به نام خداوند جان و خرد

جزوه جلسه دوم باکتری عملی **زهراحامدی**

ابزار های مورد نیاز در آزمایشگاه میکروب شناسی:

1) وسایل برداشت نمونه: ابتدا قلم مو هایی داریم که از یک میله و یک حلقه انتهایی تشکیل شده است که به آن آنس یا لوو میگویند. آنس های میکروب شناسی استاندارد هستند یعنی وقتی از آنس استفاده میکنیم حلقه انتهایی باید بتواند یک عدد حجم خاصی را بتواند جابه جا کند معمولا انسهایی که در این آزمایشگاه استفاده میکنیم 0.01است ولی میتواند آنس 0.05 یا 0.001 هم باشد(پس مثلا اگر در جلسات آتی گفته شد از آنس استاندارد برای کشت ادرار استفاده کنید باید از آنس 0.01 استفاده کرد.) حال برای کالیبره کردن آنس و اطمینان از کارکرد آن باید ابتدا آنس را روی شعله به طور کامل گداخته کنیم تا عاری از هر گونه باکتری احتمالی شود بعد آنس را زیر آب میگیریم تا کالیبره شود (اگر آنس درست کار کند قطره را در خود نگه میدارد ولی اگر درست کار نکند قطره میپرد برای کالیبر کردن آنس در این حالت با دست از روی سطح آن فشار جزیی به آن وارد میکنیم.) آنس های این بخش 2 صورت است:

الف- آنس استاندارد: برای کشت های معمولی از آن استفاده میشود. ب- آنس میله ای یا سوزنی: برای کشت های عمقی از آنها استفاده میشود.

پس به طور کلی برای جابه جا کردن باکتری از محیط کشت از آنس استفاده میشود ولی همیشه از محیط کشت باکتری برنمیداریم گاهی مریض هایی مراجعه میکنند که مجبوریم از ترشحات گلویشان نمونه بگیریم در این حالت دیگر نمیتوان آنس را گداخته کرد و نمونه را از حلق مریض گرفت در این صورت برای برداشت از ضایعات و بیمار از وسیله دیگری به نام سوآپ استفاده میکنیم.

سوآپ: یک چوب بلندی است شبیه گوش پاک کن علت بلندی این چوب ها این است که در هنگام برداشت نمونه از حلق بیمار دستمان در دهان مریض نرود. برای استریل کردن این این سوآپ ها8-7 عدد از آنها را درون یک لوله آزمایش قرار میدهیم و در آن را با پنبه میبندیم تا علاوه بر سر آن بیرون سوآپ ها هم آلودگی نداشته باشد برای استریلزاسیون آنها را اگر در اتوکلاو قرار دهیم ایجاد رطوبت میکند و بهتر است این سوآپ ها خشک باشند چون اگر برداشت از واژن یا گلو انجام شود خود گلو یا واژن رطوبت دارد و بهتر است ما رطوبتی اضافه نکنیم اما اگر بخواهیم از یک زخم بسته نمونه برداشت کنیم که خشک است بهتر است سوآپ را با سرم فیزیولوژی استریل مرطوب کنیم.حال در ادامه بعد از قرار دادن سوآپ ها در لوله آزمایش آنها را در فر با دمای 180 درجه به مدت 45 دقیقه آنها را استریل میکنیم(توجه: وقتی 45 دقیقه را در نظر میگیریم که ترمومتر دستگاه 180 در جه را نشان داده باشد چون مدتی طول میکشد تا دستگاه به دمای مورد نظر برسد و بعد باید زمان بگیریم) همچنین توصیه میشود که در زمان استریلیزاسیون چسب های استاندارد که استریلیزاسیون را با نوارهایی که بر روی آن است اثبات میکند را هم بر روی لوله ها بزنید چون ممکن است مثلا در حین این 45 دقیقه برق قطع شده باشد . انتهای این سوآپ ها پنبه 100٪ کتان (تا الیاف آن برای بیمار ایجاد حساسیت نکند) قرار دارد.

حال فرض کنید بیمار احتمال مننژیت دارد و میخواهیم مایع مغزی نخاعی از فرد بگیریم که باید یک حجم بسیار کمی برداشت کرد که در این صورت اگر با سوآپ برداشت کنیم همه مایع را میکشد و اگر آنس گداخته را بزنیم مایع را گرم میکند و همه باکتری ها را از بین میبرد در این حالت باید از پیپت پاستور استریل استفاده کرد برای استریل کردن آنها یک طرف(لوله مویین) را با دما و طرف دیگر را با پنبه میبندیم ودر لوله آزمایش میگذاریم و با دمای 180 در زمان 45 دقیقه آنها را استریل میکنیم. بعد از استریلیزاسیون این پیپت پاستور را در لوله آزمایش حاوی نمونه میبریم و با یک حرکت سر پیپت میشکند بعد با پوآر مایع را میکشیم و با همان نیم قطره برداشت شده آزمایشات را انجام میدهیم!

2)وسایل شیشه ای: کلیه وسایل شیشه ای مثل ارلن - پیپت-پیپت مدرج و.... خودش نباید میکروب داشته باشد برای عاری از میکروب کردن از فور استفاده میکنیم(با همان زمان)

حال برای به دست آوردن باکتری نیاز به محیط کشت داریم. محیط های کشت به 2 دسته مایع یا جامد تقسیم میشوند اگر روی پودر محیط کشتی آگار(از یک جلبک دریایی آگار آگار گرفته میشود یا آگاروز هم گفته میشود) نوشته باشد محیط جامد است ولی اگر محیطی مایع باشد روی پودر های آن براس نوشته شده است.

محیط آگار مانند ژله است تا وقتی گرم است مایع میباشد وقتی سرد میشود شکل ظرفی که به آن میدهیم را به خود میگیرد.پس میتوان این محیط های کشت را درplate تهیه کرد که به آن پتری دیش هم میگویند که سرپوش دارد تا از ورود هوا به آنها جلوگیری کرد. برای ایجاد این محیط آگار 50 گرم از پودر را باید در 1لیتر آب حل کنیم پس برای برداشت 50 گرم باید از یک ترازوی حساس (مثلا با دقت 0.01 گرم)استفاده کنیم بعد از توزین این مقدار را درون ارلن میریزیم و بعد 1 لیتر آب مقطر 2 بار تقطیر درون آن میریزیم(به این دلیل از آب شیر استفاده نمیکنیم چون کلر آب سبب میشود که دیگر PH ای که ایجاد میشود مثل phتایید شده نباشد) بعد آگار مانند ژله در آب حل نمیشود باید کمی حرارت دهیم تا حل شود در مرحله بعد باید محیط کشت را استریل کرد برای استریل کردن محیط های کشت آنها را در اتوکلاو با دمای 121 درجه در فشار 15 اتمسفر و 15 دقیقه قرار میدهیم چون اتوکلاو با فشار استریل میکند حجم آبی ما تغییر نمیکند. بعد از درآوردن محیط ها از اتوکلاو کمی صبر میکنیم تا خنک شود(چون plate ها از جنس پلاستیک است). قبل از این کار plateها را هم با اشعه گاما استریل میکنیم.بعد از اینها محیط کشت را درون پلیت میریزیم(پلیت ها را باید طوری روی میز قرار دهیم تا درب آن زیر قرار گیرد تا بخار آب روی در به محیط برنگردد و حجم را عوض نکند و همچنین وزن محیط کشت به در فشار آورد تا هوا به راحتی در زیر آن جریان نیابد)

همچنین میتوان محیط کشت جامد را درون لوله هم ریخت که وقتی در لوله است 2 حالت دارد:1) اسلند : وقتی در ابتدا محیط مایع است لوله کج و شیب دار قرار میدهیم تا به همان حالت شیبدار جامد شود 2) استوک: به طور معمول پس از ریختن محیط کشت لوله را درون جا لوله ای قرار میدهیم

- سطح تماس محیط با هوا در اسلند بیشتر است پس برای باکتری های بی هوازی بهتر است از استوک استفاده کنیم.

یک نوع محیط کشت دیگر محیط کشت دی فازیک یا جامد و مایع است که همان محیط کشت خون میباشد یک طرف این محیط جامد است و طرف دیگر مایع است.زمان کشت خون به دلیل بروسلا طولانی است. عامل مهم تب مالت بروسلا است

بروسلا دیر رشد است و اگر در محیط های کشت معمولی در اتوپ 37 درجه بگذاریم خشک میشود و رشد نمیکند پس باید کاری کنیم که سطح محیط مرطوب باشد تا بعد از 8 روز زنده بماند پس از محیط دی فازیک استفاده میکنیم.

بعد از محیط کشت دومین عامل برای رشد باکتری هوا است حال اگر باکتری هوازی باشد پلیت را در گرم خانه یا اتوو در دمای 37 درجه(دمای بدن) میگذاریم ولی اگر باکتری بی هوازی باشد از جار بی هوازی استفاده میکنیم که مانند زودپز است.برای کشت باکتری درون این جار یک کاغذی به نام گاز پک را خیس میکنیم و روی پلیت میگذاریم و در جار را محکم میبندیم این گاز پک سبب میشود که که مواد احیا کننده اکسیژن که روی آن قرار دارند با رطوبت فعال شوند و اکسیژن را کاملا به خود جذب کرده و شرایط بی هوازی را برای پلیت ایجاد میکنند.

اگر فردی با شک به سوزاک مراجعه کند برای اطمینان باید ترشحات این فرد را کشت داد دراین صورت نیاز به 10-5درصد co2 داریم برای این کار دیگر نیازی نیست از جار بیهوازی استفاده کرد به جای آن از دسیکاتور استفاده میشود.دسیکاتور با شمع کار میکند بعد از روشن کردن شمع پلیت را روی آن میگذاریم در آن را میبندیم در این صورت شمع تا وقتی روشن است اکسیژن مصرف میکند بعد از خاموشی 10-5 درصد co2 تولید شده است(باکتری مولد سوزاک یا gonorrhea برای سیکل رشدی خود نیاز به co2 دارد)

اتوو هوازی: به یک سیلندر co2وصل است چون میتواند میزان co2 را تایید کند و میزان ورودی co2را کنترل میکند که با وجود این دستگاه برای کارهای بیهوازی نیازی به دسیکاتور نیست ولی ما در آزمایشگاههای آموزشی نداریم!

بعد از رشد باکتری آن را با روش های مختلف مثل گرم رنگ میکنیم بعد از آن با عدسی 100 باکتری را میبینیم.