



Microbiology

Subject :

Lec no : 7

Done By : Tabark Aldaboubi

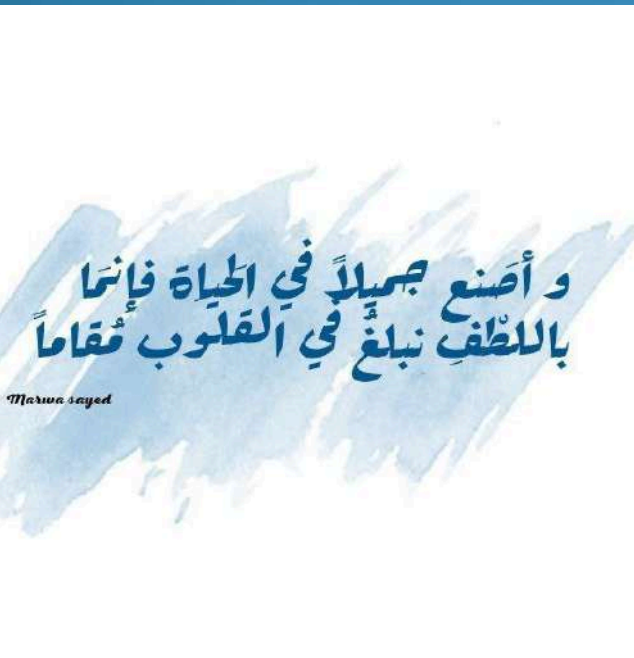
وقل رب زدني علماً

6. Diagnosis of Microbial Growth

Faculty of Medicine

Hashemite University

Dr Mohammad Al-Tamimi, MD, PhD



Objectives

- Understand principals of culture and direct observation in microbiology
- Understand the main Immunological assay used in microbiology and describe antigen and antibody interaction
الفحوصات المناعية
- Understand DNA structure and function, and describe the main genetic and molecular assay used in Microbiology
← الفحوصات المناعية التي تعتمد على وجود الاجسام المناعية
- Describe the main Biochemical assay used in Microbiology

كيف يتم تشخيص المريض :

□ اول استئد المريض بروح على الطبيب يكون عنده
بعض الSymptoms : Fever , vomiting , swelling , redness

□ الطبيب رح يجل examination و سوف بعض ال Signs
(علامات المرض الطيبة)

بفعل الفحص ← نتأكد من فطومات او الاعراض
الذ ذكرها المريض / نكشف اعراض ما ذكرها
المريض

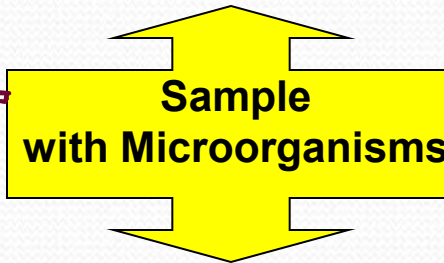
□ جلب فحوصات حتى نتأكد من مسبب المرض (Laboratory diagnoses)

Laboratory techniques in Microbiology

- Microscopy → اشوف العينة بالميكروسكوب
- Culture – **Gold standard** → اهم فحوصات
- Immunological assays فحوصات مناعية
- Molecular assays فحوصات الهاملافة بـ DNA مثل PCR
- Biochemical assays

Testing Methods in Microbiology

Culture-dependent techniques



عينة المريض
تختلف من فردا لمرضنا ومن
مريضنا لآخر

Culture-independent techniques

Direct Observation

Biochemical

Immunological
Methods

Nucleic Acid-Based
(molecular methods)

امثلة

→ هالجزء من الفحوصات
مهم جدًا

1. Direct Observation

نضع عينة المريض تحت المجهر
ولشوف ستوفيه Microorganism

هل هما تنتين سوا في مجموعة وهكذا مثلا احد
diplococci
staphylococci

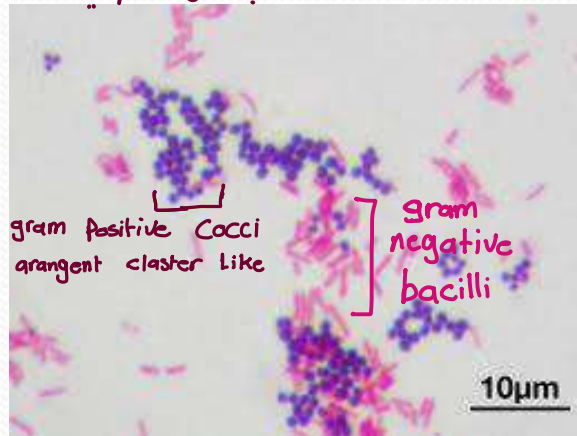
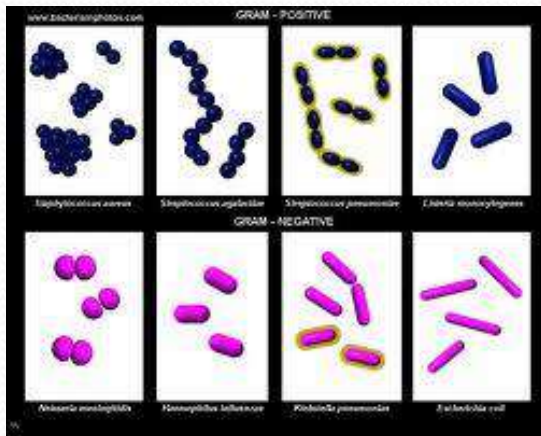
bacilli cocci spiral

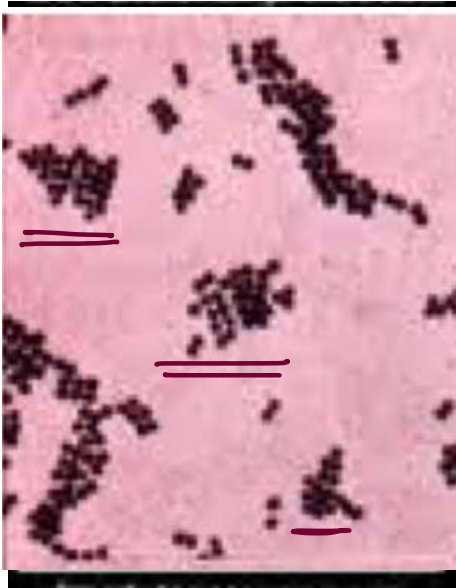
Using light microscope to visualize bacterial shape and arrangement
اعرف حجم وشكل البكتيريا بالتالي احد نوعها

Using special stains to differentiates bacteria like gram stain and acid fast stain
احدد نوع البكتيريا هل هي gram positive or negative

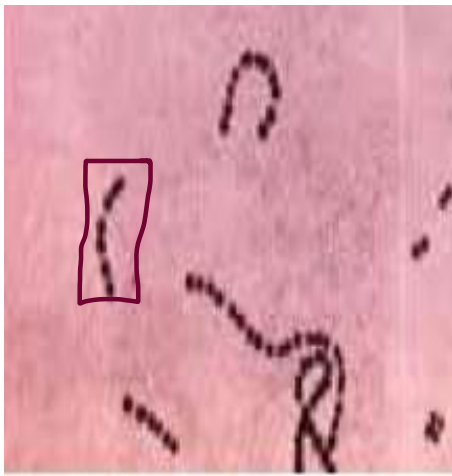
Quick and informative yet not definitive
← مصفحة لأنواع تفوق بالتشخيص وعرضة المريض

advantage → اميز نوعها، شكلها، سرعتها وسهولة وغير مكلفة
disadvantage → بقدرش اعطي species





Gram positive cocci arranged in clusters most like Staphylococci

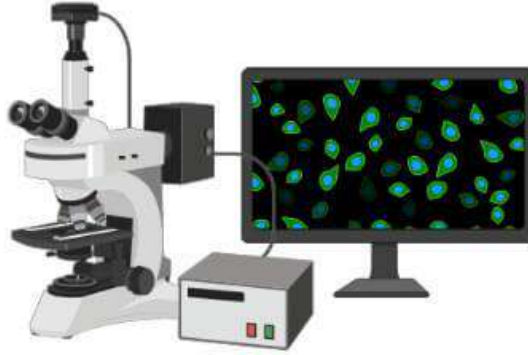


→ Gram positive cocci arranged in chain like streptococci

Type of Microscope



المجهر استخدام
Light Microscope
تم مرة بغير العينة ← 100



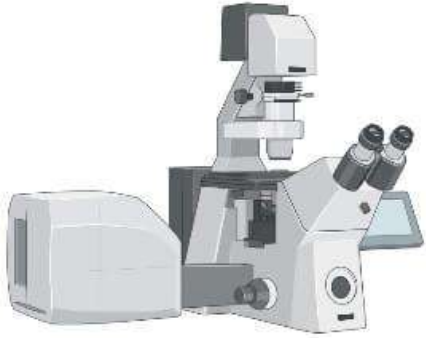
Fluorescence Microscope



Electron Microscope
اقل درجة تكبير 1000



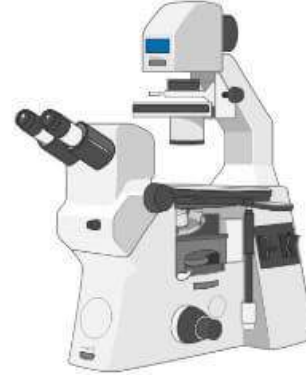
Stereo Microscope



Confocal Microscope



Atomic Force Microscope



Inverted Microscope



Retinal Imaging
Microscope

* كل نوع له خصائصه ووظائف محددة

2. Culture زرارة البكتيريا حتى اعرف فيه growth ولا هالاشن بفرق بالتشخيص

- Culture: Microbes growing in/on culture medium
- Culture Medium: Nutrients prepared for microbial growth ← بجيب Medium فيها المواد الي بتحتاجها البكتيريا للنمو ويجرطها باوساط ملائمة منا حيث الحرارة وال pH والاكسجين بستنس منا (٢٤ - ٤٨ ساعة) حتى اشوف النمو تاعها.
- Agar: Complex polysaccharide used as solidifying agent for culture media in Petri plates, slants, and deeps فقر ال tube → tube
- Agar is not metabolized by microbes, liquefies at 100°C and solidifies ~40°C ← فيه تخيمات سكريات كبيرة ، عند درجة الغليان هاي ال Agar يكون شكلها سائل عند درجة حرارة الغرفة بترجع solid كتشبيه للـ Agar (الحليب)

Types of Media

- Media can be classified on three primary levels

1. Physical State

- Liquid Media
- Semisolid → اذا بدى لعرف البكتيريا عندها Flagella تستخدم هالوسم ← نصف صلب
- Solid (Can be converted into a liquid) * * مثل Agar
- Solid (Cannot be converted into a liquid)

اكتر اشيا مستخدم

2. Chemical Composition

- Synthetic – exact formula → مصنعة (امنا بنضيف المواد) بكميات محددة
- Non synthetic or complex - No exact formula → فيها المواد الي ذكردها فوق بس

الشغل الكيمياء ← كاربون ، نيتروجين ، اجمان ، سكريات ، ماء الي بقدر اضيفها للوسط

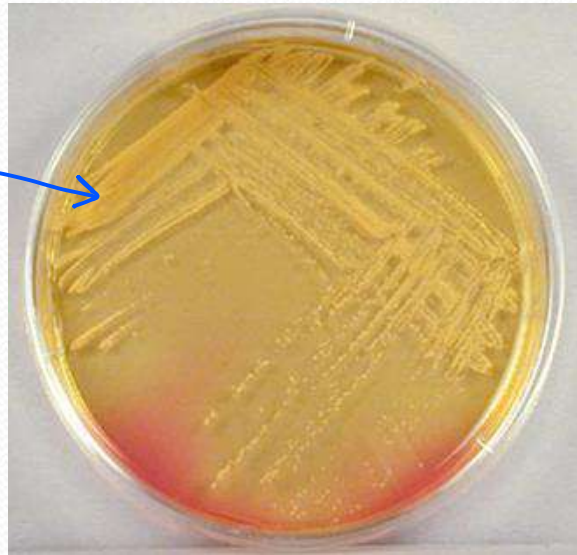
3. Functional Type

- General → جعل growth لعدد كبير من البكتيريا وخصوصا بالبداية
- Selective → جعل growth لنوع معين من البكتيريا يساعد على معرفة ال Specise عند طريق انه احطها بيبيطة مناسبة لانواع بكتيريا ومش مناسبة لاخرى.

نوع ال Agar
blood بيبيطة ملائمة
لبكتيريا وفيها كل اشيا بحتاجه البكتيريا للنمو
ولكن الكميات غير محددة
كم كمية السكر ، النيتروجين ؟ حش وعروف

Bacterial Colonies on Solid Media

نوع بكتيريا



MSA

Positive growth

وعناها نقت البكتيريا

كل بكتيريا الصافو
وتجول مستجرامت غير عندنا
البكتيريا الثانية عشان
اعيز ال species

→ ابيضنا ، كبيرة
غير منتظمة

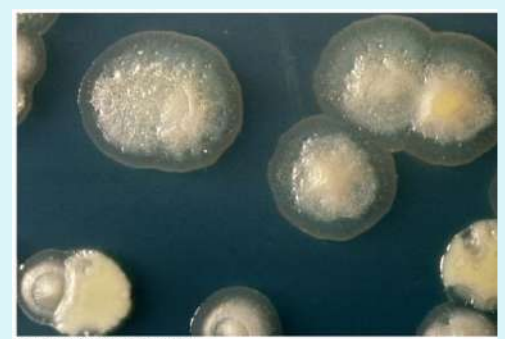


Figure 5-2c Brock Biology of Microorganisms 11/e

→ احمر ، صغيرة

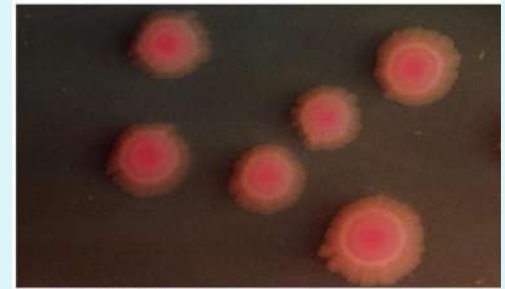


Figure 5-2d Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

**Blood
agar**

Positive growth



→ احمر ، صغيرة
Smooth سطحها



Figure 5-2b Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

المبور خارجية
للتوضيح

سطح الـ Agar فعل زعي فاهو ماتقير

وما نمته بكتيريا فغند هالحمكيد ؟
→

اما في خطأ بزراية العينة او حطيتها بظروف مش ملائمة.

او فاني بكتيريا بالعينة



← كلام الدكتور عند الـ Culture رح اكلوا هون

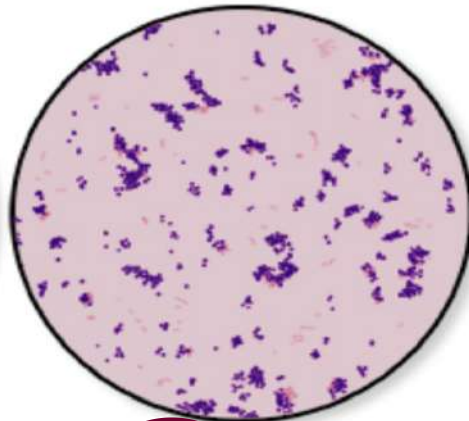


بتعطيني Colonies (مستقرات) واربع اخذهم واشوفهم تحت المجهر → advantages
ايز شكل البكتيريا ، استخدم مضاد حيوي بعد ما زرعنا وبتوف هل هو فعال ام لا .

بتحتاج وقت طويل لتنمو البكتيريا → disadvantages



Gram-negative



Gram-positive

3. Immunologic Methods

- Any assay that relies on the characterization of antigen and/or antibody reaction
- Antibodies can reveal the history of a patient's contact with microorganisms or other antigens
- Serology: the branch of immunology that traditionally deals with *in vitro* diagnostic testing of the serum

بدل ما ازرع عينات واشوف فيه بكتيريا وهيكل بقدر اخذ عينة دم واعملها فحص واشوف فيها اجسام مضادة ولا لا طيب شو بدني استفيد؟ احنا جهاز المناعة بجسمنا اذا دخل عليه مادة غريبة ان كانت بكتيريا او فيروسات او اي مادة رح يصير بيني اجسام مضادة للدفاع معناها اذا كان بعينة الدم جسم مضاد بعرف انه في بكتيريا بالجسم اذا في جسم مضاد لل staph aureus بعرف انه في بكتيريا ال staph aureus لو عندي اجسام مضادة لل HIV بعرف انه عنده فيروس ال HIV وهكذا

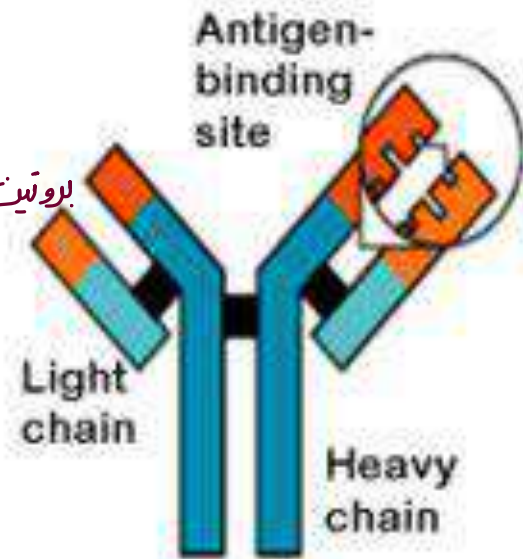
اي جسم غريب

- Antigen: any “thing”, foreign to the immune system. e.g. bacteria, viruses, (or their parts), pollen, etc

العواد الي يتحول حساسية

- Antibody: proteins produced by the immune system *بروتينات بيكونه الجسم استجابة لـ Antigen* which help defend against antigens

- Antigen/antibody interaction



Variable region

↓ متغير مع يتغير على حسب شكل الـ Antigen

Constant region

↓ جزء ثابت

Visualizing Antigen-Antibody Interactions

Antigen- antibody interaction occurs at molecular level and can not be seen directly

To visualize antigen-antibody interaction multiple strategies can be applied:

1. **Agglutination** → تخثر الدم

2. Precipitation

3. Immunodiffusion

4. Complement fixation

5. Fluorescent antibody tests

6. Other Immunoassay tests

X

Agglutination Test

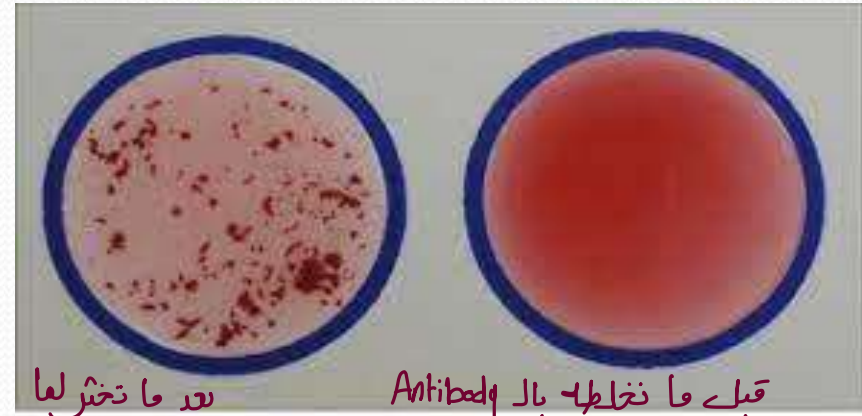
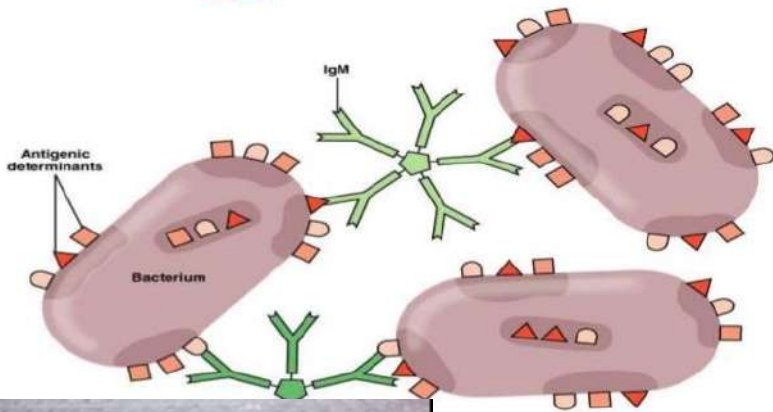
- Agglutination: antigens are whole cells such as red blood cells or bacteria with determinant groups on the surface
- Antibodies cross-link the antigens to form visible clumps
تربط بين الخلايا وتكون جلطة (تخثر) واضحة للعين المجردة
- Performed routinely to determine ABO and Rh blood types
احد افضلها معرفة زمر الدم
- Widal test: tube agglutination test for diagnosing salmonella and undulant fever
تشخيصي
نتم بهاي الطريقة
- Latex agglutination tests: tiny latex beads with antigens affixed

Advantegase → راجع لنوع البكتيريا كونه الـ Antibody خاص لنوع معين، سريعة

disadvantegase → Antibody راجع افضل اجراد الـ Antibody كونه راجع افضل اجراد الـ Antibody

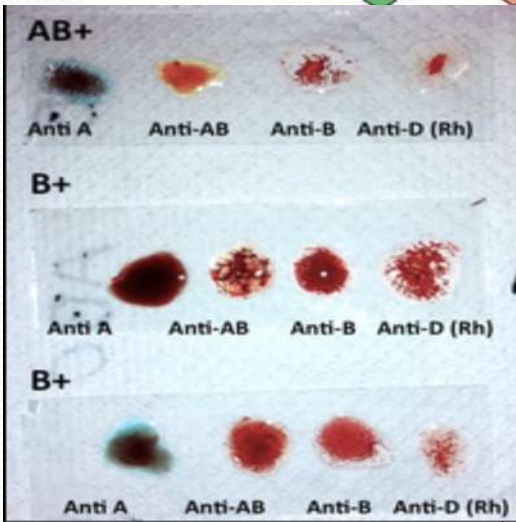
لا حساب المصادفة بتناول الجسم بعض ممكن المريض يكون طاب
ويضلل بعض positive بالتحص

Agglutination Test

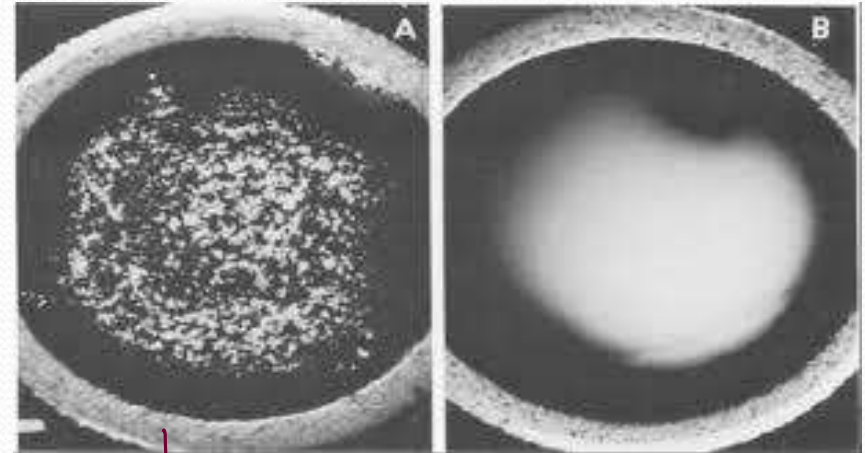


بعد ما تختبر لما
+ صفتت عليه Antibody

قبل ما نخلطه بال Antibody



فحص زمر
الدم ابي عينه
بتختبر فيها الدم
لما احط ال Anti
عليه تكون هاي الزمرة
الصورة للتوضيح



في تختبر (تخلطت)
معناها نية Antibody

negative
ما في تختبر
اذا ما في Antibody

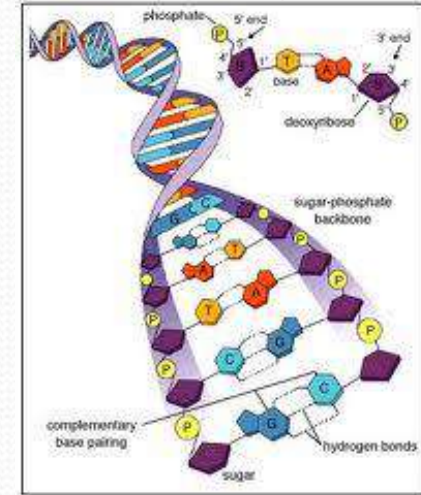
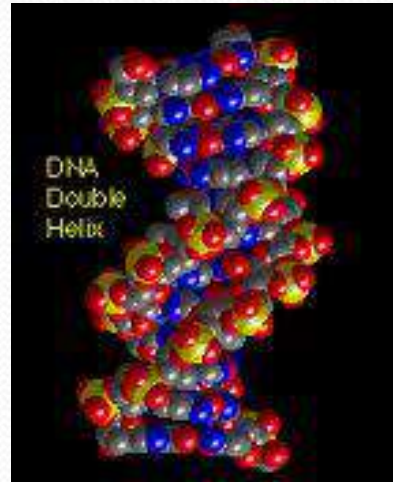
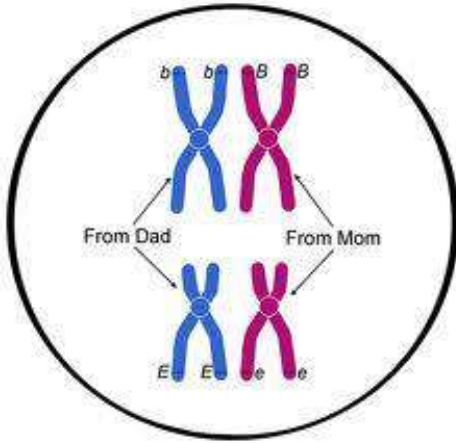
4. Molecular Methods

استوف ال DNA عطول وانقرن
على ال Species منحللها

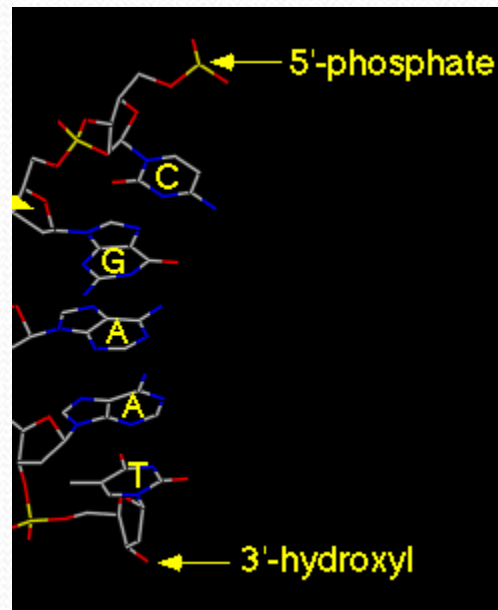
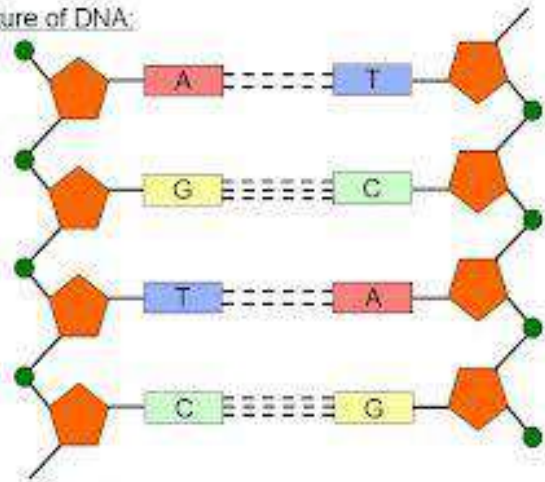
- Every organism contain unique species specific DNA sequence (NUCLEIC ACID) that differentiate it from other organisms
- DNA carry all the inherited characteristics of each organism
- Molecular methods make the species specific DNA visible

DNA Structure

كل Species لها ترتيب معين بال DNA بقدر
 احسن النوع من حلالها .



Structure of DNA:



DNA is formed by
 4 nucleotides

A is for adenine

G is for guanine

C is for cytosine

T is for thymine

Molecular Methods

- **Polymerase chain reaction (PCR)**

- DNA hybridization
 - Nucleic acid sequence analysis
 - Plasmid fingerprinting.
- X

Polymerase Chain Reaction (PCR)

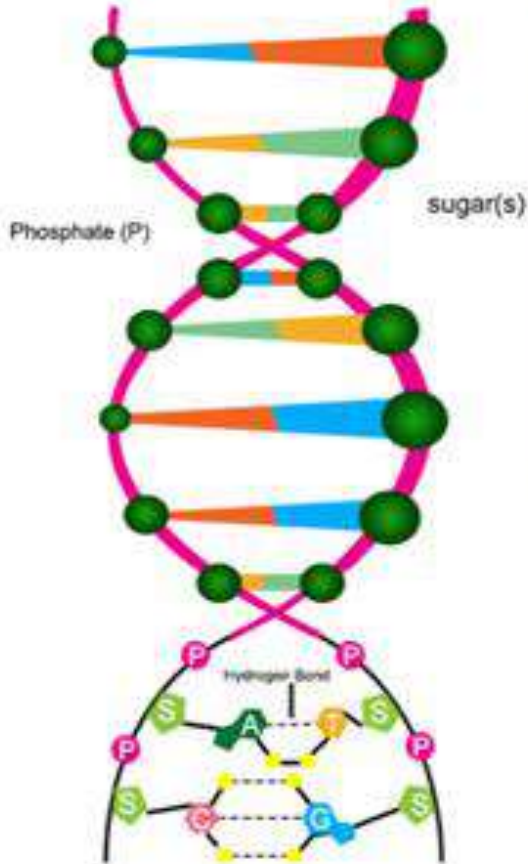
- PCR is widely used for the identification of microorganisms.
- Sequence specific primers are used with PCR in the amplification of DNA or RNA of specific pathogens.
- PCR allows for the detection even if only a few cells are present and can also be used on viable nonculturables
- The presence of the appropriate amplified PCR product confirms the presence of the organisms

Advantage → دقيقة جدًا ، سريعة

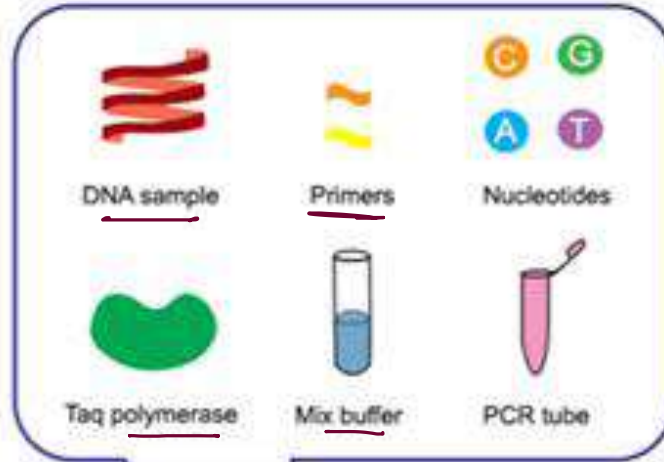
disadvantage → Primar اذا ما كان عندي شك ب species وعدد بصير صعبه كونه رح افضل اجرب ال

تأخ كل الفيروسات

The structure of DNA



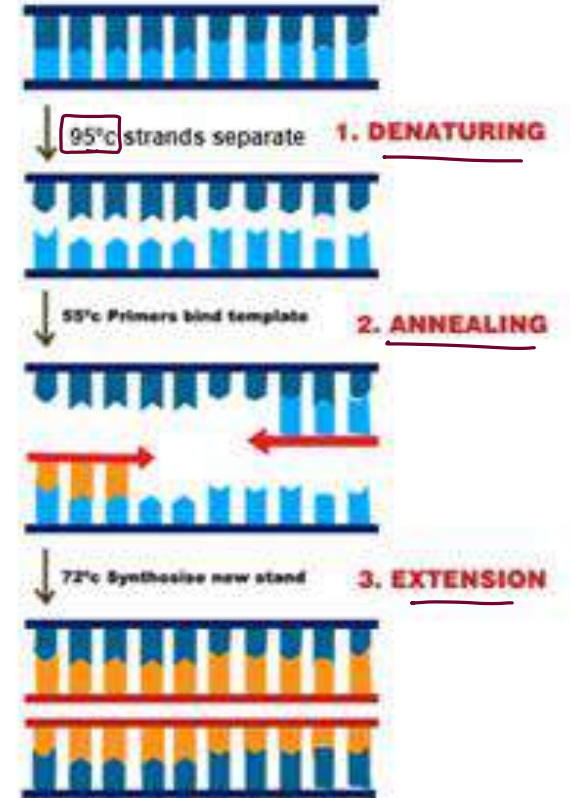
PCR Components



Thermal Cycler



PCR Process (ONE Cycle)



اسم الجهاز

بخط عينة المريض فيه

٣] برجع برفع الحرارة مرة ثانية وبنفصل و يرجع بقراءة ونكمله ونهيك بضمك العدد ونجعل عدد صيرنا ال DNA

٤] ننزل

درجة الحرارة

بيجين ال polymerase

بقراءة ال strand

ونكمله...

١] برفع درجة

الحرارة رح

ينفصلوا الى

2 Strands

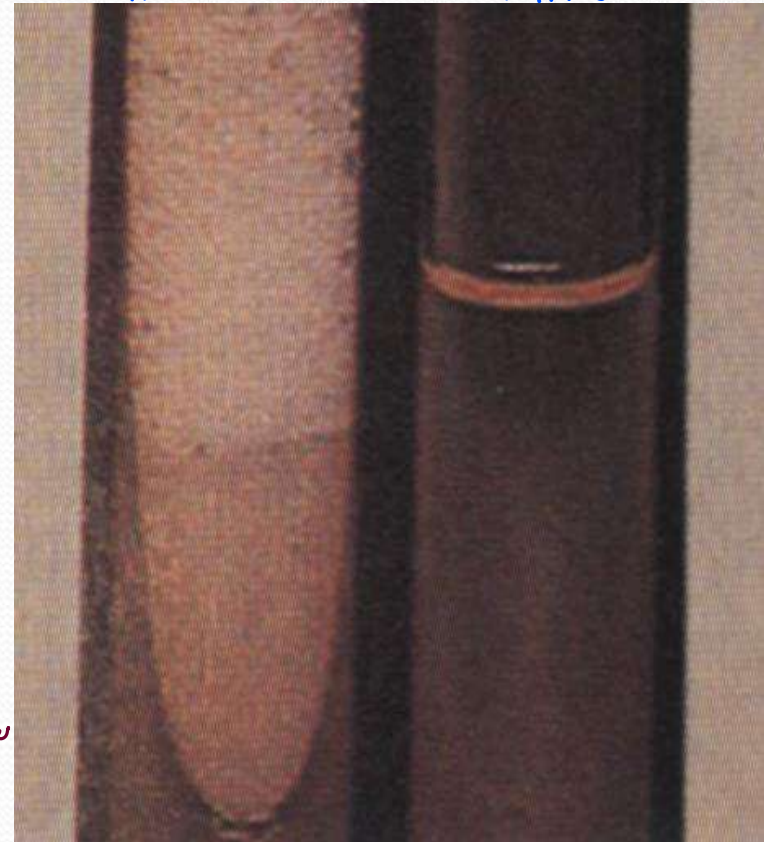
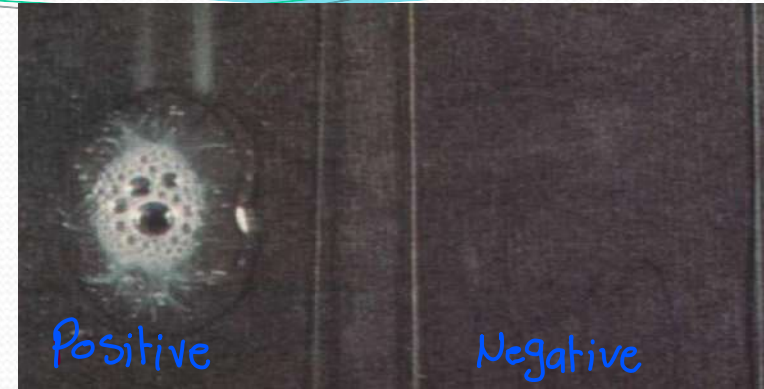
5. Biochemical Tests

كل بكتيريا عند مجموعة التزيمات تختلف
عند غيرها مثال
catalase
test

- The microbe is cultured in a media with a special substrate and tested for an end product
- Prominent biochemical tests include carbohydrate fermentation, acid or gas production and the hydrolysis of gelatin or starch
- Many of these test used in rapid system for quik detection of certain infection called Rapid test

Catalase Test

- This test is used to identify organisms that produce the enzyme, catalase
- This enzyme detoxifies hydrogen peroxide by breaking it down into water and oxygen gas
- Place a drop of H_2O_2 on the culture. A positive reaction show gas bubbles



سباعد عال استخداام تحول ال $(H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2)$
بحيية عينة المريضة وبصنيف الها H_2O_2 ال Catalase بحولها الى $(H_2O + O_2)$
بتصير العينة وطلع فقاعات دليل على انه هان الكثير Catalase Positive

Thank you....

