دستورالعمل

آماده سازی و کنترل کیفی محیطهای کشت

تهیه کننده : رقیه صبوریان

آزمایشگاه مرجع سلامت

وزارت بهداشت ، درمان و آموزش پزشکی

اردیبهشت ماه 1389

آماده سازی و کنترل کیفی محیطهای کشت

هر آزمایشگاه باید از کیفیت هر شماره ساخت از محیطهای کشت دهیدراته خریداری شده قبل از استفاده ، اطمینان حاصل نماید.کنترل کیفی محیطهای کشت بنا به اقتضا شامل موارد ذیل می باشد:

1) آماده سازی یا ساخت و استریل نمودن محیطها مطابق با فرمول تایید شده یا دستور خاص سازنده
2) بررسی چشمی محیطهای آماده شده
3) انجام آزمون کنترل کیفی میکروبیولوژی با استفاده از سوشهای کنترل کیفی جهت بررسی توانایی رشد آنها و یا مهارشان بر روی محیطهای آماده شده
4) بررسی توانایی ایجاد واکنشهای مناسب بیوشیمیایی با استفاده از سوشهای کنترل

1) آماده سازی محیطهای کشت

• هر محیط را مطابق دستور سازنده که بر روی برچسب ظرف حاوی پودر دهیدراته ذکر شده است ، تهیه کنید. برای حل کردن پودر محیط آنرا تا نقطه جوش حرارت دهید ، اما از گرمادهی بیش از اندازه پرهیز نمایید.

• هر محیط را به روش مناسب استریل نمایید. a)محیط Cary-Blair نباید اتوکلاو شود بلکه باید در بن ماری جوش به مدت 15 دقیقه استریل شود. a)محیطهایی مانند HE , XLD Agar و Selenite broth نیز نباید اتوکلاو شده و نیازی به استریل کردن ندارند.

• مقدار کافی از هر محیط را در پلیتها یا لوله ها تقسیم نمایید. a)برای محیطهای پلیتی عمق محیط باید حدود3-4 mm باشد. b)حجم محیط Cary-Blair داخل ظروف باید به مقداری باشد که 4cm عمق ایجاد نماید. c)حجم محیط Selenite broth در هر لوله باید به مقداری باشد که 5cm عمق ایجاد شود. d)عمق محیط SIM در هر لوله حداقل 3cm باشد. e)حجم محیطهای KIA , TSI , LIA در هر لوله باید به مقداری باشد که 3cm عمق و 2.5cm شیب ایجاد شود. f)حجم محیط MR-VP در لوله برای هر تست باید 2.5mL باشد.

• محیطهای پلیتی را بعد از خنک شدن در کیسه های نایلونی در بسته قرار دهید.نام محیط کشت و تاریخ ساخت آن را بر روی هر بسته بنویسید.پلیتها را به مدت یک هفته در یخچال می توان نگهداری نمود.

• محیطهای لوله ای را با درپیچ محکم به مدت 6 ماه می توان در یخچال نگهداری نمود.غیر از محیط SIM که پایداری آن 3 ماه است.در صورتی که از لوله های درپنبه استفاده می کنید ، روی پنبه را با پارافیلم کاملا" بپیچید تا از تبخیر و خشک شدن محیط جلوگیری شود.

2) بررسی چشمی محیطهای آماده شده

بعد از ساخت هر محیط کشت و همچنین قبل از استفاده از آن همه پلیتها و لوله ها باید به طور چشمی از نظر مشکلات زیر مورد بررسی قرار گیرند:

• شکستگی پلیتها یا لوله ها

• خشک شدن محیطها و جدا شدن آنها از جداره پلیت یا لوله

• یخ زدگی یا ذوب شدن آگار

• پر شدن ناصاف پلیتها

• مقدار ناکافی آگار در پلیتها (کمتر از 3mmعمق) یا لوله ها (عمق و سطح ناکافی)

• همولیز خون در محیط Blood Agar

• تغییر در رنگ مورد انتظار برای هر محیط (احتمال وجود مشکل در PH محیط)

• وجود حباب یا حفره در سطح محیط

• وجود رسوب در محیط

•آلودگی :بعد از ساخت هر محیط 5-3% از پلیتها یا لوله ها را به طور تصادفی برداشته ، در $^{\circ}C$ 37-35 به مدت 48-24 ساعت انکوبه نمایید.بعد از انکوباسیون هیچ گونه رشد میکروبی نباید مشاهده شود.

3) انجام آزمون کنترل کیفی میکروب شناسی

الف _ کنترل کیفی محیطهای غیر انتخابی مانند Blood Agar , TSA و ...

از کشت 24-18 ساعته هر سویه کنترل کیفی¬ که در جدول 1 آمده است ، سوسپانسیونی در سرم فیزیولوژی استریل مطابق کدورت استاندارد نیم مک فارلند (10^{8} - 1×10^{7}) تهیه کنید.این سوسپانسیون را در سرم فیزیولوژی استریل به نسبت 1:100 رقیق نمایید.سپس 10µL (0.01mL) از رقت بدست آمده را روی پلیت تلقیح کرده به گونه ای کشت دهید که کلنی های ایزوله بدست آید.پلیتها را به مدت 48-18 ساعت در $^{\circ}C$ 37-35 انکوبه نمایید.

کیفیت یک محیط غیر انتخابی زمانی قابل قبول است که سویه های کنترل روی آن محیط رشد کافی داشته و اندازه و مورفولوژی کلنی ها متناسب با نتایج مورد انتظار باشد.

ب _ کنترل کیفی محیطهای انتخابی مانند MaC , XLD و ...

از کشت 24-18 ساعته هر سویه کنترل کیفی¬ که در جدول 2 آمده است ، سوسپانسیونی در سرم فیزیولوژی استریل مطابق کدورت استاندارد نیم مک فارلند (10^{8} - 1×10^{7}) تهیه کنید.این سوسپانسیون را در سرم فیزیولوژی استریل به نسبت 1:10 رقیق نمایید.سپس 10µL (0.01mL) از رقت بدست آمده را روی پلیت تلقیح کرده به گونه ای کشت دهید که کلنی های ایزوله بدست آید.پلیتها را به مدت 48-18 ساعت در $^{\circ}C$ 37-35 انکوبه نمایید.

کیفیت یک محیط انتخابی زمانی قابل قبول است که سویه های کنترل روی آن محیط رشد کافی داشته ، اندازه و مورفولوژی کلنی ها متناسب با نتایج مورد انتظار در جدول 2 باشد ، ضمن اینکه رشد بعضی از باکتری ها (ذکر شده در جدول2) را مهار کند.

ج _ کنترل کیفی محیطهای براث مانند GN , Selenite broth و ...

از کشت 18-24 ساعته هر سویه کنترل کیفی¬ که در جدول 3 آمده است ، سوسپانسیونی در سرم فیزیولوژی استریل مطابق کدورت استاندارد نیم مک فارلند (1×10^{7} -10^{8}) تهیه کنید. 10µL (0.01mL) از این سوسپانسیون را بدون رقیق نمودن ،در لوله براث تلقیح نمایید.لوله ها را به مدت 18-48 ساعت در $35\text{-}37^{\circ}C$ انکوبه نمایید.بعد از انکوباسیون کدورت محیط را به طور چشمی بررسی کنید.در صورت وجود کدورت برای اطمینان از عدم آلودگی براث ، از این محیط بر روی محیط Blood Agar پاساژ داده ، پلیت را به مدت 18-48 ساعت در $35\text{-}37^{\circ}C$ انکوبه نمایید.

کیفیت محیط براث زمانی قابل قبول است که سویه های کنترل رشد کافی و خالص داشته باشند.

د _ کنترل کیفی محیطهای افتراقی مانند KIA , LIA و ...

برای هر محیط افتراقی از حداقل سویه های کنترل کیفی¬ مثبت (سویه هایی که واکنش مثبت می دهند) و منفی (سویه هایی که واکنش منفی می دهند) آمده در جدول 4 استفاده کنید.محیط را با سویه های کنترل تلقیح کرده ، در شرایط ذکر شده در جدول انکوبه نمایید.

کیفیت هر محیط افتراقی زمانی قابل قبول است که با سویه های کنترل مثبت و منفی واکنشهای بیوشیمیایی مورد انتظار را ایجاد نماید.

¬ سویه کنترل کیفی : میکروارگانیسمی که برای ارزیابی عملکرد میکروبی محیط کشت استفاده می شود.

منابع سویه های کنترل کیفی

سویه های کنترل کیفی آمده در جداول این دستورالعمل همگی سویه های ATCC(American Type Culture Collection) ،مجموعه کشتهای آمریکا می باشند.سویه های کنترل را می توان از منابع مختلفی تهیه نمود :

1- آزمایشگاه می تواند سویه های ATCC را از آزمایشگاه مرجع سلامت درخواست و تهیه نماید.

2- هر آزمایشگاه می تواند از سوشهای جدا شده از نمونه های بالینی جهت آزمون کنترل کیفی استفاده کند ، به شرطی که سوشها به کمک تمام روشهای در دسترس (مانند تستهای بیوشیمیایی و آنتی سرمی) کاملا" مشخص و تعیین هویت شده باشند و نتایج تستهای آنها ثبت و نگهداری شود.

3-همچنین می توان از سویه هایی که به عنوان نمونه های ارزیابی خارجی کیفیت (EQAS)از جانب مراکز معتبر و رسمی مانند آزمایشگاه مرجع سلامت یا انستیتو پاستور به آزمایشگاه شما ارسال می شود ، جهت آزمون کنترل کیفی استفاده نمود.

4-بعضی از سویه های کنترل کیفی ATCC آمده در جداول این دستورالعمل را می توانید از شرکت های تجاری داخلی به صورت لئوفیلیزه نیز خریداری کنید.

جدول 1 – کنترل کیفی محیطهای غیر انتخابی			
محیط کشت	**شرایط ،مدت زمان و دمای انکوباسیون**	**سویه های کنترل کیفی (شماره ATCC)**	**نتایج مورد انتظار**
Blood Agar	هوازی یا وجود CO_2 18-24ساعت ، $35^{\circ}C$	*S.pyogenes* (19615) *S.pneumoniae* (6305) *S.aureus* (25923) *E.coli* (25922)	رشد ، باهمولیز بتا رشد ، باهمولیز آلفا رشد رشد
Brain Heart Infusion (BHI)Agar	هوازی یا وجود CO_2 18-24ساعت ، $35^{\circ}C$	*S.pyogenes* (19615) *S.pneumoniae* (6305) *S.aureus* (25923) *S.flexneri* (12022)	رشد رشد رشد رشد
Nutrient Agar(NA)	هوازی یا وجود CO_2 18-24ساعت ، $35^{\circ}C$	*E.faecalis* (29212) *E.coli* (25922) *P.aeruginosa* (27853)	رشد رشد رشد
Tryptic Soy Agar(TSA)	هوازی یا وجود CO_2 18-48ساعت ، $35^{\circ}C$	*S.pyogenes* (19615) *S.aureus* (25923) *E.coli* (25922)	رشد رشد رشد

جدول 2 – کنترل کیفی محیطهای انتخابی			
محیط کشت	**شرایط ،مدت زمان و دمای انکوباسیون**	**سویه های کنترل کیفی (شماره ATCC)**	**نتایج مورد انتظار**
Eosin Methylen Blue (EMB) Agar	هوازی 18-24ساعت ، $35^{\circ}C$	*S.Typhimurium*(14028) *S flexneri* (12022) *E.coli* (25922) *E.faecalis* (29212)	رشد،کلنی های بی رنگ تا کهربایی رشد،کلنی های بی رنگ تا کهربایی رشد،کلنی های آبی سیاه با درخشش سبز متالیک مهار رشد (جزئی)
Hektoen Enteric (HE) Agar	هوازی 18-24ساعت ، $35^{\circ}C$	*S.Typhimurium*(14028) *S flexneri* (12022) *E.coli* (25922) *E.faecalis* (29212)	رشد،کلنی های آبی تا سبز_آبی با مرکز سیاه رشد،کلنی های سبز تا آبی_سبز مهار رشد (جزئی تا کامل)؛کلنی های زرد تا نارنجی رنگ مهار رشد (جزئی)؛کلنی های زرد

MacConkey Agar	هوازی 35℃ ، 18-24ساعت	*E.coli* (25922) *P.mirabilis* (12453) *S.Typhimurium*(14028) *E.faecalis* (29212)	رشد،کلنی های صورتی رنگ رشد،کلنی های بی رنگ،مهار جزئی سوآرمینگ رشد،کلنی های بی رنگ مهار رشد (جزئی)
Thiosulfate Citrate Bile Sucrose (TCBS) Agar	هوازی 35℃ ، 18-24ساعت	*V.cholerae* *V.parahaemolyticus* *E.coli* (25922) *P.mirabilis* (12453) *P.aeruginosa* (27853)	رشد،کلنی های زرد رنگ رشد،کلنی های سبز آبی مهار رشد مهار رشد مهار رشد
Xylose Decarboxylate (XLD) Agar	هوازی 35℃ ، 24 ساعت	*S.Typhimurium*(14028) *S flexneri* (12022) *E.faecalis* (29212) *E.coli* (25922)	رشد،کلنی های قرمز با مرکز سیاه رشد،کلنی های قرمز مهار رشد (جزئی) مهار رشد (جزئی تا کامل)؛کلنی های زرد تا زرد_قرمز

جدول 3 – کنترل کیفی محیطهای براث

محیط کشت	شرایط ،مدت زمان و دمای انکوباسیون	سویه های کنترل کیفی (شماره**ATCC**)	نتایج مورد انتظار
GN Broth	هوازی 35℃ ، 18-24ساعت	*S.Typhimurium*(14028) *S flexneri* (12022) *E.coli* (25922) *E.faecalis* (29212)	رشد روی ساب کالچر رشد روی ساب کالچر رشد روی ساب کالچر مهار رشد(جزئی تا کامل) روی ساب کالچر
Selenite Broth	هوازی 35℃ ، 18-24ساعت	*S.Typhimurium*(14028) *S.flexneri* (12022) *E.coli* (25922)	رشد روی ساب کالچر رشد یا امکان مهار رشد روی ساب کالچر مهار رشد(جزئی تا کامل) روی ساب کالچر
Alkaline Peptone Water	هوازی 35℃ ، 18-24ساعت	*V.cholerae Ogawa* *V.cholerae Inaba* *V.parahaemolyticus*	رشد روی ساب کالچر رشد روی ساب کالچر رشد روی ساب کالچر

جدول 4 – کنترل کیفی محیطهای افتراقی

محیط کشت	شرایط ،مدت زمان و دمای انکوباسیون	سویه های کنترل کیفی (شماره**ATCC**)	نتایج مورد انتظار
Kligler Iron Agar (KIA)	هوازی 18-24ساعت ، 35°C	*E.coli* (25922) *S.Typhimurium*(14028) *S flexneri* (12022) *P.mirabilis* (12453) *P.aeruginosa* (27853)	*H2S* / *گاز* / *عمق/سطح* / *رشد* - / + / Acid/Acid / خوب + / + / Alk/Acid / خوب - / - / Alk/Acid / خوب + / - / Alk/Acid / خوب - / - / Alk/Inert / خوب
Lysine Iron Agar (LIA)	هوازی 18-24ساعت ، 35°C	*E.coli* (25922) *S.Typhimurium*(14028) *S flexneri* (12022) *P.mirabilis* (12453)	*H2S* / *دآمیناسیون (سطح)* / *دکربوکسیلاسیون (عمق)* / *رشد* - / (بنفش)- / (زرد)- / خوب + / (بنفش)- / (بنفش)+ / خوب - / (بنفش)- / (زرد)- / خوب + / (قرمز)+ / (زرد)- / خوب
Methyl Red and Voges_Proskaure (MR_VP)	هوازی 24-48ساعت ، 35°C	*E.coli* (25922) *E.aerogenes* (13048)	*VP* / *MR* / *رشد* بدون تغییر رنگ/- / قرمز/+ / خوب +/قرمز / زرد/- / خوب
SIM	هوازی 18-24ساعت ، 35°C	*E.coli* (25922) *S.Typhimurium*(14028) *S flexneri* (12022)	*اندول* / *حرکت* / *H2S* / *رشد* + / + / - / خوب - / + / + / خوب - / - / - / خوب
Simmons Citrate Agar	هوازی 18-48ساعت ، 35°C	*E.coli* (25922) *S.Typhimurium*(14028) *E.aerogenes* (13048)	*citrate* / *رشد* سبز/- / عدم رشد آبی/+ / خوب آبی/+ / خوب
Triple Sugar Iron (TSI) Agar	هوازی 18-24ساعت ، 35°C	*E.coli* (25922) *S.Typhimurium*(14028) *S flexneri* (12022) *P.aeruginosa* (27853)	*H2S* / *گاز* / *عمق/سطح* / *رشد* - / + / Acid/Acid / خوب + / + / Alk/Acid / خوب - / - / Alk/Acid / خوب - / - / Alk/Inert / خوب

Urea Agar	هوازی 6-48ساعت ، 35°C	*E.coli* (25922) *K.pneumoniae* (13883) *P.mirabilis* (12453)	*تولید اوره آز* - / بدون تغییر رنگ + ضعیف/ رنگ ارغوانی در سطح + شدید/ رنگ ارغوانی در عمق و سطح

مراجع :

1- CLSI ,Quality Control for Commercially Prepared Microbiological Culture Media;Aproved Standard _ Third Edition_M22-A3_2006

2-MacFaddin,J.F. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria,Lippincott, Third Edition,2000

3-روشهای آزمایشگاهی مورد استفاده در تشخیص همه گیری های وبا و اسهال خونی ،مراکز کنترل و پیشگیری از بیماریهای آمریکا ، سازمان جهانی بهداشت ، ترجمه دکتر کامران حکیم زاده ، وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی ، مرکز مدیریت بیماریها