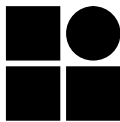


صفحه 1 از 1	راهنمای انجام آزمایش	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	محیط Bile Esculin Agar	

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. سترات 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

۴- 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 ۱۸-۲۴ ساعت در دمای $C \pm 2^{\circ} 35$ ، در شرایط هوایی 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.

۶- 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.

صفحه 1 از 1	راهنمای انجام آزمایش	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	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 (در ۱۱٪ موارد)، CAMP مثبت می باشند.

۳- نمونه اولیه:

- کشت تازه میکروبی (۲۴-۱۸ ساعته)

۴- 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 بلاد آگار 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 ۳-۴ میلی متر کشت داد).

- پلیت را به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در اتوو 35°C در حضور O_2 انکوبه می نماییم.

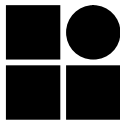
- مشاهده همولیز بتا، شبیه نوک فلش، در محلی که دو سویه استافیلوکوک اورئوس و سویه مشکوک به هم نزدیک می شوند، نشان دهنده تشدید همولیز بتا و تست CAMP مثبت است.

۶- 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

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

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 ارگانیسیم 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 ارگانیسیم 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.

۴- روش انجام کار:

مقدار خیلی کم از ارگانیسیم 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 $37^{\circ}\text{C} - 35^{\circ}\text{C}$ 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.

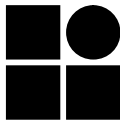
۵- تداخلات:

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.

۶- برنامه کنترل کیفی داخلی:

سویه کنترل مثبت: *انتروباکتر آئروژینوزا*

سویه کنترل منفی: *E. coli* ATCC 25922

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

۱- هدف:

این محیط کشت در ارزیابی فعالیت دزوکسی ریبونوکلاز (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 سراسیای 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 کوآگولاز مثبت، DNase مثبت نیز هستند.

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

۳- نمونه اولیه:

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

۴- 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 ۱۸-۲۴ ساعت در دمای $35 \pm 2^{\circ}$ سانتیگراد انکوبه

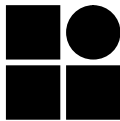
نمایید. پس از انکوباسیون، روی پلیت های DNase Test Agar ساده، اسید کلریدریک ۱ نرمال و یا

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.

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

- 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.

۶- 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)

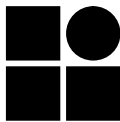
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228: رشد متوسط تا زیاد، بدون هاله (کنترل منفی)

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.

صفحه 1 از 2	راهنمای انجام آزمایش	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	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 بکار می 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:

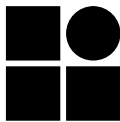
کشت تازه ۱۸-۲۴ ساعته

۴- مواد مورد نیاز:

محیط ژلاتین مغذی در لوله

۵- نحوه انجام کار:

- در لوله های حاوی ژلاتین باید محکم بسته شده، در حرارت $^{\circ}\text{C } 4-8$ یخچال نگهداری شوند. لوله ها را درست تا زمان تلقیح در یخچال نگهداری کنید.
- برای تلقیح از کشت تازه ۱۸-۲۴ ساعته (KIA یا سایر محیط های مناسب) استفاده نمایید.
- مقدار حجمی از کلنی مورد نظر را تا عمق $2/5 - 1/5$ 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 $^{\circ}\text{C } 35$ یا در صورت رشد بهتر در $^{\circ}\text{C } 25 - 22$ ، 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 $^{\circ}\text{C } 35$ باید گزارش گردد.

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

۶- کنترل کیفی:

✓ میکروارگانیسم های هوازی

رشد و ذوب: پروتئوس ولگاریس ATCC 8427

رشد و عدم ذوب: *E. coli* ATCC 25944

✓ میکروارگانیسم های بیهوازی

رشد و ذوب: باکترئید فراژیلیس ATCC 25285

رشد و عدم ذوب: کلستریدیوم پرفرنترنس ATCC 12924

صفحه 1 از 2	راهنمای انجام آزمایش	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	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 حدوداً ۳ سانتی متر باشد.

۳- نمونه اولیه:

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

۴- 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 ۳-۵ میلی متری عمق لوله، تلقیح نمایید. لوله ها را به مدت ۱۸-۲۴ ساعت و در صورت عدم واکنش تا ۴۸ ساعت، در دمای $37 \pm 2^{\circ}C$ 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. ارگانسیم هایی که توانایی تخمیر هیچ یک از دو کربوهیدرات را ندارند، سطح و عمق قرمز تولید می کنند.

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

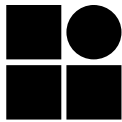
تولید سولفید هیدروژن با ایجاد رنگ سیاه در تمام عمق یا با تشکیل حلقه سیاه در نزدیکی عمق اثبات می شود. تولید گاز با ایجاد حباب یا با شکافتن یا جابجا شدگی آگار نشان داده می شود.

۶- برنامه کنترل کیفی (QC):

ارگانسیم	سطح شیب دار	عمق	سولفید هیدروژن (H ₂ S)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	اسیدی	اسیدی با گاز	-
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	قلیایی	اسیدی با گاز	+
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	قلیایی	اسیدی	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	قلیایی	قلیایی	-
<i>Citrobacter freundii</i>	اسیدی	اسیدی	+

۷- تداخلات:

- سولفات فروس موجود در این محیط به عنوان معرف H₂S گاهی دارای حساسیت کمتری نسبت به سایر نمک های فریک می باشد. بنابراین ممکن است در ایجاد H₂S 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 در برمی گیرد.
- عمق لوله های KIA و TSI، با تخمیر گلوکز، اسیدی می شود و در صورت تولید H₂S، اغلب سیاه شدن از ته لوله شروع می شود، (بوئژه با باکتریهای غیر تخمیر کننده لاکتوز) بنابراین اگر عمق سیاه است باید آن را اسیدی در نظر گرفت.

صفحه 1 از 8	راهنمای	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	رنگ آمیزی گرم	

رنگ آمیزی گرم

اصول:

در آزمایشگاه میکروبی 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 برات یا کلتی های رشد کرده روی محیط کشت جامد تهیه شود. نمونه های بالینی تازه و کشت 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 برات 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 خوردگی 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 - الکل؛ مخلوطی از ۱۰۰ ml اتانول ۹۵٪ و ۱۰۰ ml 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.

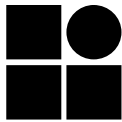
(۳) سریع ترین رنگ بر: استون (reagent grade)

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٪

صفحه 2 از 8	راهنمای	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	رنگ آمیزی گرم	

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

B. وسایل و مواد مورد نیاز

- ۱- لام شیشه ای (۷۵×۲۵ 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 دریچ دار استریل
 - ۴- قیچی، اسکالپل و پنس استریل
 - ۵- خردکن بافت
 - ۷- متانول خالص

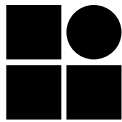
نکته: متانول را در بطری های دریچ دار قهوه ای ذخیره کنید. ذخیره کاری را می توان در ظروف پلاستیکی برای حداکثر دو هفته ذخیره نمود.

کنترل کیفی:

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

- ۱- اگر کریستال و بوله 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 *استافیلوکوک اورئوس* (ATCC 25923) تهیه و فیکس کرده و مطابق روش فوق رنگ آمیزی کنید.

صفحه 3 از 8	راهنمای	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	رنگ آمیزی گرم	

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 ارگانسیم 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 قبلاً 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 استفاده 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 ارگانسیم ها با تراکم مناسب برای مشاهده آسان ایجاد نماید. پراکندگی ارگانسیم 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

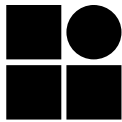
ترجیحاً باید یک سواب جداگانه برای تهیه اسمیر آماده شود .

(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.

صفحه 4 از 8	راهنمای	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	رنگ آمیزی گرم	

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 سانتیفیوژ دارند

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

۱) بعد از انجام سانتیفیوژ، با استفاده از پی پت استریل، محلول رویی را به یک لوله استریل منتقل کنید، حدود ۰/۵ ml 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) سانتیفیوژ 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 ۰/۵ ml 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)

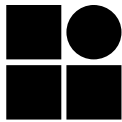
۱) بافت را با استفاده از قیچی یا اسکالپل استریل خرد کنید.

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.

صفحه 5 از 8	راهنمای	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	رنگ آمیزی گرم	

- 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):

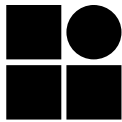
اسمیرها ممکن است با حرارت یا متانول فیکس شوند.
۱- حرارت:

- 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 را آسانتر 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 بیوشانید. 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 بیوشانید. 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.

صفحه 6 از 8	راهنمای	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	رنگ آمیزی گرم	

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 سافرینین بیوشانید 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 ارگانیسیم 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 آمیزی Kopeloff'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 عموماً باید شفاف یا صورتی باشد. اگر گلبول های سفید وجود دارند، باید به 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 نمایستی 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:

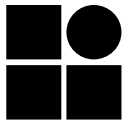
- a. مقادیر مربوط به نوتروفیل ها، مونوسیت ها و گلبول های قرمز
- b. مقادیر مربوط به سلول های اپی تلیال و باکتری های فلور نرمال که ممکن است نشانگر جمع آوری نامناسب نمونه باشد.
- c. وضعیت و آرایش میکروارگانیسیم ها

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

- a. در صورت عدم مشاهده هر گونه میکروارگانیزم: "هیچ میکروارگانیسیمی مشاهده نشد".
- b. در صورت مشاهده میکروارگانیزمها، تراکم کلی و مرفولوژی را شرح دهید.

۴- شکل سلولی غالب میکروارگانیسیم ها را ذکر نمایید

- a. شکل کلی: کوکوس، کوکوئید، کوکوباسیل، باسیل، رشته ای شکل، شبه مخمر
- b. ظاهر انتهاها: کروی، شمعی شکل، مسطح، گریزی 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، فتری

صفحه 7 از 8	راهنمای	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	رنگ آمیزی گرم	

- e. پلئومرفیسم (ناپایداری در شکل): عبارت توصیفی "دیفترئوئید" یا "کورینه فرم" برای توصیف باسیل های گرم مثبت به کار می رود که چند شکلی، گزری 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 ارگانسیم یا بیشتر در فیلد روغن ایمرسیون دیده می شود، مثبت گزارش کنید. این با کلنی کانت 10^5 CFU/ml \geq همبستگی دارد.

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

(۱) عددی

(a) ۱+ (< ۱ در فیلد روغن ایمرسیون [$10 \times$])

(b) ۲+ (۱ در فیلد روغن ایمرسیون)

(c) ۳+ (۲ تا ۱۰ در فیلد روغن ایمرسیون)

(d) ۴+ (غالب یا > 10 در فیلد روغن ایمرسیون)

(۲) توصیفی

(a) کمیاب (> 1 در فیلد روغن ایمرسیون)

(b) کم (۱ تا ۵ در فیلد روغن ایمرسیون)

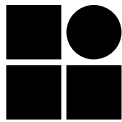
(c) متوسط (۵ تا ۱۰ در فیلد روغن ایمرسیون)

(d) زیاد (> 10 در فیلد روغن ایمرسیون)

b. مرفولوژی باکتری های مشاهده شده را ثبت کنید.

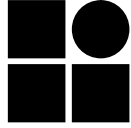
C. مرور رنگ آمیزی گرم

- 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 گزین 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 گزین از روی اسلاید بردارید.
- b. اسلاید را با الکل - استون بپوشانید تا اسمیر بی رنگ شود.
- c. دوباره رنگ کنید.

صفحه 8 از 8	راهنمای	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	رنگ آمیزی گرم	

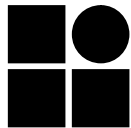
توجهات :

- 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 ضد میکروبی، یا کاهش رشد ارگانسیم 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.

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

مواد، محیط های کشت و دیسک های تشخیصی

- 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 6.5% NaCl برات 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 برات
- ۱۶- محیط اوره آگار
- ۱۷- محیط ژلاتین
- ۱۸- محیط فنل رد آگار یا برات + قندهای گلوکز، لاکتوز، مانیتول، سوکروز و ...
- ۱۹- محیط لایزین آیرون آگار (LIA) یا مولر لایزین دکربوکسیلاز
- ۲۰- محیط پایه مولر (Muller's base) + اسیدهای آمینه آرژینین و اورنی تین
- ۲۱- محیط فنیل آلانین آگار
- ۲۲- محیط OF + قندهای گلوکز، لاکتوز، مالتوز، مانیتول و ...
- ۲۳- محیط هکتون انتریک آگار (HE) یا XLD آگار
- ۲۴- محیط انتقالی کری بلر
- ۲۵- محیط TCBS

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

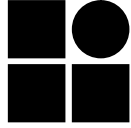
- ۲۶- محیط آب پیتونه قلیایی
- ۲۷- محیط TSB حاوی ۱۵% گلیسرول
- ۲۸- استاندارد نیم مک فارلند
- ۲۹- دیسک ONPG
- ۳۰- دیسک نووبیوسین ۵ میکروگرمی
- ۳۱- دیسک فورازولیدون
- ۳۲- دیسک باسیتراسین ۰/۰۴ واحد (...)
- ۳۳- دیسک اپتوچین
- ۳۴- دیسک Polymixin B 300U
- ۳۵- دیسک SXT
- ۳۶- پلاسمای EDTA دار خرگوش

آنتی سرم ها

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

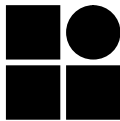
معرف ها

- 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 های VP (α نفتول و KOH)
- ۷- معرف کلرور فریک

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

ابزار و وسایل

- ۱- یخچال (۲-۸ درجه سانتیگراد)
- ۲- فریزر ۸- تا ۲۰- درجه سانتیگراد
- ۳- انکوباتور 1 ± 36 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

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

۱- هدف آزمایش:

افتراق باکتری های مختلف براساس توانایی حرکت آنها

۲- اصول انجام کار:

این آزمایش جهت افتراق ارگانیزم 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 برگردند. ارگانیزم های غیر متحرک فلاژل ندارند.

۳- نمونه اولیه:

کشت خالص ۲۴-۱۸ ساعته

۴- 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.

۵- روش کار:

قطره معلق

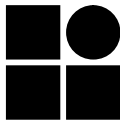
۱- یک قطره سرم فیزیولوژی یا آب مقطر روی لامل قرار دهید.

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 تقریبی ۲ میلی متر و به قطر تقریبی ۱-۱/۵ 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.

صفحه 2 از 3	راهنمای انجام آزمایش	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	بررسی حرکت باکتری	

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 سایر محیط های مناسب استفاده شود.

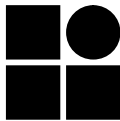
با استفاده از آنس تلقیح، مرکز محیط را سوراخ کرده تا عمق ۱cm فرو ببرید. محیط مربوطه را در حرارت 35°C به مدت ۲۴-۴۸ ساعت انکوبه کرده در صورت منفی بودن به مدت ۷ روز در حرارت اتاق $25-21^{\circ}\text{C}$ نگهداری کنید.

حرارت انکوباسیون اهمیت فوق العاده زیادی دارد. چون بسیاری از ارگانیسم های متحرک در $25-15^{\circ}\text{C}$ متحرک بوده و در حرارت 37°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 35°C و دیگری را در $25-21^{\circ}\text{C}$ 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 37°C
 - a- انتروباکتر (معمولا +) کلبسیلا (-)
 - b- ویبریو (معمولا +) اکتینوباسیلوس (-)
 - c- آئروموناس مدیا (-) و آئروموناس سالمونی سیدا (-) سایر گونه های آئروموناس (+) و پلزیوموناس شیگلوییدس (+)

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

- انکوباسیون در حرارت 25°C (حرارت اتاق)

جهت کمک در افتراق بین جنس ها: لیستریامونوسیتوزن (+) کورینه باکتریوم معمولاً (-) در صورت نیاز از املاح تترازولیوم در محیط مربوطه استفاده کنید، هر چند ممکن است این ماده رشد گروهی از ارگانیسیم ها را مهار کند. نمک های تترازولیوم بی رنگ اند ولی با رشد ارگانیسیم، 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.

۶- برنامه QC:

حرکت مثبت: *E. coli* ATCC 25922

حرکت منفی: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

در صورت استفاده از محیط های نیمه جامد جهت کنترل منفی می توان از روش عدم تلقیح میکروب استفاده کرد.

صفحه 1 از 2	راهنمای انجام آزمایش	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	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)

۴- 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 بیج دار به حجم ۲/۵ میلی 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.
- ۴۸-۷۲ ساعت (حداکثر ۵ روز) در ۳۵ °C انکوبه نمایید.
- سپس ۵ قطره از معرف متیل رد را به Broth اضافه نمایید و نتیجه واکنش را بر اساس تغییر رنگ حاصله بررسی کنید.

صفحه 2 از 2	راهنمای انجام آزمایش	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	متیل رد Methyl Red Test	

- ایجاد رنگ زرد ← واکنش منفی
- ایجاد رنگ قرمز ← واکنش مثبت در نتیجه تولید اسید زیاد و ایجاد $\text{pH} < 4.5$ است.
- ایجاد رنگ نارنجی ← واکنش منفی

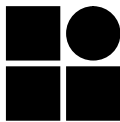
جهت کوتاه تر کردن زمان نتیجه گیری می توان حدود ۰/۵ میلی لیتر MR/VP Broth را در لوله ای ریخته و مقدار نسبتاً زیادی از میکروب را در آن تلقیح نمود و پس از انکوباسیون ۱۸-۲۴ ساعته در 35°C ، ۱-۲ قطره معرف متیل رد را به آن اضافه کرده، واکنش را مشاهده نمود.

۶- 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.

صفحه 1 از 1	راهنمای انجام آزمایش	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	فنیل آلانین دامیناز	

۱- هدف:

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

2- اساس آزمایش:

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

3- مواد و ابزار لازم:

- لوله حاوی فنیل الانین آگار
- کلروفریک 10 درصد

4- مراحل انجام کار:

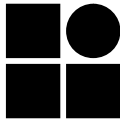
- سطح محیط با کلنی ایزوله تلقیح شده ، در لوله به صورت شل بسته شود.
- بعد از انکوباسیون محیط در 35°C به مدت 18-24 ساعت یا تا هرزمان که رشد واضحی مشاهده گردد ، (0/5cc) 4-5 قطره کلروفریک 10% مستقیماً به سطح آگار اضافه می کنیم. لوله را می چرخانیم تا کلنی ها در آن غوطه ور شوند.

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 دامینه 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.

صفحه 1 از 1	راهنمای انجام آزمایش	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	PYR	

۱- هدف:

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

۲- اساس آزمایش:

آنزیم آمینو پپتیداز توسط سوبسترای 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)

۴- مواد و ابزار لازم:

- Todd Hewitt Broth) PYR Broth با پیرولیدونیل بتا نفتیل آمید (۰/۱٪) به مقدار ۰/۲ ml در لوله
- معرف PYR (دی متیل آمینو سینامالدئید ۰/۱٪)
- لوله آزمایش

۵- روش انجام آزمایش:

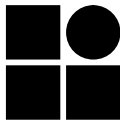
- ابتدا ۲ تا ۳ کلنی از کشت مورد نظر را در لوله محتوی 0.2 ml PYR Broth حل می کنیم.
- لوله را به مدت ۴ ساعت در حرارت 35°C انکوبه می کنیم.
- یک قطره معرف PYR به آن اضافه می نماییم.
- سرانجام واکنش را که بر اساس تغییر رنگ می باشد مشاهده و تفسیر می نماییم.
- زمان لازم برای خواندن نتایج یک دقیقه می باشد که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

۶- 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.

صفحه 1 از 2	راهنمای انجام آزمایش	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	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 0.04U حساس ولی به تریمتوپریم - 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 های C 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:

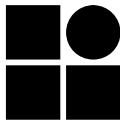
- بلاد آگار با خون گوسفند
- دیسک باسیتراسین (0.04 U)
- دیسک SXT
- پنس استریل
- سواب استریل

6- روش انجام کار:

کلنی ایزوله استرپتوکوک بتاهمولیتیک را در وسط یک پلیت بلاداآگار 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 در 35°C قرار می دهیم.

حساس = عدم رشد در اطراف دیسک ها

مقاوم = رشد تا لبه دیسک ها

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

7- برنامه QC:

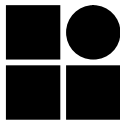
ATCC 19615 استرپتوکوک گروه A : باسیتراسین S = و R = SXT

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 بلاگ آگار باید کاملاً یکنواخت و به مقدار کافی انجام شود. تلقیح کم میکروارگانیزم روی بلاگ آگار باعث می شود استرپتوکوک non-A به باسیتراسین حساس شود و نتیجه مثبت کاذب دهد.

صفحه 1 از 2	راهنمای انجام آزمایش	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	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 صفرای 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 - بلر (Cary & Blair)

۴- مواد و ابزار لازم :

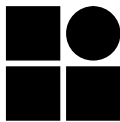
- آب پیتونه قلیایی
- محیط کشت TCBS

۵- 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 - بلر به آزمایشگاه منتقل نمود.

برای جداسازی ویبریوکلرا و دیگر گونه های ویبریو از مدفوع، آب پیتونه قلیایی و TCBS به کار می رود. یعنی نمونه را ابتدا داخل آب پیتونه قلیایی حاوی ۱٪ NaCl (pH = ۸/۵) برده و به مدت ۵-۸ 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 پیتونه قلیایی، سواب را بر روی یک پلیت TCBS بکشید، پلیت را کشت داده و انکوبه نمایید و سپس سواب را در آب پیتونه قلیایی برده و

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

به مدت ۵-۸ ساعت در دمای 35°C 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 ۱۸-۲۴ ساعت در دمای $2^{\circ}\text{C} \pm 35^{\circ}\text{C}$ 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.

۶- 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.

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

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 18-24 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.

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

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.

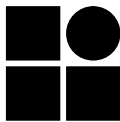
6- برنامه کنترل کیفی (QC):

ارگانیسم	سطح شیبدار	عمق	گاز	H ₂ S
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	A	A	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	K	K	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	K	A	+	+
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	K	A	-	-

A: اسیدی (زرد) K: قلیایی (قرمز)

7- تداخلات:

- برای حفظ شرایط قلیایی سطح شیب دار باید با بستن در پیچ 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 H₂S اثر می گذارد مهار می کند. بویژه سالمونلای تولید کننده H₂S و بعضی از اعضاء انتروباکتریاسه نمی توانند روی TSI Agar، H₂S تولید کنند.
- سولفات فروس موجود در این محیط (به عنوان معرف H₂S) گاهی دارای حساسیت کمتری نسبت به سایر نمک های فریک می باشد. بنابراین ممکن است در ایجاد H₂S 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.

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

۱- هدف:

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

۲- اساس آزمایش:

اوره آز آزیمی است که بعضی از ارگانسیم 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 ارگانسیم مورد نظر

۴- مواد و تجهیزات مورد نیاز:

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

۵- مراحل انجام کار:

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

۲-۵) هر دو لوله محیط کشت را با در پیچ شل به مدت ۴۸ ساعت تا هفت روز در 35°C انکوبه می نماییم. ارگانسیم هایی که اوره را سریع هیدرولیز می کنند، در عرض ۱-۲ ساعت واکنش مثبت می دهند و سویه هایی که کمتر فعالند، به ۳ روز یا بیشتر انکوباسیون نیاز دارند.

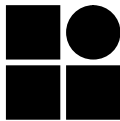
۳-۵) واکنش ها بدین صورتند :

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.

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

۶- برنامه QC :

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

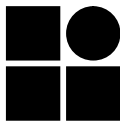
سوش کنترل مثبت: Proteus sp

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 $pH = 6/8$ می باشد برای از بین بردن اثر بافر باید مقدار نسبتاً 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 برات 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.

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

۱- هدف:

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

۲- اساس آزمایش:

اسید پیروویک 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)

۴- مواد و معرفها:

– محیط MR/VP

– معرفها :

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

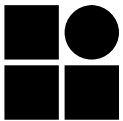
ب) هیدروکسید پتاسیم 40% در آب مقطر 100ml

۵- روش انجام کار:

یک لوله درپیچ دار حاوی 2.5ml MR/VP Broth ، را توسط کشت خالص باکتری مورد نظر تلقیح میکنیم و مدت ۲۴-۴۸ ساعت در اتوو $35^{\circ}C$ 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.

۶- برنامه QC:

سوش کنترل مثبت: انتروباکتر ائروژینوزا ، کلبسیلا پنومونیه
 سوش کنترل منفی: E coli ATCC 25922

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

۱- هدف:

کمک در تشخیص افتراقی انتروباکتریاسه ها

۲- اساسی 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 دهیدروله شده و بعد دکربوکسیله می شوند.

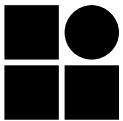
۳- مواد و تجهیزات مورد نیاز:

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

۴- 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 $35^{\circ}C$ 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 گلوکز، 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 گلوکز 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.

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

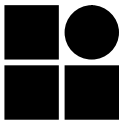
۵- کنترل کیفی:

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 دپتوسولفات، جهت شناسائی H_2S است. این محیط برای شناسایی سالمونلاها بکار می رود که اغلب H_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.

۶- تداخلات:

عده ای معتقدند استفاده از محیط لیزین برات نسبت به محیط مولر دکربوکسیلاز ارجح است. زیرا در محیط لیزین برات 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.

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

۱- هدف:

جدا کردن 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 جمله Heart Infusion broth) حاوی 0.5% 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)

۴- مواد لازم:

- محیط مایع مغذی حاوی 6.5% 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.

۵- روش انجام کار:

- 3-4 کلنی از کشت تازه باکتری مورد نظر را به مدت 24 تا 48 ساعت در اتوو 35 °C حاوی 5-7% CO₂ 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 و رشد در 6.5% NaCl نیز مثبت باشد، میکروارگانیسم انتروکوک میباشد و چنانچه ارگانیسم مورد نظر بایل اسکولین مثبت و رشد در 6.5% NaCl نیز منفی باشد، میکروارگانیسم، استرپتوکوک گروه D نان انتروکوک می باشد.

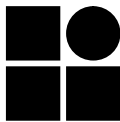
۶- تداخلات:

- 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 های گروه D نان انتروکوک

صفحه 1 از 1	دستورالعمل	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	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 ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ۱/۱۷۵ W/V) 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.

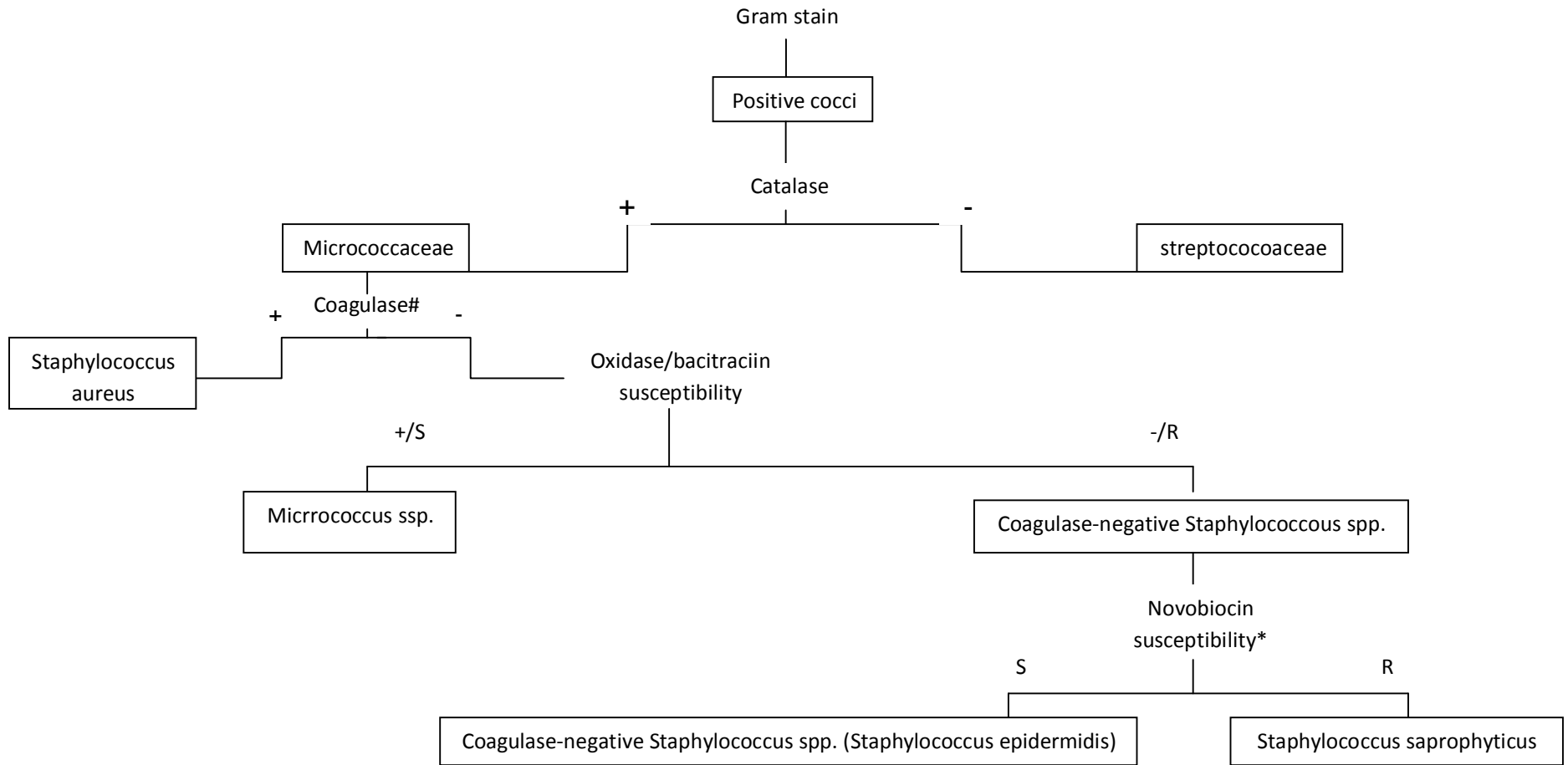
۳) سوسپانسیون سولفات باریم باید به مقدار ۴-۶ ml در لوله های در پیچ دار هم اندازه با لوله های سوسپانسیون باکتریایی ریخته شود.

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 ایجاد گردد. 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.

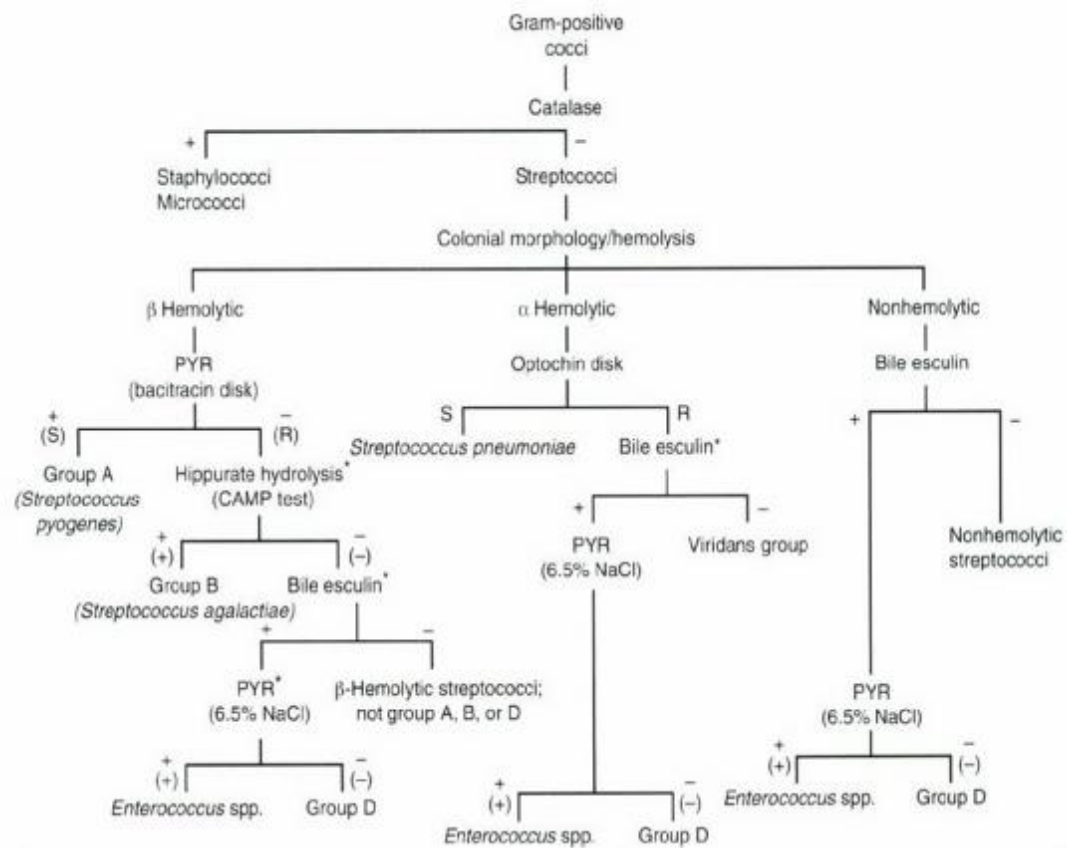
چارت شناسائی گونه های استافیلوکوک



Novobiocin susceptibility → S:16mm ≤ *

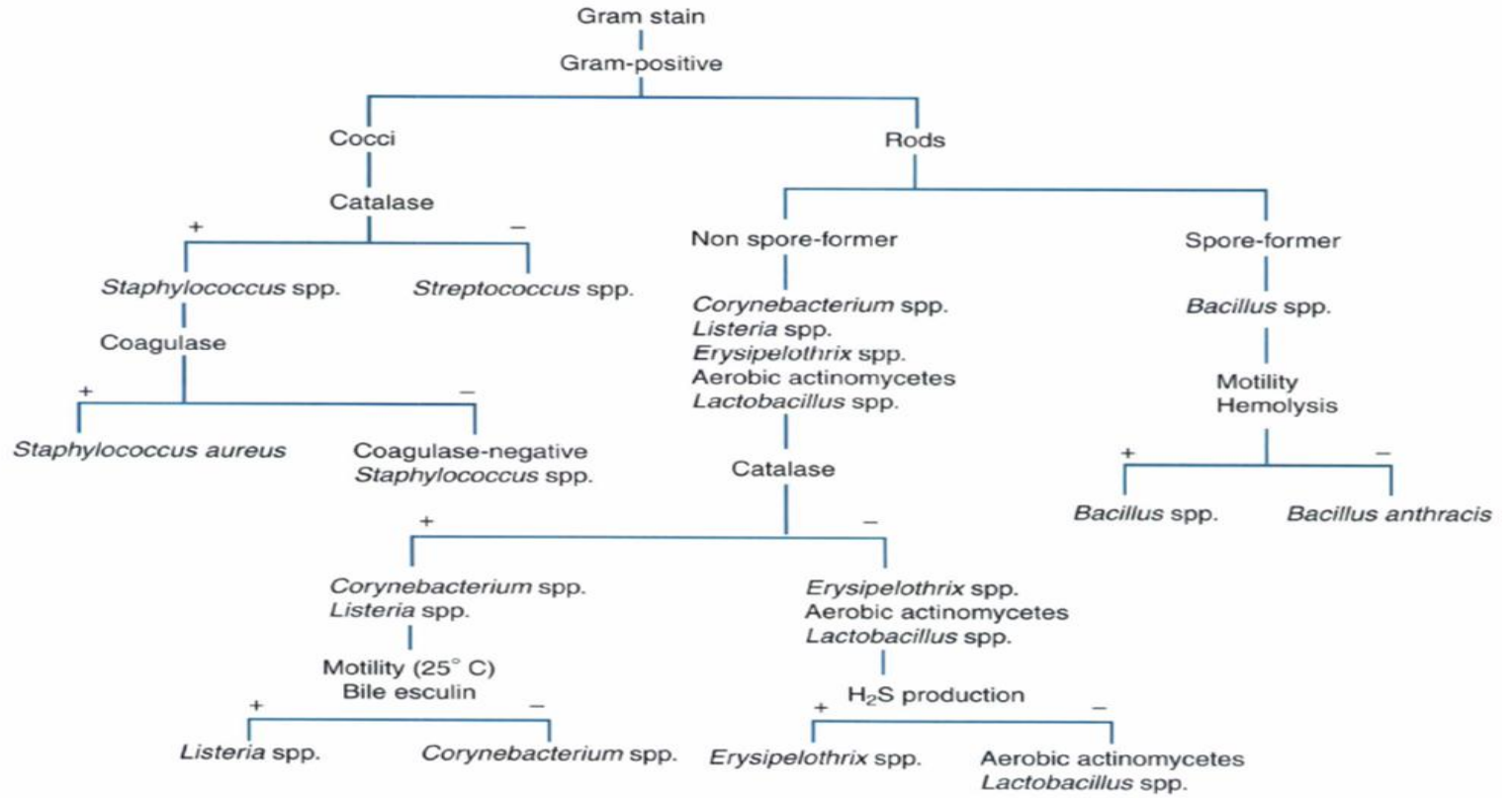
علاوه بر S.aureus، S.lugdunensis، S.intermedius، S.schleferi و S.tryicus نیز کوآگولاز مثبت میباشند.

چارت شناسایی کوکسی های گرم مثبت کاتالاز منفی

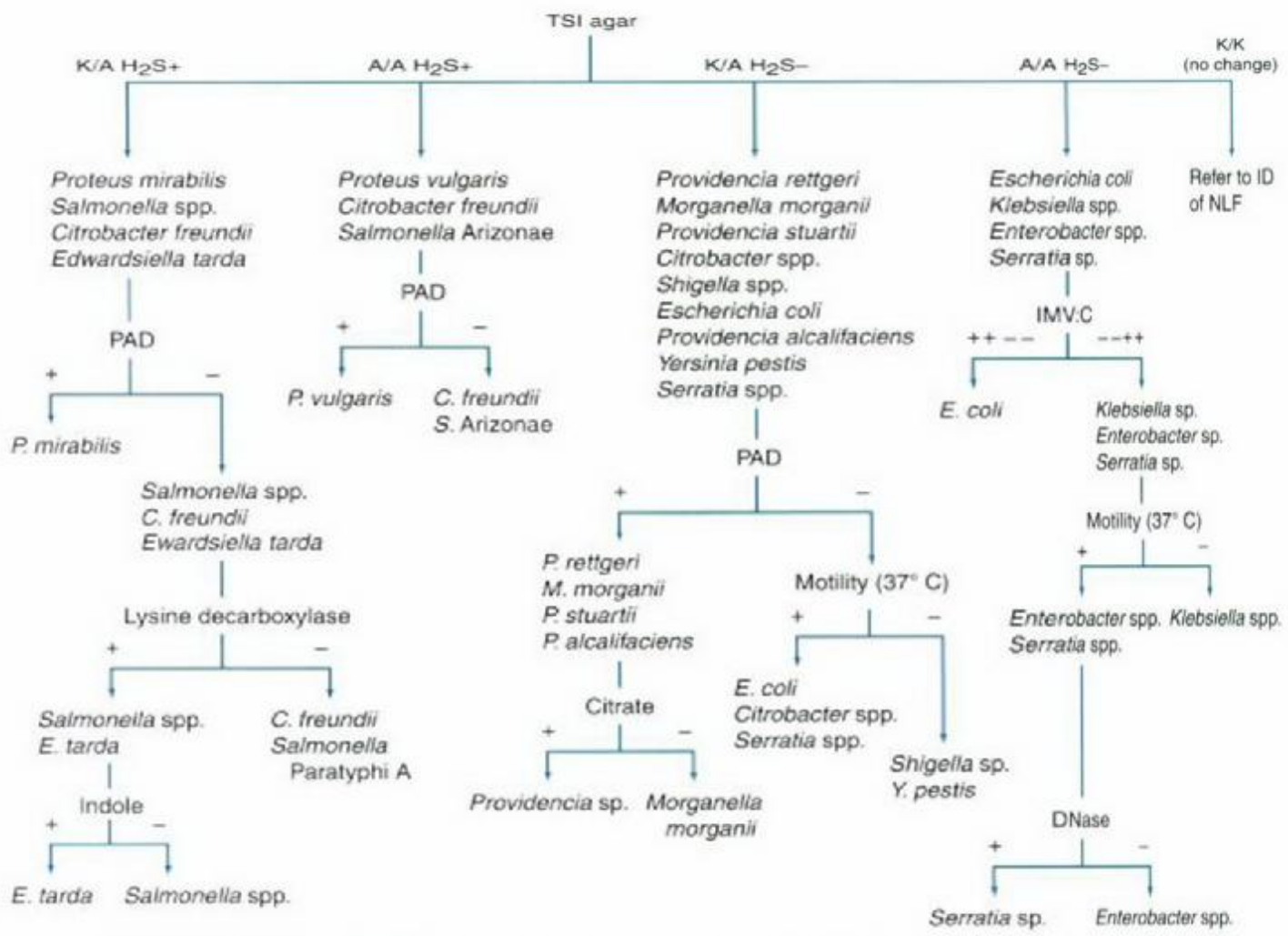


*Optochin disk ≥14mm:S <9mm:R 9-13mm:Do Bile esculin

چارت شناسائی باسیل های گرم مثبت



چارت تشخیص احتمالی انتروباکتریاسه ها در برخورد با آگار



TSI

- شناسایی 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 +	<i>Salmonella</i> spp. <i>Edwardsiella</i> spp.
K/A H_2S +	K/K or K/NC H_2S +	<i>Salmonella</i> spp. (rare)
K/Ⓐ	K/K or K/NC	<i>Salmonella</i> spp. (rare)
K/A	K/K or K/NC H_2S +	<i>Salmonella typhi</i> (rare)
K/Ⓐ	K/K or K/NC	<i>Salmonella</i> spp. (rare)
K/Ⓐ	K/A H_2S +	<i>Salmonella paratyphi</i> A (usually H_2S -)
K/Ⓐ	K/A or A/A	<i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella paratyphi</i> A <i>Shigella flexneri</i> 6 (uncommon) <i>Aeromonas</i> spp. (oxidase-positive)
K/A	K/K or K/NC	<i>Plesiomonas</i> sp. (oxidase-positive) <i>Salmonella typhi</i> (rare) <i>Vibrio</i> spp. (oxidase-positive)
K/A	K/A or A/A	<i>Escherichia coli</i> <i>Shigella</i> groups A-D <i>Yersinia</i> spp.
A/Ⓐ H_2S +	K/K or K/NC H_2S +	<i>Salmonella</i> spp. (rare)
A/Ⓐ	K/A or A/A	<i>Escherichia coli</i> (rare)
A/A	K/A or A/A	<i>Escherichia coli</i> <i>Yersinia</i> spp. <i>Aeromonas</i> spp. (oxidase-positive) <i>Vibrio cholerae</i> (rare, oxidase-positive)
A/A	K/K or K/NC	<i>Vibrio</i> spp. (oxidase-positive)

مشخصات بیوشیمیائی گونه های انتروباکتریاسه

Tests or Substrate	Escherichieae	Edwardsiellae	Citrobacteriaceae	Salmonelleae*	Klebsielleae	Proteeae†	Yersinieae
Hydrogen sulfide (TSI agar)	-	+	+ or -	+	-	+ or -	-
Urease	-	-	(+*) 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, +, (+), -; +*, weakly positive reaction TSI, triple sugar iron; KCN, potassium cyanide.


**Salmonella* serovar Typhi and Paratyphi and some rare serovars fail to use citrate in Simmons medium. Cultures of serovar Paratyphi 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.

راهنمای انتخاب محیط های کشت برای نمونه های مختلف

محیط نمونه	محیط های کشت برای بازیابی باکتریهای هوازی و بی هوازی اختیاری					محیط های کشت برای بازیابی باکتریهای بی هوازی		
	BAP(blood agar plate)	MAC(MacConkey agar) or EMB(eosin methylene blue)	CBA(chocolate blood agar)	Broth	Other	BAP(blood agar plate)	BBE(<i>Bacteroides</i> bile esculin agar)	PEA(phenylethyl alcohol)
حفرات بدن					BCB((blood culture bottles) جهت حجمهای زیاد			
مایعات								
مایع مغزی نخاعی	X		X	X (برای نمونه های شانت)				
مایع صفاقی	X	X	X		BCB(blood culture bottles)	X	X	X
مایع جنبی؛ مایع پریکارد	X		X	X	BCB	X		
مایع سینوویال	X		X	X	BCB			
زخم ها								
آسپیره	X	X	X			X	X	X
سواب	X	X				جهت کشت بیهوازی توصیه نمیشود		
بافت	X	X	X	X		X	X	X
مجرای تنفسی								
خلط	X	X	X					
گلو	X							
لاواژ برونش	X	X	X		CYE(charcoal yeast extract; for <i>Legionella</i> or <i>Nocardia</i> requests)			
براش؛ شستشوها	X	X	X			X	X	X
بینی	X							

		محیط های کشت برای بازیابی باکتریهای هوازی و بی هوازی اختیاری					محیط های کشت برای بازیابی باکتریهای بی هوازی		
محیط نمونه	BAP(blood agar plate)	MAC(MacConkey agar) or EMB(eosin methylene blue)	CBA(chocolate blood agar)	Broth	Other	BAP(blood agar plate)	BBE(<i>Bacteroides</i> bile esculin agar)	PEA(phenylethyl alcohol)	
ادراری تناسلی									
واژینال/ رکتال جهت استرپتوکوکهای گروه B (GBS)				LIM(enrichment broth for Group B Streptococcus)	Selective or chromogenic GBS media				
سایر موارد	X	X	X		GC media(Thayer–Martin or Martin–Lewis or other media enriched for recovery of <i>N. gonorrhoeae</i>)	X	X	X	
سرویکس					GC media				
پیشابراه/ آلت تناسلی مرد					GC media				
ادرار									
ادرار میانی	X	X			Screen; chromagar				
آسپیره سوپراپوبیک	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؛ آسپیره گوش میانی	X	X				X			
کاتترهای عروقی	X								

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

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

۴- مواد و ابزار لازم:


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

۴- 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.

صفحه 1 از 6	دستورالعمل	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	تهیه انواع محیط کشت، معرفها و رنگهای مورد استفاده در آزمایشگاه میکروب شناسی	

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 می باشد. 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 برات (BHB/BHA)، بایل اسکولین آگار، بیسموت سولفیت آگار، بروسلا مدیوم، کوکدمیت برات، کمپیلوباکتر سلکتیو آگار، کری بلر، کازو آگار و برات (TSA/TSB)، CTA مدیوم، DNase تست آگار، EMB آگار، هموفیلوس سلکتیو آگار، هکتون انتریک آگار، کلايگلر آبرون آگار (KIA)، لایزین دکربوکسیلاز سولفیدراز مدیوم (LDS)، لوون اشتاین جنسن مدیوم، لوفلر بلاد سرم، لایزین آبرون آگار، مولر هینتون آگار و برات (MHA/MHB)، MRVP برات، مانیتول سالت آگار، مک کانکی آگار، مالونات برات، نوترینت آگار و برات (N.A/N.B)، نیترات برات، اورنی تین دکربوکسیلاز آرژینین دهیدرولاز تست برات، OF بازال مدیوم، پیتون واتر، فنیل آلانین آگار، فنل رد برات و آگار، پیتون آگار، سیمون سیترات آگار، SIM مدیوم، سالمونلا شیگلا آگار (S.S)، سلنیت برات، تریپل شوگر آبرون آگار (TSI)، TCBS آگار، تایو گلیکولات برات، اوره آگار و برات، 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)

پیتون = 5 g

3 g = Beef Extract

ژلاتین = 120 g

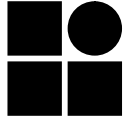
مقادیر فوق را به 1000CC آب مقطر اضافه کرده و در بن ماری جوش قرار دهید تا کاملاً حل شوند (از حرارت دادن این محیط کشت بر روی شعله پرهیز کنید). سپس در اتوکلاو به مدت 15 دقیقه و دمای 121°C در فشار 15 پوند (15 Lb) استریل نمایید. سپس در لوله تقسیم کرده و PH محیط کشت را به 6/8 برسانید

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

پیتون = 10 g

کلور سدیم (NaCl) = 10 g

آب مقطر = 1000CC

صفحه 2 از 6	دستورالعمل	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	تهیه انواع محیط کشت، معرفیها و رنگهای مورد استفاده در آزمایشگاه میکروب شناسی	

سپس pH را به ۸/۶-۹ برسانید و در شرایط ۱۵ دقیقه، فشار ۱۵ Lb در اتوکلاو قرار داده و استریل نمایید. دما نیز 121°C است. (برای تنظیم از سود ۱ N 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 (۱-۲ ml) در لوله های درپیچ دار تقسیم نموده و در شرایط 121°C ، ۱۵ دقیقه و فشار ۱۵ Lb 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 می باشد، بنابراین ۶٪ نمک به این محیط پایه اضافه نمایید تا مقدار ۶/۵٪ نمک حاصل شود. شرایط استریلیزاسیون همان دمای 121°C ، فشار ۱۵ Lb و زمان ۱۵ دقیقه می باشد.

روش تهیه انواع قندها:

محلول ۱۰٪ از انواع قندها تهیه نمایید (قند = ۱۰g و آب مقطر = ۱۰۰cc)
 روش استریلیزاسیون قندها استفاده از فیلتراسیون می باشد. در غیر اینصورت می توان همه انواع قندها را در فشار ۵ Lb به مدت ۵ دقیقه استریل نمود.
 اگر بخواهید قندها را از هم تفکیک نمایید، شرایط استریلیزاسیون برای انواع لاکتوز، مالتوز، گزیلوز، سالیسین، سوکروز، تراهالوز و آرابینوز شامل فشار ۱۵ Lb، دمای 121°C به مدت ۳ دقیقه و شرایط استریلیزاسیون برای سایر قندها شامل فشار ۱۲-۱۰، دمای $118-116^{\circ}\text{C}$ و زمان ۱۵ دقیقه می باشد.

روش تهیه انواع معرف ها و رنگ ها

روش تهیه معرف های VP

- تهیه آلفا نفتول (معرف A):

پودر آلفا نفتول: ۵ g

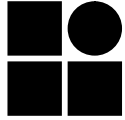
اتانول: ۱۰۰cc

-تهیه KOH (پتاس) (معرف B):

KOH: ۴۰g

کراتین (Cr): ۰/۳ g

آب مقطر: ۱۰۰cc

صفحه 3 از 6	دستورالعمل	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	تهیه انواع محیط کشت، معرفها و رنگهای مورد استفاده در آزمایشگاه میکروب شناسی	

معرف ها در ظروف تیره و در یخچال نگهداری می شوند. 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 = 0.1 g

اتانول = 300 CC

پودر متیل رد را در اتانول حل کرده سپس با آب مقطر حجم آنرا به 500 CC برسانید. معرف در ظرف تیره و در یخچال نگهداری می شود. 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 = 10 g

آمیل الکل: 150 CC

اسید کلریدریک غلیظ و تازه: 50 CC

دی متیل آمینو بنز آلدئید 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 (بر حسب میزان کار) کنترل کیفی گردد.

روش تهیه معرف کلرور فریک

کلرور فریک = 10 g

آب مقطر = 100 CC (روش غیر اسیدی)

(روش دیگر تهیه این معرف شامل کلرور فریک: 12 g ، اسید کلریدریک غلیظ: $2/5 \text{ CC}$ و آب مقطر 100 CC می باشد، که این روش، روش اسیدی است). معرف در ظروف تیره و در یخچال نگهداری می شود. چون دارای پایداری متغیر است، لازم است بطور هفتگی (بر حسب میزان کار) کنترل کیفی گردد.


روش تهیه معرف های احیاء نیترات

-تهیه معرف A:

N, N دی متیل آلفا نفتیل آمین: 6 g

اسیداستیک گلاسیال $5N$ ، (30%) : 1000 CC

مقدار فوق از N, N دی متیل آلفا نفتیل آمین را در کمتر از 1000 CC اسید استیک گلاسیال $5N$ حل کرده و کمی حرارت ملایم دهید تا حل شود. حجم را به یک لیتر رسانیده، محلول را از صافی رد کنید.

صفحه 4 از 6	دستورالعمل	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	تهیه انواع محیط کشت، معرفیها و رنگهای مورد استفاده در آزمایشگاه میکروب شناسی	

-تهیه معرف B:

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

اسیداستیک گلاسیال ۵N، (۳۰٪): ۱۰۰۰ CC

مقدار فوق از سولفانلیک 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 بوتانول 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 K₁

پودر ویتامین K₁ = ۰/۲g

اتانول = ۲۰CC

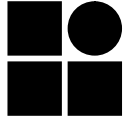
محلول در ظرف تیره و در یخچال نگهداری می شود. درب ظرف باید کاملاً محکم بسته شود. غلظت نهایی محلول ۰/۱ μg/ml برای محیط های مایع و ۱۰ μg/ml برای محیط های آگاردار است. پودر ویتامین K₁ را روی یک قطعه کوچک فویل آلومینیومی استریل وزن کرده و در شرایط آسپتیک به ۲۰ml اتانول در یک بطری استریل اضافه کنید. برای رقیق 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 برات 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°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.

صفحه 5 از 6	دستورالعمل	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	تهیه انواع محیط کشت، معرفیها و رنگهای مورد استفاده در آزمایشگاه میکروب شناسی	

روش تهیه آب اکسیژنه (H₂O₂) ۳٪

محلول آب اکسیژنه ۳۰٪ را به نسبت ۱:۱۰ با آب مقطر رقیق نمایید. (یعنی ۱CC آب اکسیژنه ۳۰٪ را به ۹CC آب مقطر 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 ۹CC آب مقطر) سپس این محلول را با چهار حجم از محلول اگزالات آمونیوم رقیق کنید (۱CC محلول کریستال ویوله رقیق شده و ۴CC اگزالات آمونیوم). محلول ذخیره و مصرفی کریستال ویوله، در ظرف تیره و در دمای اتاق نگهداری می شود.

روش تهیه لوگل

ید = ۱g

یدور پتاسیم = ۲g

آب مقطر = ۲۴۰CC

محلول آبی بیکربنات سدیم ۵٪ = ۶۰CC

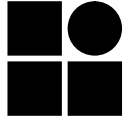
در مقدار کمی از آب مقطر، ید و یدور پتاسیم را کاملاً حل نمایید، بعد حجم را با آب مقطر به ۲۴۰CC برسانید. محلول ۵٪ بیکربنات سدیم (بیکربنات سدیم: ۵g آب مقطر: ۱۰۰C) را نیز به آن اضافه نمایید. محلول در دمای اتاق نگهداری می شود. درب آنرا باید کاملاً محکم ببندید.

روش تهیه محلول الکل-استون

اتانول = ۲۵۰CC

استون = ۲۵۰CC

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

صفحه 6 از 6	دستورالعمل	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	تهیه انواع محیط کشت، معرفها و رنگهای مورد استفاده در آزمایشگاه میکروب شناسی	

روش تهیه فوشین / یا سافرانین ذخیره

پودر فوشین = ۲g

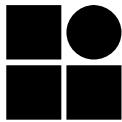
اتانول = ۱۰۰CC

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 رقیق نمایید. محلولها در ظروف تیره، تهیه و در دمای اتاق ذخیره می شوند.

صفحه 1 از 11	دستورالعمل فنی	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	تهیه و کنترل کیفیت محیط های کشت	

تهیه و کنترل کیفیت محیط های کشت

نکات عمومی در مورد محیط های کشت:

آب:

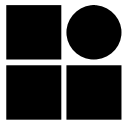
کیفیت محیط های کشت بطور مستقیم بستگی به کیفیت مواد خام مورد استفاده در تهیه آنها دارد. آب یکی از مهمترین موادی است که در تهیه محیط های کشت بکار میرود. سه معیار مهم برای آب مورد استفاده در تهیه محیط های کشت شامل وجود یونهای مس، قدرت هدایت الکتریکی و pH می باشد. در شرایط ایده آل یونهای مس بدلیل خاصیت مهارکنندگی 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 و همچنین pH 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 روی قوطی نصب گردیده است، مقدار مناسبی از پودر محیط کشت را با دقت وزن نمایید. ظرف محیط کشت را دور از کوران هوا و رطوبت باز کنید. از استنشاق پودرها به خصوص آنهایی که داراي مواد سمی هستند و تماس طولانی مدت آنها با پوست اجتناب کنید. پودر را به سرعت، به دقت و بدون ایجاد توده ای از غبار وزن کنید. هرچه زودتر درب ظرف را ببندید. نصف حجم آب مورد نیاز را داخل ظرف بریزید. سپس مقدار وزن شده محیط کشت را به آن اضافه نمایید. برای چند دقیقه به تندی تکان دهید. باقیمانده آب را به دیواره ظرف بریزید تا ذرات محیط کشت چسبیده به دیواره نیز وارد محلول شوند. این مرحله بسیار مهم است، چون پودر خشک محیط کشت در بالایی سطح آب، ممکن است در اتوکلاو استریل نشود و منبع آلودگی گردد.

حل کردن محیط کشت:

محیط های کشت بدون آگار، معمولا با تکان دادن آهسته و ملایم حل خواهند شد. اما محیط های کشت حاوی آگار باید قبل از حرارت دادن به مدت چند دقیقه با آب مخلوط شوند. سپس حرارت داده شوند تا آگار قبل از اتوکلاو کردن، حل شود. محیط های کشت را بجوشانید بدون آنکه بسوزند. محیط های کشتی که نباید اتوکلاو شوند، بعد از این مقدار حرارت دادن، برای تقسیم داخل پلیت ها یا ظروف دیگر آماده خواهند بود. اکثر محیط های کشت به استریلیزاسیون نهایی (در دمای 121°C به مدت ۱۵ دقیقه) نیاز خواهند داشت.

صفحه 2 از 11	دستورالعمل فنی	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	تهیه و کنترل کیفیت محیط های کشت	

اندازه گیری و تنظیم pH:

محیط های کشت دهیدراته اگر بطور مناسب تهیه شوند نیازی به تنظیم pH ندارند. pH نهایی محصول استریل شده را می توان روی پلیت یا بطری اندازه گیری کرد، اما باید آنها را بعد از سنجش pH دور ریخت. بنابراین بعد از استریل شدن و خشک شدن محیط کشت تا دمای 25°C ، مقدار pH را در حد مورد نظر (± 0.2) تنظیم نمایید. تنظیم pH معمولاً با استفاده از هیدروکسید سدیم ۴۰ گرم در لیتر (تقریباً یک مولار) و یا با استفاده از اسید کلریدریک ۳۶/۵ گرم در لیتر (تقریباً یک مولار) انجام می شود.

توزیع:

محیط کشت را در ظرفی مناسب با حجم ۲ تا ۳ برابر حجم محیط کشت بریزید تا بتوانید آنرا به خوبی تکان دهید و مخلوط کنید.

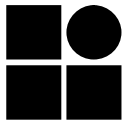
استریلیزاسیون:

بعضی از محیط های کشت به استریلیزاسیون با اتوکلاو احتیاجی نداشته و با جوشاندن استریل می شوند که دستور ساخت آنها بر روی برچسب قوطی محیط کشت قید گردیده است. استریلیزاسیون سایر محیط های کشت توسط حرارت مرطوب یا صافی غشایی انجام می گردد که این موارد نیز بر روی برچسب قوطی محیط کشت قید گردیده است.

الف) استریلیزاسیون با حرارت مرطوب:

استریلیزاسیون محیط کشت تا حجم یک لیتر، در اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای 121°C (فشار ۱/۲ کیلوگرم بر سانتیمترمربع) انجام می گیرد. برای حجم های بیشتر از یک لیتر باید چرخه استریلیزاسیون را بطور مناسب تغییر داد. اما چون اکثر مشکلات در استریلیزاسیون محیط های کشت وقتی رخ میدهد که مقادیر بیشتر از دو لیتر محیط کشت باید استریل شود، لذا توصیه می شود که مقادیر زیاد محیط کشت را در حجم های کوچکتر تقسیم نمایید.

کنترلی کیفی اتوکلاو، کنترل دما و فشار اتوکلاو بایستی بطور مداوم انجام گردد. برای کنترل اتوکلاو از اندیکاتورهای شیمیائی TST استفاده می کنند. از اندیکاتورهای بیولوژیکی که جهت کنترل کارائی اتوکلاو استفاده می کنند اسپور *Bacillus Stearothermophilus* را می توان نام برد که بصورت تجاری قابل دسترس می باشد.

صفحه 3 از 11	دستورالعمل فنی	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	تهیه و کنترل کیفیت محیط های کشت	

ب) استریلیزاسیون با صافی غشایی:

از صافی غشایی برای استریل کردن محیط های کشت و ترکیبات حساس به حرارت استفاده می شود. استریلیزاسیون بوسیله صافی غشایی تحت شرایط خلاء یا افزایش فشار انجام می پذیرد. از غشاء ها و صافیهای با قطر منفذ ۰/۲۲ یا ۰/۴۵ میکرومتر استفاده نمایید. این فیلترها باید قبل از استفاده، در اتوکلاو استریل شوند. در مورد غشاء ها و صافیهایی که در بسته بندیهای استریل به فروش می رسند، به دستورالعمل سازنده مراجعه نمایید. قسمت های مختلف دستگاه صافی را با صافی یا بدون صافی در اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 121°C استریل نمایید.

آماده سازی جهت مصرف:

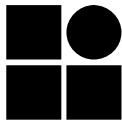
بعد از استریلیزاسیون، اجازه دهید دمای محیط کشت به حدود 50°C برسد، سپس با رعایت شرایط آسپتیک در ظروف نهایی تقسیم نمایید. هیچ وقت محیط کشت را در دمای بالاتر از 50°C تقسیم نکنید. مکمل های حساس به گرما و حرارت باید بعد از این که دمای محیط کشت به حدود 50°C رسید، به آن اضافه شوند. اجازه دهید دمای مکمل (ساپلمنت) استریل قبل از این که به محیط کشت اضافه شود، به دمای اتاق برسد. سپس مکمل را با رعایت شرایط آسپتیک به محیط کشت اضافه نموده، خوب مخلوط کنید و در ظروف نهایی که از قبل استریل شده اند، تقسیم نمایید.

پتری دیش:

کیفیت پتری دیش های مورد استفاده در تهیه محیط نیز اهمیت دارد. معمولاً پتری دیش ها را با اتیلن اکساید و یا 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 بروسلیکات استفاده کرد. استفاده از پتری دیش هایی از جنس قلیائی ممکن است موجب آزاد سازی قلیا در داخل محیط کشت گردد.

پارامترهای فیزیکی:

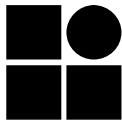
محیط کشت های تهیه شده باید قبل از استفاده، از لحاظ فیزیکی و ظاهری نیز بررسی شوند. معیارهای ظاهری قابل بررسی شامل وجود حباب، حفره، ناصافی سطح محیط، ترک خوردگی، یخ زدگی می باشد. ضخامت محیط نیز اهمیت دارد. ضخامت محیط های کشت پلیتی نباید کمتر از ۳ میلی متر باشد.

صفحه 4 از 11	دستورالعمل فنی	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	تهیه و کنترل کیفیت محیط های کشت	

نگهداری محیط های کشت تهیه شده:

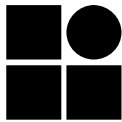
طول عمر محیط های کشت تهیه شده بستگی به نوع اجزاء تشکیل دهنده محیط، نحوه نگهداری و ذخیره کردن آنها دارد. تمامی محیط های کشت باید دور از نور نگهداری شوند. تابش نور به محیط های کشت موجب تشکیل مواد باکتریوستاتیک و باکتریساید مانند پراکسیداز می گردد. طول عمر اغلب محیط های کشت پلیتی در دمای ۴ درجه سانتیگراد یک هفته می باشد ولی اگر در داخل کیسه های پلاستیکی بسته بندی شوند بطوریکه هوا داخل آنها نفوذ نکند تا ۳-۴ 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 ای در مقایسه با محیط های کشت پلیتی عمر طولانی تری دارند. اغلب این محیط های کشت اگر در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شوند ۳-۶ ماه قابل مصرف می باشند.

موارد استثناء: تایوگلیکولات برات، اندول نیترا ت برات و SIM فقط به مدت یکماه قابل نگهداری می باشند. محیط های CTA Medium و OF Medium حاوی کربوهیدرات و مولر هینتون برات فقط به مدت ۶ هفته قابل نگهداری می باشند.

صفحه 5 از 11	دستورالعمل فنی	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	تهیه و کنترل کیفیت محیط های کشت	

جدول ۱- علل اشکالات رایج در محیط های کشت

علت	اشکال
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 سازی زیاد با مایع تلقیح یا مکمل ها و ذخیره سازی طولانی در دمای ۵۰ °C	نرم بودن آگار
استفاده از شیشه های قلیائی، آب ناخالص، حرارت بیش از حد، آلودگی شیمیائی، اندازه گیری pH در دمای نامناسب، استفاده از pH متر غیرکالیبره، استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده، ذخیره سازی نادرست محیط کشت دهیدراته و کیفیت پایین آب یا ظروف	pH نامناسب
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 سازی طولانی در دمای ۵۰ °C	رنگ یا تیرگی غیرطبیعی
حرارت دادن بیش از حد (سوزاندن محیط)، استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده، قرارگیری در معرض مستقیم نور خورشید و حجم نادرست مکمل اضافه شده	سمیت
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 سازی طولانی محیط کشت، خشک شدن، تیرگی و تغییر pH محیط کشت	رشد ضعیف ارگانیزم یا داشتن خاصیت ضعیف انتخابی و یا افتراقی
حرارت بیش از حد محیط در هنگام افزودن مکمل به آن	لخته یا کواگوله شدن محیط کشت
رگه رگه سیاه: نیم سوز شدن آگار رگه رگه روشن: سرد شدن آگار موقع افزودن مکمل	رگه رگه شدن محیط کشت
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 سازی طولانی در دمای ۵۰ °C	ایجاد رسوب یا کدورت

صفحه 6 از 11	دستورالعمل فنی	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	تهیه و کنترل کیفیت محیط های کشت	

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 منشأ 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.

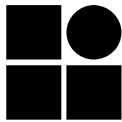
منبع سویه های کنترل:

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 می 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 های بیشتر به کار می روند.

روش انجام آزمون کنترل کیفیت محیط های کشت

تهیه سوسپانسیون میکروبی:

یک کشت از ارگانیسم کنترل کیفی روی پلیت بلاداگار تهیه کنید. بعد از انکوباسیون پلیت ۳-۵ کلنی ایزوله را در مقدار کمی تریپتیکس سوی برات (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 روی پلیت، سوسپانسیون میکروبی مطابق با کدورت نیم مک فارلند تهیه کرد. بدین ترتیب که ۳-۵ کلنی ایزوله روی پلیت ۲۴ ساعته را در ۳-۵ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل حل کرده و کدورت آن را با نیم مک فارلند تنظیم نمایید. با هر روشی که این سوسپانسیون

صفحه 7 از 11	دستورالعمل فنی	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	تهیه و کنترل کیفیت محیط های کشت	

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

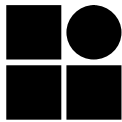
بررسی آزمایش های عملکردی محیط کشت (Performance testing)

۱- آزمایش ظرفیت مغذی بودن (Nutritional activity) محیط های کشت پلیتی مانند بلاد آگار
 سوسپانسیون اولیه را به نسبت ۱ به ۱۰۰ در نرمال سالین یا آب مقطر استریل رقیق نموده و مقدار $10 \mu\text{l}$ یا 0.1 ml سوسپانسیون رقیق شده را به محیط کشت مورد آزمایش تلقیح کنید. تعداد کلنی های مورد انتظار در هر پلیت (CFU/plate) 10^4-10^3 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 پلیتی مانند مکانکی آگار
 سوسپانسیون اولیه را به نسبت ۱ به ۱۰ در نرمال سالین یا آب مقطر استریل رقیق نموده و مقدار $10 \mu\text{l}$ یا 0.1 ml سوسپانسیون رقیق شده را به محیط کشت مورد آزمایش تلقیح کنید. تعداد کلنی های مورد انتظار در هر پلیت (CFU/plate) 10^5-10^4 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 $10 \mu\text{l}$ یا 0.1 ml از سوسپانسیون اولیه تهیه شده مطابق با نیم مک فارلند (بدون رقیق سازی) 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 $35 \pm 2^\circ\text{C}$ می باشد. محیط شکلات آگار و سایر محیط های کشت برای جداسازی انتخابی گونه های نیسریای بیماریزا باید در $10-5\% \text{ CO}_2$ انکوبه شوند و در فواصل زمانی ۲۴-۱۸ ساعت و سپس ۴۸-۲۴ ساعت بررسی گردند.
 برای باکتری های 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 42°C در شرایط میکروآنروفلیک غنی از CO_2 به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شوند.

صفحه 8 از 11	دستورالعمل فنی	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	تهیه و کنترل کیفیت محیط های کشت	

۴- کنترل محیط های کشت برای آزمایشهای بیوشیمیایی

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 کافی از کلنی های باکتریهای مورد نظر می 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 عاری از آلودگی 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.

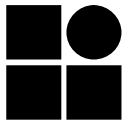
بررسی آلودگی محیط های کشت (استریل بودن محیط های کشت):

در صورتیکه تعداد پلیت یا لوله تهیه شده در هر سری ساخت یا Lot، ۱۰۰ عدد یا کمتر باشد، باید به تعداد ۳-۵٪ محیط های تهیه شده را در دمای $37-35^{\circ}C$ به مدت ۲-۵ 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 مورفولوژیکی کلنی ها بارز باشد. در مورد محیط های انتخابی، رشد بعضی از ارگانیسم های خاص مهار می شود، ضمن اینکه اجازه رشد کافی به سایر ارگانیسم می دهد. در بعضی موارد، واکنشهای رنگی خاص یا همولیز همچنانکه در جدول ۲ آمده است، باید ایجاد شود. مثلاً در مورد کشت بلاآگار 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:

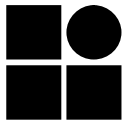
صفحه 9 از 11	دستورالعمل فنی	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	تهیه و کنترل کیفیت محیط های کشت	

محیطهای کشت آماده مصرف باید از نظر موارد زیر نیز بررسی شوند:

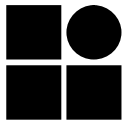
- شکستگی ظروف پتری
- پر شدن ناصاف پلیتها
- ترک خوردگی محیط کشت در پلیتها
- وجود همولیز (برای بلاد آگار)
- یخ زدگی
- وجود مقدار زیاد حباب یا حفره در سطح محیط کشت

جدول ۲

نتیجه قابل انتظار	ارگانیسم های کنترلی	زمان انکوباسیون	محیط کشت
رشد مثبت، محیط سیاهرنگ می شود رشد منفی	<i>S. faecalis</i> استرپتوکوک فکالیس <i>S. pyogenes</i> استرپتوکوک پایورژنز	۲۴ ساعت	بایل اسکولین آگار
رشد مثبت دارای همولیز بتا رشد مثبت دارای همولیز آلفا رشد مثبت	<i>Streptococcus pyogenes</i> استرپتوکوک پایورژنز <i>S. pneumoniae</i> استرپتوکوک پنومونیه هموفیلوس آنفلوانزا	۲۴ ساعت	بلاد آگار جار شمع دار CO ₂
رشد مثبت رشد مثبت	<i>Haemophilus influenzae</i> سالمونلا تایفی موریروم	۲۴ ساعت	شکلات آگار
مثبت (بنفش رنگ می شود) منفی (بدون تغییر رنگ) مثبت	<i>S. typhimurium</i> سالمونلا تایفی موریروم <i>Shigella flexneri</i> شیکلافلکسنری	۴۸ ساعت	لایزین دکربوکسیلاز (محیط بوسیله روغن استریل پوشانده میشود)
منفی مثبت	<i>S. typhimurium</i> سالمونلا تایفی موریروم <i>K. pneumoniae</i> کلیسیلا پنومونیه	۴۸ ساعت	اورنیتین (دکربوکسیلاز)
منفی مثبت	<i>S. typhimurium</i> سالمونلا تایفی موریروم پروتئوس میرابیلیس	۴۸ ساعت	آرژینین (دی هیدرولاز)
منفی مثبت	<i>E. coli</i> اشرشیا کلی <i>Bacillus subtilis</i> باسیلوس سوبتیلیس	۲۴ ساعت	ژلاتیناز
گاز + A/A, SH ₂ گاز یا بدون گاز + K/A, SH ₂ K/A تغییر نمی کند	<i>Citrobacter freundii</i> سیتروباکتر فروندی <i>S. typhimurium</i> سالمونلا تایفی موریروم <i>Sh. flexneri</i> شیکلا فلکسنری اسیتوباکتر کالکوآسیتیوس <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	۲۴ ساعت	کلاپگر آبرون آگار

صفحه 10 از 11	دستورالعمل فنی	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	تهیه و کنترل کیفیت محیط های کشت	

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

صفحه 11 از 11	دستورالعمل فنی	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	تهیه و کنترل کیفیت محیط های کشت	


رشد مثبت- رنگ آبی کلنی های زرد رنگ	<i>K. pneumonia</i> کلسیلا پنومونیه <i>Vibrio SPP</i>	۲۴ ساعت	انکوباتور گذاشته شود) TCBS آگار
رشد مثبت رشد مثبت	نایسریا مننژیتیدیس <i>Neisseria meningitidis (CO₂)</i> نایسریا گونوره <i>N. Gonorrhoeae</i>	۲۴ ساعت	تایر مارتین
رشد منفی رشد مثبت	اشرشیا کلی <i>E. coli</i> باکتر ونیس فراجیلیس <i>Bacteriodes fragilis</i>	۲۴ ساعت	تایوگلیکولات براث Thioglycollate broth
گاز + SH ₂ , A/A گاز یا بدون گاز + SH ₂ , K/A K/A تغییر نمی کند	سیتروباکتر فروندی <i>Citrobacter frundii</i> سالمونلا تایفی موریم <i>S. typhimurium</i> شیگلا فلکسنری <i>Sh. flexneri</i> اسینتوباکتر کالکوستیکوس <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	۲۴ ساعت	TSI عمق محیط باید ۳ سانتی متر باشد (با درپنج شل اتو گذاری شود)
منفی مثبت، صورتی	اشرشیا کلی <i>E. coli</i> پروتئوس میرابیلیس <i>P. mirabilis</i>	۲۴ ساعت	محیط اوره

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 های کشت آزمایشگاهی (موارد مصرف و کنترل کیفی) به انضمام اطلس رنگی محیط های کشت؛
گرد آوری و ترجمه مهناز صارمی - محمد علی صارمی؛ آزمایشگاه مرجع سلامت، وزارت بهداشت، درمان
و آموزش پزشکی؛ ۱۳۸۷

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

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 ارگانیزم مورد نظر

۳- مواد و معرفها:

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

۴- روش انجام آزمایش:

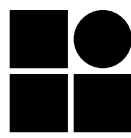
- یک سوسپانسیون از ارگانیزم مورد نظر در آب مقطر استریل یا Broth تهیه نمایید.
- کدورت سوسپانسیون باید مطابق با استاندارد نیم مک فارلند باشد .
- با یک سوآب استریل روی نصف پلیت بلاد آگار کشت دهید.
- تحت شرایط استریل یک دیسک نووبیوسین روی ناحیه تلقیح شده قرار دهید. با پنس استریل به آرامی روی دیسک فشار آورید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

۶- 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.

صفحه 1 از 3	دستورالعمل فنی	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	روش تعیین حجم لوپ	

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 و تعداد 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 است در 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

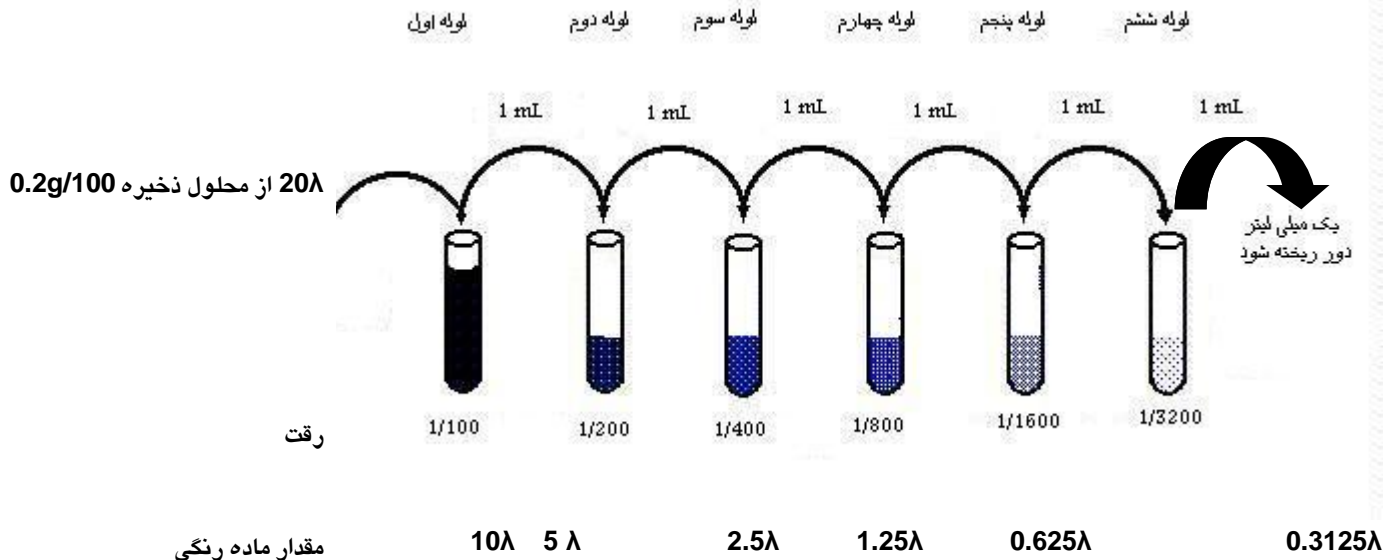
- ۱- پودر اوانس بلو (Evans Blue). این ماده به صورت پودر تجاری قابل‌دسترس بوده و به آسانی در آب حل می‌شود.
- ۲- آب مقطر
- ۳- لوله آزمایش
- ۴- پیپت یا سمپلر
- ۵- اسپکتروفتومتر یا فتومتر کالیبره
- ۶- کاغذ میلیمتری

روش انجام

- ۱- 20mg از پودر رنگی اوانس بلو را در ۱۰ میلی لیتر آب حل نمایید. غلظت این محلول 0.2g/100 می‌باشد.
- ۲- ۶ لوله آزمایش انتخاب کرده ، در لوله اول 2ml و در 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 کاملاً 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

صفحه 2 از 3	دستورالعمل فنی	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	روش تعیین حجم لوپ	

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.



۳- میزان جذب نوری (OD) هر یک از ۶ محلول حاصله را به کمک اسپکتروفوتومتر در طول موج 620nm بدست آورید.

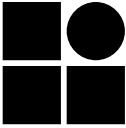
۴- جهت تعیین حجم لوپ مورد بررسی، ۱۰ لوله آزمایش برداشته و در هر یک ۱ میلی لیتر آب مقطر بریزید.

۵- لوپ تحت کنترل را بطور کاملاً 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 کاملاً خشک شود. از سوزاندن لوپ خودداری نمایید.

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

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.

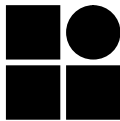
صفحه 3 از 3	دستورالعمل فنی	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	روش تعیین حجم لوپ	

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 $1/100$ و تعداد کلنی‌های روی پلیت 500 عدد باشد ، باید 500 را در 100 ضرب و نتیجه را بصورت cfu/ml $50/000$ 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.

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

۱- هدف:

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

۲- اساس آزمایش:

سیتوکروم ها، هوموپروتئین 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 ارگانسیم مورد نظر از محیط های کشت مناسب

۴- مواد و ابزار لازم:

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

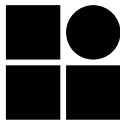
۵- مراحل انجام کار:

الف - 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 - روش غیر مستقیم:

- از پودر معرف ، محلول ۱٪ در آب مقطر تهیه کنید و ۱۰ ml از محلول را در مقادیر ۱ ml تقسیم کرده در برودت 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 از دیسک های آماده تجاری نیز استفاده نمود .
- مقداری از کلنی باکتری را روی کاغذ حاوی معرف می کشیم. (توصیه می شود که از مشتق تترامتیل پارافیلین 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.)

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

- 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.

۶- 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

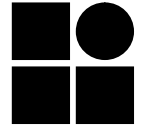
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Streptococcus pneumoniae ATCC 49619

E.coli ATCC 35218 فقط به عنوان یک میکروارگانیسم کنترلی برای ترکیبات ممانعت کننده بتالاکتامان،

مثل ترکیبات حاوی کلوالانیک 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. در محیط کشت قابل قبول، هاله عدم رشد واضحی به قطر 20 mm 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 20 mm 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، احتمالاً 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.

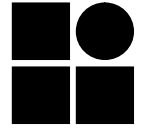
آزمایش کنترل کیفیت را باید در چه فواصل زمانی انجام داد؟

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 ۲ مراجعه 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)

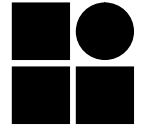
الف - نتایج خارج از محدوده قابل قبول به دلیل خطاهای مشهود و واضح شامل:

- استفاده از دیسک اشتباه
 - استفاده از سویه کنترلی اشتباه
 - آلودگی واضح سویه
 - استفاده غیرعمدی از دما و شرایط اشتباه انکوباسیون
- بوجود آمده است. در این 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 قطر هاله 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 نهایى مشکل پی برده شود.

عملیات اصلاحی اضافی:

وقتی عملیات اصلاحی فوری مشکل را حل نکرد، احتمالاً 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

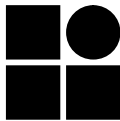


- رعایت تاریخ انقضا و شرایط نگهداری دیسکها و مواد مورد استفاده (دور از رطوبت و در دمای مناسب)
- مناسب بودن دما و اتمسفر انکوباتور
- تغییر نیافتن یا آلوده نبودن سویه های کنترل
- مطابقت صحیح سوسپانسیون تلقیح با استاندارد نیم مک فارلند
- استفاده از پلیت کشت تازه برای تلقیح (پلیت کشت باید تازه بوده و مدت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

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

نگهداری دیسکهای آنتی بیوتیکی

- دیسکها باید در یخچال 8°C و پایین تر، یا در فریزر 14°C - 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 ایمپینم، سفاکلر و ترکیبات کلانولانیک 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.

صفحه 1 از 2	راهنمای انجام آزمایش	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	کاتالاز	

۱- هدف :

- تشخیص استافیلوکوک و میکروکوک (کاتالاز مثبت) از استرپتوکوک (کاتالاز منفی)
- افتراق کلستریدیوم از باسیلوس ها (کاتالاز مثبت)
- افتراق لیستریامونوسیتوزنز (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 ۱۸-۲۴ ساعته از ارگانیزم مورد نظر

۴- مواد و تجهیزات مورد نیاز:

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

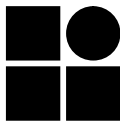
۵- مراحل انجام کار:

- 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 ایجاد 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.

۶- برنامه QC:

پراکسید هیدروژن 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*

	راهنمای انجام آزمایش	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	کاتالاز	
صفحه 2 از 2		

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 پراکسید هیدروژن می شود، ایجاد حباب های ریز به تعداد کم، بعد از ۳۰ - ۲۰ ثانیه به معنی واکنش مثبت نمی باشد.

صفحه 1 از 1	راهنمای انجام آزمایش	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	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. ارگانیسیم 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. ارگانیسیم 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 ارگانیسیم بر روی TSI ، KIA یا Broth

۴- مواد و ابزار لازم:

محیط کشت مالونات Broth

۵- روش انجام کار:

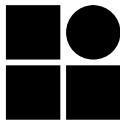
از کشت ارگانیسیم بر روی TSI ، KIA یا KI Broth به محیط مالونات Broth تلقیح نمایید. مایع تلقیح باید شفاف و رقیق باشد. کشت را در دمای $35^{\circ}C$ انکوبه نموده و آن را بعد از ۲۴-۱۸ ساعت و سپس بعد از ۴۸ ساعت برای تولید رنگ آبی بررسی نمایید. بعضی از ارگانیسیم ها فقط مقادیر کمی قلیا تولید می کنند. هر نشانی 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.

۶- 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)

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

۱- هدف آزمایش:

افتراق استافیلوکوک اورئوس از سایر میکروکوک‌ها

۲- اساس آزمایش:

غلظت بالای نمک (۷/۵٪) رشد اکثر سوش‌های گرم منفی و گرم مثبت بجز استافیلوکوک اورئوس را مهار می‌کند. استافیلوکوک می‌تواند 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 می‌شود، در این آزمایش کلنی‌های استافیلوکوک به طور مشخص زرد رنگ شده و توسط هاله زردی احاطه می‌شوند اما سایر استافیلوکوک‌ها و میکروکوک‌ها که قدرت تخمیر مانیتول را ندارند با شکستن پپتون موجود در محیط کلنی‌های قرمز رنگ با هاله‌ای ارغوانی - قرمز ایجاد می‌کنند.

۳- نمونه اولیه :

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

۴- مواد و ابزار مورد نیاز :

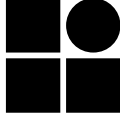
محیط مانیتول سالت آگار (لوله یا پلیت)

۵- مراحل انجام کار :

کلنی‌های مورد نظر را روی محیط تلقیح کرده به مدت ۲۴-۴۸ ساعت در حرارت 35°C انکوبه نمایید (محیط بدون CO_2) و سپس نتیجه را بررسی کنید .
 از آنجا که بعضی از گونه‌های استافیلوکوک آهسته تر مانیتول را تخمیر می‌کنند، بنابراین لازم است حتماً تا ۴۸ ساعت پلیت‌ها نگهداری شود.
 - کلنی‌های استافیلوکوک زرد رنگ بوده و توسط هاله زردی احاطه می‌شود.

۶- تداخلات :

انتروکوک می‌تواند روی این محیط رشد کرده و مانیتول را نیز کمی تخمیر کند. افتراق از استافیلوکوک بر اساس رنگ آمیزی گرم و تست کاتالاز خواهد بود.
 اگر مدت انکوباسیون از ۴۸ ساعت طولانی تر شود ارگانیزم‌های دیگر نیز قدرت رشد و تخمیر مانیتول را دارند.

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

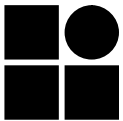
نکته:

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. استافیلوکوک 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

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

1- هدف:

- این محیط کشت، یک محیط انتخابی و افتراقی برای تشخیص ارگانیزم 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 میکروارگانیزم های گرم مثبت بویژه انتروکوک ها و استافیلوکوک ها را مهار می کند. جهت تفکیک میکروارگانیزم های روده ای، از ترکیب لاکتوز و معرف قرمز استفاده میشود. بسته به توانایی 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 غیر تخمیر کننده ها (نان فرمترها) 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 فکاليس 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 ارگانیزم 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 $35 \pm 2^\circ \text{C}$ یا دمای مناسب دیگری به مدت 18-24 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.

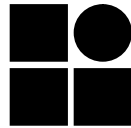
صفحه 2 از 2	راهنمای انجام آزمایش	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	کشت روی محیط MacConkey Agar	

6- برنامه کنترل کیفی (QC):

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

صفحه 1 از 5	دستورالعمل فنی	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	نگهداری و استفاده از سویه‌های باکتریایی	

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 طولانی مدت 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°C - درجه سانتی‌گراد یا پایین تر (در دیپ فریز یا در نیتروژن مایع) می‌باشد.

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


باکتری مورد نظر را روی محیط مغذی مانند پلیت TSA (Trypticase Soy Agar) حاوی 5% حاوی گوسفند و در مورد میکروارگانیسمهای سخت رشد روی محیط آگار شکلاته کشت دهید. پلیتها را به مدت 18-24 ساعت در دمای $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 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 10-15% باشد.

سپس از سوسپانسیون باکتریایی فوق به مقدار 1 ml - 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°C تا -70°C درجه سانتی‌گراد به مدت یکسال نگهداری نمود. در صورت عدم دسترسی به فریزر -70°C درجه می‌توان سویه‌های با رشد سریع را در فریزر -20°C درجه نیز نگهداری نمود. در

این شرایط توجه به نکات زیر ضروری است:

صفحه 2 از 5	دستورالعمل فنی	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	نگهداری و استفاده از سویه‌های باکتریایی	

سویه‌های سخت رشد مانند هموفیلوس آنفلوانزا 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 سریعاً 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 18-24 ساعت در دمای 35 ± 2 درجه و در صورت نیاز در شرایط CO_2 انکوبه نمائید. 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 مجدداً فریز نگردد.

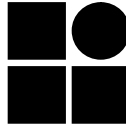
کشتهای working control: عبارتست از کشت مجدد از کشت ذخیره فریز شده که برای کنترل کیفیت محیط کشت و ... استفاده می‌شود.

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 2-8 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 نمائید. برای باکتریهای مشکل‌پسند مانند گونوکوک، مننگوکوک، 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.

صفحه 3 از 5	دستورالعمل فنی	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	نگهداری و استفاده از سویه‌های باکتریایی	

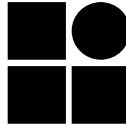
- 2- روغن معدنی (یا پارافین مایع) را در حرارت خشک (170 درجه سانتی‌گراد به مدت یکساعت) استریل نمائید.
- 3- میکروب مورد نظر را روی محیط کشت دهید.
- 4- بعد از بدست آوردن کشت کافی، روغن استریل را به مقدار 1 CC روی سطح محیط بریزید.
- 5- در صورت نیاز به کشت مجدد، نمونه از سطح آگار (زیر روغن) برداشته می‌شود.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

3- کشت عمقی و نگهداری در دمای اتاق:

- این روش فقط برای باکتری‌هایی که مشکل‌پسند نیستند مانند استافیلوکوک و خانواده انتروباکتریاسه بکار می‌رود.
- 1- یک محیط کشت آگار بدون کربوهیدرات مانند TSA را با عمق زیاد در لوله تهیه نمائید.
 - 2- باکتری را بصورت کشت عمقی در این محیط تلقیح نمائید.
 - 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 کاملاً در لوله را بپوشاند.
 - 6- کشته‌ها را در حرارت اتاق نگهداری نمائید.
 - 7- هر ساله سوش موردنظر را تجدید نمائید.

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

- 1- محیط CTA را در لوله تهیه نمائید .
- 2- باکتری را بطور عمقی در این محیط کشت دهید.
- 3- محیط را بمدت 24 ساعت در انکوباتور 35 درجه سانتی‌گراد انکوبه نمائید.
- 4- در لوله را با چوب‌پنبه یا در پیچ ببندید.
- 5- لوله در پیچ‌دار را در پارافین مایع فرو ببرید به گونه‌ای که کاملاً 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.

صفحه 4 از 5	دستورالعمل فنی	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	نگهداری و استفاده از سویه‌های باکتریایی	

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- کشتهای 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

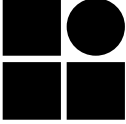
- 1- سوش مورد نظر را در سطح محیط **TSA** لوله‌ای در پیچ‌دار کشت دهید.
- 2- محیط را بمدت 24 ساعت در انکوباتور 35 درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.
- 3- پس از رشد کامل، لوله را در یخچال نگهداری کنید
- 4- هر ماه کشت را تجدید نمائید.

§ استرپتوکوکها

- 1- سوش مورد نظر را در سطح آگار خوندار شیب‌دار (لوله‌ای در پیچ‌دار) 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.

§ منگوکوک 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.

صفحه 5 از 5	دستورالعمل فنی	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	نگهداری و استفاده از سویه‌های باکتریایی	

- 3- پس از رشد کامل، لوله را در حرارت اتاق نگهداری کنید
- 4- هر 2 هفته کشت را تجدید نمایید.

§ 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- هر 2 روز یکبار کشت را تجدید نمایید.