آزمایشگاه مرجع سلامت	راهنمای انجام آزمایش	صفحه 1 از 1
	محیط **Bile Esculin Agar**	

۱- هدف:

بایل اسکولین آگار جهت افتراق استرپتوکوک های گروه D از استرپتوکوک های غیر گروه D به کار می رود.

۲- اساس آزمایش:

استرپتوکوک های گروه D (شامل انتروکوک ها) گلیکوزید اسکولین را به اسکولتین و دکستروز تجزیه می کنند. اسکولتین (Esculetin) با نمک آهن به شکل کمپلکس قهوه ای تیره یا سیاه واکنش می دهد. سیترات فریک به عنوان معرف (اندیکاتور) تجزیه اسکولین و تشکیل اسکولتین، به داخل محیط افزوده می شود. Oxgall (صفرای گاوی) نیز رشد باکتری های گرم مثبت به جز انتروکوک ها را مهار کند.

نکته: حدود ۳۰٪ از استرپتوکوک های ویریدنس بایل اسکولین مثبت هستند.

۳- نمونه اولیه:

کلنی های ایزوله شده روی بلاد آگار

٤- مواد و ابزار مورد نیاز:

محیط کشت بایل اسکولین آگار تهیه شده در پلیت یا در لوله بصورت شیب دار

۵- روش انجام کار:

محیط کشت را با دو یا سه کلنی تلقیح کنید (اگر محیط کشت در لوله تهیه شده، باید سطح و عمق را تلقیح نمایید) و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای $35 \pm 2^{\circ} C$ ، در شرایط هوازی یا اتمسفر محتوی دی اکسید کربن، انکوبه نمایید (بعضی از سویه ها به انکوباسیون بیشتری، نهایتاً ۴۸ ساعت، نیاز دارند). سیاه شدن محیط دلالت بر مثبت بودن نتیجه آزمایش دارد.

نتیجه مثبت اغلب در طی ۴ ساعت ظاهر می شود. اما در نهایت همه استرپتوکوک های گروه D در طی ۴۸ ساعت، مثبت خواهند شد.

٦- برنامه کنترل کیفی (QC):

Streptococcus faecalis ATCC 29212**:** رشد می کند و اطراف کلونی ها سیاه می شود (کنترل مثبت)

Streptococcus pyogenes ATCC 19615**:** رشد بطور جزئی تا کامل مهار می شود (کنترل منفی)

Streptococcus viridans, not group D: فاقد رشد، عدم تغییر رنگ محیط کشت (کنترل منفی)

۷- تداخلات:

توجه نمایید که محیط بایل اسکولین آگار، حاوی ۴۰٪ بایل باشد. محیط کشت ساخت بعضی از سازندگان، حاوی مقدار کمتری صفرا می باشد، در نتیجه باعث اشتباه در تشخیص بعضی از استرپتوکوک های ویریدنس به عنوان استرپتوکوک گروه D یا انتروکوک می شود.

آزمایشگاه مرجع سلامت	راهنمای انجام آزمایش	صفحه 1 از 1
	تست CAMP	

۱- هدف:

شناسایی و افتراق استرپتوکوک گروه B (آگالاکتیه) از سایر استرپتوکوکها

۲- اساس آزمایش:

استرپتوکوک گروه B پروتئین خارج سلولی به نام CAMP factor ترشح می نماید که با بتا لیزین استافیلوکوک اورئوس بصورت سینرژیک عمل نموده و سبب افزایش لیز گلبول های قرمز خون می شود.

- حساسیت این تست بسیار بالا است و حتی سویه های بدون همولیز استرپتوکوک گروه B (در۱۱ ٪ موارد)، CAMP مثبت می باشند.

۳- نمونه اولیه:

- کشت تازه میکروبی (۲۴-۱۸ ساعته)

٤- مواد و ابزار لازم:

- پلیت بلاد آگار حاوی ۵٪ خون گوسفند
- استافیلوکوک اورئوس بتا همولیتیک ATCC (25923) یا استاف اورئوس بتا همولیتیک جدا شده از بیمار

۵- روش انجام کار:

- ابتدا در وسط پلیت بلادآگار یک خط مستقیم از استافیلوکوک اورئوس مولد بتا لیزین راکشت می دهیم.
- سپس استرپتوکوک مورد نظر را عمود بر خط کشت استافیلوکوک اورئوس کشت داده بطوریکه این دو با هم برخورد و تداخل نکنند (می توان چند میکروار گانیسم را به فاصله ۴-۳ میلی متر کشت داد).
- پلیت را به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در اتوو 35^0 C در حضور O_2 انکوبه می نماییم.
- مشاهده همولیز بتا، شبیه نوک فلش، در محلی که دو سویه استافیلوکوک اورئوس و سویه مشکوک به هم نزدیک می شوند، نشان دهنده تشدید همولیز بتا و تست CAMP مثبت است.

٦- تداخلات:

اگر پلیت تست در کندل جار یا اتو CO_2 و یا در شرایط بی هوازی انکوبه شود بعضی از استرپتوکوک های گروه A ایجاد واکنش CAMP مثبت می کنند، بنابراین پلیت تست، باید حتماً در حضور O_2 اتوو گذاری شود.

۷- برنامه QC:

سویه کنترل مثبت: *استرپتوکوک* گروه B

سویه کنترل منفی: *استرپتوکوک* گروه A و *استرپتوکوک بوویس*

آزمایشگاه مرجع سلامت	راهنمای انجام آزمایش مصرف سیترات توسط باکتری ها	صفحه 1 از 1

۱- هدف:

شناسایی و افتراق اعضای خانواده انتروباکتریاسه

۲- اساس آزمایش:

سدیم سیترات، نمک اسید سیتریک و یک ترکیب آلی است که در سیکل کربن متابولیزه شده و می تواند منبع کربن محسوب شود.

برخی از ارگانیسم ها می توانند انرژی مورد نیاز خود را با استفاده از سدیم سیترات به عنوان تنها منبع کربن و از نمک های آمونیوم غیر ارگانیک به عنوان تنها منبع نیتروژن بدست آورند.

توجه شود که هر محیطی که برای تعیین استفاده از سیترات به کار می رود، باید فاقد پروتئین و کربوهیدرات به عنوان منابع دیگر کربن باشد.

۳- مواد و معرفها:

- کشت تازه میکروبی (کشت خالص ۲۴-۱۸ ساعته از ارگانیسم مورد نظر)
- محیط سیمون سیترات آگار Simmons Citrate agar که حاوی نمک ها،کاتیون ها، بافرهای سیترات و بروم تیمول آبی به عنوان اندیکاتور است، می تواند در pH قلیایی (بالاتر از 7.6) و در جریان تولید ترکیبات قلیایی (ترکیبات آمونیوم) حاصل از مصرف سیترات تولید رنگ آبی در محیط نماید.

٤- روش انجام کار:

مقدار خیلی کم از ارگانیسم مورد نظر (۲-۱ کلنی ایزوله) را در سطح آگار شیب دار سیمون سیترات تلقیح نمایید. فرو بردن سوزن مخصوص کشت، به ته لوله جهت کشت لازم نمی باشد.

سپس ۴۸-۲۴ ساعت (حد اکثر ۷ روز) لوله را در 35^0C - $37\ ^0C$ انکوبه نمایید.

ایجاد رنگ آبی نشان دهنده واکنش مثبت است. گاهی ممکن است تغییر رنگ در محیط دیده نشود اما در مسیر خط کشت باکتری، رشد دیده شود که این حالت نیز مثبت در نظر گرفته می شود. بهتر است در این شرایط مجدداً با مقادیر کم باکتری، آزمایش را تکرار نمایید.

۵- تداخلات:

مقدار تلقیح باکتری باید به میزان خیلی کم باشد زیرا در غیر این صورت ترکیبات آلی موجود در دیواره باکتری های در حال تخریب، کربن و نیتروژن زیادی آزاد کرده و می توانند واکنش مثبت کاذب حاصل نمایند.

٦- برنامه کنترل کیفی داخلی:

سویه کنترل مثبت: *انتروباکتر آئروژینوزا*

سویه کنترل منفی: *E. coli* ATCC 25922

آزمایشگاه مرجع سلامت	**راهنمای انجام آزمایش** **محیط** **DNase Test Agar**	صفحه 1 از 2

۱- هدف:

این محیط کشت در ارزیابی فعالیت دزوکسی ریبونوکلئاز (DNase) باکتری ها و قارچ ها و خصوصاً به عنوان کمک در تشخیص استافیلوکوک های بیماریزا بکار می رود.

DNase Test Agar with Toluidine Blue برای کمک در تفکیک و تشخیص گونه سراشیای بدون پیگمان که ممکن است به اشتباه بعنوان گونه انتروباکتر و کلبسیلا تشخیص داده شوند، به کار می رود.

۲- اساس آزمایش:

اگر استافیلوکوک آنزیم DNase داشته باشد این آنزیم، اسیدنوکلئیک را هیدرولیز می نماید که با استفاده از معرف و ایجاد هاله شفاف در اطراف محل رشد باکتری می توان به این موضوع پی برد.

ویژگی های آزمایش:

حساسیت: ۹۹٪ استافیلوکوک های کواگولاز مثبت، DNase مثبت نیز هستند.

اختصاصیت:۲۰٪ استافیلوکوک های کواگولاز منفی، DNase مثبت هستند.

۳- نمونه اولیه:

پلیت های LEMB Agar یا Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood حاوی ارگانیسم مورد نظر

٤- مواد و ابزار مورد نیاز:

- پلیت DNase Test Agar
- معرف اسید کلریدریک 1N (یک نرمال) یا معرف تولوئیدین بلو ۰/۱٪

توجه : پلیت های DNase Test Agar with Toluidine Blue را می توان مستقیماً بدون افزودن معرف بررسی نمود، چون خود محیط کشت حاوی ۰/۰۵ g/lit از ماده Toluidine Blue O می باشد. مقدار این ماده در محیط کشت نباید از ۰/۰۰۵ ٪ تجاوز کند چون در غلظت های بالاتر ممکن است شناسایی فعالیت DNase را مشکل سازد.

۵- روش انجام کار:

پلیت های DNase Test Agar یا DNase Agar with Toluidine Blue را با نمونه مورد نظر به صورت نقطه ای (یا خطی) تلقیح نمایید. پلیت ها را به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۲ ± ۳۵ سانتیگراد انکوبه نمایید. پس از انکوباسیون، روی پلیت های DNase Test Agar ساده، اسید کلریدریک ۱ نرمال و یا تولوئیدین بلو ۰/۱٪ بریزید به گونه ای که سطح پلیت را کاملاً بپوشاند و سپس آن را بر روی زمینه تیره قرار داده و بررسی نمایید. تلقیح باید نقطه ای باشد، چون بعضی از سویه های استافیلوکوک اورئوس به خوبی بر روی محیط، رشد نمی کنند و در نتیجه میزان رشد برای ارزیابی فعالیت DNase کافی نخواهد بود. در صورت تلقیح نقطه ای، حتی اگر در محل تلقیح، رشدی ایجاد نشود می توان فعالیت DNase را ارزیابی نمود.

- DNase Test Agar که اسید کلریدریک یک نرمال روی آن ریخته شده است:

a) مثبت: فوراً هاله های شفاف کاملاً مشخصی اطراف کلنی یا محل تلقیح را در محیط کشت احاطه می کنند.

b) منفی: اطراف کلنی ها یا محل تلقیح شفاف نمی شود.

- DNase Test Agar که تولوئیدین بلو ۰/۱٪ روی آن ریخته شده است:

a) مثبت: هاله های شفاف قرمز صورتی، اطراف کلنی یا محل تلقیح را احاطه می کنند. محیط در جایی که DNA باقی مانده باشد آبی می شود.

b) منفی: هاله های کدر قرمز صورتی اطراف کلنی یا محل تلقیح را احاطه می کنند.

- پس از انکوباسیون روی پلیت های DNase Test Agar With Toluidine Blue، معرف ریخته نمی شود و مستقیماً بررسی می گردد.

a) مثبت (+): هاله شفاف قرمز صورتی واضحی اطراف کلنی یا محل تلقیح را در یک محیط آبی (نیلی) احاطه می کند.

b) منفی (−): بدون تغییر، محیط به رنگ آبی تیره شفاف باقی می ماند.

٦- برنامه کنترل کیفی (QC):

DNase Test Agar:

Staphylococcus aureus ATCC 25923: رشد متوسط تا زیاد، احاطه شده با هاله شفاف صورتی تا قرمز (کنترل مثبت)

Staphylococcus epidermidis ATCC 12228**:** رشد متوسط تا زیاد، بدون هاله (کنترل منفی)

DNase Test Agar with Toluidine Blue:

Klebsiella pneumoniae ATCC 33495: رشد متوسط تا زیاد، بدون هاله (کنترل منفی)

Serratia marcescens ATCC 13880: رشد متوسط تا زیاد، احاطه شده با هاله صورتی شفاف (کنترل مثبت)

۷- تداخلات:

بعضی از سویه های استافیلوکوک ممکن است روی DNase Test Medium with Toluidine Blue مهار شوند.

پروتئوس ولگاریس، سودوموناس آئروژینوزا و آئروموناس، واکنش های مثبت زیادی برای تولید DNase نشان می دهند.

آزمایشگاه مرجع سلامت	راهنمای انجام آزمایش	صفحه 1 از 2
	بررسی توانائی ذوب ژلاتین توسط باکتری ها	

۱- هدف:

افتراق باکتری های مولد ژلاتیناز از سایر باکتری ها

۲- اساس آزمایش:

محیط ژلاتین یک محیط افتراقی است که جهت کشف آنزیم ژلاتیناز از طریق هیدرولیز ژلاتین بکارمی رود. ژلاتین در اصل مشتق پروتئین کلاژن حیوانی است که به محیط های مختلف افزوده می شود. ژلاتین توسط آنزیم ژلاتیناز به اسیدهای آمینه سازنده اش هیدرولیز می شود و خاصیت ژلاتینی خود را از دست می دهد.

۳- نمونه اولیه:

کشت تازه ۲۴-۱۸ ساعته

٤- مواد مورد نیاز:

محیط ژلاتین مغذی در لوله

۵- نحوه انجام کار:

- در لوله های حاوی ژلاتین باید محکم بسته شده، در حرارت $^{\circ}C$ ۸-۴ یخچال نگهداری شوند. لوله ها را درست تا زمان تلقیح در یخچال نگهداری کنید.
- برای تلقیح از کشت تازه ۲۴-۱۸ ساعته (KIA یا سایر محیط های مناسب) استفاده نمایید.
- مقدار حجیمی از کلنی مورد نظر را تا عمق ۲/۵ – ۱/۵ سانتی متری لوله فرو ببرید.
- لوله تلقیح نشده ای را به عنوان لوله کنترل در کنار لوله آزمایش قرار دهید. هر ۲ لوله را در حرارت $^{\circ}C$ ۳۵ یا در صورت رشد بهتر در $^{\circ}C$ ۲۵- ۲۲، در این دما به مدت ۱۴-۱ روز انکوبه کنید. لوله ها را تا ۲ هفته هر روز بررسی کنید مگر اینکه در زمان زودتری عمل ذوب انجام پذیرد.
- در صورت وجود علائمی از ذوب، هر ۲ لوله را به مدت ۲ ساعت در یخچال یا حمام یخ قرار دهید تا مشخص شود که آیا هضم ژلاتین صورت گرفته است یا خیر.
- روزانه لوله ها را از انکوباتور بیرون آورده و بمدت ۲ ساعت در یخچال قرار دهید. انتقال لوله ها از انکوباتور به یخچال بدون تکان دادن لوله ها انجام گیرد. گاهی مقدار اندکی هضم ژلاتین تنها در محل تلقیح باکتری ایجاد می گردد.
- ممکن است گهگاه انکوباسیون طولانی تری (۳۰ روز تا ۶ هفته) مورد نیاز باشد ولی برای آزمایشات روزانه نتیجه آزمایش (ذوب یا عدم ذوب) در پایان ۲ هفته انکوباسیون در $^{\circ}C$ ۳۵ باید گزارش گردد.

٦- کنترل کیفی:

V میکروارگانیسم های هوازی

رشد و ذوب: *پروتئوس ولگاریس* ATCC 8427

رشد و عدم ذوب: *E. coli* ATCC 25944

V میکروارگانیسم های بیهوازی

رشد و ذوب: *باکتروئید فراژیلیس* ATCC 25285

رشد و عدم ذوب: *کلستریدیوم پرفرنژنس* ATCC 12924

آزمایشگاه مرجع سلامت	راهنمای انجام آزمایش	صفحه 1 از 2
	محیط **Kligler Iron Agar**	

۱- هدف:

تفکیک اعضاء خانواده انتروباکتریاسه بر پایه توانایی در تخمیر دکستروز (گلوکز) و لاکتوز و تجزیه سولفیدها

۲- اساس آزمایش:

محیط کشت KIA، علاوه بر کازئین و پپتون های گوشت (Meat Peptones)، محتوی لاکتوز و دکستروز است که و در طی تخمیر این قندها به واسطه تغییر رنگ معرف pH (فنل رد) در پاسخ به اسید تولید شده، قادر است گونه باسیل های روده ای را تفکیک نماید. غلظت دکستروز فقط در این محیط ۱۰٪ غلظت لاکتوز است. ترکیب سیترات آمونیم فریک و تیوسولفات سدیم، شناسایی تولید سولفید هیدروژن را میسر می سازد.

توجه: به هنگام تهیه محیط کشت باید دقت شود که طول سطح شیب دار و عمق محیط کشت در لوله حدودا ۳ سانتی متر باشد.

۳- نمونه اولیه:

کشت ارگانیسم مورد نظر بر روی محیط پلیتی روده ای یا کشت Broth خالص

٤- مواد مورد نیاز:

لوله محیط کشت KIA بصورت شیب دار

۵- روش انجام کار:

محیط کشت را با مقدار زیادی از کلونی باکتری مورد نظر، با کشت مارپیچی روی تمام سطح شیب دار و سپس سوراخ کردن عمق آگار (و یا بالعکس) تا فاصله ۵-۳ میلی متری عمق لوله، تلقیح نمایید. لوله ها را به مدت ۲۴-۱۸ ساعت و در صورت عدم واکنش تا ۴۸ ساعت ، در دمای $35 \pm 2^{\circ} C$ در شرایط هوازی انکوبه نمایید. بعد از انکوباسیون، نتیجه واکنش در سطح شیب دار و عمق را ثبت نموده، تشکیل گاز و تولید سولفید هیدروژن را یادداشت نمایید.

غیرتخمیرکننده های لاکتوز (مثل سالمونلا و شیگلا) در ابتدا رنگ زرد تولید می کنند که ناشی از اسید تولید شده به دلیل تخمیر مقدار کمی دکستروز است. وقتی دکستروز تمام می شود در سطح محیط شیب دار (منطقه هوازی)، به علت اکسیداسیون اسیدها واکنش به حالت قلیایی (سطح قرمز) برمی گردد. این تغییر رنگ در عمق (منطقه بی هوازی) رخ نمی دهد، پس اسیدی (عمق زرد) باقی می ماند.

تخمیرکننده های لاکتوز سطح و عمق زرد تولید می کنند، چون اسید کافی در سطح شیب دار تولید می شود تا pH اسیدی را تحت شرایط هوازی حفظ کند. ارگانیسم هایی که توانایی تخمیر هیچ یک از دو کربوهیدرات را ندارند، سطح و عمق قرمز تولید می کنند.

تولید سولفید هیدروژن با ایجاد رنگ سیاه در تمام عمق یا با تشکیل حلقه سیاه در نزدیکی عمق اثبات می شود. تولید گاز با ایجاد حباب یا با شکافتن یا جابجا شدگی آگار نشان داده می شود.

٦- برنامه کنترل کیفی (QC):

ارگانیسم	سطح شیب دار	عمق	سولفیدهیدروژن (H_2S)
Escherichia coli ATCC 25922	اسیدی	اسیدی با گاز	–
Salmonella typhimurium ATCC 14028	قلیایی	اسیدی با گاز	+
Shigella flexneri ATCC 12022	قلیایی	اسیدی	–
Pseudomonas aeruginosa	قلیایی	قلیایی	–
Citrobacter freundii	اسیدی	اسیدی	+

۷- تداخلات:

- سولفات فروس موجود در این محیط به عنوان معرف H_2S گاهی دارای حساسیت کمتری نسبت به سایر نمک های فریک می باشد. بنابراین ممکن است در ایجاد H_2S در TSI و KIA با سایر محیط های کشت مثل SIM مغایرت هایی دیده شود.
- برای بالا بردن شرایط قلیایی در سطح شیب دار باید با شل کردن در پیچ لوله، اجازه داده شود تا تبادل هوا صورت گیرد. اگر در پیچ لوله محکم بسته شود، یک واکنش اسیدی که فقط با تخمیر دکستروز ایجاد شده، سطح شیب دار را نیز دربرمی گیرد.
- عمق لوله های KIA و TSI، با تخمیر گلوکز، اسیدی می شود و در صورت تولید H_2S، اغلب سیاه شدن از ته لوله شروع می شود، (بویژه با باکتریهای غیر تخمیر کننده لاکتوز) بنابراین اگر عمق سیاه است باید آن را اسیدی در نظر گرفت.

رنگ آمیزی گرم

اصول:

در آزمایشگاه میکروب شناسی بالینی، رنگ آمیزی گرم آزمایشی مهم برای تشخیص احتمالی سریع عوامل عفونی است و کیفیت نمونه های بالینی را ارزیابی می کند . این آزمایش برای طبقه بندی باکتری ها بر اساس شکل، اندازه، مورفولوژی سلول و واکنش گرم آنها به کار می رود.

تفسیر گسترش هایی که رنگ آمیزی گرم شده اند، با در نظر گرفتن مشخصه های رنگ آمیزی ، اندازه، شکل و آرایش سلول صورت می گیرد. این مشخصه ها ممکن است بوسیله بسیاری از فاکتورها مانند مدت زمان ماندگی پلیت ها، محیط کشت، اتمسفر انکوباسیون ، روش رنگ آمیزی و وجود مواد مهارکننده تحت تأثیر قرار بگیرند. برای تفسیر اسمیرهای تهیه شده از نمونه های بالینی مانند خلط، به وجود عوامل اضافی مانند انواع سلول های میزبان و فاگوسیتوز نیز می بایست دقت نمود .

نمونه:

اسمیر برای رنگ آمیزی گرم ممکن است از نمونه های بالینی، محیط براث یا کلنی های رشد کرده روی محیط کشت جامد تهیه شود. نمونه های بالینی تازه وکشت های تازه (کمتر از ۲۴ ساعت) از محیط های غیرمهارکننده ، صحیح ترین نتایج را می دهند؛برای برخی بررسی های مورفولوژیکی، اسمیر تهیه شده از کشت براث مورد نیاز می باشد.

مواد:

A. معرف ها

معرف ها ممکن است به صورت تجاری خریداری شوند یا در آزمایشگاه تهیه گردند.

۱- Hucker's modification

a. کریستال ویوله

b. ید

احتیاط: ید خاصیت خورندگی دارد. از استنشاق، خوردن یا تماس آن با پوست خودداری کنید.

c. رنگ برها

۱) کندترین رنگ بر: اتانول ۹۵ ٪

۲) رنگ بر متوسط: استون ـ الکل؛ مخلوطی از ml ۱۰۰ اتانول ۹۵٪ و ml ۱۰۰ استون (reagent grade) را در بطری شیشه ای قهوه ای رنگ ترکیب کنید، با یک سال تاریخ انقضاء برچسب بزنید و در حرارت اتاق نگهداری کنید.

۳) سریع ترین رنگ بر: استون (reagent grade)

احتیاط: اتانول و استون قابل اشتعال هستند.

d. **Counterstains** (رنگ متقابل)

۱) سافرانین

۲) به طور جایگزین: فوشین بازی (wt/vol) ۰/۲٪ یا ۰/۱٪

۲- Kopeloff's modification for anaerobes
۳- Carbol-fuchsin–basic fuchsin counterstain

B. وسایل و مواد مورد نیاز

۱- لام شیشه ای (۲۵×۷۵ mm)
۲- NaCl ۰/۸۵٪ استریل
۳- پی پت پاستور و اپلیکاتور چوبی استریل
۴- لوپ میکروب شناسی، آنس تلقیح سازی
۵- Safety box برای دور ریختن زباله بیولوژیک شامل وسایل نوک تیز
۶- روغن ایمرسیون

C. تجهیزات

موارد اختیاری با توجه به نوع نمونه
۱- سانتریفوژ
۲- ورتکس
۳- لوله درپیچ دار استریل
۴- قیچی، اسکالپل و پنس استریل
۵- خردکن بافت
۷- متانول خالص

نکته: متانول را در بطری های درپیچ دار قهوه ای ذخیره کنید. ذخیره کاری را می توان در ظروف پلاستیکی برای حداکثر دو هفته ذخیره نمود .

کنترل کیفی:

A. روزانه معرف ها را از نظر ظاهری بررسی کنید.

۱- اگر کریستال ویوله رسوب کرده یا ته نشین شده، قبل از استفاده آن را صاف کنید، حتی زمانی که معرف ها به صورت تجاری خریداری می شوند.

نکته: بعضی رنگ ها، خصوصاً فوشین بازی و سافرانین می توانند آلوده شوند. در صورت شک به آلودگی ، انجام رنگ آمیزی با استفاده از معرف تازه توصیه میگردد .

۲- تبخیر شدن مواد ممکن است کارایی و تأثیر معرف ها را دگرگون کند. اگر محلول های کاری با مصرف روزانه تمام نمی شوند، باید به طور منظم تعویض شوند.

B. به طور روزانه و زمانی که یک سری ساخت جدید استفاده می شود، گسترشی از *اشریشیا کلی* (ATCC 25922) و *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* (ATCC 12228) و یا *استافیلوکوک اورئوس* (ATCC 25923) تهیه و فیکس کرده و مطابق روش فوق رنگ آمیزی کنید.

نتایج مورد انتظار:

۱ – باسیل های گرم منفی، صورتی

۲– کوکسی های گرم مثبت، بنفش پررنگ

توجه:بعنوان روش کنترل کیفی جایگزین پیشنهاد میشود با یک اپلیکاتور چوبی از بین دندان ها نمونه گیری شود؛ هم ارگانیسم های گرم مثبت و هم گرم منفی وجود خواهد داشت.

C. برخی از علل رایجی که موجب تهیه اسلاید رنگ آمیزی گرم نامناسب می گردند:

۱– استفاده از لام های شیشه ای که قبلا تمیز یا چربی زدایی نشده اند.

توجه: با ذخیره لام ها در ظرف حاوی اتانول ۹۵٪ از تمیز بودن آنها مطمئن خواهیم بود. قبل از استفاده، الکل اضافی را از روی لام خالی کنید یا آن را روی شعله بگیرید.

۲– گسترش ها خیلی ضخیم تهیه شده است.

۳– حرارت دادن زیاد گسترش، زمانی که برای فیکس کردن از حرارت ا ستفاده می شود.

۴– آب کشی زیاد در طی فرایند رنگ آمیزی

D. برای اطمینان از صحت تفسیر، سیستمی برای بررسی گزارش های رنگ آمیزی گرم برقرار کنید.

۱– بررسی روزانه تعدادی از رنگ های گرم توسط سوپروایزر

۲– مقایسه نتایج کشت نهایی با گزارش های رنگ آمیزی گرم

۳– گردآوری مجموعه ای از لام های مرجع برای آموزش

روش انجام آزمایش:

A. تهیه اسمیر

اسمیر مناسب باید لایه ای از ارگانیسم ها با تراکم مناسب برای مشاهده آسان ایجاد نماید. پراکندگی ارگانیسم ها می بایست به نحوی باشد که آرایش آنها مشخص شود. برای تهیه اسمیر از لام های شیشه ای نو و تمیز استفاده نمایید.

نکته: زمانی که از یک پی پت یا سواب برای تهیه اسمیر و تلقیح محیط کشت استفاده می کنید، همیشه قبل از تهیه اسمیر، ابتدا محیط کشت را تلقیح کنید.

۱– نمونه های بالینی:

نکته : استفاده از دستکش لاتکس در زمان کار روی نمونه های بالینی ضروری است .

a. نمونه های دریافت شده روی سواب

ترجیحاً باید یک سواب جداگانه برای تهیه اسمیر آماده شود .

۱) جهت جلوگیری از تخریب عناصر سلولی و از بین رفتن آرایش باکتریایی، به آرامی سواب را در سرتاسر لام بچرخانید.

۲) در مواردی که فقط یک سواب دریافت می شود، سواب را در مقدار کمی سالین قرار داده و آن را ورتکس کنید. سواب را به دیواره داخلی لوله بفشارید و آن را برای تهیه گسترش به کار ببرید. از باقیمانده سوسپانسیون برای تلقیح محیط کشت استفاده کنید.

b. نمونه هایی که روی سواب دریافت نمی شوند شامل: آسپیره ها، ترشحات، چرک، مدفوع

۱) اگر نمونه در یک سرنگ دریافت شده باشد، ابتدا تمامی آن را در یک لوله استریل بریزید. در صورت کافی بودن حجم نمونه آن را ورتکس کنید.

نکته: سرنگ های همراه سوزن را ، نپذیرید. به کارکنان مربوطه جداسازی ایمن سوزن ها را آموزش دهید .

۲) با استفاده از یک اپلیکاتور، پی پت یا لوپ سیمی استریل قسمت های چرکی یا خونی نمونه را انتخاب کنید. نمونه های خیلی غلیظ یا نمونه های چرکی را می توان در یک قطره سالین روی لام رقیق نمود تا تهیه اسمیر آسان تر شود.

۳) نمونه را روی منطقه بزرگی از لام پهن کنید تا یک لایه نازک ایجاد شود.

c. CSF و سایر مایعات بدن که نیاز به سانتریفوژ دارند

بعضی از آزمایشگاهها ممکن است برای تغلیظ مایعات بدن و تهیه اسمیر از Cytopsin Slide Centrifuge استفاده کنند. این روش به افزایش حساسیت رنگ گرم ،کاهش زمان سانتریفوژ و دسترسی سریعتر به نتیجه کمک می نماید.

۱) بعد از انجام سانتریفوژ، با استفاده از پی پت استریل، محلول رویی را به یک لوله استریل منتقل کنید، حدود ml ۰/۵ را به عنوان رسوب باقی بگذارید.

۲) رسوب را ورتکس کرده یا با چند بار داخل و خارج کردن از یک پی پت پاستور استریل آنرا کاملا مخلوط نمایید.

۳) با استفاده از پی پت پاستور یک قطره کوچک از رسوب را روی یک لام تمیز قرار دهید.

۴) قطره را پخش نکنید. اجازه دهید تا در مجاورت هوا خشک شود.

d. نمونه های ادرار

۱) سانتریفوژ نکنید. نمونه را به خوبی مخلوط کنید.

۲) با استفاده از یک پی پت پاستور استریل ۱ قطره را روی لام قرار دهید. قطره را پخش نکنید.

۳) اجازه دهید قطره در مجاورت هوا خشک شود.

e. مواد خشک یا مقادیر خیلی کم نمونه های بالینی:

۱) نمونه را در ml ۰/۵ سالین استریل حل کنید. در صورت نیاز ورتکس نمایید.

۲) با استفاده از پی پت پاستور استریل ۱ قطره را روی لام قرار دهید.

۳) با استفاده از نوک پی پت، قطره را پخش کنید تا لایه نازکی ایجاد شود.

f. بیوپسی ها و برش های بافت

تهیه نمونه حاصل از تماس مستقیم اسلاید با سطح نمونه (touch prep) و/یا نمونه خرد شده (ground specimen)

۱)بافت را با استفاده از قیچی یا اسکالپل استریل خرد کنید.

۲) نمونه ای حاصل از تماس مستقیم اسلاید با سطح نمونه (touch prep) تهیه کنید. با استفاده از پنس استریل قطعه ها را نگه دارید و کناره های یک یا تعداد بیشتری از قطعات خرد شده را با اسلاید شیشه ای استریل تماس دهید، برای بررسی آسانتر تماس ها را با هم دسته بندی کنید.

۳) برای نمونه های تماسی یکنواخت، یک قطره را روی اسلاید قرار دهید و به اندازه یک دایره ۲/۵ سانتی متری پخش کنید.

۲- کشت های براث:

برای جلوگیری از مخلوط شدن نمونه های مختلف روی یک لام ، توصیه می شود روی هر اسلاید، یک گسترش تهیه شود.

a. با استفاده از پی پت پاستور استریل (یا یک سوزن منفذدار، برای ظروفی مثل بطری های کشت خون، جهت جلوگیری از آلودگی با سوزن و سرنگ) یک قطره روی لام قرار دهید.
b. قطره را پخش کنید تا لایه نازکی ایجاد شود.

۳- کلنی از روی محیط های کشت جامد:

a. یک قطره سالین یا آب مقطر استریل روی لام قرار دهید.
b. مقدار کمی از کلنی را با یک اپلیکاتور، آنس یا لوپ استریل بردارید.
c. به آرامی مخلوط کنید تا سوسپانسیون یکنواختی حاصل گردد.

B. فیکس کردن اسمیر (گسترش):

اسمیرها ممکن است با حرارت یا متانول فیکس شوند.

۱- حرارت:

a. اسمیر را در مجاورت هوا روی یک سطح صاف یا داخل اتو قرار دهید تا خشک شود.
b. اگر اسمیرها در مجاورت هوا خشک شدند، آنها را ۲ یا ۳ بار از روی شعله بگذرانید. برای جلوگیری از سوختگی یا تغییر شکل سلول ها، از حرارت زیاد استفاده نکنید .
c. بگذارید لام قبل از رنگ آمیزی خنک شود.

۲- از آنجا که حفظ مشخصات سلولهای میزبان جهت تفسیر گستره های بالینی ضروری است بهترین روش برای رنگ آمیزی گستره های مستقیم، فیکس کردن با استفاده از متانول است. این امر با ممانعت از لیز گلبول های قرمز و تخریب سلول های میزبان موجب واضح تر شدن زمینه اسلاید می گردد که تفسیر نمونه راآسانتر میکند.این روش برای همه نمونه های بالینی، مخصوصاً ادرار موکدا توصیه می شود که در عین حال مانع از شسته شدن نمونه های ادرار می گردد.

a. اسمیر را در مجاورت هوا روی یک سطح صاف خشک نمایید.
b. برای ۱ دقیقه چند قطره متانول روی لام بریزید. متانول را بدون آبکشی از روی لام خالی کنید و اجازه دهید تا اسلاید در مجاورت هوا خشک شود.
c. قبل از رنگ آمیزی، از حرارت استفاده نکنید.

C. روش انجام رنگ آمیزی:

۱- Hucker's modification

a. اسمیر فیکس شده را با محلول کریستال ویوله بپوشانید. ۳۰ ثانیه منتظر بمانید.
b. آهسته کریستال ویوله را خالی کنید، اسلاید را به آرامی با آب جاری بشوئید.

احتیاط: شستشوی بیش از حد در این مرحله می تواند باعث شسته شدن کریستال ویوله از سلول های گرم مثبت شود. برای اطمینان از جریان آرام آب در سمت اسمیردار لام، اسلاید را به صورت زاویه دار نگه دارید.

c. آب اضافی را با محلول ید شستشو دهید و سپس اسلاید را با محلول ید تازه بپوشانید. ۳۰ ثانیه منتظر بمانید.
d. اسلاید را به آرامی با آب جاری بشوئید.
e. با جاری کردن معرف روی گستره در حالی که اسلاید زاویه دار نگه داشته شده است، رنگ بری کنید. وقتی مایع جاری ، بی رنگ می شود این کار را به اتمام برسانید. زمان رنگ بری را بر اساس ضخامت اسمیر و نوع رنگ بر مورد استفاده تنظیم کنید.
f. رنگ بر اضافی را با جریان آرام آب خارج کنید.

نکته: اسمیری که بطور مناسب رنگ بری شده است، با ته رنگ سبز زیتونی و بدون آثاری از رنگ کریستال ویوله دیده خواهد شد.

g. اسلاید را با سافرانین بپوشانید و اجازه دهید رنگ متقابل(counter stain) برای ۳۰ ثانیه باقی بماند.

h. رنگ متقابل اضافی را با جریان آرام آب خارج کنید.

i. اسلاید را در وضعیت ایستاده در مجاورت هوا خشک کنید. پشت لام را با استفاده از دستمال کاغذی آغشته به استون یا الکل پاک کنید.

j. اسمیر را از نظر میکروسکوپی بررسی کنید.

۲- Basic/carbol-fuchsin counterstain

Basic/carbol-fuchsin برای شناسایی ارگانیسم های گرم منفی که رنگ کمی گرفته اند به کار می رود.

۳- Kopeloff's modification

برای مشاهده و افتراق بهتر بی هوازیها توصیه می شود از روش رنگ آمیزیKopeloff's modification استفاده شود .

گزارش نتایج:

A. نتایج و تفسیر

۱- وضعیت کلی اسمیر را با بزرگنمایی کم (۱۰×) ارزیابی کنید.

a. دقت نمایید که اسمیر بطور مناسبی رنگ بری شده باشد. بسته به نوع نمونه، زمینه عموما باید شفاف یا صورتی باشد. اگر گلبول های سفید وجود دارند، بایدبه صورت گرم منفی ظاهر شوند. رسوب های نازک سوزنی شکل کریستال ویوله را با باکتری های میله ای شکل گرم مثبت اشتباه نگیرید.

b. دقت نمایید ضخامت اسمیر مناسب باشد. برای تفسیر مناسب، گستره نمیبایستی بیش از یک سلول ضخامت داشته و روی هم افتادگی سلول ها نباید مشاهده شود.

۲- اسمیرهای تهیه شده از نمونه های بالینی را جهت بررسی موارد زیر با بزرگنمایی کم بررسی کنید:

a. مقادیر مربوط به نوتروفیل ها، مونوسیت ها و گلبول های قرمز

b. مقادیر مربوط به سلول های اپی تلیال و باکتری های فلور نرمال که ممکن است نشانگر جمع آوری نامناسب نمونه باشد.

c. وضعیت و آرایش میکروارگانیسم ها

۳- مناطق متعددی از اسمیر را با روغن ایمرسیون از نظر وجود میکروارگانیسم ها بررسی و به شیوه زیر گزارش کنید.

a. در صورت عدم مشاهده هر گونه میکروارگانیزم :"هیچ میکروارگانیسمی مشاهده نشد".

b. در صورت مشاهده میکروارگانیزمها ، تراکم کلی و مرفولوژی را شرح دهید.

۴- شکل سلولی غالب میکروارگانیسم ها را ذکر نمایید

a. شکل کلی: کوکوس، کوکوئید، کوکوباسیل، باسیل، رشته ای شکل، شبه مخمر

b. ظاهر انتهاها: کروی، شمعی شکل، مسطح، گرزی شکل، مقعر. برآمدگی کناره ها می تواند وجود اسپورها را پیشنهاد کند، اما می تواند به علت واکوئل ها، پلئومرفیسم، یا رنگ آمیزی نامنظم باشد.

c. ظاهر کناره ها: موازی، تخم مرغی شکل (برآمده)، مقعر، نامنظم

d. ماهیت محور تقارن: مستقیم، منحنی، فنری

e. پلئومرفیسم (ناپایداری در شکل): عبارت توصیفی "دیفتروئید" یا "کورینه فرم" برای توصیف باسیل های گرم مثبت به کار می رود که چند شکلی، گرزی شکل یا نامنظم و بی قاعده هستند یا آرایش نرده ای یا زاویه دار دارند (اشکال V و L).

f. گسترش شاخه ای یا سلولی

B. ثبت مشاهدات

هر آزمایشگاه باید سیاست گزارشدهی ویژه ای را تدوین کند. یافته های مهم بالینی باید جهت اطلاع به پزشک معالج اعلام شود.

– اسمیر نمونه های بالینی

برای کشت های ادرار ۲۰ فیلد یا بیشتر را بررسی کنید. اگر بطور میانگین،ن یک ارگانیسم یا بیشتر در فیلد روغن ایمرسیون دیده می شود، مثبت گزارش کنید. این با کلنی کانت $\geq ۱۰^{۵}$ CFU/ml همبستگی دارد.

a. مقادیر مربوط به سلول ها و میکروارگانیسم های مشاهده شده را گزارش دهید. معمولا سیستم های کمی مورد استفاده شامل موارد زیر است.

۱) عددی

a) +۱ (۱> در فیلد روغن ایمرسیون [×۱۰۰])

b) +۲ (۱ در فیلد روغن ایمرسیون)

c) +۳ (۲ تا ۱۰ در فیلد روغن ایمرسیون)

d) +۴ (غالب یا ۱۰< در فیلد روغن ایمرسیون)

۲) توصیفی

a) کمیاب (۱< در فیلد روغن ایمرسیون)

b) کم (۱ تا ۵ در فیلد روغن ایمرسیون)

c) متوسط (۵ تا ۱۰ در فیلد روغن ایمرسیون)

d) زیاد (۱۰< در فیلد روغن ایمرسیون)

b. مرفولوژی باکتری های مشاهده شده را ثبت کنید.

C. مرور رنگ آمیزی گرم

۱– بعد از تفسیر اسمیرها، اسلایدها را به مدت کافی برای مرور تأییدی نگه دارید .

a. روغن اضافی را خالی کنید یا به آرامی پاک کنید.

b. برای اسلایدهای کتابخانه و مجموعه های آموزشی که برای مدت زمان طولانی تری ذخیره خواهد شد، روغن ایمرسیون را می توان با محلول گزیلن پاک کرد و با یک درزگیر نظیر محلول permount پوشاند تا از محوشدگی آنها جلوگیری شود.

c. اسلایدها ممکن است کیسه های خطر زیستی را سوراخ کنند، آنها را به عنوان مواد زائد بیولوژیک " تیز و برنده" در نظر گرفته و جهت دفع از ظروف خطر زیستی (biohazard) مطابق با دستورالعمل دفع پسماند آزمایشگاه مرجع سلامت استفاده کنید.

۲– اگر تکرار رنگ آمیزی گرم یا یک رنگ آمیزی ویژه برای تأیید یافته ها لازم است، وقتی اسمیرهای رنگ نشده اضافی در دسترس نیستند، یک اسمیر رنگ گرم را می توان رنگ بری نمود.

a. روغن ایمرسیون را با محلول گزیلن از روی اسلاید بردارید.

b. اسلاید را با الکل– استون بپوشانید تا اسمیر بی رنگ شود.

c. دوباره رنگ کنید.

توجهات :

A. نتایج رنگ آمیزی گرم میبایستی در تطابق با سایر یافته های بالینی و آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گیرد.

B. برای کسب نتایج صحیح، پیروی دقیق از روش انجام آزمایش و معیارهای تفسیر الزامی می باشد. صحت، ارتباط زیادی با آموزش و مهارت شخص مشاهده کننده اسلاید دارد.

C. مشاهده میکروارگانیزم های گرم مثبت و نمونه های کشت منفی ممکن است در نتیجه آلودگی معرف ها و سایر لوازم، حضور عوامل ضدمیکروبی، یا کاهش رشد ارگانیسم ها تحت شرایط کشت معمول (محیط کشت ، اتمسفر و غیره) باشد.

D. نتایج گرم نادرست ، ممکن است مربوط به کیفیت نامناسب جمع آوری نمونه باشد.

E. ممکن است گاهی واکنش رنگ آمیزی گرم با کلنی های خیلی تازه در مقایسه با کلنی های کهنه تر متفاوت باشد. وقتی که اسمیرها از ساب کالچر ۲۴ – ۱۸ ساعته تهیه می شوند (زمانی که سلول های باکتریایی در فاز لگاریتمی رشد هستند)، مرفولوژی اغلب باکتری ها در رنگ آمیزی گرم، در بهترین شرایط می باشد.

آزمایشگاه مرجع سلامت	**فهرست** **مواد، محیط های کشت و دیسک های تشخیصی**	صفحه **1 از 3**

مواد، محيط هاي كشت و ديسك هاي تشخيصي

۱- محیط بلاد آگار(خون گوسفند)
۲- محیط مک کانگی آگار یا EMB آگار
۳- محیط نوترینت آگار یا TSA یا برین هارت اینفیوژن آگار (BHIA)
۴- محیط کشت خون (TSB یا BHIB) در صورت نیاز
۵- محیط مولر هینتون آگار
۶- محیط شکلات آگار(خون گوسفند)
۷- محیط مانیتول سالت آگار
۸- محیط DNase آگار
۹- محیط Nacl 6.5% براث یا آگار
۱۰- محیط بایل اسکولین آگار
۱۱- محیط KIA
۱۲- محیط TSI
۱۳- محیط SIM
۱۴- محیط سیمون سیترات آگار
۱۵- محیط MR-VP براث
۱۶- محیط اوره آگار
۱۷- محیط ژلاتین
۱۸- محیط فنل رد آگار یا براث + قندهاي گلوكز، لاكتوز، مانيتول، سوكروز و ...
۱۹- محیط لایزین آیرون آگار (LIA) یا مولر لایزین دکربوکسیلاز
۲۰- محیط پایه مولر (Muller's base)+ اسیدهای آمینه آرژینین و اورني تين
۲۱- محیط فنیل آلانین آگار
۲۲- محیط OF + قندهای گلوکز، لاکتوز، مالتوز، مانیتول و...
۲۳- محیط هکتون انتريك آگار (HE) یا XLD آگار
۲۴- محیط انتقالي کری بلر
۲۵- محیط TCBS

۲۶- محیط آب پپتونه قلیایي
۲۷- محیط TSB حاوی ۱۵% گلیسرول
۲۸- استاندارد نیم مک فارلند
۲۹- دیسک ONPG
۳۰- دیسک نووبیوسین ۵ میکروگرمی
۳۱- دیسک فورازولیدون
۳۲- دیسک باسیتراسین ۰/۰۴ واحد (....)
۳۳- دیسک اپتوچین
۳۴- دیسک Polymixin B 300U
۳۵- دیسک SXT
۳۶- پلاسمای EDTA دار خرگوش

آنتی سرم ها

۱- مجموعه آنتی سرم های شیگلا
۲- مجموعه آنتی سرم های سالمونلا
۳- مجموعه آنتی سرم های E. coli

معرف ها

۱- معرف کاتالاز (آب اکسیژنه ۳%)
۲- معرف اکسیداز (تترا متیل پارافنیلن دی آمین دی هیدروکلراید)
۳- معرف HCl ۱%
۴- معرف کواکس
۵- معرف MR
۶- معرف هاي VP (α نفتول و KOH)
۷- معرف کلرور فریك

آزمایشگاه مرجع سلامت	**فهرست** **مواد، محیط های کشت و دیسک های تشخیصی**	صفحه 3 از 3

ابزار و وسایل

۱- یخچال (۸-۲ درجه سانتیگراد)
۲- فریزر۸- تا ۲۰- درجه سانتیگراد
۳- انکوباتور ۱± ۳۶ درجه سانتیگراد)
۴- کندل جار + شمع
۵- بن ماری
۶- اتوکلاو
۷- pH متر
۸- سانتریفوژ
۹- اون (فور)
۱۰- ورتکس
۱۱- میکروسکوپ
۱۲- لوپ و آنس
۱۳- سواب
۱۴- اسلاید

آزمایشگاه مرجع سلامت	**راهنمای انجام آزمایش** **بررسی حرکت باکتری**	صفحه 1 از 3

۱- هدف آزمایش:

افتراق باکتری های مختلف براساس توانایی حرکت آنها

۲- اصول انجام کار:

این آزمایش جهت افتراق ارگانیسم های متحرک از غیر متحرک به کار می رود. باکتری ها توسط فلاژل حرکت می کنند. فلاژل اغلب در باسیل ها دیده می شود، هر چند که تعداد اندکی از کوکسی ها نیز متحرکند. گاه باکتری های متحرک واریانت های غیر متحرک ایجاد می کنند که ممکن است در نهایت به فرم متحرک بر گردند. ارگانیسم های غیر متحرک فلاژل ندارند.

۳- نمونه اولیه:

کشت خالص ۲۴-۱۸ ساعته

٤- مواد و ابزار لازم:

- جهت انجام روش قطره معلق مواد و وسایل زیر مورد نیاز است:
  ۱- اسلاید (لام)
  ۲- لامل
  ۳- خمیر هماتوکریت
  ۴- سرم فیزیولوژی
- جهت بررسی حرکت در محیط نیمه جامد از لوله حاوی محیط SIM یا Motility test medium (Semisolid) یا محیط های مشابه می توان استفاده نمود.

٥- روش کار:

قطره معلق

۱- یک قطره سرم فیزیولوژی یا آب مقطر روی لامل قرار دهید.
۲- با استفاده از آنس از رأس کلنی های تازه باکتری، مقدار اندکی برداشته با قطره فوق مخلوط نمایید.
۳- با استفاده از خمیر هماتوکریت یا پنبه، حلقه ای به ضخامت تقریبی۲ میلی متر و به قطر تقریبی ۱/۵-۱ cm روی لام درست کنید.
۴- لامل حاوی سوسپانسیون میکروبی را به شکلی که با خمیر یا پنبه تماس پیدا نکند (به سرعت) روی لام برگردانید.
۵- نمونه فوق را زیر میکروسکوپ با عدسی ۴۰ مشاهده نمایید.

تفسیر : افتراق حرکت باکتری از حرکت براونی حائز اهمیت است. در صورت متحرک بودن باکتری، هریک از باکتریها نسبت به باکتری های همجوار در حال تغییر موقعیت مداوم هستند و بعضا با سرعت زیاد در میدان دید میکروسکوپ حرکت می کنند. این حرکت ممکن است به شکلهای مختلف از چرخش، خم و راست شدن و حرکت سریع مانند گلوله یا تیر دیده شود. در حرکت براونی، عده زیادی از باکتریها بدون چرخش و تغییر موقعیت و همگی در یک مسیر حرکت می نمایند (حرکت کاذب).

محیط های نیمه جامد

جهت تلقیح ارگانیسم در محیط های مربوطه (SIM یا MTM) از کشت خالص ۲۴-۱۸ ساعته بر روی محیط KIA یا سایرمحیط های مناسب استفاده شود.

با استفاده از آنس تلقیح، مرکز محیط را سوراخ کرده تا عمق ۱cm فرو ببرید. محیط مربوطه را در حرارت ۳۵^{o}C به مدت ۴۸-۲۴ ساعت انکوبه کرده در صورت منفی بودن به مدت ۷ روز در حرارت اتاق ۲۵ ^{o}C-۲۱ نگهداری کنید.

حرارت انکوباسیون اهمیت فوق العاده زیادی دارد. چون بسیاری از ارگانیسم های متحرک در ۲۵ ^{o}C-۱۵ متحرک بوده و در حرارت ۳۷ ^{o}C که حرارت مطلوب رشد آنهاست غیر متحرکند. اگر به متحرک بودن ارگانیسم در حرارت پائین تر مشکوک هستید، ۲ لوله را همزمان تلقیح کنید، یکی را در حرارت ۳۵ ^{o}C و دیگری را در ۲۵^{o}C -۲۱ نگهداری نمائید.

تفسیر:

در صورت متحرک بودن باکتری (حرکت مثبت) علاوه بر رشد در خط تلقیح، محیط اطراف این خط نیز رشد واضح و یا کدورت نشان میدهد.

انکوباسیون در حرارت های مختلف:

- انکوباسیون در حرارت ۳۷ ^{o}C
  - a- انتروباکتر (معمولا +) کلبسیلا (ـ)
  - b- ویبریو (معمولا +) اکتینوباسیلوس (-)
  - c- آئروموناس مدیا (-) و آئروموناس سالمونی سیدا (-) سایر گونه های آئروموناس (+) و پلزیوموناس شیگلوئیدس (+)

- انکوباسیون در حرارت ۲۵°C (حرارت اتاق)

جهت کمک در افتراق بین جنس ها: لیستریامونوسیتوژن (+) کورینه باکتریوم معمولاً (-)

در صورت نیاز از املاح تترازولیوم در محیط مربوطه استفاده کنید، هر چند ممکن است این ماده رشد گروهی از ارگانیسم ها را مهار کند. نمک های تترازولیوم بی رنگ اند ولی با رشد ارگانیسم، رنگ به سلول ها چسبیده و به پیگمان قرمز رنگ نامحلولی به نام فورمازان احیا می شود. رنگ قرمز صرفاً در نواحی از محیط که باکتری در آن رشد کرده ایجاد خواهد شد.

بعد از گذشت ۲۴ ساعت انکوباسیون، میزان مثبت شدن "حرکت" بر روی محیط نیمه جامد مشابه قطره معلق خواهد بود. اما بعد از گذشت ۴۸ ساعت، میزان مثبت شدن واکنش حرکتی در محیط نیمه جامد در ۴٪ موارد بیشتر خواهد بود.

٦- برنامه QC:

حرکت مثبت: *E. coli* ATCC 25922

حرکت منفی : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

درصورت استفاده از محیط های نیمه جامد جهت کنترل منفی می توان از روش عدم تلقیح میکـروب اسـتفاده کرد.

آزمایشگاه مرجع سلامت	راهنمای انجام آزمایش	صفحه 1 از 2

متیل رد
Methyl Red Test

۱- هدف:

تشخیص و تمایز اعضای خانواده انتروباکتریاسه براساس میزان فرآورده نهائی ناشی از متابولیسم گلوکز و تولید اسید از طریق مسیر Mixed Acid Fermentation

۲- اساس آزمایش:

معرف متیل رد یک اندیکاتور pH است که در محدوده بین pH= 6 (زرد) و pH= 4.4 (قرمز) واکنش نشان می دهد. اسیدیته ای که در آن معرف متیل رد قادر است تا تغییر رنگ ایجاد نماید بسیار کمتر از سایر معرفهای بیولوژیکی بوده و تنها در مجاورت اسیدیته بالا، در مسیر تخمیر چند اسید از گلوکز می تواند ایجاد واکنش نماید.

برخی از انتروباکتریاسه فقط در ابتدای دوره انکوباسیون تولید اسید می نمایند ولی تنها باکتریهایی که قادر باشند برای مدت طولانی طی انکوباسیون (۷۲-۴۸ ساعت) pH محیط را در حد پایین حفظ نمایند دارای واکنش مثبت می باشند.

۳- نمونه اولیه:

کشت خالص و تازه از باکتری مورد نظر (کشت ۲۴ -۱۸ ساعته)

٤- مواد و معرفها:

- MR/VP Broth با pH نهایی ۶/۹
- معرف متیل رد که عبارت است از 0.1 g پودر متیل رد در 300 ml الکل اتیلیک ۹۵٪ و 200 ml آب مقطر

توجه: ابتدا پودر متیل رد را باید در الکل حل نمود و سپس آب به آن اضافه کرد. محلول تهیه شده را باید در شیشه تیره و در یخچال نگهداری نمود. جهت مصرف روزانه و هفتگی آنرا در لوله های در پیچ دار به حجم ۲/۵میلی لیتر ریخته و در یخچال بگذارید.

۵- روش انجام آزمایش:

- ابتدا چند کلنی از کشت خالص باکتری را در لوله حاوی ۲/۵ میلی لیتر MR/VP Broth تلقیح نمایید.
- ۷۲-۴۸ ساعت (حداکثر ۵ روز) در C° ۳۵ انکوبه نمائید.
- سپس ۵ قطره از معرف متیل رد را به Broth اضافه نمایید و نتیجه واکنش را بر اساس تغییر رنگ حاصله بررسی کنید.

ایجاد رنگ زرد ⟵ واکنش منفی

ایجاد رنگ قرمز ⟵ واکنش مثبت در نتیجه تولید اسید زیاد و ایجاد $pH<4.5$ است.

ایجاد رنگ نارنجی ⟵ واکنش منفی

جهت کوتاه تر کردن زمان نتیجه گیری می توان حدود ۰/۵ میلی لیتر MR/VP Broth را در لوله ای ریخته و مقدار نسبتاً زیادی از میکروب را در آن تلقیح نمود و پس از انکوباسیون ۲۴-۱۸ ساعته در $35^{\circ}C$ ، ۲-۱ قطره معرف متیل رد را به آن اضافه کرده، واکنش را مشاهده نمود.

٦- برنامه کنترل کیفی:

کنترل مثبت: *E. coli* ATCC 25922

کنترل منفی: انتروباکتر آئروژینوزا 13048، *Klebsiella Pneumoniae* ATCC 13883

توجه : در هر روز کاری، قبل از انجام آزمایش، کنترل کیفی باید با سویه های مثبت و منفی انجام شود.

آزمایشگاه مرجع سلامت	**راهنمای انجام آزمایش** **فنیل آلانین دآمیناز**	صفحه 1 از 1

۱- هدف:

کمک در تشخیص پروتئوس، مورگانلا و پرووِیدنسیا از سایر باکتری های گرم منفی

2- **اساس آزمایش**:

فنیل آلانین اسید آمینه ای است که ضمن دآمنیه شدن به فنیل پیرووِیک اسید تبدیل می شود، این اسید با افزودن کلرورفریک 10% و ایجاد رنگ سبز مشخص می شود.

3- **مواد و ابزار لازم** :

- لوله حاوی فنیل الانین آگار
- کلرورفریک 10 درصد

4- **مراحل انجام کار**:

- سطح محیط با کلنی ایزوله تلقیح شده ، در لوله به صورت شل بسته شود.
- بعد از انکوباسیون محیط در c °35به مدت 24-18 ساعت یا تا هرزمان که رشد واضحی مشاهده گردد ، (0/5cc) 5-4 قطره کلرورفریک 10% مستقیماً به سطح آگار اضافه می کنیم. لوله را می چرخانیم تا کلنی ها در آن غوطه ور شوند.

5- **تفسیر**:

ظهور بلافاصله رنگ سبز بعد از ریختن معرف، بیانگر مثبت بودن این تست است. در عرض 10 دقیقه رنگ سبز، کم رنگ تر می شود، که با افزودن مقادیر اضافی معرف، دوباره رنگ سبز ایجاد می شود.
بعضی گونه ها به قدری سریع فنیل آلانین را دآمینه می کنند که بعد از 4 ساعت انکوباسیون محیط کشت، نیز تست مثبت می شود.

6- **کنترل کیفی**:

کنترل مثبت: پروتئوس ولگاریس ATCC 33420
کنترل منفی: ATCC 25922 Ecoli

- کنترل کیفی فوق باید برای هر سری ساخت جدید محیط یا معرف انجام گیرد.

آزمایشگاه مرجع سلامت	راهنمای انجام آزمایش	صفحه 1 از 1
	PYR	

۱- هدف:

تست با حساسیت بالا جهت تشخیص استرپتوکوک های گروهA و انتروکوک های گروه D

۲- اساس آزمایش:

آنزیم آمینو پپتیداز توسط سوبسترایی به نام L-pyrolidonyl-β-naphthylamide هیدرولیز می شود و در نتیجه β-naphthylamide آزاد می شود که با افزودن N,N-dimethylaminocinnamaldehyde و با ایجاد رنگ قرمز مشخص می شود.

۳- نمونه اولیه:

- کشت تازه میکروبی (۲۴-۱۸ ساعته)

٤- مواد و ابزار لازم:

- PYR Broth (Todd Hewitt Broth با پیرولیدونیل بتا نفتیل آمید ۰/۰۱٪) به مقدار ۰/۲ ml در لوله)
- معرف PYR (دی متیل آمینو سینامالدئید ۰/۰۱٪)
- لوله آزمایش

٥- روش انجام آزمایش:

- ابتدا ۲ تا ۳ کلنی ازکشت مورد نظر را در لوله محتوی PYR Broth 0.2 ml حل می کنیم.
- لوله را به مدت ۴ ساعت در حرارت $35^{\circ}C$ انکوبه می کنیم.
- یک قطره معرف PYR به آن اضافه می نماییم.
- سرانجام واکنش را که بر اساس تغییر رنگ می باشد مشاهده و تفسیر می نماییم.
- زمان لازم برای خواندن نتایج یک دقیقه می باشد که رنگ زرد یا عدم تغییر رنگ نشانگر منفی بودن تست و ایجاد رنگ قرمز پررنگ نشانگر واکنش مثبت است.

٦- کنترل کیفی:

سوش کنترل مثبت: *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615

سوش کنترل منفی: *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813 و *انتروکوک فکالیس*

در هر روز کاری، قبل از انجام آزمایش، کنترل کیفی باید با سوش های مثبت و منفی انجام شود.

۷- تداخلات:

قبل از انجام این آزمایش باید مطمئن بود که ارگانیسم مورد نظر استرپتوکوک است یعنی کوکسی گرم مثبت و کاتالاز منفی در اختیار داریم. زیرا ارگانیسم های دیگر مانند بعضی از کوکسی ها، استافیلوکوک ها و استرپتوکوک های ویریدنس نیز PYR مثبت هستند.

آزمایشگاه مرجع سلامت	راهنمای انجام آزمایش	صفحه 1 از 2
	حساسیت به باسیتراسین و SXT	

۱- هدف:
تشخیص استرپتوکوک بتاهمولیتیک گروه A از سایر استرپتوکوک ها

2- اساس آزمایش:
استرپتوکوک بتاهمولیتیک گروه A به دیسک باسیتراسین 0.04Uحساس ولی به تریمتوپریم ـ سولفامتوکسازول (SXT) 1.25Ug مقاوم است. استرپتوکوک بتاهمولیتیک گروه B به هر 2 آنتی بیوتیک مقاوم است.

3- ویژگی های تست:
بیش از 10% سویه های گروه C و G به باسیتراسین حساسند بنابراین این تست جهت گروه A چندان اختصاصی نیست. به همین دلیل، این تست اغلب همراه با تست حساسیت به SXT انجام می شود که گروه هایC و G عموماً به آن (SXT) حساس بوده و گروه های A و B مقاومند.

4- نمونه اولیه:
کشت 24 – 18 ساعته از باکتری مورد نظر

5- لوازم و ابزار مورد نیاز:
-بلاد آگار با خون گوسفند
-دیسک باسیتراسین (0.04 U)
-دیسک SXT
-پنس استریل
-سواب استریل

6- روش انجام کار:
کلنی ایزوله استرپتوکوک بتاهمولیتیک را در وسط یک پلیت بلادآگار قرار داده و سپس با یک سواب یا لوپ استریل آن را بطور یکنواخت روی پلیت کشت می دهیم. یک دیسک باسیتراسین و یک دیسک SXT را روی ناحیه کشت داده شده، قرار می دهیم. باید توجه نمود که دیسک ها از همدیگر فاصله داشته باشند. پلیت را دراتووC^0 35 قرار می دهیم.
حساس = عدم رشد در اطراف دیسک ها
مقاوم = رشد تا لبه دیسک ها

7- **برنامه QC**:

ATCC 19615 استرپتوکوک گروه A : باسیتراسین = S و R = SXT

ATCC 27956 استرپتوکوک گروه B : باسیتراسین = R و R = SXT

استرپتوکوک بتاهمولیتیک گروههای C و F یا G: باسیتراسین = S و S= SXT

8- **تداخلات**:

- این تست تنها باید برای تشخیص استرپتوکوک های بتاهمولیتیک انجام شود زیرا بعضی از استرپتوکوک های آلفاهمولیتیک (مثل پنوموکوک) به باسیتراسین حساسند.
- کشت روی بلاد آگار باید کاملاً یکنواخت و به مقدار کافی انجام شود. تلقیح کم میکروارگانیسم روی بلادآگار باعث می شود استرپتوکوک non-A به باسیتراسین حساس شود و نتیجه مثبت کاذب دهد.

آزمایشگاه مرجع سلامت	راهنمای انجام آزمایش	صفحه 1 از 2
	محیط TCBS Agar	

۱- هدف:

جداسازی انتخابی ویبریوهای کلرا و ویبریو پاراهمولیتیکوس

۲- اساس آزمایش:

TCBS آگار Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar محیطی انتخابی برای جداسازی ویبریوکلرا و ویبریوپاراهمولیتیکوس و نیز دیگر ویبریوها است.

- مهار باکتری های گرم مثبت با افزودن Oxgall (صفرای گاوی، محتوی مخلوطی از نمک های صفراوی و Sodium Cholate) انجام می شود.
- تیوسولفات سدیم به عنوان منبع سولفور عمل می کند و در ترکیب با سیترات فریک، تولید سولفید هیدروژن می کند.
- ساکاروز بعنوان کربوهیدرات قابل تخمیر برای متابولیسم ویبریوها موجود است.
- pH قلیائی محیط، جداسازی ویبریوکلرا را افزایش می دهد. تیمول بلو و برم تیمول بلو به عنوان معرف های تغییر pH موجودند.

3- نمونه اولیه :

- سواب های محتوی ماده نمونه در محیط کشت انتقالی کری ـ بلر (Cary & Blair)

٤- مواد و ابزار لازم :

- آب پپتونه قلیایی
- محیط کشت TCBS

٥- روش انجام کار:

حتی الامکان به محض دریافت نمونه، آن را کشت دهید. نمونه هایی مثل سوابهای مقعد، مدفوع، ماده استفراغ شده، ماهی یا غذاهای دیگر را می توان با سواب به طور مستقیم روی محیط تهیه شده در پلیت برد. تلقیح زیاد، مخصوصاً اگر نمونه ها تازه نیستند، توصیه می شود. اگر تأخیری در رسیدن نمونه به آزمایشگاه پیش بینی می شود، سواب های محتوی ماده نمونه را باید در محیط انتقالی کری ـ بلر به آزمایشگاه منتقل نمود.

برای جداسازی ویبریوکلرا و دیگر گونه های ویبریو از مدفوع، آب پپتونه قلیایی و TCBS به کار می رود. یعنی نمونه را ابتدا داخل آب پپتونه قلیایی حاوی ۱٪ NaCl (pH = ۸/۵) برده و به مدت ۸-۵ ساعت در دمای ۳۵ ° C انکوبه نمایید و سپس روی محیط TCBS کشت دهید.

اما در مواقع اورژانس و کمبود وقت توصیه می شود قبل از قرار دادن سواب در آب پپتونه قلیایی، سواب را بر روی یک پلیت TCBS بکشید، پلیت را کشت داده و انکوبه نمایید و سپس سواب را در آب پپتونه قلیایی برده و

به مدت ۸–۵ ساعت در دمای C ° ۳۵ انکوبه نمایید و پس از آن ساب کالچر مجددی بر روی پلیت TCBS تهیه نمایید.
پلیت ها را دور از نور نگهداشته و به مدت ۲۴–۱۸ ساعت در دمای C ° ۲ ±۳۵ انکوبه نمایید. اگر بعد از ۲۴ ساعت منفی بود برای ۲۴ ساعت دیگر انکوبه نمایید.

- *توجه :از زمان تهیه محیط TCBS نباید بیش از یک هفته گذشته باشد. همچنین محیطهای TCBS باید در کیسه های فریزر در بسته در یخچال نگهداری شوند.*

نکته: برای کشت ویبریوها نباید نمونه ها را فریز کرد.

٦- برنامه کنترل کیفی (QC):

Vibrio Cholerae ATCC 9459: رشد متوسط تا زیاد، کلونی های زرد
Vibrio parahaemolyticus ATCC 17802: رشد متوسط تا زیاد، کلونی های آبی
Escherichia coli ATCC 25922: اگر رشد کند،کلونی ها کوچک و شفاف هستند.
Pseudomonas aeruginosa ATCC 10145: رشد به طور جزئی یا کامل مهار می شود. اگر رشد کند، کلونی ها آبی هستند.
Streptococcus faecalis ATCC 29212: رشد به طور جزئی یا کامل مهار می شود. اگر رشد کند، کلونی ها کوچک و زرد هستند.

آزمایشگاه مرجع سلامت	**راهنمای انجام آزمایش** **محیط** **Triple Sugar Iron Agar (TSI Agar)**	صفحه 1 از 2

۱- هدف:
تفکیک باسیل های روده ای گرم منفی (بر اساس تخمیر کربوهیدرات و تولید سولفید هیدروژن)

2- اساس آزمایش:
در این محیط کشت، ساکاروز به دو قندی (دکستروز و لاکتوز) که در محیط کلایگلر آیرون آگار (KIA) وجود دارد، اضافه می شود. افزودن ساکاروز، با تسهیل در جداسازی باسیل های تخمیر کننده ساکاروز و نیز تخمیر کننده های لاکتوز و یا دکستروز، حساسیت محیط را افزایش می دهد. تخمیر کربوهیدرات، با تغییر رنگ قابل مشاهده معرف pH یعنی فنل رد (از قرمز به زرد) نشان داده می شود. تولید سولفید هیدروژن با ایجاد رسوبی که محیط را در عمق لوله سیاه می کند و نتیجه افزودن سولفات فروس به محیط است، نشان داده می شود.
برای تسهیل در جداسازی ارگانیسم هایی که فقط دکستروز را تخمیر می کنند، غلظت دکستروز یک دهم (0/1) غلظت لاکتوز یا ساکاروز است. مقدار کم اسید تولید شده در سطح شیب دار لوله در طی تخمیر دکستروز، به سرعت اکسید می شود و باعث می شود محیط به pH قلیایی(قرمز) برگردد. در مقابل، بدلیل فشار پایین تر اکسیژن در عمق، واکنش اسیدی (زرد) حفظ می شود.
توجه: به هنگام تهیه محیط کشت باید دقت نمود که طول سطح شیب دار و عمق محیط کشت در لوله، حدوداً 3 سانتی متر باشد.

3- نمونه اولیه :
- کشت ارگانیسم بر روی یک پلیت محیط مورد استفاده برای کشت انتروباکتریاسه

4- مواد و تجهیزات مورد نیاز:
- لوله محیط کشت TSI بصورت شیب دار

5- روش انجام کار:
با استفاده از آنس سوزنی استریل خنک، رشد را از مرکز یک کلونی که به تازگی روی پلیت محیط مورد استفاده برای کشت انتروباکتریاسه رشد کرده است، به سطح شیب دار TSI Agar انتقال دهید و آن را با حرکت آنس در امتداد سطح شیب دار، کشت دهید و سپس عمق را با سوراخ کردن محیط، تلقیح نمایید. لوله ها را با در پوش های شل شده به مدت 24-18 ساعت در دمای $35 \pm 2^{\circ} C$ در اتمسفر هوازی انکوبه نمایید.
واکنش های تولید شده توسط ایزوله مجهول را با ارگانیسم های کنترل، مقایسه نمایید. تخمیر کربوهیدرات با رنگ زرد محیط نشان داده می شود.
اگر محیط در عمق لوله زرد شود (اسیدی) اما در سطح شیب دار قرمز شود (قلیایی)، ارگانیسم تحت بررسی فقط دکستروز (گلوکز) را تخمیر می کند.

رنگ زرد (اسیدی) در سطح شیب دار و عمق نشان می دهد که ارگانیسم تحت بررسی، دکستروز، لاکتوز و یا ساکاروز را تخمیر می کند.

رنگ قرمز (قلیایی) در سطح شیب دار و عمق، نشان می دهد که ارگانیسم تحت بررسی، یک غیر تخمیر کننده (Nonfermenter) است.

تولید سولفید هیدروژن سبب تولید رسوب سیاه در عمق لوله می شود.

تولید گاز با شکاف و ترک خوردگی محیط نشان داده می شود.

6- برنامه کنترل کیفی (QC):

ارگانیسم	سطح شیبدار	عمق	گاز	H_2S
Escherichia coli ATCC 25922	A	A	+	-
Pseudomons aeruginosa ATCC 27853	K	K	-	-
Salmonella typhimurium ATCC 14028	K	A	+	+
Shigella flexneri ATCC 12022	K	A	-	-

A: اسیدی (زرد) K: قلیایی (قرمز)

7- تداخلات:

- برای حفظ شرایط قلیایی سطح شیب دار باید با بستن درپیچ لوله بصورت شل، اجازه داد که تبادل آزاد هوا صورت گیرد. اگر لوله محکم بسته شود، واکنش اسیدی (ایجاد شده فقط با تخمیر دکستروز) سطح شیب دار را درگیر خواهد کرد.
- بعضی از ارگانیسم ها ممکن است تولید سولفید هیدروژن را روی KIA نشان دهند، اما روی TSI نشان ندهند، چون استفاده از ساکاروز در TSI Agar، مکانیسم آنزیمی را که در تولید H_2S اثر می گذارد مهار می کند. بویژه سالمونلای تولید کننده H_2S و بعضی از اعضاء انتروباکتریاسه نمی توانند روی TSI Agar، H_2S تولید کنند.
- سولفات فروس موجود در این محیط(به عنوان معرفH_2S) گاهی دارای حساسیت کمتری نسبت به سایر نمک های فریک می باشد. بنابراین ممکن است در ایجادH_2S در TSI و KIA با سایر محیط های کشت مثل SIM مغایرت هایی دیده شود.
- چون عمق لوله های KIA و TSI، با تخمیر گلوکز اسیدی می شود ، سیاه شدن اغلب در ته لوله وجود دارد یا به همان جا محدود می شود (بویژه با باکتریهای غیر تخمیر کننده لاکتوز) بنابراین اگر عمق سیاه است باید آن را اسیدی در نظر گرفت.

آزمایشگاه مرجع سلامت	راهنمای انجام آزمایش	صفحه 1 از 2
	اوره آز	

۱- هدف:

افتراق انتروباکتریاسه ها، افتراق بین گونه های بروسلا، شناسایی گونه های مهمی نظیر کورینه باکتریوم اوره آ لیتیکوم، هلیکوباکترپیلوری، تشخیص مخمرهای کپسول دار و به عنوان یک تست اضافی برای تشخیص بعضی کوکوباسیل های گرم منفی

۲- اساس آزمایش:

اوره آز آنزیمی است که بعضی از ارگانیسم ها آن را تولید کرده و اوره را به دی اکسید کربن، آب و آمونیاک هیدرولیز می کنند. آمونیاک در محلول به کربنات آمونیوم تبدیل شده و باعث قلیایی شدن محیط و بالا رفتن pH می شود.

۳- نمونه اولیه:

کشت ۲۴ – ۱۸ ساعته از ارگانیسم مورد نظر

٤- مواد و تجهیزات مورد نیاز:

محیط کشت مایع نظیر Stuart's urea broth یا محیط کشت آگار مانند Christensen's urea Agar

٥- مراحل انجام کار:

۵-۱) محیط کشت Broth یا سطح شیبدار محیط کشت جامد را با مقدار نسبتاً زیادی از کلنی های ایزوله تلقیح می کنیم.

۵-۲) هر دو لوله محیط کشت را با در پیچ شل به مدت ۴۸ ساعت تا هفت روز در ^{0}C ۳۵ انکوبه می نماییم. ارگانیسم هایی که اوره را سریع هیدرولیز می کنند، در عرض ۲-۱ ساعت واکنش مثبت می دهند و سویه هایی که کمتر فعالند، به ۳ روز یا بیشتر انکوباسیون نیاز دارند.

۵-۳) واکنش ها بدین صورتند :

a. **اوره براث:**

- ایجاد رنگ قرمز نشان دهنده واکنش قلیایی و هیدرولیز اوره می باشد.

b. **اوره آگار:**

- سوش های اوره آز مثبت سریع : ایجاد رنگ قرمز در تمام محیط
- سوش های اوره آز مثبت ضعیف : ایجاد رنگ قرمز ابتدا فقط در سطح و بتدریج در عمق لوله
- سوش های اوره آز منفی : محیط کشت به رنگ اولیه خود باقی می ماند.

٦- برنامه QC:

هر batch جدید از محیط کشت باید با ارگانیسم های کنترل مثبت و منفی تست شود.

سوش کنترل مثبت: Proteus sp

سوش کنترل مثبت ضعیف: Klebsiella sp

سوش کنترل منفی: E. coli

توجه:

باید به اهمیت تفاوت محیط کشت اوره Broth و اوره آگار توجه شود. از آنجا که اوره Broth حاوی مقدار زیادی از بافر نمک های فسفات با pH = ۶/۸ می باشد برای از بین بردن اثر بافر باید مقدار نسبتا زیادی آمونیاک توسط باکتری ایجاد شود تا pH محیط به بالای ۸ برسد و تغییر رنگ ایجاد شود.

محیط اوره آگار حاوی مقدار کمتری بافر نسبت به اوره Broth می باشد و پپتون و گلوکز دارد. این محیط غنی بوده و رشد بسیاری از باکتری هایی را که نمی توانند در اوره براث رشد کنند، افزایش می دهد. از طرفی کم بودن مقدار بافر در اوره آگار اجازه می دهد که مقدار کم آمونیاک حاصل از هیدرولیز اوره توسط باکتری های اوره آز ضعیف، مشخص شود. باکتری هایی که اوره آز کمی ایجاد می کنند مثل گونه هایی از کلبسیلا و آنتروباکتر و بروسلا در محیط اوره آگار، تست می شوند.

آزمایشگاه مرجع سلامت	راهنمای انجام آزمایش آزمایش VP (Voges Proskauer-Test)	صفحه 1 از 1

۱- هدف:

شناسایی میکروارگانیسم هایی که قادرند در مسیر تخمیر گلوکز از اسید پیرورویک، تولید استوئین (استیل متیل کربونیل) نمایند.

۲- اساس آزمایش:

اسید پیرورویک حاصل از تخمیر گلوکز ، از چندین راه متابولیکی ممکن است توسط باکتریها هیدرولیز گردد. باکتری هایی مانند کلبسیلا، انتروباکتر و سراشیا می توانند تولید استوئین نمایند، در حضور اکسیژن هوا و هیدروکسید پتاسیم 40% استوئین به دی استیل تبدیل می شود و آلفا نفتول به عنوان یک کاتالیزور عمل نموده و تولید رنگ قرمز می نماید.

۳- نمونه اولیه:

کشت تازه میکروبی (کشت خالص ۲۴-۱۸ ساعته)

٤- مواد و معرفها:

- محیط MR/VP
- معرفها :

الف) آلفا نفتول 5gr در اتیل الکل خالص 100ml

ب) هیدروکسید پتاسیم 40% در آب مقطر 100ml

٥- روش انجام کار:

یک لوله درپیچ دار حاوی 2.5ml ، MR/VP Broth را توسط کشت خالص باکتری مورد نظر تلقیح میکنیم و مدت ۴۸-۲۴ ساعت در اتوو 35^0 C قرار می دهیم. سپس یک قطره آلفا نفتول ۵٪ و دو قطره 40% KOH به آن اضافه می نماییم. لوله را به آرامی تکان داده و آن را به طور ثابت به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه قرار می دهیم. ایجاد واکنش و تولید رنگ قرمز در مدت ۱۵ دقیقه یا بیشتر نشانگر وجود دی استیل و مثبت بودن تست VP می باشد. رنگ زرد یا عدم واکنش نشانگر منفی بودن تست VP است.

این آزمایش نباید بیش از یک ساعت بعد از ریختن معرف ها خوانده شود زیرا می تواند نتیجه مثبت کاذب دهد.

٦- برنامه QC:

سوش کنترل مثبت: انتروباکتر آئروژینوزا ، کلبسیلا پنومونیه

سوش کنترل منفی: E coli ATCC 25922

آزمایشگاه مرجع سلامت	راهنمای انجام آزمایش آزمایش دکربوکسیلاسیون (لیزین، اورنیتین و آرژینین)	صفحه 1 از 2

۱- هدف:

کمک در تشخیص افتراقی انتروباکتریاسه ها

۲- اساس تست:

آنزیم های دکربوکسیلاز، اسیدهای آمینه را در محیط کشت دکربوکسیله نموده و آمین تولید می کنند. آمین های تولید شده باعث واکنش قلیایی می شوند. تعدادی از اسیدهای آمینه ابتدا دهیدرولـه شده و بعد دکربوکسیله می شوند.

۳-مواد و تجهیزات مورد نیاز:

- محیط مولر دکربوکسیلاز براث حاوی اسید آمینه
- محیط مولر دکربوکسیلاز براث بدون اسید آمینه
- روغن استریل

٤- مراحل انجام کار:

از کلنی های ایزوله باکتری مورد نظر، در دو لوله مولر دکربوکسیلاز (یک لوله حاوی اسید آمینه و لوله دیگر فاقد اسید آمینه به عنوان لوله کنترل) تلقیح کنید. در هر دو لوله، روی محیط کشت را با روغن استریل، حدود ۱cm بپوشانید. لوله ها را به مدت ۴روز در $35^{o}C$ انکوبه کرده ولی تغییر رنگ آنها را روزانه چک نمایید. تغییر رنگ زرد در اندیکاتور برموکرزول پورپل در لوله کنترل، بیانگر زنده بودن ارگانیسم و تخمیر کننده بودن آن می باشد که در اثر تخمیر گلوگز، PH محیط اسیدی شده و برای عملکرد آنزیم دکربوکسیلاز شرایط فراهم شده است. در طی مراحل ابتدایی انکوباسیون، هر ۲ لوله زرد می شوند که به دلیل تخمیر مقدار کم گلوگز در محیط کشت است. اگر اسید آمینه مصرف شود رنگ محیط حاوی اسید آمینه به رنگ اولیه خود (بنفش) بر می گردد. اگر اسید آمینه مصرف نشود رنگ محیط زرد باقی می ماند، ایجاد رنگ خاکستری در بعضی مواقع به دلیل احیا شدن اندیکاتور است .

توجه: بعضی سویه ها نظیر باکتری های غیر تخمیری (عدم توانایی تخمیر گلوکز) به مدت انکوباسیون ۱۴-۷روز نیاز دارند .جهت تسریع در کار می توان از مقدار کمی محیط کشت همراه با تلقیح مقدار زیادی کلنی خالص باکتری استفاده کرد.

۵- کنترل کیفی:

اسید آمینه	سوش کنترل مثبت	سوش کنترل منفی
Lysine	Enterobacter aerogenes	Enterobacter cloacae
Ornithine	Enterobacter cloacae	Klebsiella pneumoniae
Arginine	Enterobacter cloacae	Enterobacter aerogenes

محیط دیگری که برای دکربوکسیلاسیون لیزین بکار می رود Lysine Iron Agar می باشد که شامل فریک آمونیوم نیترات دیتوسولفات، جهت شناسائی H_2S است. این محیط برای شناسایی سالمونلاها بکار می رود که اغلبH_2S و لیزین دکربوکسیلاز مثبت اند. ایجاد رنگ سیاه در عمق و رنگ بنفش در سطح محیط، نشان دهنده مثبت بودن این ۲ تست است.

٦- تداخلات:

عده ای معتقدند استفاده از محیط لیزین براث نسبت به محیط مولر دکربوکسیلاز ارجح است. زیرا در محیط لیزین براث فقط به قلیایی شدن و تغییر رنگ اندیکاتور PH نیاز است. (نه به شرایط هوازی یا محیط اسیدی) اما این محیط نمی تواند برای بعضی از باکتری ها مثل کلبسیلا، انتروباکتر، سراشیا و هافنیا استفاده شود. زیرا این باکتری ها استیل متیل کربونیل تولید می کنند که با PH قلیایی نهایی تداخل کرده و واکنش منفی کاذب می دهد.

آزمایشگاه مرجع سلامت	راهنمای انجام آزمایش تحمل نمک	صفحه 1 از 1

۱- هدف:

جداکردن انتروکوک ها از استرپتوکوکهای نان انتروکوک گروه D

۲- اساس آزمایش:

محیط های مایع مغذی که جهت رشد اکثر باکتری ها به کار میروند(از جملهHeart Infusion broth) حاوی0.5% Nacl می باشند، که با افزایش نمک آنها به 6.5%، محیط نیمه انتخابی برای رشد انتروکوک ها فراهم می شود که سایر باکتری ها قادر به رشد در آن نمی باشند.

۳- نمونه اولیه:

- کشت تازه (۲۴-۱۸ ساعته)

٤- مواد لازم:

- محیط مایع مغذی حاوی6.5% Nacl که می توان در ساخت آن از اندیکاتور نیز استفاده نمود (1.6gr بروموکرزول بنفش purple در 100ml اتانول 95%) .
- می توان از محیط آگار حاوی 6.5% Nacl نیز به جای محیط مایع استفاده نمود.

٥- روش انجام کار:

- ۴-3 کلنی از کشت تازه باکتری مورد نظر را به مدت 24 تا 48 ساعت در اتوو 35 °C حاوی7-5% CO_2 انکوبه می نماییم.
- وجود رشد واضح در محیط کشت بدون اندیکاتور و تغییر رنگ در محیط کشت دارای اندیکاتور، بیان گر واکنش مثبت است.
- چنانچه ارگانیسم مورد نظر بایل اسکولین مثبت ورشد در 6.5% Nacl نیز مثبت باشد، میکروارگانیسم انتروکوک میباشد و چنانچه ارگانیسم مورد نظر بایل اسکولین مثبت و رشد در 6.5% Naclنیز منفی باشد، میکروارگانیسم، استرپتوکوک گروه D نان انتروکوک می باشد.

٦- تداخلات:

- در صورت تلقیح زیاد به محیط کشت Broth ممکن است کدورت زیاد آن به عنوان رشد در نظر گرفته شود و نتیجه مثبت کاذب گزارش شود.
- به هنگام بررسی لوله را به آرامی تکان دهید، زیرا ممکن است میکروب در طی اتووگذاری در ته لوله ته نشین شده باشد و اشتباهاً نتیجه منفی کاذب گزارش شود.
- بیش از ۸۰٪ استرپتوکوک های گروه B و گاهی استرپتوکوک های گروه A در 6.5% Nacl رشد می کنند.

۷- برنامه QC:

سوش کنترل مثبت: انتروکوک فکالیس

سوش کنترل منفی: استرپتوکوک گروه D نان انتروکوک

آزمایشگاه مرجع سلامت	دستورالعمل	صفحه 1 از 1
	تهیه کدورت استاندارد نیم مک فارلند	

۱- هدف:

جهت استاندارد کردن غلظت تلقیح برای آزمایش تعیین حساسیت میکروبی، باید از استاندارد سولفات باریم ($BaSo_4$)، برابر با استاندارد نیم مک فارلند استفاده شود.

۲- مواد و ابزار لازم:

کلرور باریم دهیدراته، اسیدسولفوریک، مزور، بالن ژوژه، لوله آزمایش در پیچ دار استریل

۳- روش انجام کار:

استاندارد نیم مک فارلند سولفات باریم به روش زیر تهیه می شود :

۱) ۰/۵ ml از کلرور باریم ($BaCl_2$) ۰/۰۴۸ mol/l (۱/۱۷۵٪ W/V$BaCl_2.2H_2O$) را به ۹۹/۵ml اسید سولفوریک ۰/۱۸ mol/l (۱٪ V/V) اضافه کنید و با هم زدن مداوم سوسپانسیون بدست آورید.

۲) چگالی صحیح کدورت استاندارد با استفاده از اندازه گیری جذب در اسپکترو فتومتر با طول مسیر نوری 1 cm، مشخص شود. جذب در ۶۲۵ nm باید بین ۰/۰۸ تا ۰/۱۳ باشد.

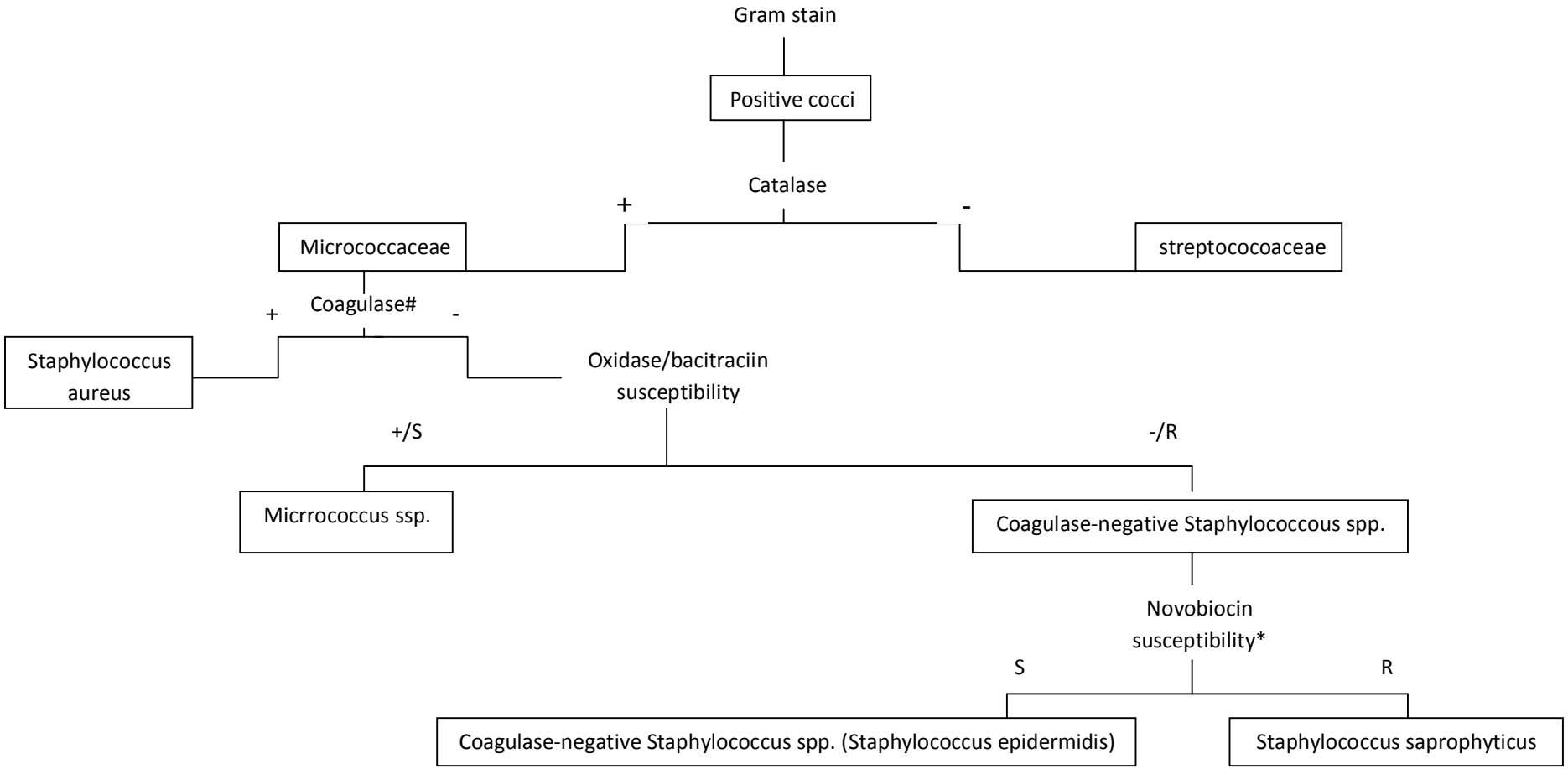
۳) سوسپانسیون سولفات باریم باید به مقدار ml ۶-۴ در لوله های در پیچ دار هم اندازه با لوله های سوسپانسیون باکتریایی ریخته شود.

۴) درب این لوله ها باید محکم بسته شوند و در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری گردند.

۵) استاندارد سولفات باریم قبل از هر بار استفاده باید به شدت (ترجیحا با ورتکس مکانیکی) همزده شود، تا کدورت یکنواختی ایجادگردد. در صورت مشاهده ذرات بزرگ، باید استاندارد تازه ای تهیه گردد.

۶) استاندارد سولفات باریم باید به صورت ماهانه جایگزین شود یا جذب آن اندازه گیری گردد.

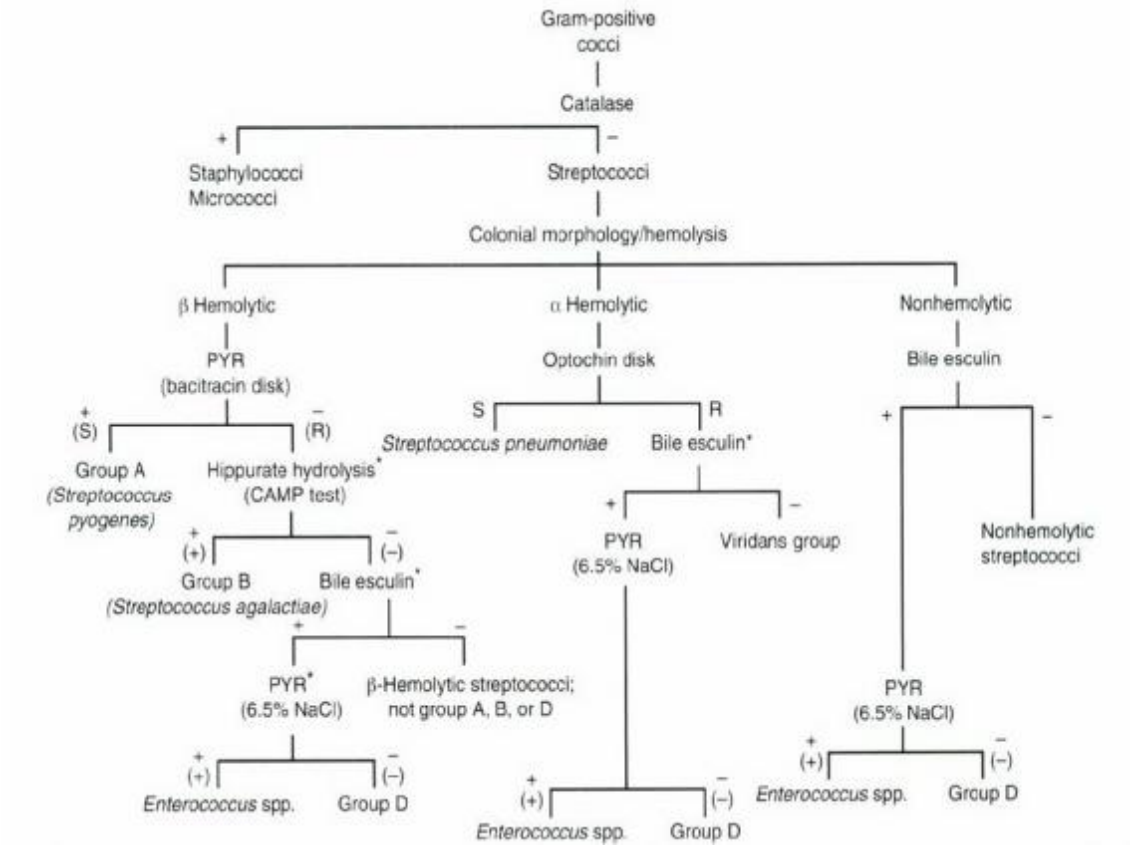
چارت شناسائی گونه های استافیلوکوک



#علاوه برS.aureus، S.lugdunensis، S.intermedius، S.schleferi و S.tryicus نیز کواگولاز مثبت میباشند.

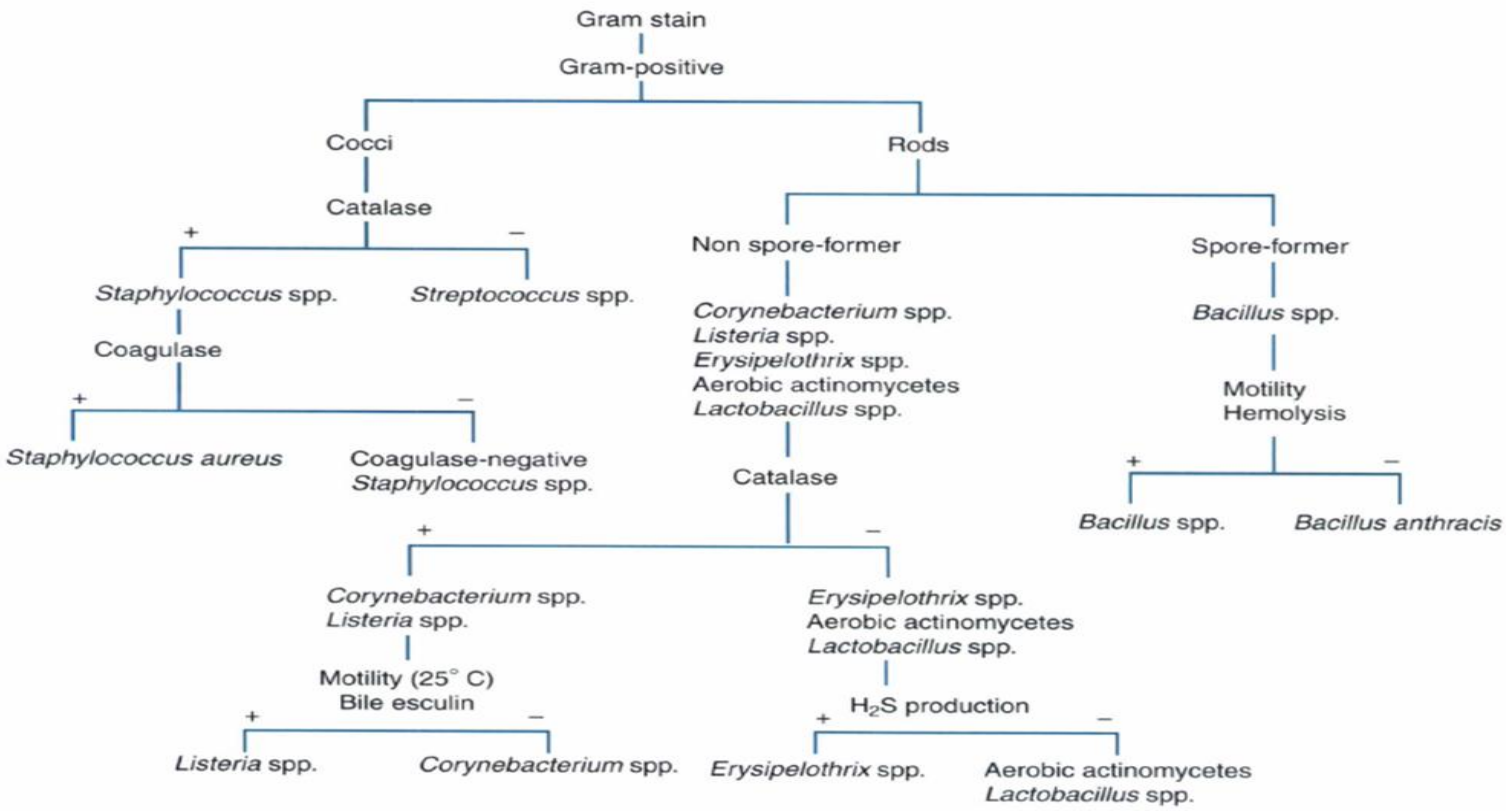
*Novobiocin susceptibility⟶S:16mm≤

چارت شناسائی کوکسی های گرم مثبت کاتالاز منفی

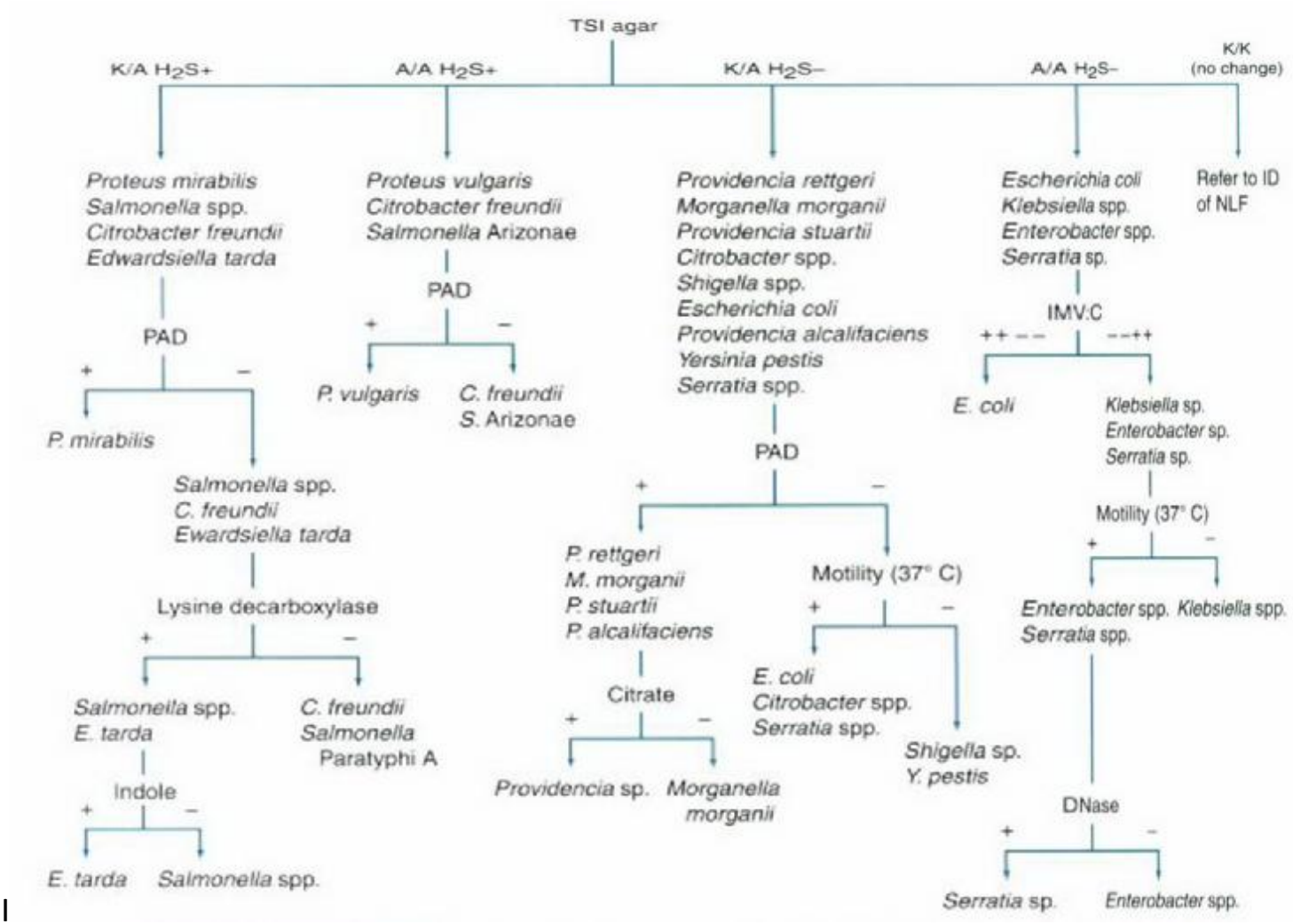


*Optochin disk ≥14mm:S <9mm:R 9-13mm:Do Bile esculin

چارت شناسائی باسیل های گرم مثبت



چارت تشخیص احتمالی انتروباکتریاسه ها در برخورد با آگار



TSI

- شناسائی گونه های انتروباکتریاسه با توجه به واکنش آنها در محیطهای TSI و LIA

A, Acid
@, acid and gas production
H_2S, hydrogen sulfide
K, alkaline
LIA. Lysine iron agar
NC. no change
TSI. triple sugar iron agar

TSI Reactions‡	LIA Reactions‡	Possible Identification
K/Ⓐ *or* K/A H_2S +	K/K *or* K/NC H_2S +	*Salmonella* spp. *Edwardsiella* spp.
K/A H_2S+	K/K *or* K/NC H_2S +	*Salmonella* spp. (rare)
K/Ⓐ	K/K *or* K/NC	*Salmonella* spp. (rare)
K/A	K/K *or* K/NC H_2S +	*Salmonella typhi* (rare)
K/Ⓐ	K/K *or* K/NC	*Salmonella* spp. (rare)
K/Ⓐ	K/A H_2S +	*Salmonella paratyphi* A (usually H_2S–)
K/Ⓐ	K/A *or* A/A	*Escherichia coli* *Salmonella paratyphi A* *Shigella flexneri* 6 (uncommon) *Aeromonas* spp. (oxidase-positive)
K/A	K/K *or* K/NC	*Plesiomonas* sp. (oxidase-positive) *Salmonella typhi* (rare) *Vibrio* spp. (oxidase-positive)
K/A	K/A *or* A/A	*Escherichia coli* *Shigella* groups A-D *Yersinia* spp.
A/Ⓐ H_2S +	K/K *or* K/NC H_2S +	*Salmonella* spp. (rare)
A/Ⓐ	K/A *or* A/A	*Escherichia coli* (rare)
A/A	K/A *or* A/A	*Escherichia coli* *Yersinia* spp. *Aeromonas* spp. (oxidase-positive) *Vibrio cholerae* (rare, oxidase-positive)
A/A	K/K *or* K/NC	*Vibrio* spp. (oxidase-positive)

مشخصات بیوشیمیائی گونه های انتروباکتریاسه

Tests or Substrate	Escherichieae	Edwardsielleae	Citrobacteriaceae	Salmonelleae*	Klebsielleae	Proteeae†	Yersinieae
Hydrogen sulfide (TSI agar)	–	+	+ or –	+	–	+ or –	–
Urease	–	–	(+w) or –	–	– or (+)	+ or –	+
Indole	+ or –	+	– or +	–	–	+ or –	+ or –
Methyl red	+	+	+	+	–	+	+
Voges-Proskauer	–	–	–	–	+	–	–
Citrate (Simmons)	–	–	+	+	+	d	–
KCN	–	–	+ or –	–	+	+	–
Phenylalanine deaminase	–	–	–	–	–	+	–
Mucate	d	–		d	+ or –	–	
Mannitol	+ or –	–	+	+	+	– or +	+

Modified from Ewing WH: *Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae*, ed 4, East Norwalk, Conn, 1986, Appleton & Lange.

+, ≥90% positive within 1 or 2 days; (+), positive reaction after 3 or more days (decarboxylase tests: 3 or 4 days); –, ≥90% no reaction in 30 days; + *or* –, most cultures positive, some strains negative; – *or* +, most strains negative, some cultures positive; *d*, different reactions, +, (+), –; +w, weakly positive reaction *TSI*, triple sugar iron; *KCN*, potassium cyanide.

**Salmonella* serovar Typhi and Paratyhpi and some rare serovars fail to use citrate in Simmons medium. Cultures of serovar Paratyhpi and some rare serotypes may fail to produce hydrogen sulfide; an occasional strain of almost serotype of *Salmonella* genus may be hydrogen sulfide negative.

†Some cultures of *Proteus mirabilis* may yield positive Voges-Proskauer tests.

راهنماي انتخاب محيط هاي كشت براي نمونه هاي مختلف

	محيط هاي كشت براي بازيابي باكتريهاي هوازي و بي هوازي اختياري					محيط هاي كشت براي بازيابي باكتريهاي بي هوازي		
محيط / نمونه	**BAP(**blood agar plate)	**MAC(**MacConkey agar) **or EMB(**eosin methylene blue)	**CBA(**chocolate blood agar)	**Broth**	**Other**	**BAP(**blood agar plate)	**BBE(***Bacteroides* bile esculin agar**)**	**PEA(**phenylethyl alcohol**)**
حفرات بدن					BCB((blood culture bottles) جهت حجمهای زیاد			
مايعات								
مايع مغزي نخاعي	X		X	X (برای نمونه های شانت)				
مايع صفاقي	X	X	X		**BCB**(blood culture bottles)	X	X	X
مايع جنبي؛ مايع پريكارد	X		X	X	BCB	X		
مايع سينوويال	X		X	X	**BCB**			
زخم ها								
آسپيره	X	X	X			X	X	X
سواب	X	X				جهت كشت بيهوازی توصيه نميشود		
بافت	X	X	X	X		X	X	X
مجراي تنفسي								
خلط	X	X	X					
گلو	X							
لاواژ برونش	X	X	X		**CYE**(charcoal yeast extract; for *Legionella* or *Nocardia* requests)			
براش؛ شستشوها	X	X	X			X	X	X
بيني	X							

	محيط هاي كشت براي بازيابي باكتريهاي هوازي و بي هوازي اختياري					محيط هاي كشت براي بازيابي باكتريهاي بي هوازي		
محيط / نمونه	**BAP(**blood agar plate)	**MAC(**MacConkey agar) **or EMB(**eosin methylene blue)	**CBA(**chocolate blood agar)	**Broth**	**Other**	**BAP(**blood agar plate)	**BBE(***Bacteroides* bile esculin agar**)**	**PEA(**phenylethyl alcohol**)**
ادراري تناسلي								
واژينال/ ركتال جهت استرپتوكوكهاي گروه B (GBS)				**LIM**(enrichment broth for Group B Streptococcus)	Selective or chromogenic GBS media			
ساير موارد	X	X	X		**GC media**(Thayer–Martin or Martin–Lewis or other media enriched for recovery of *N. gonorrhoeae*)	X	X	X
سرويكس					GC media			
پيشابراه/ آلت تناسلي مرد					GC media			
ادرار								
ادرار مياني	X	X			Screen; chromagar			
آسپيره سوپراپوبيك	X	X						
مدفوع			X	**EB**(enrichment broth)	**HE**(Hektoen enteric agar) or **XLD**(xylose–lysine–deoxycholate agar) **Campy**(Campylobacter-selective medium)			
چشم	X	X	X			X		
گوش؛ آسپيره گوش مياني	X	X				X		
كاتترهاي عروقي	X							

آزمایشگاه مرجع سلامت	راهنمای انجام آزمایش حساسیت به باسیتراسین	صفحه 1 از 1

۱- هدف:

افتراق میکروکوک و استوماتوکوک از استافیلوکوک

۲- اساس آزمایش:

باسیتراسین آنتی بیوتیکی است که سبب مهار رشد میکروکوک ها می گردد ولی بر رشد استافیلوکوک ها اثر مهاری ندارد .

۳- نمونه اولیه:

- کشت ۲۴- ۱۸ ساعته از ارگانیسم مورد نظر روی Trypticase Soy Broth

٤- مواد و ابزارلازم:

- دیسک باسیتراسین (4U ٪)
- محیط کشت بلاد آگار یا مولر هینتون آگار
- محلول میکروبی با کدورت نیم مک فارلند
- سواب استریل

٤- روش انجام کار:

می توان از محیط بلاد آگار یا مولر هینتون آگار استفاده نمود.

بعداز یک شبانه روز انکوباسیون، قطر هاله عدم رشد اندازه گرفته می شود، استافیلوکوک ها به باسیتراسین مقاومند و هیچ هاله عدم رشدی مشاهده نمی شود. اما میکروکوک ها به آن حساسند. (قطر هاله عدم رشد (>10mm)

۵- برنامه کنترل کیفی (QC):

کنترل مثبت : *Micrococcus Luteus* با هاله عدم رشد بزرگتر از ۱۰ میلی متر (از یک نمونه میکروکوک لوتئوس موجود در آزمایشگاه استفاده کنید.)

کنترل منفی :*Staphylococcus Epidermidis* ATCC 14995: هاله ای از عدم رشد وجود ندارد.

دستورالعمل تهیه انواع محیط های کشت، معرفها و رنگ های مصرفی در آزمایشگاه میکروب شناسی، به شرح ذیل می باشد:

روش تهیه انواع محیط های کشت دهیدراته و استریلیزاسیون آنها

روش کار بر اساس دستورالعمل موجود بر روی قوطی های حاوی انواع محیط های کشت می‌باشد. روش استریلیزاسیون نیز بر روی برچسب دستورالعمل تهیه محیط کشت درج گردیده است. این دستورالعمل ها بر حسب نوع محیط کشت و کارخانه تولیدکننده، متفاوت است.

محیط های کشت دهیدراته شامل:

آگار بی هوازی، بلاد آگار(B.A)، برین هارت آگار و براث (BHB/BHA)، بایل اسکولین آگار، بیسموت سولفیت آگار، بروسلا مدیوم، کوکدمیت براث، کمپیلوباکتر سلکتیو آگار، کری بلر، کازو آگار و براث (TSA/TSB)، CTA مدیوم، DNase تست آگار، EMB آگار، هموفیلوس سلکتیو آگار، هکتون انتریک آگار، کلایگلر آیرون آگار (KIA)، لایزین دکربوکسیلاز سولفیدراز مدیوم (LDS)، لوون اشتاین جنسن مدیوم، لوفلر بلاد سرم، لایزین آیرون آگار، مولر هینتون آگار و براث (MHA/MHB)، MRVP براث، مانیتول سالت آگار، مک کانکی آگار، مالونات براث، نوترینت آگار و براث (N.A/N.B)، نیترات براث، اورنی تین دکربوکسیلاز آرژینین دهیدرولاز تست براث، OF بازال مدیوم، پپتون واتر، فنیل آلانین آگار، فنل رد براث و آگار، پپتون آگار، سیمون سیترات آگار، SIM مدیوم، سالمونلا شیگلا آگار (S.S)، سلنیت براث، تریپل شوگر آیرون آگار (TSI)، TCBS آگار، تایو گلیکولات براث، اوره آگار و براث، XLD آگار و سایر محیط های کشت دهیدراته که در دفتر راهنمای محیط های کشت ثبت شده اند می باشد.

روش تهیه محیط کشت ژلاتین (ترکیبی)

پپتون= ۵ g

۳ g = Beef Extract

ژلاتین= ۱۲۰ g

مقادیر فوق را به ۱۰۰۰cc آب مقطر اضافه کرده و در بن ماری جوش قرار دهید تا کاملاً حل شوند (از حرارت دادن این محیط کشت بر روی شعله پرهیز کنید). سپس در اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه و دمای ^{o}C ۱۲۱ در فشار ۱۵ پوند (Lb ۱۵) استریل نمایید. سپس در لوله تقسیم کرده و PH محیط کشت را به ۶/۸ برسانید

روش تهیه محیط کشت آب پپتونه قلیایی یا APW (ترکیبی)

پپتون= ۱۰g

کلرور سدیم (Nacl)= ۱۰g

آب‌مقطر= ۱۰۰۰cc

سپس pH را به ۹-۸/۶ برسانید و در شرایط ۱۵ دقیقه، فشار Lb ۱۵ در اتوکلاو قرار داده و استریل نمایید. دما نیز ^{o}C ۱۲۱ است. (برای تنظیم از سود N ۱ استفاده کنید)

روش تهیه محیط کشت حاوی گلیسرین جهت دیپ فریز

از محیط کشت پایه: محیط TSB (Trypticase Soy Broth) یا محیط کشت BHB (Brain Heart Infusion Broth) استفاده کنید. به میزان ۱۵٪ گلیسرین به محیط پایه اضافه نمایید. به خوبی تکان دهید تا محلول یکنواختی حاصل شود. سپس در مقادیر کم (ml ۲-۱) در لوله های درپیچ دار تقسیم نموده و در شرایط ^{o}C ۱۲۱ ، ۱۵ دقیقه و فشار Lb ۱۵ اتوکلاو نمایید.

روش تهیه محیط کشت NaCl ۶/۵٪ (براث/ آگار)

محیط پایه همان محیط برین هارت اینفیوژن براث/آگار است. از آنجا که این محیط کشت حاوی ۰/۵٪ نمک می‌باشد، بنابراین ۶٪ نمک به این محیط پایه اضافه نمایید تا مقدار ۶/۵٪ نمک حاصل شود. شرایط استریلیزاسیون همان دمای ^{o}C۱۲۱، فشار Lb ۱۵ و زمان ۱۵ دقیقه می‌باشد.

روش تهیه انواع قندها:

محلول ۱۰٪ از انواع قندها تهیه نمایید (قند= g۱۰ و آب‌مقطر= cc۱۰۰)

روش استریلیزاسیون قندها استفاده از فیلتراسیون می‌باشد. در غیر اینصورت می توان همه انواع قندها را در فشار Lb ۵ به مدت ۵ دقیقه استریل نمود.

اگر بخواهید قندها را از هم تفکیک نمایید، شرایط استریلیزاسیون برای انواع لاکتوز، مالتوز، گزیلوز، سالیسین، سوکروز، ترهالوز و آرابینوز شامل فشار Lb ۱۵، دمای ^{o}C ۱۲۱ به مدت ۳ دقیقه و شرایط استریلیزاسیون برای سایر قندها شامل فشار Lb ۱۲-۱۰، دمای ^{o}C ۱۱۸-۱۱۶ و زمان ۱۵ دقیقه می باشد.

روش تهیه انواع معرف ها و رنگ ها

روش تهیه معرف های VP

- تهیه آلفا نفتول (معرفA):

پودرآلفا نفتول: g ۵

اتانول: cc۱۰۰

-تهیه KOH (پتاس) (معرفB):

KOH: g۴۰

کراتین (cr): g ۰/۳

آب‌مقطر: cc۱۰۰

معرف ها در ظروف تیره و در یخچال نگهداری می‌شوند. چون دارای پایداری متغیر هستند لازم است به طور هفتگی (بر حسب میزان کار) کنترل کیفی گردند.

روش تهیه معرف متیل رد (MR)

پودر متیل رد= ۰/۱ g

اتانول= ۳۰۰cc

پودر متیل رد را در اتانول حل کرده سپس با آب مقطر حجم آنرا به ۵۰۰cc برسانید. معرف در ظرف تیره و در یخچال نگهداری می‌شود. چون دارای پایداری متغیر است، لازم است بطور هفتگی (بر حسب میزان کار) کنترل کیفی گردد.

روش تهیه معرف کواکس

P–دی متیل آمینو بنز آلدئید= ۱۰g

آمیل الکل: ۱۵۰cc

اسید کلریدریک غلیظ و تازه: ۵۰cc

دی متیل آمینو بنزآلدئید را به آمیل الکل اضافه نموده و به آرامی اسید کلریدریک را به آنها اضافه نمایید. برای تهیه این معرف از هود استفاده نمایید. معرف در ظروف تیره و در یخچال نگهداری می شود. چون دارای پایداری متغیر است، لازم است بطور هفتگی (برحسب میزان کار) کنترل کیفی گردد.

روش تهیه معرف کلرور فریک

کلرور فریک= ۱۰g

آب مقطر = ۱۰۰cc (روش غیر اسیدی)

(روش دیگر تهیه این معرف شامل کلرور فریک: ۱۲g، اسید کلریدریک غلیظ: ۲/۵cc و آب مقطر ۱۰۰cc می‌باشد، که این روش، روش اسیدی است). معرف در ظروف تیره و در یخچال نگهداری می‌شود. چون دارای پایداری متغیر است، لازم است بطور هفتگی (برحسب میزان کار) کنترل کیفی گردد.

روش تهیه معرف های احیاء نیترات

-تهیه معرف A:

N، N دی متیل آلفا نفتیل آمین: ۶g

اسیداستیک گلاسیال۵N، (۳۰٪): ۱۰۰۰cc

مقدار فوق از N، N دی متیل آلفا نفتیل آمین را در کمتر از ۱۰۰۰cc اسید استیک گلاسیال ۵N حل کرده و کمی حرارت ملایم دهید تا حل شود. حجم را به یک لیتر رسانیده، محلول را از صافی رد کنید.

-تهیه معرف B:

سولفانیلیک اسید (P- آمینو بنزن سولفونیک اسید): ۸g

اسیداستیک گلاسیال ۵N، (۳۰٪): ۱۰۰۰ cc

مقدار فوق از سولفانیلیک اسید را در کمتر از ۱۰۰۰ cc اسیداستیک حل کرده و سپس حجم را به یک لیتر برسانید. معرف ها در ظروف تیره و در یخچال نگهداری می شوند. آلفا نفتیل آمین سرطان زا است.

روش تهیه معرف نین هیدرین

پودر نین هیدرین= ۳/۵ g

استن= ۵۰ cc

بوتانول = ۵۰ cc

استن و بوتانل را مخلوط کرده و سپس پودر نین هیدرین را اضافه نمایید. معرف در ظرف تیره و در دمای اتاق نگهداری می شود. درب آن باید کاملاً محکم بسته شود.

روش تهیه ویتامین K_1

پودر ویتامین k_1= ۰/۲g

اتانول= ۲۰cc

محلول در ظرف تیره و در یخچال نگهداری می‌شود. درب ظرف باید کاملاً محکم بسته شود. غلظت نهایی محلول ۰/۱ µg/ml برای محیط های مایع و ۱۰µg/ml برای محیط های آگاردار است. ۰/۲g پودر ویتامین K_1 را روی یک قطعه کوچک فویل آلومینیومی استریل وزن کرده و در شرایط آسپتیک به ۲۰ml اتانول در یک بطری استریل اضافه کنید. برای رقیق سازی بیشتر از آب مقطر استریل استفاده کنید. محلول ذخیره ۱۰mg/ml است. ۱ml از محلول ذخیره را به یک لیتر آگار و ۰/۰۱ ml/l براث اضافه کنید. محلول را دور از نور و در یخچال ذخیره کنید.

روش تهیه همین(Haemine)

پودر همین= ۰/۵ g

سود (NaOH) ۱N= ۱۰cc

مقدار فوق از پودر همین را به ۱۰cc سود ۱ نرمال اضافه کرده و حل کنید، سپس با آب مقطر به حجم ۱۰۰cc برسانید. در شرایط ۱۵ دقیقه، ۱۲۱^{o}C، فشار ۱۵ Lb در اتوکلاو استریل نمایید.

محلول در ظرف تیره و در یخچال نگهداری می شود. این محلول ذخیره ۵ mg/ml غلظت دارد، ولی هنگام مصرف به عنوان ساپلمنت، باید دارای غلظت نهایی ۵ µg/ml باشد.

روش تهیه آب اکسیژنه (H_2O_2) ۳٪

محلول آب اکسیژنه ۳۰٪ را به نسبت ۱:۱۰ با آب مقطر رقیق نمایید. (یعنی ۱cc آب اکسیژنه ۳۰٪ را به ۹cc آب‌مقطر اضافه نمایید). محلول در ظرف تیره و در یخچال نگهداری می شود.

روش تهیه کریستال ویوله ذخیره و اگزالات آمونیوم ذخیره

-تهیه کریستال ویوله

پودر کریستال ویوله = ۲۰g

اتانول= ۱۰۰cc

-تهیه اگزالات آمونیوم

پودر اگزالات آمونیوم= ۱g

آب مقطر= ۱۰۰cc

هنگام مصرف، محلول کریستال ویوله ذخیره را به نسبت ۱:۱۰ با آب مقطر رقیق نمایید. (۱cc از محلول کریستال ویوله و ۹ cc آب مقطر) سپس این محلول را با چهار حجم از محلول اگزالات آمونیم رقیق کنید (۱cc محلول کریستال ویوله رقیق شده و ۴cc اگزالات آمونیم).

محلول ذخیره و مصرفی کریستال ویوله، در ظرف تیره و در دمای اتاق نگهداری می‌شود.

روش تهیه لوگل

ید= ۱g

یدور پتاسیم = ۲g

آب مقطر= ۲۴۰cc

محلول آبی بیکربنات سدیم۵٪= ۶۰cc

در مقدار کمی از آب مقطر، ید و یدور پتاسیم را کاملاً حل نمایید، بعد حجم را با آب مقطر به ۲۴۰cc برسانید. محلول ۵٪ بیکربنات سدیم (بیکربنات سدیم: ۵g آب مقطر: ۱۰۰c) را نیز به آن اضافه نمایید. محلول در دمای اتاق نگهداری می شود . درب آنرا باید کاملا" محکم ببندید.

روش تهیه محلول الکل-استون

اتانول= ۲۵۰cc

استون= ۲۵۰cc

حجم مساوی از الکل اتیلیک (اتانول) را با استون مخلوط نمایید.

روش تهیه فوشین/ یا سافرانین ذخیره

پودر فوشین= ۲g

اتانول= ۱۰۰cc

و یا

پودر سافرانین= ۲/۵g

اتانول= ۱۰۰cc

به هنگام مصرف، محلول ذخیره فوشین یا محلول ذخیره سافرانین را به نسبت ۱:۱۰ با آب مقطر رقیـق نماییـد. محلولها در ظروف تیره، تهیه و در دمای اتاق ذخیره می شوند.

تهیه و کنترل کیفیت محیط های کشت

نکات عمومی در مورد محیط های کشت:

آب:

کیفیت محیط های کشت بطور مستقیم بستگی به کیفیت مواد خام مورد استفاده در تهیه آنها دارد. آب یکی از مهمترین موادی است که در تهیه محیط های کشت بکار میرود. سه معیار مهم برای آب مورد استفاده در تهیه محیط های کشت شامل وجود یونهای مس، قدرت هدایت الکتریکی و pH می باشد. در شرایط ایده آل یونهای مس بدلیل خاصیت مهارکنندگی برای اغلب میکروارگانیسم ها نباید در آب مورد استفاده جهت تهیه محیط های کشت وجود داشته باشد. قدرت هدایت الکتریکی آب باید کمتر از ۱۵ میکرو زیمنس باشد وهمچنینpH آب مورد استفاده بهتر است کمی اسیدی باشد ولی نباید کمتر از ۵/۵ باشد.

توزین محیط کشت و افزودن آب:

طبق دستورالعمل تهیه محیط کشت که بر روي قوطي نصب گرديده است، مقدار مناسبي از پودر محيط كشت را با دقت وزن نماييد. ظرف محيط كشت را دور از كوران هوا و رطوبت باز كنيد. از استنشاق پودرها به خصوص آنهايي كه داراي مواد سمي هستند و تماس طولاني مدت آنها با پوست اجتناب كنيد. پودر را به سرعت، به دقت و بدون ايجاد توده اي از غبار وزن كنيد. هرچه زودتر درب ظرف را ببنديد. نصف حجم آب مورد نياز را داخل ظرف بريزيد. سپس مقدار وزن شده محيط كشت را به آن اضافه نماييد. براي چند دقيقه به تندي تكان دهيد. باقيمانده آب را به ديواره ظرف بريزيد تا ذرات محيط كشت چسبيده به ديواره نيز وارد محلول شوند. اين مرحله بسيار مهم است، چون پودر خشک محيط كشت در بالاي سطح آب، ممكن است در اتوكلاو استريل نشود و منبع آلودگي گردد.

حل کردن محیط کشت:

محيط هاي كشت بدون آگار، معمولا با تكان دادن آهسته و ملايم حل خواهند شد. اما محيط هاي كشت حاوي آگار بايد قبل از حرارت دادن به مدت چند دقيقه با آب مخلوط شوند. سپس حرارت داده شوند تا آگار قبل از اتوكلاو كردن، حل شود. محيط هاي كشت را بجوشانيد بدون آنكه بسوزند.

محيط هاي كشتي كه نبايد اتوكلاو شوند، بعد از اين مقدار حرارت دادن، براي تقسيم داخل پليت ها يا ظروف ديگر آماده خواهند بود. اكثر محيط هاي كشت به استريليزاسيون نهايي (در دماي C $^{\circ}$ ۱۲۱ به مدت ۱۵ دقيقه) نياز خواهند داشت.

اندازه گيري و تنظيم pH:

محيط هاي كشت دهيدراته اگر بطور مناسب تهيه شوند نيازي به تنظيم pH ندارند. pH نهايي محصول استريل شده را مي توان روي پليت يا بطري اندازه گيري كرد، اما بايد آنها را بعد از سنجش pH دور ريخت. بنابراين بعد از استريل شدن و خنک شدن محيط كشت تا دماي C ˚۲۵، مقدار pH را در حد مورد نظر (۰/۲ ±) تنظيم نماييد. تنظيم pH معمولا با استفاده از هيدروكسيد سديم ۴۰ گرم در ليتر (تقريبا" يک مولار) و يا با استفاده از اسيد كلريدريک ۳۶/۵ گرم در ليتر (تقريبا" يک مولار) انجام مي شود.

توزيع:

محيط كشت را در ظرفي مناسب با حجم ۲ تا ۳ برابر حجم محيط كشت بريزيد تا بتوانيد آنرا به خوبي تكان دهيد و مخلوط كنيد.

استريليزاسيون:

بعضي از محيط هاي كشت به استريليزاسيون با اتوكلاو احتياجي نداشته و با جوشاندن استريل مي شوند كه دستور ساخت آنها بر روي برچسب قوطي محيط كشت قيد گرديده است. استريليزاسيون ساير محيط هاي كشت توسط حرارت مرطوب يا صافي غشايي انجام مي گردد كه اين موارد نيز بر روي بر چسب قوطي محيط كشت قيد گرديده است.

الف) استريليزاسيون با حرارت مرطوب:

استريليزاسيون محيط كشت تا حجم يک ليتر، در اتوكلاو به مدت ۱۵ دقيقه و در دماي C ˚۱۲۱ (فشار ۱/۲ كيلوگرم بر سانتيمترمربع) انجام مي گيرد. براي حجم هاي بيشتر از يک ليتر بايد چرخه استريليزاسيون را بطور مناسب تغيير داد. اما چون اكثر مشكلات در استريليزاسيون محيط هاي كشت وقتي رخ ميدهد كه مقادير بيشتر از دو ليتر محيط كشت بايد استريل شود، لذا توصيه مي شود كه مقادير زياد محيط كشت را در حجم هاي كوچكتر تقسيم نماييد.

كنترلی كيفی اتوكلاو ، كنترل دما و فشار اتوكلاو بايستی بطور مداوم انجام گردد. برای كنترل اتوكلاو از انديكاتورهای شيميائی TST استفاده می كنند. از انديكاتورهای بيولوژيكی كه جهت كنترل كارائی اتوكلاو استفاده می كنند اسپور *Bacillus Stearothermophilus* را می توان نام برد كه بصورت تجاری قابل دسترس می باشد.

ب) استريليزاسيون با صافي غشايي:

از صافي غشايي براي استريل كردن محيط هاي كشت و تركيبات حساس به حرارت استفاده مي شود. استريليزاسيون بوسيله صافي غشايي تحت شرايط خلاء يا افزايش فشار انجام مي پذيرد. از غشاء ها و صافيهاي با قطر منفذ ۰/۲۲ يا ۰/۴۵ ميكرومتر استفاده نماييد. اين فيلترها بايد قبل از استفاده، در اتوكلاو استريل شوند. در مورد غشاء ها و صافيهايي كه در بسته بنديهاي استريل به فروش مي رسند، به دستورالعمل سازنده مراجعه نماييد. قسمت هاي مختلف دستگاه صافي را با صافي يا بدون صافي در اتوكلاو به مدت ۱۵ دقيقه در دماي C ° ۱۲۱ استريل نماييد.

آماده سازي جهت مصرف:

بعد از استريليزاسيون، اجازه دهيد دماي محيط كشت به حدود C ° ۵۰ برسد، سپس با رعايت شرايط آسپتيک در ظروف نهايي تقسيم نماييد. هيچ وقت محيط كشت را در دماي بالاتر از C ° ۵۰ تقسيم نكنيد. مكمل هاي حساس به گرما و حرارت بايد بعد از اين كه دماي محيط كشت به حدود C ° ۵۰ رسيد، به آن اضافه شوند. اجازه دهيد دماي مكمل (ساپلمنت) استريل قبل از اين كه به محيط كشت اضافه شود، به دماي اتاق برسد. سپس مكمل را با رعايت شرايط آسپتيک به محيط كشت اضافه نموده، خوب مخلوط كنيد و در ظروف نهايي كه از قبل استريل شده اند، تقسيم نماييد.

پتری دیش:

کیفیت پتری دیش های مورد استفاده در تهیه محیط نیز اهمیت دارد. معمولاً پتری دیش ها را با اتیلن اکساید ویا اشعه گاما استریل می کنند. در صورت استفاده از پتری دیش هایی که با اتیلن اکساید استریل شده باشند بایستی از نظر وجود بقایای این ماده بررسی شود زیرا اتیلن اکساید دارای خاصیت مهار کنندگی برای میکروارگانیسم ها می باشد و می توان آن را با روش کروماتوگرافی اندازه گرفت. در صورت استفاده از پتری دیش های شیشه ای بایستی از پتری دیش هایی از جنس بروسیلیکات استفاده کرد. استفاده از پتری دیش هایی از جنس قلیائی ممکن است موجب آزاد سازی قلیا در داخل محیط کشت گردد.

پارامترهای فیزیکی:

محیط کشت های تهیه شده باید قبل از استفاده، از لحاظ فیزیکی و ظاهری نیز بررسی شوند. معیارهای ظاهری قابل بررسی شامل وجود حباب، حفره، ناصافی سطح محیط، ترک خوردگی، یخ زدگی می باشد. ضخامت محیط نیز اهمیت دارد. ضخامت محیط های کشت پلیتی نباید کمتر از ۳ میلی متر باشد.

نگهداری محیط های کشت تهیه شده:

طول عمر محیط های کشت تهیه شده بستگی به نوع اجزاء تشکیل دهنده محیط، نحوه نگهداری و ذخیره کردن آنها دارد. تمامی محیط های کشت باید دور از نور نگهداری شوند. تابش نور به محیط های کشت موجب تشکیل مواد باکتریوستاتیک و باکتریساید مانند پراکسیداز می گردد. طول عمر اغلب محیط های کشت پليتي در دمای ۴ درجه سانتیگراد یک هفته می باشد ولی اگر در داخل کیسه های پلاستیکی بسته بندی شوند بطوریکه هوا داخل آنها نفوذ نکند تا ۴-۳ هفته قابل مصرف هستند. طول عمر محیط های کشت حاوی آنتی بیوتیک بستگی به پایداری آنتی بیوتیک موجود در آن دارد. در مجموع محیط های حاوی آنتی بیوتیک را در مدت یک هفته باید مصرف کرد. از سوی دیگر با گذشت زمان اینگونه محیط های کشت رطوبت خود را از دست داده، بدلیل افزایش غلظت آنتی بیوتیک قدرت انتخابی آنها افزایش می یابد. پلیت ها را باید قبل از مصرف به دمای اتاق رساند. اگر پلیت محیط کشت بیش از ۸ ساعت در دمای اتاق باقی بماند برای مصرف مناسب نمی باشد. محیط های کشت لوله اي در مقایسه با محیط های کشت پلیتی عمر طولانی تري دارند. اغلب این محیط های کشت اگر در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شوند ۶-۳ ماه قابل مصرف می باشند.

موارد استثناء: تایوگلیکولات براث، اندول نیترات براث و SIM فقط به مدت یکماه قابل نگهداري مي باشند. محیط هاي CTA Medium و OF Medium حاوي کربوهیدرات و مولرهینتون براث فقط به مدت ۶ هفته قابل نگهداري مي باشند.

جدول ۱- علل اشکالات رایج در محیط های کشت

اشکال	علت
نرم بودن آگار	حرارت بیش از حد، pH پایین که موجب هیدرولیز اسید در محیط کشت می گردد، توزین یا مخلوط نکردن درست، حل نشدن کامل آگار، حجم نادرست آب، رقیق سازي زیاد با مایع تلقیح یا مکمل ها و ذخیره سازي طولاني در دماي ۵۰ ºC
pH نامناسب	استفاده از شیشه های قلیائی، آب ناخالص، حرارت بیش از حد، آلودگی شیمیائی، اندازه گیری pH در دماي نامناسب، استفاده از pH متر غیرکالیبره، استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده، ذخیره سازي نادرست محیط کشت دهیدراته و کیفیت پایین آب یا ظروف
رنگ یا تیرگي غیرطبیعي	ناخالص بودن آب، استفاده از شیشه آلات کثیف، استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده، حرارت دادن بیش از حد، pH نامناسب، حل نشدن کامل محیط کشت و ذخیره سازي طولاني در دماي ۵۰ ºC
سمیت	حرارت دادن بیش از حد (سوزاندن محیط)، استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده، قرارگیري در معرض مستقیم نور خورشید و حجم نادرست مکمل اضافه شده
رشد ضعیف ارگانیسم یا داشتن خاصیت ضعیف انتخابی و یا افتراقی	استفاده از آب و یا شیشه آلات آلوده، استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده، توزین یا مخلوط نکردن درست، حرارت بیش از حد، ذخیره سازي طولاني محیط کشت، خشك شدن، تیرگي وتغییر pH محیط کشت
لخته یا کواگوله شدن محیط کشت	حرارت بیش از حد محیط در هنگام افزودن مکمل به آن
رگه رگه شدن محیط کشت	رگه رگه سیاه: نیم سوز شدن آگار رگه رگه روشن: سرد شدن آگار موقع افزودن مکمل
ایجاد رسوب یا کدورت	pH نامناسب، ناخالص بودن آب، استفاده از شیشه آلات کثیف، حل نشدن محیط کشت، کیفیت پایین آب یا ظروف، حرارت بیش از حد و ذخیره سازي طولاني در دماي ۵۰ ºC

کنترل کیفی محیط های کشت میکروبی:

اصطلاحات مربوط به سویه های میکروبی کنترل

- سویه کنترل (Control Strain): میکروارگانیسمی که برای ارزیابی عملکرد میکروبی محیط کشت استفاده می شود.
- سویه مرجع (Reference Strain): میکروارگانیسمی که حداقل تا سطح جنس و گونه شناسایی شده و بر اساس ویژگی ها و ترجیحاً منشا آن، فهرست بندی و تعریف شده است.
- ذخیره های مرجع (Reference Stocks): کشت های بدست آمده از پاساژ سویه مرجعی که از مراکز بین المللی تهیه شده است.
- ذخیره های کاری (Working Stocks): کشت مجددی که از کشت های ذخیره جهت کنترل کیفیت محیط های کشت استفاده می شود.

منبع سویه های کنترل:

همه سویه های کنترل که در جدول ۲ از آنها نام برده شده است، ATCC می باشند (American type culture collection). این سوشها، حداقل سوشهایی هستند که باید برای ارزیابی هر محیط کشت استفاده شوند. ارگانیسم های مورد استفاده برای اهداف کنترل کیفی مي تواند از سویه های National collection باشد. سویه های دیگری نیز ممکن است توسط سازنده محیط کشت به کار رود که شامل مجموعه ای از سویه های وحشی (Wild strain) یا بدست آمده از نمونه های بیمار می باشد که مختص هر آزمایشگاه بوده و برای انجام آزمایش هاي بیشتر به کار می روند.

روش انجام آزمون کنترل کیفیت محیط های کشت

تهیه سوسپانسیون میکروبی:

یک کشت از ارگانیسم کنترل کیفی روی پلیت بلادآگار تهیه کنید. بعد از انکوباسیون پلیت ۵-۳ کلنی ایزوله را در مقدار کمی تریپتیکیس سوی براث (TSB) استریل حل نمایید تا سوسپانسیون میکروبی حاصل شود و آن را برای چهار یا پنج ساعت انکوبه نمایید. سپس کدورت آن را با استاندارد نیم مک فارلند تنظیم کنید. (استاندارد نیم مک فارلند در طول موج 625 nm، دارای جذب ۰/۰۸ تا ۰/۱ ناتومتر می باشد)

به جای این روش می توان مستقیماً از کلنی های ایزوله روي پلیت، سوسپانسیون میکروبی مطابق با کدورت نیم مك فارلند تهیه کرد. بدین ترتیب که ۵-۳ کلنی ایزوله روی پلیت ۲۴ ساعته را در ۵-۳ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل حل کرده و کدورت آن را با نیم مک فارلند تنظیم نمایید. با هر روشی که این سوسپانسیون

میکروبي تهیه شود، باید کدورتي حاوی 10^7-10^8 CFU/ml کلنی داشته باشد. (مطابق با استاندارد نیم مک فارلند).

بررسی آزمایش هاي عملکردی محیط کشت (Performance testing)

۱- **آزمایش ظرفیت مغذی بودن (Nutritional activity) محیط هاي کشت پلیتی** مانند بلاد آگار

سوسپانسیون اولیه را به نسبت **۱ به ۱۰۰** در نرمال سالین یا آب مقطر استریل رقیق نموده و مقدار µl ۱۰ یا ml ۰/۰۱ سوسپانسیون رقیق شده را به محیط کشت مورد آزمایش تلقیح کنید. تعداد کلنی های مورد انتظار در هر پلیت (CFU/plate) $۱۰^۳$-$۱۰^۴$ می باشد. برای اجتناب از رشد زیاد باکتری در بعضی از محیطهای کشت انتخابی ممکن است نیاز باشد که سوسپانسیون را ده بار رقیق تر تهیه نمایید.

۲- **آزمایش ظرفیت مهار کنندگی محیط های کشت انتخابی پلیتي** مانند مکانکي آگار

سوسپانسیون اولیه را به نسبت **۱ به ۱۰** در نرمال سالین یا آب مقطر استریل رقیق نموده و مقدار µl ۱۰ یا ml ۰/۰۱ سوسپانسیون رقیق شده را به محیط کشت مورد آزمایش تلقیح کنید. تعداد کلنی های مورد انتظار در هر پلیت (CFU/plate) $۱۰^۴$-$۱۰^۵$ می باشد. برای اجتناب از رشد زیاد باکتری در بعضی از محیطهای کشت انتخابی ممکن است نیاز باشد که سوسپانسیون ده بار رقیق تر تهیه شود.

۳- آزمایش محیط های کشت لوله ای

هر لوله باید با µl ۱۰ یا ml ۰/۰۱ از سوسپانسیون اولیه تهیه شده مطابق با نیم مک فارلند (بدون رقیق سازي) تلقیح شود. گاهی ممکن است به تلقیح کمتر یا بیشتر نیاز باشد.

محیط مورد آزمون را بعد از تلقیح تحت شرایطی که در جدول ۲ آمده است، انکوبه نمایید. به طور نرمال زمان انکوباسیون، ۲۴-۱۸ ساعت یا ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ^oC ۲±۳۵ می باشد. محیط شکلات آگار و سایر محیط های کشت برای جداسازی انتخابی گونه های نیسریای بیماریزا باید در ۱۰- ۵% Co_2 انکوبه شوند و در فواصل زمانی۲۴-۱۸ ساعت وسپس ۴۸-۲۴ ساعت بررسی گردند.

برای باکتري هاي بی هوازی، کشتها عموماً به حداقل ۴۸ ساعت انکوباسیون در شرایط بی هوازی و غنی از Co_2 نیاز دارند.

در مورد کمپیلوباکتر آگار، پلیتها باید در ^oC ۴۲ در شرایط میکروآئروفیلیک غنی از Co_2 به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شوند.

۴- کنترل محیط های کشت براي آزمايشهاي بيوشيميايی

از سوسپانسیون میکروبی رقیق نشده برای کنترل این محیطها استفاده می کنیم.

پس از تلقیح، تمام کشت ها را در شرایط لازم (از نظر Co_2، رطوبت و یا شرایط بیهوازی و درجه حرارت مناسب) قرار داده و پس از طی مدت زمان لازم (۲۴ تا ۴۸ ساعت) آنها را مورد بررسی قرار می دهیم. محیط های مناسب دارای رشد کافي از کلنی های باکتريهاي مورد نظر مي باشند و در مورد محیطهای انتخابی مهار میکروارگانیسمهای مورد نظر باید مشخص باشد.

کنترل محیط های ساخته شده تجاری (آماده مصرف):

۱- رطوبت: محیطهای کشت باید بدون هر گونه رطوبت اضافی بوده، همچنین هیچ نشانه ای از خشک شدن اطراف محیط کشت نباید مشاهده گردد.

۲- سترون بودن: محیطهای کشت باید عاري ازآلودگی باشند.

رنگ: محیطهای کشت آگار خوندار نباید هیچ نشانه ای از همولیز داشته باشند و محیطهای کشت دیگر نباید هیچگونه تغییر رنگ غیر طبیعی داشته باشند.

بررسی آلودگی محیط های کشت (استریل بودن محیط های کشت):

در صورتیکه تعداد پلیت یا لوله تهیه شده در هر سری ساخت یا Lot، ۱۰۰ عدد یا کمتر باشد، باید به تعداد ۵-۳% محیط هاي تهيه شده را در دماي ºC ۳۷-۳۵ به مدت ۵-۲ روز انکوبه نمود. برای Lot های با تعداد بیش از ۱۰۰، باید به تعداد ۱۰ پلیت یا لوله را به طور تصادفی برداشته و در شرایط فوق انکوبه نمود. بعد از انکوباسیون هیچ گونه رشد میکروبی نباید مشاهده شود.

تفسیر نتایج:

یک محیط کشت زمانی قابل قبول می باشد که با همه سویه های پیشنهادی برای آزمون محیط کشت که در جدول ۲ مشخص شده است، رشد کافی داشته و خصوصیات مورفولوژيكي کلنی ها بارز باشد. در مورد محیط های انتخابی، رشد بعضی از ارگانیسم های خاص مهار می شود، ضمن اینکه اجازه رشد کافی به سایرارگانیسم می دهد. در بعضی موارد، واکنشهای رنگی خاص یا همولیز همچنانکه در جدول ۲ آمده است، باید ایجاد شود. مثلاً در مورد کشت بلادآگار ایجاد همولیز مناسب ضروری است و یا برای محیط مکانکی آگار ایجاد واکنش های رنگی برای سویه های میکروبی مشخص ضروری می باشد.

سایر معیارهای تضمین کیفیت:

محیطهای کشت آماده مصرف باید از نظرموارد زیر نیز بررسی شوند:

- شکستگی ظروف پتری
- پر شدن ناصاف پلیتها
- ترک خوردگی محیط کشت در پلیتها
- وجود همولیز (برای بلاد آگار)
- یخ زدگی
- وجود مقدار زیاد حباب یا حفره در سطح محیط کشت

جدول ۲

محیط کشت	زمان انکوباسیون	ارگانیسم های کنترلی	نتیجه قابل انتظار
بایل اسکولین آگار	۲۴ ساعت	*استرپتوکوک فکالیس* *S. faecalis* *استرپتوکوک پایوژنز* *S. pyogenes*	رشد مثبت، محیط سیاهرنگ می شود رشد منفی
بلاد آگار جار شمع دار CO_2	۲۴ ساعت	*استرپتوکوک پایوژنز* *Streptococcus pyogenes* *استرپتوکوک پنومونیه* *S. pnemoniae*	رشد مثبت دارای همولیزبتا رشد مثبت دارای همولیز آلفا
شکلات آگار	۲۴ ساعت	*هموفیلوس آنفلوانزا* *Haemophilus influenzae*	رشد مثبت
لایزین دکربوکسیلاز (محیط بوسیله روغن استریل پوشانده میشود)	۴۸ ساعت	*سالمونلا تایفی موریوم* *S. typhimurium* *شیگلافلکسنری* *Shigella flexneri*	مثبت (بنفش رنگ می شود) منفی (بدون تغییر رنگ)
اورنیتین (دکربوکسیلاز)	۴۸ ساعت	*سالمونلا تایفی موریوم* *S. typhimurium* *کلبسیلا پنومونیه* *K. pneumoniae*	مثبت منفی
آرژینین (دی هیدرولاز)	۴۸ ساعت	*سالمونلا تایفی موریوم* *S. typhimurium* *پروتئوس میرابیلیس* *Proteus mirabilis*	مثبت منفی
ژلاتیناز	۲۴ ساعت	*اشرشیا کلی* *E. coli* *باسیلوس سوبتیلیس* *Bacillus subtilis*	منفی مثبت
کلایگلرآیرون آگار	۲۴ ساعت	*سیتروباکتر فروندی* *Citrobacter frundii* *سالمونلا تایفی موریوم* *S. typhimurium* *شیگلا فلکسنری* *Sh. flexneri* *اسینتوباکتر کالکوستیکوس* *Acinetobacter calcoaceticus*	گاز + $A/A, SH_2$ گاز یا بدون گاز + $K/A, SH_2$ K/A تغییر نمی کند

مک کانکی آگار (همراه با کریستال ویوله)	۲۴ ساعت	*اشرشیا کلی E. coli* *پروتئوس میرابیلیس Proteus mirabilis* *استرپتوکوک فکالیس S. faecalis*	کلنی های قرمز رنگ کلنی های بیرنگ، بدون سوارمینگ (خزش) رشد منفی
مالونات	۲۴ ساعت	*اشرشیا کلی E. coli* *کلبسیلا پنومونیه K. pneumonia*	منفی (سبز رنگ) مثبت (آبی رنگ)
مانیتول سالت آگار	۲۴ ساعت	*استافیلوکوک اورئوس S. aureus* *S. epidermidis استافیلوکوک اپیدرمیدیس* *اشرشیا کلی E. coli*	کلنی های زرد رنگ کلنی های قرمز رنگ رشد منفی
MRVP	۴۸ ساعت	*اشرشیا کلی E. coli* *کلبسیلا پنومونیه K. pneumonia*	MR مثبت- VP منفی MR منفی- VP مثبت
مولرهینتون آگار	۲۴ ساعت	*استافیلوکوک اورئوس* *S. aureus ATCC 25923* *سودوموناس آئروژینوزا* *P. aeruginosa ATCC 27853* *اشرشیا کلی E. coli ATCC 25922*	به جدول میزان هاله عدم رشد قابل قبول در بخش آنتی بیوگرام مراجعه شود
نیترات براث	۲۴ ساعت	*اشرشیا کلی E. coli* *اسینتوبا کتر کالکوستیکوس* *Acinetobacter calcoaceticus*	مثبت منفی
آب پپتونه (اندول)	۲۴ ساعت	*اشرشیا کلی E. coli* *کلبسیلا پنومونیه K. pneumoniae*	مثبت منفی
فنیل آلانین دآمیناز	۲۴ ساعت	*اشرشیا کلی E. coli* *پروتئوس میرابیلیس P. mirabilis*	منفی مثبت
سالمونلا شیگلا آگار (S.S) یا دزوکسی کلات سیترات آگار	۲۴ ساعت	*اشرشیا کلی E. coli* *سالمونلا تایفی موریوم* *Salmonella typhimurium* *یرسینیا انتروکولیتیکا* *Yersinia enterocolitica* *شیگلا فلکسنری Shigella flexneri*	منفی کلنی های بیرنگ کلنی های بیرنگ کلنی های بیرنگ
سلنیت برات (SF)	۲۴ ساعت	*سالمونلا تایفی موریوم S. typhimurium* *اشرشیا کلی E. coli*	بعد از کشت مجدد رشد می کند بعد از کشت مجدد رشد نمی کند
سیمون سیترات (در لوله های با درپیچ شل در	۴۸ ساعت	*اشرشیا کلی E. coli*	رشد منفی

انکوباتور گذاشته شود)		*کلبسیلا پنومونیه K. pneumonia*	رشد مثبت- رنگ آبی
TCBS آگار	۲۴ ساعت	*Vibrio SPP*	کلنی های زرد رنگ
تایر مارتین	۲۴ ساعت	*نایسریا منتژیتیدیس Neisseria meningitidis (CO_2)*	رشد مثبت
		نایسریا گونوره N. Gonorrhoeae	رشد مثبت
		اشرشیا کلی E. coli	رشد منفی
تایوگلیکولات براث Thioglycollate broth	۲۴ ساعت	*باکتروئیدس فراجیلیس Bacteriodes fragilis*	رشد مثبت
TSI عمق محیط باید ۳ سانتی متر باشد (با درپیچ شل اتوو گذاری شود)	۲۴ ساعت	*سیتروباکتر فروندی Citrobacter frundii*	گاز + A/A, SH_2
		سالمونلا تایفی موریوم S. typhimurium	گاز یا بدون گاز + K/A, SH_2
		شیگلا فلکسنری Sh. flexneri	K/A
		اسینتوباکتر کالکوستیکوس Acinetobacter calcoaceticus	تغییر نمی کند
محیط اوره	۲۴ ساعت	*اشرشیا کلی E. coli*	منفی
		پروتئوس میرابیلیس P. mirabilis	مثبت، صورتی

منابع :

1- Quality Assurance for commercially prepared Microbiological Culture Media- Second Edition ; Approved standard.- Third edition document M22-A3. Vol. 24 No.19; 2006.

2- Oxoid company- General Guide to the use of Oxoid culture Media.

۳- محیط هاي کشت آزمایشگاهي (موارد مصرف وکنترل کیفي) به انضمام اطلس رنگي محیط هاي کشت؛ گرد آوري و ترجمه مهناز صارمي – محمد علي صارمي؛ آزمایشگاه مرجع سلامت، وزارت بهداشت، درمان وآموزش پزشکي؛ ۱۳۸۷

آزمایشگاه مرجع سلامت	راهنمای انجام آزمایش دیسک نووبیوسین جهت افتراق استافیلوکوکهای کوآگولاز منفی	صفحه 1 از 1

۱- هدف:

تعیین حساسیت به نووبیوسین، جهت غربالگری استافیلوکوکهای کوآگولاز منفی جدا شده از کشتهای ادرار، بکار می رود.

۲- نمونه اولیه:

- کشت ۲۴-۱۸ ساعته از ارگانیسم مورد نظر

۳- مواد و معرفها:

- دیسک نووبیوسین ۵ میکروگرمی
- پلیت بلاد آگار خون گوسفند
- سوآب استریل

٤- روش انجام آزمایش:

- یک سوسپانسیون از ارگانیسم مورد نظر در آب مقطر استریل یا Broth تهیه نمایید.
- کدورت سوسپانسیون باید مطابق با استاندارد نیم مک فارلند باشد .
- با یک سوآب استریل روی نصف پلیت بلاد آگار کشت دهید.
- تحت شرایط استریل یک دیسک نووبیوسین روی ناحیه تلقیح شده قرار دهید. با پنس استریل به آرامی روی دیسک فشار آورید تا مطمئن شوید با سطح آگار تماس پیدا کند.

۵- نتایج:

- S.saprophyticus به نووبیوسین مقاوم بوده و هاله عدم رشد ۶ mm تا ۱۲ mm ایجاد می کند.
- سایر استافیلوکوکهای کوآگولاز منفی و S.aureus ، به نووبیوسین حساس بوده و هاله عدم رشد ۱۶ mm یا بزرگتر ایجاد می کنند.

٦- کنترل کیفی:

- سوش کنترلی مقاوم به نووبیوسین S.saprophyticus
- سوش کنترلی حساس به نووبیوسین S.epidermidis

کنترل کیفی با هر Lot جدید از دیسک یا بطور هفتگی با سویه های فوق باید انجام شود.

روش تعیین حجم لوپ

برای شمارش کلنی‌های بدست آمده از کشت نمونه‌های بالینی بویژه ادرار به منظور تشخیص عفونت لازم است از لوپهای استاندارد با حجم معین استفاده شود. آزمایشگاه می‌بایست همواره از لوپهای کالیبره جهت کشت نمونه‌های ادراری استفاده وتعداد کلنی‌های موجود در هر میلی‌لیتر ادرار(CFU/ml) را گزارش نماید.

برای بررسی حجم لوپ از روشهایی مانند رنگسنجی و توزین استفاده می‌شود. ساده ترین روش برای بررسی حجم لوپ استفاده از روش رنگسنجی از طریق اسپکتروفتومتر یا فتومتر به کمک مواد رنگی مانند متیلن بلو ، کریستال ویوله و اوانس بلو می‌باشد. در این دستورالعمل روش رنگسنجی با استفاده از اوانس بلو توضیح داده شده است‌در صورت استفاده از سایر مواد رنگی ، میبایستی طول موج و جذب نوری ویژه همان ماده بکار برده شود.

ابزار و مواد مورد نیاز تعیین حجم لوپ با استفاده از ماده رنگی اوانس بلو

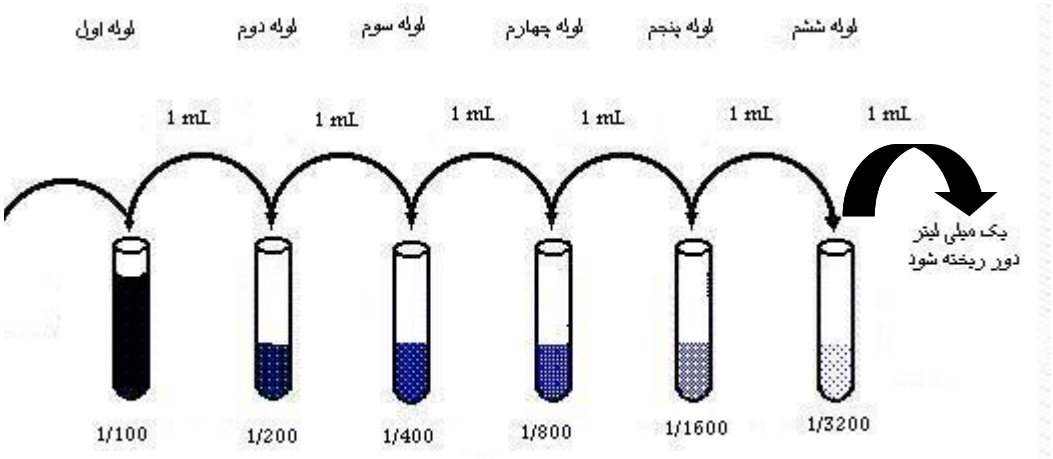
۱- پودر اوانس بلو (Evans Blue) .این ماده به صورت پودر تجاری قابل‌دسترس بوده و به آسانی در آب حل می‌شود.
۲- آب مقطر
۳- لوله آزمایش
۴- پیپت یا سمپلر
۵- اسپکتروفتومتر یا فتومتر کالیبره
۶- کاغذ میلیمتری

روش انجام

۱- 20mg از پودر رنگی اوانس بلو را در ۱۰ میلی لیترآب حل نمایید. غلظت این محلول 0.2g/100 می‌باشد.

۲- ۶ لوله آزمایش انتخاب کرده ، در لوله اول 2ml ودر هر یک از لوله‌های باقیمانده 1ml آب مقطر بریزید. 20 لاندا (0.02 ml) از محلول ذخیره اولیه (0.2g/100) برداشته در لوله اول ریخته و کاملا مخلوط نمایید. سپس 1ml از لوله اول برداشته و در لوله دوم بریزید ، از لوله دوم ، در لوله سوم و این عمل را تا آخر ادامه

دهید. در انتها یک میلی لیتر از لوله ششم را برداشته و دور بریزید . به این ترتیب ۶ محلول خواهید داشت که رقت نهایی بدست آمده در هر یک و میزان ماده رنگی موجود در آن بشرح زیر خواهد بود.



20λ از محلول ذخیره 0.2g/100

رقت

مقدار ماده رنگی **10λ** **5 λ** **2.5λ** **1.25λ** **0.625λ** **0.3125λ**

۳- میزان جذب نوری (OD) هر یک از۶ محلول حاصله را به کمک اسپکتروفتومتر در طول موج 620nm بدست آورید.

۴- جهت تعیین حجم لوپ مورد بررسی ، ۱۰ لوله آزمایش برداشته و در هر یک ۱ میلی‌لیتر آب مقطر بریزید.

۵- لوپ تحت کنترل را بطور کاملا عمودی وارد محلول ذخیره اولیه نموده ، از محلول رنگی برداشته و در لوله‌های آزمایش فرو برید . این کار را ۱۰ بار تکرار و در فواصل لوپ را روی کاغذ خشک کن قرار دهید تا کاملا خشک شود. از سوزاندن لوپ خودداری نمایید.

۶- بعد از مخلوط کردن ، جذب هریک از لوله‌ها را در طول موج 620nm قرائت نمائید.

۷- بر روی کاغذ میلی‌متری نموداری ترسیم نمایید که در آن ، محور افقی نشانگر رقتهای تهیه شده و محور عمودی نمایانگر جذب نوری هر رقت باشد.

۸- با قرار دادن میانگین جذب بدست آمده از لوپ کنترلی، روی محور عمودی می‌توان ضریب رقت لوپ کنترلی را از روی محور افقی بدست آورد.

جهت تعیین تعداد کلنی در هر میلی‌لیتر ادرار ، باید تعداد کلنی‌های بدست آمده از کشت روی پلیت را در عکس ضریب رقت لوپ ، ضرب کرد. بطور مثال اگر ضریب رقت لوپ مجهول ۱/۱۰۰ و تعداد کلنی‌های روی پلیت ۵۰۰ عدد باشد ، باید ۵۰۰ را در ۱۰۰ ضرب و نتیجه را بصورت cfu/ml ۵۰/۰۰۰ گزارش نمود.

روشهای دیگری نیز برای بررسی میزان حجم برداشتی توسط لوپ باکتریولوژی وجود دارد که از بین آنها می‌توان به روش توزینی مندرج در کتاب

Diagnostic microbiology ,Elmer W.Koneman, 5th edition, page 96

اشاره کرد که در آن با استفاده از ترازوی بسیار حساس تغییرات وزن دیسک کاغذی بعد از افزودن یک لوپ آب مقطر روی آن، محاسبه می‌گردد.

آزمایشگاه مرجع سلامت	راهنمای انجام آزمایش	صفحه 1 از 2
	سیتوکروم اکسیداز	

۱- هدف:

- جداسازی انتروباکتریاسه ها (که همه اکسیداز منفی هستند) از باکتری هایی مثل ویبریوناسه، آئروموناس، سودوموناس، نیسریا، کمپیلوباکتر و پاستورلا(که همه اکسیداز مثبت اند)
- شناسایی ارگانیسم هایی که فاقد آنزیم سیتوکروم اکسیدازند یا بی هوازی اجباری می باشند.

۲- اساس آزمایش:

سیتوکروم ها، هموپروتئین های حاوی آهن می باشند که در زنجیره تنفسی عامل انتقال الکترون (هیدروژن) به اکسیژن هستند. در این تست از یک معرف رنگی استفاده می شود که بجای اکسیژن به عنوان پذیرنده نهائی الکترون جایگزین می گردد.

۳- نمونه اولیه:

- کشت ۲۴-۱۸ ساعته از ارگانیسم مورد نظر از محیط های کشت مناسب

٤- مواد و ابزار لازم:

- محلول ۱٪ تترامتیل پارافنیلن دی آمین دی هیدروکلراید در آب مقطر استریل یادیسک تجاری آماده اکسیداز
- کاغذ صافی
- اپلیکاتور چوبی یا لوپ پلاستیکی یا پلاتینیوم

۵- مراحل انجام کار:

الف ـ روش مستقیم روی پلیت:

دو تا سه قطره از معرف تازه تهیه شده را مستقیماً روی کلنی های باکتری بر روی پلیت اضافه می کنیم. کلنی های باکتری های اکسیداز مثبت بلافاصله به رنگ بنفش تغییر رنگ می دهند.

ب ـ روش غیر مستقیم:

- از پودر معرف ، محلول ۱٪ در آب مقطر تهیه کنید و۱۰ ml از محلول را در مقادیر۱ ml تقسیم کرده در بردوت ۲۰- درجه در فریزر نگهداری نمایید. موقع مصرف یک ویال از فریزر خارج کرده ، پس از ذوب شدن ، به تعداد مورد نیاز کاغذ صافی را به معرف آغشته کرده در پلیت تمیز قرار دهید. البته می توان ازدیسک های آماده تجاری نیز استفاده نمود .
- مقداری از کلنی باکتری را روی کاغذ حاوی معرف می کشیم. (توصیه می شود که از مشتق تترامتیل پارافنیلن دی آمین بجای مشتقات دی متیل استفاده شود، زیرا این معرف برای ذخیره کردن پایدارتر و برای تعیین سیتوکروم اکسیداز حساس تر است و نسبت به مشتق دی متیل، کمتر سمی می باشد.)

- در باکتری های اکسیداز مثبت در محل تلقیح کلنی در عرض ۱۰ ثانیه رنگ آبی تیره (مایل به بنفش) ایجاد می شود (زمان بسیار مهم است). اما باکتری های اکسیداز منفی در عرض ۱۰ ثانیه بیرنگ باقی می مانند. باکتری هایی که در مدت ۶۰ –۱۰ ثانیه رنگ بنفش ایجاد می کنند، نیاز به انجام تست های بیشتری دارند، زیرا احتمالاً متعلق به خانواده آنتروباکتریاسه نمی باشند.

٦- برنامه QC:

کنترل کیفی باید برای هر سری جدید و هر زمان که این تست انجام می شود، صورت گیرد.

کنترل مثبت: Pseudomonas aeruginosa

کنترل منفی: E.Coli

۷-تداخلات:

- نباید از کشت کهنه (بیشتر از ۲۴ ساعت) استفاده شود.
- محلول ۱٪ اکسیداز باید بصورت تازه و روزانه تهیه شود مگر اینکه محلول ساخته شده در فریزر نگهداری گردد.
- نباید از محیط های کشت رنگی مثل مک کانکی استفاده شود زیرا نتیجه مثبت کاذب می دهد.
- برای انتقال باکتری روی کاغذ صافی یا دیسک اکسیداز نباید از لوپ فلزی مثل استیل یا نیکروم استفاده شود، زیرا بر اثر سوزاندن لوپ، مقدار کمی اکسید آهن بر روی آن ایجاد می شود، که ممکن است نتیجه مثبت کاذب دهد.

۸- ایمنی

بدلیل ایجاد تحریک ، از تماس معرف با پوست و چشم خودداری نمایید . در صورت تماس اتفاقی پوست یا چشم را با مقادیر زیادی آب حداقل به مدت ۱۵ دقیقه شستشو دهید .

کنترل کیفیت دیسک های آنتی بیوتیک جهت انجام آزمایش تعیین حساسیت میکروبی به روش *disk diffusion agar*

هدف

هدف از برنامه کنترل کیفی پایش و ارزیابی موارد زیر می باشد:

- صحت و دقت روش انجام آزمایش تعیین حساسیت
- مواد و وسایل به کار برده شده در این آزمایش
- عملکرد افرادی که آزمایش را انجام داده و نتایج بدست آمده را قرائت می نمایند.

به منظور دست یابی بهینه به این اهداف در دسترس داشتن سویه های کنترل کیفی تهیه شده از مراکز معتبر ضروری است.

سویه های کنترل کیفی پیشنهادی توسط CLSI عبارتند از:

Enterococcus faecalis ATCC 29212

Escherichia coli ATCC 25922

Escherichia coli ATCC 35218

Haemophilus influenzae ATCC 49247

Haemophilus influenzae ATCC 49766

Klebsiella pneumoniae ATCC 700603

Neisseria gonorrhoeae ATCC 49226

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Streptococcus pneumoniae ATCC 49619

E.coli ATCC 35218 فقط به عنوان یک میکروارگانیسم کنترلی برای ترکیبات ممانعت کننده بتالاکتامار، مثل ترکیبات حاوی کلاولانیک اسید، سولباکتام یا تازوباکتام پیشنهاد می شود.

Enterococcus faecalis ATCC 29212 (یا *E.faecalis ATCC 33186*) برای ارزیابی محیط مولر هینتون آگار با دیسک تری متوپریم/ سولفامتوکسازول استفاده می شود. درمحیط کشت قابل قبول، هاله عدم رشد واضحی به قطر *mm* ۲۰ یا بزرگتر ایجاد می شود در حالیکه در محیطهای کشت غیر قابل قبول، هاله عدم رشد ایجاد نمی شود یا در داخل هاله، رشد کم مشاهده می شود و یا هاله ای با قطر کمتر از *mm* ۲۰ ایجاد میگردد. این کار به منظور بررسی مقادیر غیرقابل قبول تیمیدین در محیط کشت مزبور است.

Enterococcus faecalis ATCC 29212 همچنین برای کنترل دیسکهای آمینو گلیکوزید با دوز بالا به کار می رود.

Klebsiella pneumoniae ATCC 700603 به عنوان یک سویه کنترلی برای آزمایشات *ESBL* به کار برده می شود.

کنترل کیفیت قطر هاله عدم رشد سویه کنترلی/ دیسک آنتی بیوتیکی

سویه های کنترل کیفی را باید به روش استاندارد آزمایش *disk diffusion* و با استفاده از همان مواد و روشی که برای سویه های جدا شده از نمونه های کلینیکی استفاده می شود آزمایش و نتایج را با جداول ۳ و ۳A CLSI (ضمیمه ۳) مقایسه و بررسی نمود. محدوده قطر هاله عدم رشد قابل قبول برای هر سویه کنترلی نسبت به یک دیسک آنتی بیوتیکی در جداول فوق فهرست شده است.

چنانچه تغییر در میانگین قطر هاله عدم رشد ناشی از خطا در روش انجام آزمایش نباشد، احتمالا" ناشی از تغییر در حساسیت ذاتی باکتری نسبت به آن آنتی بیوتیک می باشد. در این صورت لازم است کشت تازه از سوش کنترل تهیه شود.

آزمایش کنترل کیفیت را باید درچه فواصل زمانی انجام داد؟

الف _ انجام آزمایش روزانه

برای هر سویه کنترلی با یک دیسک آنتی بیوتیکی باید ۲۰ روز متوالی آزمایش تعیین حساسیت انجام و نتایج با مقادیر قابل قبول اشاره شده در جداول فوق مقایسه گردد. بر اساس ضریب اطمینان ۹۵٪ تنها یک مورد از ۲۰ نتیجه قرائت شده می تواند خارج از محدوده کنترل باشد (به ضمیمه ۲مراجعه کنید). چنانچه بیشتر از یک مورد خارج از محدوده کنترل باشد نیاز به اقدامات اصلاحی خواهد بود، که در ادامه توضیح داده می شود.

ب _ انجام آزمایش هفتگی

– در صورتیکه تنها یک مورد از ۲۰ نتیجه قطر هاله عدم رشد برای هر سویه کنترلی/ دیسک آنتی بیوتیکی خارج از محدوده قابل قبول مندرج در جداول ۳ و ۳A (ضمیمه ۳) قرار گیرد ، کنترل کیفی روزانه را به هفتگی تغییر دهید (به ضمیمه ۲ مراجعه کنید).

-آزمایش کنترل کیفی هفتگی را یکبار در هفته و هم چنین زمانیکه یکی از عوامل آزمایش (مانند سری ساخت آگار یا دیسکهای تهیه شده از یک سازنده) تغییر کند، انجام دهید.

اگر هر یک از نتایج کنترل کیفی هفتگی خارج از محدوده قابل قبول باشد ، انجام اقدامات اصلاحی مورد نیاز است .

اقدامات اصلاحی (Corrective actions)

الف _ نتایج خارج از محدوده قابل قبول به دلیل خطاهای مشهود و واضح شامل:

- استفاده از دیسک اشتباه
- استفاده از سویه کنترلی اشتباه
- آلودگی واضح سویه
- استفاده غیرعمدی از دما و شرایط اشتباه انکوباسیون

بوجود آمده است . دراین حال باید دلیل ایجاد خطا مکتوب و پس از اصلاح آزمایش دوباره تکرار شود . اگر نتایج گزارش شده در محدوده مورد نظر قرار گرفت ، عملیات اصلاحی بیشتری مورد نیاز نمی باشد .

ب _ عامل ایجاد نتایج خارج از محدوده کنترل نامشخص است. در این حال باید اقدامات اصلاحی فوری بشرح زیر انجام شود.

- آزمایش را جهت یک سویه کنترلی / دیسک آنتی بیوتیکی برای ۵ روز متوالی تکرار و همه نتایج را ثبت کنید.
- اگر اندازه هر ۵ قطرهاله مطابق جداول ۳ و ۳A (ضمیمه ۳) و در محدوده قابل قبول باشد ، عملیات اصلاحی بیشتری مورد نیاز نمی باشد.
- اگر اندازه هر یک از ۵ قطر هاله عدم رشد خارج از محدوده قابل قبول باشد ، به عملیات اصلاحی اضافی نیاز است.
- آزمایشهای کنترلی روزانه باید ادامه داده شود تا به دلیل نهایی مشکل پی برده شود.

عملیات اصلاحی اضافی:

وقتی عملیات اصلاحی فوری مشکل را حل نکرد، احتمالا" خطای مشاهده شده بعلت بروز یک اشکال کلی در سیستم و نه یک خطای تصادفی ایجاد شده است. در این حالت باید موارد بیشتری بررسی شوند. مانند:

- اندازه گیری و ثبت صحیح قطر هاله های عدم رشد

- رعایت تاریخ انقضا و شرایط نگهداری دیسکها و مواد مورد استفاده (دور از رطوبت و در دمای مناسب)
- مناسب بودن دما و اتمسفر انکوباتور
- تغییرنیافتن یا آلوده نبودن سویه های کنترل
- مطابقت صحیح سوسپانسیون تلقیح با استاندارد نیم مک فارلند
- استفاده از پلیت کشت تازه برای تلقیح (پلیت کشت باید تازه بوده و مدت زمان انکوباسیون آن بیشتر از ۲۴ ساعت نباشد)

وقتی مشکل بر طرف شد، می‌توان کنترل کیفی هفتگی را برقرار کرد.

نگهداری دیسکهای آنتی بیوتیکی

– دیسکها باید در یخچالC° ۸ و پایین تر ، یا در فریزرC° ۱۴- و پایین تر تا زمان مصرف نگهداری شوند.

– تمامی دیسکهای گروه بتالاکتام مانند پنی سیلین، آمپی سیلین، کربنی سیلین، تیکارسیلین، اگزاسیلین و نسل اول، دوم و سوم سفالوسپورین ها و ... باید در فریزر نگهداری شوند، و فقط می توان مقداری از آن را بر اساس کار روزانه آزمایشگاه حداکثر به مدت یک هفته در یخچال نگهداری نمود.

– بعضی آنتی بیوتیکهای حساس مثل ایمیپنم ، سفاکلر و ترکیبات کلاولانیک اسید یا سولباکتام اگر تا هنگام مصرف در فریزر نگهداری شوند، پایداری بیشتری خواهند داشت.

– دیسکها باید در ظروف دارای درپوش محکم و حاوی مواد جاذب رطوبت نگهداری شوند.

– دیسکهای آنتی بیوتیکی باید یک تا دو ساعت قبل از استفاده از یخچال یا فریزر خارج شوند تا به درجه حرارت اتاق برسند.

آزمایشگاه مرجع سلامت	راهنمای انجام آزمایش	صفحه 1 از 2
	کاتالاز	

۱- هدف :

- تشخیص استافیلوکوک و میکروکوک (کاتالاز مثبت) از استرپتوکوک (کاتالاز منفی)
- افتراق کلستریدیوم از باسیلوس ها (کاتالاز مثبت)
- افتراق لیستریامونوسیتوژنز (کاتالاز مثبت) از استرپتوکوک بتاهمولیتیک

۲- اساس آزمایش:

کاتالاز آنزیمی است که H_2O_2 را به آب و اکسیژن تجزیه می کند. H_2O_2 یکی از محصولات نهایی اکسیداسیون در متابولیسم کربوهیدرات است.

۳- نمونه اولیه:

کشت ۲۴-۱۸ ساعته از ارگانیسم مورد نظر

٤- مواد و تجهیزات مورد نیاز:

- پراکسید هیدروژن ۳٪ (این ماده باید در شیشه های قهوه ای یا تیره رنگ ودر یخچال نگهداری شود)
- اپلیکاتور چوبی یا شیشه ای یا لوپ پلاتینی
- لام شیشه ای

٥- مراحل انجام کار:

- با یک اپلیکاتور چوبی از مرکز یک کلنی به سطح لام شیشه ای منتقل کنید.
- یک قطره H_2O_2 را بلافاصله به کلنی روی لام اضافه کنید و ا یجاد حباب روی لام را بررسی نمایید. نتیجه را به صورت مثبت یا منفی گزارش کنید.
- ایجاد حباب های سریع و ماندگار با حالت جوش زدن (کف) نشانگر مثبت بودن تست است.

٦- برنامه QC:

پراکسید هیدورژن باید هر روز یا قبل از تست نمودن باکتری مجهول با سوش های کنترل مثبت و منفی تست شود.

سوش کنترل مثبت : Staphylococcus. aureus

سوش کنترل منفی : Streptococcus. pyogenes

۷- تداخلات :

- جهت تست کاتالاز باید از روی محیطی کلنی برداشته شود که فاقد خون باشد. زیرا گلبول های قرمز واکنش کاتالاز مثبت ضعیف ایجاد می کنند. اما از آنجائی که اکثر نمونه های کلینیکی روی محیط های خون دار کشت داده می شوند، برای انجام تست میتوان نمونه را از قله کلنی ها بدون تماس با محیط برداشت تا واکنش مثبت کاذب ایجاد نشود.
- بهتر است از یک اپلیکاتور چوبی برای برداشتن کلنی استفاده شود. استفاده از لوپ آهنی واکنش مثبت کاذب ایجاد می کند.
- از آنجائی که بعضی از باکتری ها دارای آنزیم هایی غیر از کاتالاز هستند که موجب تجزیه پراکسیدهیدروژن می شود، ایجاد حباب های ریز به تعداد کم، بعد از ۳۰ – ۲۰ ثانیه به معنی واکنش مثبت نمی باشد.

آزمایشگاه مرجع سلامت	راهنمای انجام آزمایش	صفحه 1 از 1

کشت روی محیط
Malonate Broth

۱- هدف:
تشخیص گونه های انتروباکتریاسه بویژه سالمونلا

۲- اساس آزمایش:
این محیط کشت محتوی مالونات سدیم (منبع کربن اولیه)، مقادیر کمی گلوکز و عصاره مخمر (مواد مغذی)، برم تیمول بلو (معرف pH)، انواع نمک ها و یک سیستم بافر است. ارگانیسم هایی که رنگ آبی نیلی (رنگ آبی آهن دار Prussian blue) تولید می کنند، قادرند مالونات را به عنوان منبع کربن استفاده کنند. اگر بتوانند از مالونات به عنوان منبع کربن استفاده کنند، پس می توانند از سولفات آمونیم نیز به عنوان نیتروژن استفاده کنند، در نتیجه محصولات قلیایی تولید می کنند که دلیل افزایش pH و تغییر رنگ محیط به آبی است. ارگانیسم هایی که قادر نیستند از مالونات به عنوان منبع کربن استفاده کنند، معمولاً رشد نمی کنند و محیط سبز باقی می ماند.

۳- نمونه اولیه:
کلونی های ناشی از کشت ارگانیسم بر روی TSI ، KIA یا Broth

٤- مواد و ابزار لازم:
محیط کشت مالونات Broth

٥- روش انجام کار:
از کشت ارگانیسم بر روی TSI, KIA یا KI Broth به محیط مالونات Broth تلقیح نمایید. مایع تلقیح باید شفاف و رقیق باشد. کشت را در دمای C ° ۳۵ انکوبه نموده و آن را بعد از ۲۴-۱۸ ساعت و سپس بعد از ۴۸ ساعت برای تولید رنگ آبی بررسی نمایید. بعضی از ارگانیسم ها فقط مقادیر کمی قلیا تولید می کنند. هر نشانی از رنگ آبی را مثبت تلقی نمایید. مقایسه با لوله ای که تلقیح نشده، می تواند مفید باشد. تولید رنگ زرد نشانگر واکنش منفی است. این واکنش احتمالاً ناشی از تخمیر مقدار کم گلوکز در محیط است.

٦- برنامه کنترل کیفی (QC):
- سوش کنترل منفی : *E. coli* ATCC 25922 فاقد رشد (سبز)
- سوش کنترل مثبت: *Klebsiella pneumonia sub sp. Pneumonia* ATCC 13882 رشد خوب، آبی (مثبت)
- سوش کنترل مثبت : *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 رشد خوب، آبی (مثبت)

آزمایشگاه مرجع سلامت	روش اجرایی آزمایش مانیتول سالت آگار	صفحه 1 از 2

۱- هدف آزمایش:

افتراق استافیلوکوک اورئوس از سایر میکروکوکاسه ها

۲- اساس آزمایش:

غلظت بالای نمک (۷/۵٪) رشد اکثر سوش های گرم منفی و گرم مثبت بجز استافیلوکوک اورئوس را مهار می کند. استافیلوکوک می تواند مانیتول را تخمیر کرده (مانیتول تنها کربوهیدرات موجود در محیط است) و اسید تولید کند. این مسئله منجر به افت pH و تغییر رنگ فنل رد به زرد می شود، در این آزمایش کلنی های استافیلو کوک به طور مشخص زرد رنگ شده و توسط هاله زردی احاطه می شوند اما سایر استافیلو کوک ها و میکروکوک ها که قدرت تخمیر مانیتول را ندارند با شکستن پپتون موجود در محیط کلنی های قرمز رنگ با هاله ای ارغوانی – قرمز ایجاد می کنند.

۳- نمونه اولیه :

کشت ۲۴ – ۱۸ ساعته از ارگانیزم مورد نظر (استافیلوکوک)

٤- مواد و ابزار مورد نیاز :

محیط مانیتول سالت آگار (لوله یا پلیت)

۵- مراحل انجام کار :

کلنی های مورد نظر را روی محیط تلقیح کرده به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در حرارت $^{\circ}C$ ۳۵ انکوبه نمایید (محیط بدون CO_2) و سپس نتیجه را بررسی کنید .

از آنجا که بعضی از گونه های استافیلوکوک آهسته تر مانیتول را تخمیر می کنند، بنابراین لازم است حتماً تا ۴۸ ساعت پلیت ها نگهداری شود.

- کلنی های استافیلوکوک زرد رنگ بوده و توسط هاله زردی احاطه می شود.

٦- تداخلات :

انتروکوک می تواند روی این محیط رشد کرده و مانیتول را نیز کمی تخمیر کند. افتراق از استافیلوکوک بر اساس رنگ آ میزی گرم و تست کاتالاز خواهد بود.

اگر مدت انکوباسیون از ۴۸ ساعت طولانی تر شود ارگانیزم های دیگر نیز قدرت رشد و تخمیر مانیتول را دارند.

نکته:

تمام کلنی های مشکوک به استافیلوکوک باید به کمک تست کواگولاز یا سایر تست های افتراقی تایید شوند. بعضی فرمولاسیون ها توصیه می کنند 20CC زرده تخم مرغ استریل به محیط اضافه شود، استافیلوکوک های کواگولاز مثبت همزمان لیپاز نیز دارند بنابراین رسوب کدری در اطراف کلنی ها ظاهر خواهد شد. استافیلو کوک هایی که کواگولاز تولید نمی کنند لیپاز نداشته و هاله ایجاد نمی کنند.

۷- کنترل کیفی:

سوش کنترل مثبت : استافیلوکوک اورئوس ATCC 25923

سوش کنترل منفی : استافیلوکوک اپیدرمیدیس ATCC 12228 و پروتئوس میرابیلیس

آزمایشگاه مرجع سلامت	راهنمای انجام آزمایش کشت روی محیط MacConkey Agar	صفحه 1 از 2

1- هدف:

- این محیط کشت، یک محیط انتخابی و افتراقی برای تشخیص ارگانیسم های کلی فرم و پاتوژن های روده ای است.
- برای جداسازی انواع مایکوباکتریوم از مک کانکی آگار بدون کریستال ویوله، استفاده می شود.

2- اساس آزمایش:

کریستال ویوله رشد میکروارگانیسم های گرم مثبت بویژه انتروکوک ها و استافیلوکوک ها را مهار می کند. جهت تفکیک میکروارگانیسم های روده ای، از ترکیب لاکتوز و معرف قرمز استفاده میشود. بسته به توانائی تخمیر لاکتوز، کلونی های بی رنگ یا صورتی قرمز تولید می شوند. اگر یک باسیل گرم منفی روی بلاد آگار رشد کند اما روی مک کانکی آگار رشد نکند یا بطور ضعیف رشد کند، مشکوک به گروه وابسته به غیرتخمیر کننده ها (نان فرمنترها) است.

3- ویژگی های تست:

غلظت نمک های صفراوی در این محیط در مقایسه با دیگر محیط های پلیتی جهت کشت آنتروباکتریاسه ها ، نسبتاً کم است. بنابراین انتخابی بودن این محیط برای باکتری های گرم منفی، از بعضی فرمول های دیگر (مثل Salmonella Shigella Agar و Hektoen Enteric Agar) بیشتر نیست. به عنوان مثال استرپتوکوک فکالیس به طور جزئی توانایی رشد روی این محیط را دارد.

4- مواد و ابزار لازم:

محیط کشت مک کانکی

5- روش انجام کار:

به محض دریافت نمونه در آزمایشگاه، پلیت های محیط کشت را به روش کشت خطی یا سواب کشیدن، تلقیح نمایید. توصیه می شود برای افزایش شانس جداسازی باکتری های گرم منفی، وقتی تعداد آنها کم است و نیز جهت تعیین ارگانیسم های دیگری که در نمونه وجود دارند، باید به یک محیط غیر انتخابی نیز تلقیح نمود .

پلیت ها را دور از نور نگه داشته و در دمای $35 \pm 2^{\circ} C$ یا دمای مناسب دیگری به مدت 24-18 ساعت انکوبه نمایید. اگر بعد از 24 ساعت منفی بود، دوباره برای 24 ساعت دیگر انکوبه نمایید. انکوباسیون در دمای اتاق، شانس جداسازی یرسینیا انتروکولیتیکا را افزایش می دهد. پلیت ها را نباید بیش از 48 ساعت انکوبه کرد، چون در تفسیر نتایج اشکال پیش می آید.

6- برنامه کنترل کیفی (QC):

Escherichia coli ATCC 25922: رشد می کند، کلنی های قرمز گل سرخی می دهد.

Proteus marbilis ATCC 12453: رشد می کند، کلنی های بی رنگ می دهد.

Salmonella typhimurium ATCC 14028: رشد می کند، کلنی های بی رنگ می دهد.

Streptococcus faecalis ATCC 29212: رشد بطور جزئی مهار می شود.

7- تداخلات:

- بعضی از انتروباکتریاسه ها و سودوموناس آئروژینوزا وقتی در محیط دارای Co2 انکوبه شوند، رشدشان روی این محیط، مهار میشود.

نگهداری و استفاده از سویه‌های باکتریایی

برای نگهداری سویه‌های باکتریایی می‌توان از روشهای طولانی مدت و کوتاه مدت استفاده نمود.

الف) نگهداری طولانی مدت

نگهداری طولانی‌مدت باکتریها این امکان را می‌دهد که کلیه سویه‌های میکروبی اعم از هوازی (با رشد سریع و یا سخت رشد) و نیز بیهوازی، ماهها و حتی سالها به صورت زنده نگهداری شوند. بهترین روشهای نگهداری طولانی مدت شامل لیوفیلیزاسیون (Freeze drying) و نگهداری در دمای 70- درجه سانتی‌گراد یا پایین تر (در دیپ فریز یا در نیتروژن مایع) می‌باشد.

1- نگهداری در دیپ فریز (50- تا 70- درجه سانتی‌گراد یا پایین تر) و یا نیتروژن مایع:

باکتری مورد نظر را روی محیط مغذی مانند پلیت TSA (Trypticase Soy Agar) حاوی 5% خون گوسفند و در مورد میکروارگانیسمهای سخت رشد روی محیط آگار شکلاته کشت دهید. پلیتها را به مدت 24-18 ساعت در دمای 2±35 درجه سانتی‌گراد و در صورت نیاز تحت شرایط CO_2 برای هر باکتری انکوبه نمائید.

بعد از انکوباسیون، خالص بودن و مورفولوژی کلنی‌ها را بررسی نموده و در صورت نیاز، تستهای بیوشیمیایی آنرا انجام دهید. سپس از باکتری رشد یافته، سوسپانسیون غلیظی در 100-50 میلی‌لیتر از یک محیط محافظت‌کننده از سرما (Cryoprotective) تهیه نمائید. این محیط برای جلوگیری از تخریب سلولهای باکتری در شرایط انجماد مورد استفاده قرار می‌گیرد. محیط محافظت‌کننده از سرما می‌تواند Skim milk، خون گوسفند یا خرگوش دفیبرینه استریل یا Tryptic Soy Broth (TSB) حاوی گلیسرول با غلظت نهایی 15-10% باشد.

سپس از سوسپانسیون باکتریایی فوق به مقدار ml 1- 0/5 در ویالهای شیشه‌ای یا پلاستیکی کوچک استریل توزیع کنید. تعداد ویال ذخیره خود را برای مصرف یکسال آماده نمائید.

ویالهای حاوی سویه‌ها را می‌توان در برودت 50- تا 70- درجه سانتی‌گراد به مدت یکسال نگهداری نمود. در صورت عدم دسترسی به فریزر 70- درجه می توان سویه‌های با رشد سریع را در فریزر 20- درجه نیز نگهداری نمود. در این شرایط توجه به نکات زیر ضروری است:

سویه‌های سخت رشد مانند هموفیلوس انفلوانزا و نیسریا گونوره در این دما قابل نگهداری نمی‌باشند و باید در فریزر 70- درجه نگهداری شوند.

سویه‌های بارشد سریع در این دما عمر کمی دارند و تعداد زیادتری از آنها از بین می‌روند. بنابراین توصیه می‌شود برای اطمینان از حیات سویه‌ها هر چند ماه، طبق روش زیر کشت داده شوند.

یک ویال از فریزر بیرون آورده و سریعا زیر آب جاری ولرم محتویات آنرا ذوب نمائید. نمونه را روی محیط آگار خوندار یا شکلاته (در مورد باکتریهای سخت رشد) تلقیح کرده و به مدت 24-18 ساعت در دمای 2±35 درجه و در صورت نیاز در شرایط CO_2 انکوبه نمایید. این باکتری می‌تواند برای آزمایشهای کنترل داخلی کیفیت در آزمایشگاه یا برای تهیه working control بکار رود. قبل از هر اقدام باید از خالص بودن نمونه، اطمینان حاصل کرد. ویال مورد استفاده بعد از ذوب شدن باید دور انداخته شده و به هیچ وجه مجددا فریز نگردد.

کشتهای working control: عبارتست ازکشت مجدد از کشت ذخیره فریز شده که برای کنترل کیفیت محیط کشت و ... استفاده می‌شود.

از کشت ذخیره تا 3 پاساژ پشت سر هم می‌توان انجام داد. پس از آن، نمونه باید دور انداخته شده و از یک کشت ذخیره فریز شده دیگر برای تهیه کشتهای working control استفاده شود. پاساژهای مکرر (بیش از 3 پاساژ)، احتمال تغییر فنوتیپی سویه‌ها را افزایش می‌دهد.

برای تهیه working control، از کشت ذخیره فریز شده، روی پلیت یا آگار شیب دار تلقیح و آنرا به مدت یک شبانه‌روز تا زمانی که رشد مناسبی بدست آید، انکوبه نمائید. در مورد ارگانیسمهای با رشد سریع این پلیت یا آگار شیبدار را می‌توان در 8-2 درجه سانتیگراد یا در دمای اتاق تا مدت 4 هفته نگهداری نمود. بعد از هر پاساژ، خالص بودن و مورفولوژی کلنی‌ها را بررسی نمائید.

2- استفاده از روغن معدنی در دمای اتاق:

1- محیط کشت Brain Heart Infusion Agar (BHIA) را با شیب کم در لوله تهیه نمایید. برای باکتریهای مشکل‌پسند مانند گونوکوک، منگوکوک، استرپتوکوک پنومونیه و هموفیلوس آنفلوانزا، لازم است محیط شکلات آگار را با افزودن 5% خون گوسفند به محیط فوق پس از خروج از اتوکلاو و رسیدن به دمای 50 درجه سانتی‌گراد و قرار دادن در بن‌ماری 80 درجه سانتی‌گراد به مدت 15 دقیقه تهیه نمود.

2- روغن معدنی (یا پارافین مایع) را در حرارت خشک (170 درجه سانتی‌گراد به مدت یکساعت) استریل نمائید.
3- میکروب مورد نظر را روی محیط کشت دهید.
4- بعد از بدست آوردن کشت کافی، روغن استریل را به مقدار cc 1 روی سطح محیط بریزید.
5- در صورت نیاز به کشت مجدد، نمونه از سطح آگار (زیر روغن) برداشته می‌شود.
6- بعد از 12-6 ماه تجدید کشت نمایید.

3- کشت عمقی و نگهداری در دمای اتاق:

این روش فقط برای باکتریهایی که مشکل‌پسند نیستند مانند استافیلوکوک وخانواده انتروباکتریاسه بکار می‌رود.
1- یک محیط کشت آگار بدون کربوهیدرات مانند TSA را با عمق زیاد در لوله تهیه نمایید.
2- باکتری را بصورت کشت عمقی در این محیط تلقیح نمایید.
3- این محیط را 24 ساعت در انکوباتور 35 درجه انکوبه نمائید.
4- در لوله را با درپیچ یا چوب پنبه ببندید.
5- لوله در پیچ‌دار را در پارافین مایع فرو ببرید به گونه‌ای که کاملا در لوله را بپوشاند.
6- کشتها را در حرارت اتاق نگهداری نمائید.
7- هرساله سوش موردنظر را تجدید نمائید.

4- کشت عمقی در محیط سیستین تریپتیکیس آگار (CTA) برای نیسریا و استرپتوکوک:

1- محیط CTA را در لوله تهیه نمایید .
2- باکتری را بطور عمقی در این محیط کشت دهید.
3- محیط را بمدت 24 ساعت در انکوباتور 35 درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.
4- در لوله را با چوب‌پنبه یا در پیچ ببندید.
5- لوله در پیچ‌دار را در پارافین مایع فرو ببرید به گونه‌ای که کاملا در لوله را بپوشاند.
6- برای نیسریا لوله را در 35 درجه نگهداری و هر دو هفته کشت را تجدید نمائید. برای استرپتوکوک لوله را در حرارت اتاق نگهداری کرده و هر ماه تجدید کشت کنید.

5- **محیط کشت Cooked meat برای باکتریهای بیهوازی**:

1- باکتری را در لوله‌های حاوی محیط Cooked meat کشت دهید.

2- محیط را بمدت 24 ساعت در انکوباتور 35 درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.

3- در لوله را با چوب‌پنبه یا در پیچ ببندید.

4- کشتها را در حرارت اتاق نگهداری نمائید.

5- هر دو ماه کشت را تجدید نمائید.

ب) نگهداری کوتاه مدت

کشتهای working control که برای کارهای روتین روزانه استفاده می‌شوند، به روشهای زیر تهیه می‌شوند:

§ باکتریهای با رشد سریع

1- سوش مورد نظر را در سطح محیط TSA لوله‌ای درپیچ‌دار کشت دهید.

2- محیط را بمدت 24 ساعت در انکوباتور 35 درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.

3- پس از رشد کامل، لوله را در یخچال نگهداری کنید

4- هر ماه کشت را تجدید نمائید.

§ استرپتوکوکها

1- سوش مورد نظر را در سطح آگار خوندار شیب دار(لوله‌ای درپیچ‌دار) کشت دهید.

2- محیط را بمدت 24 ساعت در انکوباتور 35 درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.

3- پس از رشد کامل، لوله را در یخچال نگهداری کنید. (جهت استرپتوکوک پنومونیه، محیط را در دمای اتاق نگهداری کنید.)

4- هر ماه کشت را تجدید نمائید.

§ منتگوکوک و هموفیلوس

1- سوش مورد نظر را در سطح محیط آگار شکلاته لوله‌ای یا پلیت کشت دهید.

2- محیط را بمدت 24 ساعت در انکوباتور 35 درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.

3- پس از رشد کامل، لوله را در حرارت اتاق نگهداری کنید
4- هر2 هفته کشت را تجدید نمائید.

§ گونوکوک

1- سوش مورد نظر را در سطح محیط آگار شکلاته کشت دهید.
2- محیط را بمدت 24 ساعت در انکوباتور 35 درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.
3- نمونه را در دمای 35 درجه نگهداری نمایید.
4- هر2 روز یکبار کشت را تجدید نمائید.