

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۱۰/۱۰	 آزمایشگاه مرجع بهداشت	فرم: اصول کنترل کیفی در میکروبیشناسی
شماره سند: MNG/GUD/102/1402/01		بخش استقرار: باکتری شناسی
محدوده توزیع: تضمین کیفیت		

اصول کنترل کیفی در میکروبیشناسی

معاونت بهداشت

نام و امضاء مسئول فنی/تایید کننده:	نام و امضاء تأیید کننده:	نام و امضاء تهیه کننده:
	جواد صفابخش: کارشناس مسئول آزمایشگاههای معاونت بهداشت	علی حقی: کارشناس ارشد باکتری شناسی پزشکی

اصول صحیح کنترل کیفی در آزمایشگاه میکروب شناسی

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 آن ها دارد. آب یکی از مهمترین موادی است که در تهیه محیط های کشت بکار می رود. 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 یون های 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 دارای 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 بالای سطح آب، ممکن است در اتوکلاو استریل نشود و منبع آلودگی گردد.

حل کردن محیط کشت:

محیط‌های کشت بدون آگار، معمولاً با تکان دادن آهسته و ملایم حل خواهند شد. اما محیط‌های 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. محیط‌های کشت را بجوشانید بدون آنکه بسوزند.

محیط‌های کشتی که نباید اتوکلاو شوند، بعد از این مقدار حرارت دادن، برای تقسیم داخل پلیت‌ها یا ظروف دیگر آماده خواهند بود. اکثر محیط‌های کشت به استریلیزاسیون نهایی (در دمای 121°C به مدت ۱۵ دقیقه) نیاز خواهند داشت.

اندازه‌گیری و تنظیم pH

محیط‌های کشت دهیدراته اگر بطور مناسب تهیه شوند نیازی به تنظیم pH ندارند. pH نهایی محصول استریل شده را می‌توان روی پلیت یا بطری اندازه‌گیری کرد، اما باید آنها را بعد از سنجش pH دور ریخت. بنابراین بعد از استریل شدن و خنک 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 می‌شود.

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 محیط‌های کشت به استریلیزاسیون با اتوکلاو احتیاجی نداشته و با جوشاندن استریل می‌شوند که دستور ساخت آنها بر روی برچسب قوطی محیط کشت قید گردیده است. استریلیزاسیون سایر محیط‌های کشت توسط حرارت مرطوب یا صافی غشایی انجام می‌گردد 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 $1/2$ کیلوگرم بر سانتیمترمربع) انجام می‌گیرد. برای حجم‌های بیشتر از یک لیتر باید چرخه استریلیزاسیون را بطور مناسب تغییر داد. اما چون اکثر مشکلات در استریلیزاسیون محیط‌های کشت وقتی رخ میدهد که مقادیر بیشتر از دو لیتر محیط کشت باید استریل شود، لذا توصیه می‌شود که مقادیر زیاد محیط کشت را در حجم‌های کوچکتر تقسیم نمایید.

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

ب) استریلیزاسیون با صافی غشایی:

از صافی غشایی برای استریل کردن محیط‌های کشت و ترکیبات حساس به حرارت استفاده می‌شود. استریلیزاسیون بوسیله صافی غشایی تحت شرایط خلاء یا افزایش فشار انجام می‌پذیرد. از غشاء ها و صافی‌های با قطر منفذ $0/22$ یا $0/45$ میکرومتر استفاده نمایید. این فیلترها باید قبل از استفاده، در اتوکلاو استریل شوند. در مورد غشاء ها و صافی‌هایی که در بسته‌بندیهای استریل به فروش می‌رسند، به دستورالعمل سازنده مراجعه نمایید. قسمت‌های 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. مکمل‌های 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 دیش‌های مورد استفاده در تهیه محیط نیز اهمیت دارد. معمولاً پتری دیش‌ها را با اتیلن اکساید و یا اشعه گاما استریل می‌کنند. در صورت استفاده از پتری دیش‌هایی که با اتیلن اکساید استریل شده باشند بایستی از نظر وجود بقایای این ماده بررسی شود زیرا اتیلن اکساید دارای خاصیت مهارکنندگی برای میکروارگانیسم‌ها می‌باشد و می‌توان آن را با روش کروماتوگرافی اندازه گرفت.

در صورت استفاده از پتری دیش‌های شیشه‌ای بایستی از پتری دیش‌هایی از جنس بروسیلیکات استفاده کرد. استفاده از پتری دیش‌هایی از جنس پلیانی ممکن است موجب آزادسازی قلیا در داخل محیط کشت گردد.

پارامترهای فیزیکی:

محیط کشت‌های 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 می‌باشد. ضخامت محیط نیز اهمیت دارد. ضخامت محیط‌های کشت پلیتی نباید کمتر از ۳ میلی‌متر باشد.

نگهداری محیط‌های کشت تهیه شده:

طول عمر محیط‌های کشت تهیه شده بستگی به نوع اجزاء تشکیل دهنده محیط، نحوه نگهداری و ذخیره کردن آنها دارد. تمامی محیط‌های کشت باید دور از نور نگهداری شوند. تابش نور به محیط‌های کشت موجب تشکیل مواد باکتریوستاتیک و باکتریوساید مانند پراکسیداز می‌گردد. طول عمر اغلب محیط‌های کشت پلیتی در دمای ۴ درجه سانتیگراد یک هفته می‌باشد ولی اگر در داخل کیسه‌های پلاستیکی بسته بندی شوند بطوری که هوا داخل آنها نفوذ نکند تا ۳-۴ هفته قابل مصرف هستند. طول عمر محیط‌های کشت حاوی آنتی بیوتیک بستگی به پایداری آنتی بیوتیک موجود در آن دارد. در مجموع محیط‌های حاوی آنتی بیوتیک را در مدت یک هفته باید مصرف کرد. از سوی دیگر با گذشت زمان این‌گونه محیط‌های کشت رطوبت خود را از دست داده، بدلیل افزایش

غلظت آنتی بیوتیک قدرت انتخابی آنها افزایش می‌یابد. پلیت‌ها 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 نمی‌باشد. محیط‌های کشت لوله‌ای در مقایسه با محیط‌های کشت پلیتی عمر طولانی‌تری دارند. اغلب این محیط‌های کشت اگر در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شوند ۳-۶ ماه قابل مصرف می‌باشند.

موارد استثناء:

تایوگلیکولات براث، اندول نیترات براث و SIM فقط به مدت یک‌ماه قابل نگهداری می‌باشند. محیط‌های OF Medium و CTA Medium حاوی کربوهیدرات و مولرینتون براث فقط به مدت ۶ هفته قابل نگهداری می‌باشند.

اشکالات و علل رایج در محیط‌های کشت

اشکال	علت
نرم بودن آگار	حرارت بیش از حد، pH پایین که موجب هیدرولیز اسید در محیط کشت می‌گردد، توزین یا مخلوط نکردن درست، حل نشدن کامل آگار، حجم نادرست آب، رقیق سازی زیاد با مایع تلقیح یا مکمل‌ها و ذخیره سازی طولانی در دمای ۵۰ °C
pH نامناسب	استفاده از شیشه‌های 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
رنگ یا تیرگی غیرطبیعی	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 50°C	
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 ارگانیسیم 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 50°C	ایجاد رسوب یا کدورت

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 ویژگی‌ها و ترجیحاً منشأ آن، فهرست‌بندی و تعریف شده است.
- ذخیره‌های مرجع (Reference Stocks): کشت‌های بدست آمده از پاساژ سویه مرجعی که از مراکز بین‌المللی تهیه شده است.
- ذخیره‌های کاری (Working Stocks): کشت مجددی که از کشت‌های ذخیره جهت کنترل کیفیت محیط‌های کشت استفاده می‌شود.

منبع سویه‌های کنترل:

همه سویه‌های کنترل که در جدول از آنها نام برده شده است، ATCC می‌باشند (American type culture collection). این سوش‌ها، حداقل سوش‌هایی هستند که باید برای ارزیابی هر محیط کشت استفاده شوند. ارگانیسم‌های مورد استفاده برای اهداف کنترل کیفی می‌تواند از سویه‌های National collection باشد. سویه‌های دیگری نیز ممکن است توسط سازنده محیط کشت به کار رود که شامل مجموعه‌ای از سویه‌های وحشی (Wild strain) یا بدست آمده از نمونه‌های بیمار می‌باشد که مختص هر آزمایشگاه بوده و برای انجام آزمایش‌های بیشتر به کار می‌روند.

روش انجام آزمون کنترل کیفیت محیط‌های 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 براث (TSB) استریل حل نمایید تا سوسپانسیون میکروبی حاصل شود و آن را برای چهار یا پنج ساعت انکوبه نمایید. سپس کدورت آن را با استاندارد نیم مک فارلند تنظیم کنید. (استاندارد نیم مک فارلند در طول موج ۶۲۵ nm، دارای جذب ۰/۰۸ تا ۰/۱ ناتومتر می‌باشد)

به جای این روش می‌توان مستقیماً از کلنی‌های 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 میکروبی تهیه شود، باید کدورتی حاوی 10^7-10^8 CFU/ml کلنی داشته باشد. (مطابق با استاندارد نیم مک فارلند).

بررسی آزمایش‌های عملکردی محیط کشت (Performance testing)

۱- آزمایش ظرفیت مغذی بودن (Nutritional activity) محیط‌های 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 کلنی‌های مورد انتظار در هر پلیت (CFU/plate) 10^3-10^4 می‌باشد. برای اجتناب از رشد زیاد باکتری در بعضی از محیط‌های کشت انتخابی ممکن است نیاز باشد که سوسپانسیون را ده بار رقیق‌تر تهیه نمایید.

۲- آزمایش ظرفیت مهارکنندگی محیط‌های 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 کلنی‌های مورد انتظار در هر پلیت (CFU/plate) 10^4-10^5 می‌باشد. برای اجتناب از رشد زیاد باکتری در بعضی از محیط‌های کشت انتخابی ممکن است نیاز باشد که سوسپانسیون ده بار رقیق‌تر تهیه شود.

۳- آزمایش محیط‌های کشت لوله‌ای

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 آمده است، انکوبه نمایید. به طور نرمال زمان انکوباسیون، ۱۸-۲۴ ساعت یا ۲۴-۴۸ ساعت در دمای $35 \pm 2^\circ\text{C}$ می‌باشد. محیط شکلات آگار و سایر

محیط‌های کشت برای جداسازی انتخابی گونه‌های نیسریای بیماریزا باید در ۱۰-۵٪ CO₂ انکوبه شوند و در فواصل زمانی ۲۴-۱۸ ساعت و سپس ۴۸-۲۴ ساعت بررسی گردند.

برای باکتری‌های بی‌هوازی، کشت‌ها عموماً به حداقل ۴۸ ساعت انکوباسیون در شرایط بی‌هوازی و غنی از CO₂ نیاز دارند.

در مورد کمپیلوباکتر آگار، پلیت‌ها باید در ۴۲ °C در شرایط میکروآنروفیلیک غنی از CO₂ به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شوند.

۴- کنترل محیط‌های کشت برای آزمایش‌های بیوشیمیایی

از سوسپانسیون میکروبی رقیق نشده برای کنترل این محیط‌ها استفاده می‌کنیم.

پس از تلقیح، تمام کشت‌ها را در شرایط لازم (از نظر CO₂، 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 می‌دهیم. محیط‌های مناسب دارای رشد کافی از کلنی‌های باکتریهای مورد نظر می‌باشند و در مورد محیط‌های انتخابی مهار میکروارگانیزم‌های مورد نظر باید مشخص باشد.

کنترل محیط‌های ساخته شده تجاری (آماده مصرف):

۱- رطوبت: محیط‌های کشت باید بدون هر گونه رطوبت اضافی بوده، همچنین هیچ نشانه‌ای 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 نشانه‌ای از همولیز داشته باشند و محیط‌های کشت دیگر نباید هیچگونه تغییر رنگ غیر طبیعی داشته باشند.

بررسی آلودگی محیط‌های کشت (استریل بودن محیط‌های کشت):

در صورتی که تعداد پلیت یا لوله تهیه شده در هر سری ساخت یا Lot، ۱۰۰ عدد یا کمتر باشد، باید به

تعداد ۳-۵٪ محیط‌های تهیه شده را در دمای ۳۷-۳۵ °C به مدت ۲-۵ روز انکوبه نمود. برای Lot‌های 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 هیچ‌گونه رشد میکروبی نباید مشاهده شود.

تفسیر نتایج:

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

سایر معیارهای تضمین کیفیت:

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

نتیجه قابل انتظار	ارگانیزم های کنترلی	زمان انکوباسیون	محیط کشت
رشد مثبت، محیط سیاه رنگ می شود رشد منفی	استرپتوکوک فکالیس <i>S. faecalis</i> استرپتوکوک پایوژنز <i>S. pyogenes</i>	۲۴ ساعت	بایل اسکولین آگار
رشد مثبت دارای همولیز بتا رشد مثبت دارای همولیز آلفا	استرپتوکوک پایوژنز <i>Streptococcus pyogenes</i> استرپتوکوک پنومونیه <i>S. pneumoniae</i>	۲۴ ساعت	بلاد آگار جار شمع دار CO ₂
رشد مثبت	هموفیلوس آنفلوانزا <i>Haemophilus influenzae</i>	۲۴ ساعت	شکلات آگار
مثبت (بنفش رنگ می شود) منفی (بدون تغییر رنگ)	سالمونلا تایفی موریوم <i>S. typhimurium</i> شیگلا فلکسنری <i>Shigella flexneri</i>	۴۸ ساعت	لایزین دکربوکسیلاز (محیط بوسیله روغن استریل پوشانده میشود)
مثبت منفی	سالمونلا تایفی موریوم <i>S. typhimurium</i> کلپسیلا پنومونیه <i>K. pneumoniae</i>	۴۸ ساعت	اورنیتین (دکربوکسیلاز)
مثبت منفی	سالمونلا تایفی موریوم <i>S. typhimurium</i> پروتئوس میرابیلیس <i>Proteus mirabilis</i>	۴۸ ساعت	آرژینین (دی هیدرولاز)
منفی مثبت	اشرشیا کلی <i>E. coli</i> باسیلوس سوبتیلیس <i>Bacillus subtilis</i>	۲۴ ساعت	ژلاتیناز
گاز + SH ₂ , A/A گاز یا بدون گاز + SH ₂ , K/A K/A تغییر نمی کند	سیتروباکتر فروندی <i>Citrobacter freundii</i> سالمونلا تایفی موریوم <i>S. typhimurium</i> شیگلا فلکسنری <i>Sh. flexneri</i> اسینتوباکتر کالکوستیکوس <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	۲۴ ساعت	کلا یگلر آبرون آگار
کلنی های قرمز رنگ کلنی های بیرنگ، بدون سوارمینگ (خزش) رشد منفی	اشرشیا کلی <i>E. coli</i> پروتئوس میرابیلیس <i>Proteus mirabilis</i> استرپتوکوک فکالیس <i>S. faecalis</i>	۲۴ ساعت	مک کانکی آگار (همراه با کریستال ویوله)

منفی (سبز رنگ)	اشرشیا کلی <i>E. coli</i>		
مثبت (آبی رنگ)	کلبسیلا پنومونیه <i>K. pneumonia</i>	۲۴ ساعت	مالونات
کلنی های زرد رنگ	استافیلوکوک اورئوس <i>S. aureus</i>		
کلنی های قرمز رنگ	<i>S. epidermidis</i> استافیلوکوک اپیدرمیدیس	۲۴ ساعت	مانیتول سالت آگار
رشد منفی	اشرشیا کلی <i>E. coli</i>		
MR مثبت - VP منفی	اشرشیا کلی <i>E. coli</i>	۴۸ ساعت	MRVP
MR منفی - VP مثبت	کلبسیلا پنومونیه <i>K. pneumonia</i>		
به جدول میزان هاله عدم رشد قابل قبول در بخش آنتی بیوگرام مراجعه شود	استافیلوکوک اورئوس <i>S. aureus</i> ATCC ۲۵۹۲۳ سودوموناس آئروژینوزا <i>P. aeruginosa</i> ATCC ۲۷۸۵۳ اشرشیا کلی <i>E. coli</i> ATCC ۲۵۹۲۲	۲۴ ساعت	مولر هینتون آگار
مثبت	اشرشیا کلی <i>E. coli</i>		
منفی	اسینتوبا کتر کالکوستیکوس <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	۲۴ ساعت	نیترا ت برات
مثبت	اشرشیا کلی <i>E. coli</i>		
منفی	کلبسیلا پنومونیه <i>K. pneumoniae</i>	۲۴ ساعت	آب پپتونه (اندول)
منفی	اشرشیا کلی <i>E. coli</i>		
مثبت	پروتئوس میرابیلیس <i>P. mirabilis</i>	۲۴ ساعت	فنیل آلانین دامیناز
منفی	اشرشیا کلی <i>E. coli</i>		
کلنی های بیرنگ	سالمونلا تایفی موریم <i>Salmonella typhimurium</i>	۲۴ ساعت	سالمونلا شیگلا آگار (S.S)
کلنی های بیرنگ	یرسینیا انتروکولیتیقا <i>Yersinia enterocolitica</i>		یا دزوکسی کلات سیترا ت آگار
کلنی های بیرنگ	شیگلا فلکسنری <i>Shigella flexneri</i>		
بعد از کشت مجدد رشد می کند	سالمونلا تایفی موریم <i>S. typhimurium</i>	۲۴ ساعت	سلنیت برات (SF)

بعد از کشت مجدد رشد نمی کند	اشرشیا کلی <i>E. coli</i>		
رشد منفی	اشرشیا کلی <i>E. coli</i>	۴۸ ساعت	سیمون سبترات (در لوله های با دریچ شل در انکوباتور گذاشته شود)
رشد مثبت - رنگ آبی	کلبسیلا پنومونیه <i>K. pneumoniae</i>		
کلنی های زرد رنگ	<i>Vibrio SPP</i>	۲۴ ساعت	آگار TCBS
رشد مثبت	نایسریا مننژیتیدیس <i>Neisseria meningitidis</i> (CO ₂)		
رشد مثبت	نایسریا گونورهه <i>N. Gonorrhoeae</i>	۲۴ ساعت	تایر مارتین
رشد منفی	اشرشیا کلی <i>E. coli</i>		
رشد مثبت	باکترئیدس فراجیلیس <i>Bacteriodes fragilis</i>	۲۴ ساعت	تایوگلیکولات برات <i>Thioglycollate</i> <i>broth</i>
گاز + SH ₂ , A/A	سیتروباکتر فروندی <i>Citrobacter freundii</i>		
گاز یا بدون گاز + SH ₂ , K/A	سالمونلا تایفی موربوم <i>S. typhimurium</i>	۲۴ ساعت	TSI عمق محیط باید ۳ سانتی متر باشد (با دریچ شل اتوو گذاری شود)
K/A	شیگلا فلکسنری <i>Sh. flexneri</i>		
تغییر نمی کند	اسینتوباکتر کالکوستیکوس <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>		
منفی	اشرشیا کلی <i>E. coli</i>		
مثبت، صورتی	پروتئوس میرابیلیس <i>P. mirabilis</i>	۲۴ ساعت	محیط اوره