دستورالعمل آماده سازی، تهیه و کنترل کیفیت محیط های کشت

آزمایشگاه مرجع سلامت

وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی

ویرایش- سال ۱۳۹۷

مقدمه

محیط های کشت نقش اساسی را در آزمایشگاه میکروب شناسی ایفا می کنند و به طور گسترده ای برای جداسازی، شناسایی و تعیین حساسیت میکروارگانیسم های بیماری زا به کار می روند. بسیاری از آزمایشگاه ها به طور روتین محیط های کشت مورد نیاز برای مصارف تشخیصی و تحقیقاتی را خودشان تهیه می نمایند. برای اطمینان از این که محیط های کشت، کیفیت خوب و نتایج مطلوبی دارند، باید روش های کنترل کیفی مناسبی به کار گرفته شود. برای رسیدن به این هدف باید در تهیه و مصرف محیط های کشت معیارهای ذیل در نظر گرفته شود.

نکات عمومی در مورد تهیه محیط های کشت:

آب مصرفی:

کیفیت محیط های کشت به طور مستقیم به کیفیت مواد خام مورد استفاده در تهیه آنها بستگی دارد. آب یکی از مهمترین موادی است که در تهیه محیط های کشت به کار می رود. معیارهای مهم برای آب مورد استفاده در تهیه محیط های کشت شامل بررسی قدرت هدایت الکتریکی، مقاومت الکتریکی، آلودگی میکروبی و pH می باشد. در شرایط ایده آل یون های مس به دلیل خاصیت مهارکنندگی برای اغلب میکروارگانیسم ها، نباید در آب مورد استفاده برای تهیه محیط های کشت وجود داشته باشد.

ویژگی	درجه I	درجه II	درجه III
pH	در نظر گرفته نمی‌شود	در نظر گرفته نمی‌شود	۵-۸
آلودگی میکروبی بر اساس CFU/mL	۱۰	$۱۰^{۳}$	در نظر گرفته نمی‌شود
مقاومت الکتریکی برحسب میلی‌اهم بر سانتی‌متر (Mohm/cm)	۱۰	۲	۰/۱
هدایت الکتریکی برحسب میکروزیمنس بر سانتی‌متر (Microsiemens/cm)	۰/۱	۰/۵	۱۰
مواد آلی	آب از کربن فعال عبور داده شود	در نظر گرفته نمی‌شود	در نظر گرفته نمی‌شود
تعداد ذرات ریز معلق که از فیلتر با سوراخ ۰/۲۲ میکرون عبور داده می‌شود	< ۵۰۰/Lit	در نظر گرفته نمی‌شود	در نظر گرفته نمی‌شود

توزین پودر محیط کشت و افزودن آب:

طبق دستورالعمل تهیه محیط کشت که بر روی قوطی آن نصب گردیده است، مقدار مناسبی از پودر محیط کشت را با دقت وزن نمایید. قوطی محیط کشت را دور از جریان هوا و رطوبت باز کنید. از استنشاق پودرها به خصوص آنهایی که دارای مواد سمّی هستند و تماس طولانی مدت آنها با پوست اجتناب کنید. پودر را به سرعت، به دقت و بدون ایجاد غبار وزن کنید. هرچه زودتر درِ ظرف را ببندید. آب را در ظرف مناسب، با حجم دو برابر حجم نهایی محیط کشت بریزید تا مخلوط کردن آن به خوبی امکان‌پذیر باشد. 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 داخلی 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:

محیط های کشت بدون آگار، معمولاً 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 استریل دیگر آماده خواهند بود. توصیه می شود استریلیزاسیون نهایی در دمای ۱۲۱°C، به مدت ۱۵ دقیقه برای لوله ها و بطری های کوچک حاوی حدود ۱۰ ml محیط کشت، ۲۰ دقیقه برای ارلن های حاوی ۵۰۰ ml محیط کشت، ۲۵ دقیقه برای ارلن های حاوی ۱۰۰۰ ml محیط کشت، و ۳۰ دقیقه برای ارلن های حاوی ۲۰۰۰ ml محیط کشت باشد.

استریلیزاسیون:

بعضی از محیط های کشت به استریلیزاسیون با اتوکلاو احتیاجی نداشته و با جوشاندن قابل استفاده می شوند. استریلیزاسیون سایر محیط های کشت توسط حرارت مرطوب (اتوکلاو) یا صافی غشایی (فیلتراسیون) انجام می گردد که دستور استفاده از هر روش 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 ۱۲۱°C (فشار ۱/۲ کیلوگرم بر سانتی متر مربع) انجام می گیرد. برای حجم های بیشتر از یک لیتر باید چرخه استریلیزاسیون را به طور مناسب تغییر داد. اما چون اکثر مشکلات در استریلیزاسیون محیط های کشت هنگامی رخ میدهد که مقادیر بیشتر از دو لیتر محیط کشت باید استریل شوند، لذا توصیه می شود که مقادیر زیاد محیط کشت را در حجم های کوچکتر تقسیم نمایید.

کنترل کیفی اتوکلاو، کنترل دما و فشار آن باید به طور مداوم انجام گردد. برای کنترل اتوکلاو از کلاس ۵ یا ۶ اندیکاتورهای شیمیایی TST در هر ران کاری استفاده می شود. از اندیکاتورهای بیولوژیکی جهت پایش عملکرد اتوکلاو به طور هفتگی یا فواصل بیشتر، متناسب با بار کاری اتوکلاو استفاده می شود که ویال حاوی اسپور *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 است (Sterility Assurance Level=SAL$\leq 10^{-6}$ CFU) و به صورت تجاری در دسترس می باشد.

ب) استریلیزاسیون با صافی غشایی (فیلتراسیون):

از صافی غشایی برای استریل کردن محیط های کشت و ترکیبات حساس به حرارت استفاده می شود.

استریلیزاسیون به وسیله صافی غشایی تحت شرایط خلاء یا افزایش فشار انجام می پذیرد. از غشاء ها و صافی های با قطر منفذ ۰/۲۲ (برای فیلتر قندها و محلول اوره) یا ۰/۴۵ میکرومتر استفاده نمایید. این فیلترها باید قبل از استفاده، در اتوکلاو استریل شوند. در مورد غشاء ها و صافی هایی که در بسته بندی های 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 ۱۲۱°C استریل نمایید.

آماده سازی جهت مصرف:

بعد از استریلیزاسیون، اجازه دهید دمای محیط کشت به حدود ۵۰°C برسد، سپس با رعایت شرایط آسپتیک در ظروف نهایی تقسیم نمایید. هیچ وقت محیط کشت را در دمای بالاتر از ۵۰°C تقسیم نکنید. مکمل های حساس به گرما و حرارت باید بعد از این که دمای محیط کشت به حدود ۴۵–۵۰°C رسید، به آن اضافه شوند. دمای مکمل (ساپلمنت) استریل قبل از این که به محیط کشت اضافه شود، باید 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.

اندازه‌گیری pH:

- مقدار pH محیط کشت یکی از خصوصیات فیزیکی مهمی است که بررسی می شود. pH نهایی محصول استریل شده و خنک شده تا دمای ۲۵°C را باید روی پلیت یا ارلن با استفاده از pH متر استاندارد اندازه‌گیری نموده، و آنها را بعد از سنجش pH دور ریخت.
- بر اساس توصیه CLSI، اندازه‌گیری pH برای هر بار تهیه و ساخت محیط مولر هینتون آگار الزامی است.
- در صورتی که pH محیط ساخته شده با عدد مورد انتظار (درج شده بر روی قوطی محیط کشت) همخوانی نداشته باشد نباید از آن استفاده شود.
- در هنگام تهیه محیط های کشت تلفیقی که از افزودن چند ماده مجزا تهیه می شوند (مانند آب پپتونه قلیایی)، pH اندازه‌گیری و سپس تنظیم می شود (pH ±۰/۲ مورد نظر). pH این نوع محیط های کشت، قبل و بعد از اتوکلاو کردن و خنک شدن آن، با استفاده از pH متر استاندارد، اندازه‌گیری و سپس تنظیم می شود. از آنجا که دمای بالای اتوکلاو می تواند باعث تغییر pH شود، بنابراین لازم است بعد از استریل شدن محیط کشت و خنک شدن آن تا دمای ۲۵°C، مجدداً مقدار pH، اندازه‌گیری و در صورت نیاز، در حد مورد نظر تنظیم شود. 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.

pH را به یکی از روش های ذیل اندازه‌گیری نمایید:

- روش اول: آگار یک پلیت را در ظرفی کوچک کاملاً له کرده و اجازه دهید به مدت ۳۰–۱۵ دقیقه در این حالت باقی بماند، سپس نوک الکترود pH متر را در آن قرار دهید و pH را اندازه‌گیری نمایید.
- روش دوم: نوک الکترود pH متر را در داخل ارلن کوچکی قرار دهید. مقدار اندکی از آگار مذاب را به داخل ارلن ریخته، پس از سفت شدن آگار، pH را اندازه‌گیری نمایید.
- روش سوم: از الکترودهای سطحی استفاده نمایید.

نگهداری محیط های کشت ساخته شده:

عوامل مورد ارزیابی در این شرایط، دما، نور و رطوبت است. طول عمر محیط های کشت ساخته شده، به نوع اجزاء تشکیل دهنده، نحوه نگهداری و ذخیره سازی آنها بستگی دارد. تمامی محیط های کشت باید دور از نور نگهداری شوند. تابش نور به محیط های کشت موجب تشکیل مواد باکتریوستاتیک و باکتریوساید مانند پراکسیداز می گردد. طول عمر اغلب محیط های کشت پلیتی در دمای ۴ درجه سانتی گراد یک هفته می باشد، ولی اگر به گونه ای مناسب بسته‌بندی شوند که هوا داخل آنها نفوذ نکند، تا ۴–۳ هفته قابل مصرف هستند. طول عمر محیط های کشت

حاوی آنتی‌بیوتیک به پایداری آنتی‌بیوتیک موجود در آنها بستگی دارد. توصیه می شود محیط های حاوی آنتی بیوتیک در مدت یک هفته استفاده شوند. از سوی دیگر با گذشت زمان این گونه محیط های کشت رطوبت خود را از دست داده، به دلیل افزایش غلظت آنتی‌بیوتیک، 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 سانتی گراد نگهداری شوند، ۶-۳ ماه قابل مصرف می باشند.

موارد اســتثناء: تایوگلیکولات براث، اندول نیترات براث و SIM به مدت یک ماه قابل نگهداری می باشــند. محیط هایCTA Medium و OF Medium حاوی کربوهیدرات و مولر هینتون براث به مدت ۶ هفته قابل نگهداری می باشند.

جدول شماره ۱- خطاها، مشکلات و علل ممکن در استریلیزاسیون محیط های کشت

مشکلات	علل ممکن
رنگ یا تیرگی غیرطبیعی محیط کشت (Abnormal color/darkening)	ـ آب ناخالص ـ ظروف شیشه‌ای کثیف ـ افت کیفیت محیط کشت دهیدراته ـ حرارت زیاد یا نادرست در طی استریلیزاسیون ـ pH اشتباه یا تغییر و انحراف pH ـ حل نشدن کامل محیط کشت ـ ذخیره‌سازی طولانی مدت در دمای ۵۰°C
لخته یا منعقد شدن محیط کشت (Coagulation)	داغ بودن محیط کشت در هنگام افزودن ساپلمنت (مکمل) به آن
رگه رگه شدن محیط کشت (Flecks in culture medium)	رگه های سیاه: نیم‌سوز شدن آگار رگه های روشن: سرد شدن تقریبی آگار در هنگام افزودن ساپلمنت (مکمل) به آن
pH نادرست (Incorrect pH)	ـ آب ناخالص یا ظروف شیشه‌ای کثیف ـ حرارت زیاد در طی استرایلیزاسیون ـ ذوب مجدد یا ذخیره‌سازی طولانی مدت در دمای ۵۰°C ـ آلودگی شیمیایی ـ کالیبراسیون نادرست pH متر ـ حل نشدن کامل محیط کشت ـ اندازه‌گیری pH در دمای بالای ۲۵°C ـ افت کیفیت محیط کشت دهیدراته ـ ذخیره‌سازی نادرست یا بیش از نیمه عمر محیط کشت دهیدراته ـ کیفیت پایین آب یا ظروف
سمّیت (Toxicity)	ـ حرارت بیش از اندازه در طی استریلیزاسیون ـ افت کیفیت محیط کشت دهیدراته ـ قرارگیری در معرض نور مستقیم خورشید ـ حجم اشتباه مکمل اضافه شده

مشکلات	علل ممکن
ایجاد رسوب یا کدورت (Precipitation/Turbidity)	ـ حرارت بیش از اندازه در طی استریلیزاسیون ـ ذخیره‌سازی طولانی مدت (بیش از ۴ ساعت) در حالت مذاب (بیش از ۵۰°C) ـ افت کیفیت محیط کشت دهیدراته ـ pH اشتباه ـ آب ناخالص یا ظروف شیشه‌ای کثیف ـ حل نشدن کامل محیط کشت ـ داغ بودن محیط کشت در هنگام افزودن مکمل به آن ـ کیفیت پایین آب یا ظروف
شل بودن آگار (Soft agar)	ـ حرارت بیش از اندازه (به ویژه در مقایر pH پایین) ـ هیدرولیز اسید در محیط کشت با pH پایین ـ توزین یا مخلوط کردن نادرست ـ حل نشدن کامل آگار ـ حجم نادرست آب ـ رقیق‌سازی زیاد با مایه تلقیح یا مکمل‌های محیط کشت ـ ذخیره‌سازی طولانی مدت در دمای ۵۰°C
رشد باکتریولوژیک ضعیف یا اثر روی خواص انتخابی/ افتراقی	ـ توزین یا مخلوط کردن نادرست ـ آب یا ظروف آلوده ـ مواد مهارکننده در آب یا ظروف ـ افت کیفیت محیط کشت دهیدراته ـ داغ بودن محیط کشت در هنگام افزودن مکمل به آن ـ داغ بودن محیط کشت در هنگام کشت نمونه بر روی آن ـ ذخیره‌سازی طولانی مدت محیط کشت ـ خشک شدن بیش از حد سطح محیط کشت ـ حل نشدن کامل محیط کشت ـ تیرگی محیط کشت و تغییر و انحراف pH ـ حرارت بیش از اندازه و طولانی مدت

ارزیابی کیفیت محیط های کشت:

هر آزمایشگاه باید از کیفیت هر شماره ساخت از محیط های آماده مصرف تجاری و یا محیط های دهیدراته، قبل از استفاده اطمینان حاصل نماید. الزامات عمومی کنترل کیفیت محیط های کشت عبارتند از:

الف) ثبت اطلاعات محیط های کشت

۱. محیط های آماده مصرف تجاری:

- نام شرکت سازنده، سری ساخت، تاریخ انقضاء، تاریخ دریافت و تاریخ شروع به استفاده از آن را برای هر یک از انواع محیط ثبت کنید.

- هر محیط را مطابق دستورالعمل سازنده نگهداری کنید (معمولاً در $^{\circ}C$ ۸–۲).

۲. محیط های ساخته شده از پودر دهیدراته در آزمایشگاه:

- مقدار محیط ساخته شده، نام شرکت سازنده، شماره ساخت، روش استریل نمودن آن، تاریخ ساخت در آزمایشگاه، pH، تاریخ شروع به استفاده از آن، تاریخ انقضاء و نام فرد سازنده آن ثبت شود.

ب) بررسی مشخصات ظاهری:

محیط های کشت تهیه شده باید قبل از استفاده، از لحاظ فیزیکی و ظاهری نیز بررسی شوند:

- شکستگی یا آسیب دیدگی پلیت ها و لوله ها؛
- جدا شدن آگار از جداره پلیت ها و لوله ها؛
- یخ زدگی یا ذوب شدن آگار؛
- ناصاف پر شدن پلیت ها؛
- مقدار ناکافی آگار در پلیت ها (عمق کمتر از mm ۳؛ برای MHA عمق کمتر از mm ۴) و لوله ها (عمق و سطح ناکافی)؛
- وجود همولیز در محیط های حاوی خون؛
- تغییر در رنگ مورد انتظار برای هر محیط (احتمال اشکال در pH محیط)؛
- وجود حباب یا ناهمواری بیش از حد در سطح محیط؛
- رطوبت اضافی یا خشک شدن بیش از حد محیط؛
- آلودگی قابل مشاهده؛
- وجود رسوب.

ج) بررسی وجود آلودگی:

به عنوان یک قاعده کلی، برای سری ۱۰۰تایی یا کمتر (≤۱۰۰)، ۵–۳٪ از لوله ها/ پلیت ها باید از نظر عدم وجود آلودگی و رشد باکتریایی بررسی شوند. برای مقادیر بیشتر (>۱۰۰) باید ۱۰ لوله یا پلیت به صورت رندوم و تصادفی انتخاب، و انکوبه شوند. نمونه ها باید برای ۴۸–۲۴ ساعت در دمای $^{\circ}C$ ۳۷–۳۵ انکوبه، و سپس به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق نگهداری شوند. نباید شواهدی از رشد میکروبی بعد از انکوباسیون مشاهده گردد. بعد از کامل شدن بررسی، باید تمام نمونه های بررسی شده دور ریخته شوند.

د) انجام آزمایش کنترل کیفیت:

هر محیط کشت باید از نظر میزان رشد قابل قبول و/یا خاصیت مهارکنندگی، با میکروارگانیسم های کنترل مناسب مطابق جدول شماره ۳ بررسی شود.

منابع تهیه میکروارگانیسم های کنترل عبارتند از:

- ATCC (American Type Culture Collection) یا PTCC (Persian Type Culture Collection)
- سویه های شناسنامه دار که طی برنامه ارزیابی خارجی کیفیت دریافت می شوند.
- سویه های شناخته شده بیماران که دارای ثبات فنوتیپی می باشند.

برای این کار لازم است از سویه های کنترل کیفی مورد نظر، سوسپانسیون میکروبی تهیه شود.

A. تهیه سوسپانسیون میکروبی:

یک کشت از ارگانیسم کنترل کیفی مورد نظر روی پلیت بلاد آگار تهیه کنید. بعد از انکوباسیون پلیت به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای $35\pm2^{\circ}C$، ۵-۳ کلنی ایزوله را در ۵-۳ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل حل کرده و کدورت آن را با کدورت استاندارد نیم مک فارلند تنظیم نمایید. این سوسپانسیون میکروبی باید کدورتی مطابق با استاندارد نیم مک فارلند (10^{7} - 10^{8} CFU/ml) داشته باشد.

B. بررسی عملکرد محیط های کشت:

۱) رقیق سازی برای بررسی ویژگی های رشد (Growth properties) محیط های کشت غیر انتخابی پلیتی مانند بلاد آگار، نوترینت آگار، تریپتیک سوی آگار و ...

سوسپانسیون اولیه میکروبی مطابقت یافته با کدورت 0.5 MF را مطابق شکل ۱ به نسبت ۱:۱۰۰ در سرم فیزیولوژی استریل رقیق نموده و مقدار ۱۰µl یا ۰/۰۱ ml سوسپانسیون رقیق شده را به محیط کشت مورد آزمایش، تلقیح نموده و مطابق شکل ۲ کشت دهید که کلنی های ایزوله به دست آید. پلیت ها را مطابق شرایط ذکر شده در جداول شماره ۲ و ۳ انکوبه نمایید. کلنی های مورد انتظار در هر پلیت بعد از انکوباسیون در محدوده (CFU/plate) 10^{3}-10^{4} می باشد. برای اجتناب از رشد زیاد باکتری در بعضی از محیط های کشت غیر انتخابی و برای داشتن کلنی های ایزوله، ممکن است لازم باشد رقت ۱:۱۰۰۰ تهیه شود.

۲) رقیق سازی برای بررسی ویژگی های رشد و مهار کنندگی (Growth and Inhibitory properties) محیط های کشت انتخابی پلیتی مانند مکانکی آگار، EMB آگار، XLD آگار و ...

سوسپانسیون اولیه میکروبی مطابقت یافته با کدورت 0.5 MF را مطابق شکل ۱ به نسبت ۱:۱۰ در سرم فیزیولوژی استریل رقیق نموده و مقدار ۱۰µl یا ۰/۰۱ ml سوسپانسیون رقیق شده را به محیط کشت مورد آزمایش تلقیح نموده و مطابق شکل ۲ کشت دهید که کلنی های ایزوله به دست آید. پلیت ها را مطابق شرایط ذکر شده در جداول شماره ۲ و ۳ انکوبه نمایید. کلنی های مورد انتظار در هر پلیت بعد از انکوباسیون در محدوده (CFU/plate) 10^{4}-10^{5} می باشد. برای اجتناب از رشد زیاد باکتری در بعضی از محیط های کشت انتخابی و برای داشتن کلنی های ایزوله ممکن است لازم باشد رقت ۱:۱۰۰ تهیه شود.

۳) بررسی محیط های کشت لوله ای مانند نوترینت براث، MRVP، SIM، مالونات و ...

هر لوله را با ۱۰µl یا ۰/۰۱ ml از سوسپانسیون اولیه میکروبی مطابقت یافته با کدورت 0.5 MF (بدون رقیق سازی) تلقیح نمایید. لوله ها را مطابق شرایط ذکر شده در جداول شماره ۲ و ۳ انکوبه نمایید. پس از انکوبا سیون، لوله ها را از نظر وجود رشد و/یا ایجاد کدورت و نیز ایجاد واکنش مناسب بیوشیمیایی بررسی نمایید.

موارد استثناء: برای بررسی محیط های لوله ای SIM، TSI، KIA، LIA، CTA، OF و فنل رد آگار به جای تهیه سوسپانسیون، از روش تلقیح مستقیم هم می توان استفاده کرد.

C. زمان انکوباسیون (جدول شماره ۲):

سویه های کنترل کیفی	دمای انکوباسیون	اتمسفر انکوباسیون	مدت انکوباسیون
باکتری های دارای رشد سریع	۳۵–۳۷˚C	*عادی یا غنی شده با CO_2	۲۴– ۱۸ ساعت
باکتری های دارای نیازهای خاص برای رشد	۳۵–۳۷˚C	غنی شده با CO_2	۷۲– ۲۴ ساعت
بی هوازی ها	۳۵–۳۷˚C	شرایط بی هوازی	۷۲– ۲۴ ساعت
کمپیلوباکتر	۴۲˚C	گازپک Campy	۴۸– ۲۴ ساعت
مایکوباکتریوم ها	۳۵–۳۷˚C	غنی شده با CO_2	۲۱– ۷ روز
مخمرها	۳۵–۳۷˚C	عادی	≥ ۷۲ ساعت
کپک ها	۲۵–۳۰˚C	عادی	≥ ۷۲ ساعت

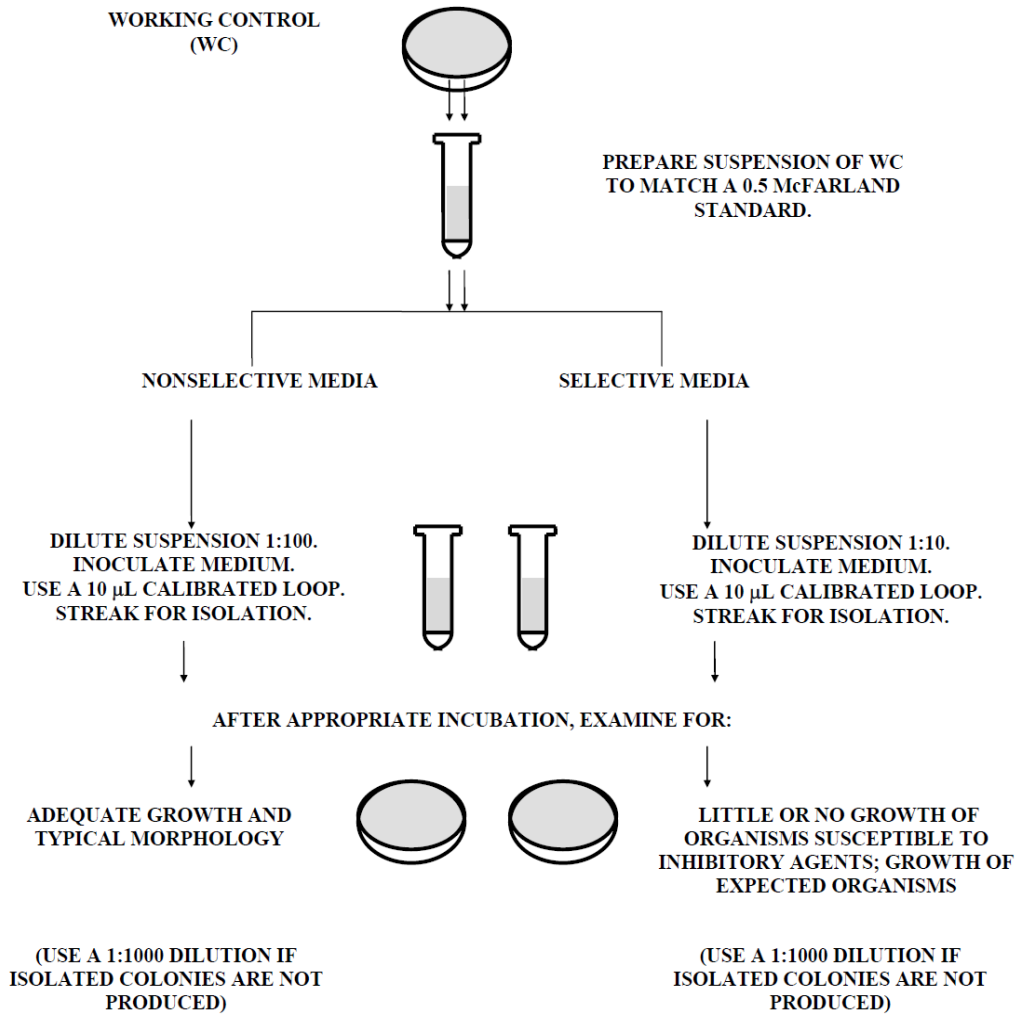
* اتمسفر به نوع محیط بستگی دارد. توصیه های سازنده را بررسی نمایید.

D. تفسیر نتایج:

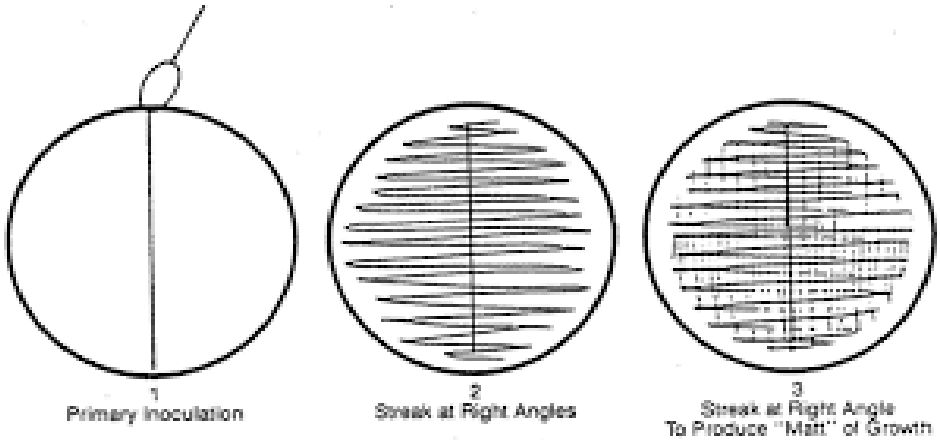
- عملکرد محیط های غیر انتخابی در صورتی رضایت بخش است که سویه های کنترل کیفی، رشد کافی، سایز و مرفولوژی مورد انتظار کلنی را نشان دهند.
- عملکرد محیط های انتخابی در صورتی رضایت بخش است که سویه های کنترل کیفی، رشد کافی، سایز و مرفولوژی مورد انتظار کلنی و مهار رشد بعضی از ارگانیسم های خاص را نشان دهند.

در بعضی موارد، واکنش های رنگی خاص یا همولیز همچنان که در جدول شماره ۳ آمده است، باید ایجاد شود. مثلاً در مورد محیط کشت بلاد آگار ایجاد همولیز مناسب ضروری است و یا برای محیط مکانکی آگار ایجاد واکنش های رنگی برای سویه های میکروبی مشخص ضروری می باشد.

- عملکرد محیط های لوله ای در صورتی رضایت بخش است که سویه های کنترل کیفی در آن رشد کافی نموده یا کدورت لازم را ایجاد کنند و واکنش های بیوشیمیایی مورد انتظار را نشان دهند.



شکل ۱- روش رقیق سازی برای کنترل کیفیت محیط های کشت انتخابی و غیر انتخابی پلیتی



شکل ۲- روش کشت برای بررسی ظرفیت مغذی بودن و مهارکنندگی محیط های پلیتی

جدول شماره ۳- الزامات کنترل کیفیت محیط های کشت

محیط کشت	اتمسفر، مدت زمان و دمای انکوباسیون	ارگانیسم های کنترلی (شماره ATCC)	نتایج قابل انتظار
Alkaline peptone water (APW)	هوازی، ۱۲- ۶ ساعت، ۳۵˚C	*V. cholerae* non O1 *E. coli* (25922)	رشد بر روی ساب کالچر (بلاد آگار) مهار جزئی تا کامل بر روی ساب کالچر (بلاد آگار)
Anaerobic sheep blood and laked blood agar	بی هوازی، ۴۸- ۲۴ ساعت، ˚C۳۵	*C. perfringens* (13124)	رشد می کند، همولیز بتا
		B. fragilis (25285) or *F. nucleatum* (25586) or *P. anaerobius* (27337) or *P. melaninogenica* (25845)	رشد می کند رشد می کند رشد می کند رشد می کند
Anaerobic broths—thioglycolate medium (را ملاحظه نمایید)			
Bile esculin agar	هوازی، ۴۸- ۲۴ ساعت، ۳۵˚C	*E. faecalis* (29212) *S. pyogenes* (19615)	رشد می کند، اطراف کلنی ها سیاه می شود (نصف یا بیشتر محیط سیاه می شود) مهار (جزئی تا کامل)؛ اطراف کلنی ها سیاه نمی شود
Bismuth sulfite agar	هوازی، ۴۸- ۲۴ ساعت، ۳۵˚C	*S. typhi* (19430) *S. typhimurium* (14028) *E. coli* (25922) *E. faecalis* (29212)	رشد، کلنی های سیاه با درخشندگی رشد، کلنی های سیاه یا خاکستری مایل به سبز، ممکن است درخشندگی داشته باشند مهار جزئی؛ کلنی های قهوه ای تا سبز مهار کامل رشد
Blood agar (BA)—nonselective sheep blood agar media	هوازی یا Co_2، ۲۴- ۱۸ ساعت، ۳۵˚C	*S. pyogenes* (19615) *S. pneumoniae* (6305)	رشد می کند، همولیز بتا رشد می کند، همولیز آلفا
		S. aureus (25923) or *E. coli* (25922)	رشد می کند رشد می کند
Blood agar-CAMP test (trypticase soy agar [TSA] with sheep blood only)	هوازی، ۲۴- ۱۸ ساعت، ۳۵˚C	*S. aureus* (33862) or (25923) *S. agalactiae* (12386) *S. pyogenes* (19615)	رشد می کند واکنش مثبت (تشکیل نوک پیکان شفاف) واکنش منفی (عدم تشکیل نوک پیکان)
Blood agar—Selective sheep blood agar media (Columbia [CNA] agar, phenylethyl alcohol [PEA] agar)	CNA، CO_2، ۴۸- ۲۴ ساعت، ۳۵˚C	*S. pyogenes* (19615) *S. pneumoniae* (6305) *S. aureus* (25923) *P. mirabilis* (12453)	رشد می کند، همولیز بتا رشد می کند، همولیز آلفا رشد می کند مهار می شود (به طور جزئی)
	PEA، CO_2، ۴۸- ۲۴ ساعت، ۳۵˚C	*S. pyogenes* (19615) or *S. aureus* (25923)	رشد می کند رشد می کند
		P. mirabilis (12453)	مهار می شود (به طور جزئی)
Blood culture media	بیهوازی، CO_2، ۵ روز، ۳۵˚C	*B. fragilis* (25285)	رشد می کند
	هوازی، CO_2، ۵ روز، ۳۵˚C	*S. pneumoniae* (6305)	رشد می کند
Brain heart infusion agar	هوازی، ۴۸- ۲۴ ساعت، ۳۵˚C	*C. albicans* (10231) or *S. flexneri* (12022) or *S. pneumoniae* (6305)	رشد متوسط تا زیاد رشد متوسط تا زیاد رشد متوسط تا زیاد
Campylobacter agar	O_2 کاهش یافته، غنی شده با Co_2، ۴۸ ساعت، ۴۲˚C	*C. jejuni* (33291) *E. coli* (25922)	رشد می کند مهار می شود (به طور جزئی)
Cary-Blair transport medium	هوازی، ۲۴- ۱۸ ساعت، ۲۵˚C	*S. typhimurium* (14028) *V. cholerae* non O1 *S. flexneri* (12022)	روی ساب کالچر (بلاد آگار) رشد می کند روی ساب کالچر (بلاد آگار) رشد می کند روی ساب کالچر (بلاد آگار) رشد می کند

محیط کشت	اتمسفر، مدت زمان و دمای انکوباسیون	ارگانیسم های کنترلی (شماره ATCC)	نتایج قابل انتظار
Chocolate agar	CO_2، ۴۸- ۲۴ ساعت، ۳۵˚C	*H. influenzae* (10211)	رشد می کند
DNase test agar	هوازی، ۲۴- ۱۸ ساعت، ۳۵˚C	*S. aureus* (25922) or *S. marcescens* (8100) or *S. pyogenes* (19615)	رشد خوب، ایجاد هاله رشد خوب، ایجاد هاله رشد خوب، ایجاد هاله
		S. epidermidis (12228) *K. pneumonia* (33495)	رشد خوب، عدم ایجاد هاله رشد متوسط تا زیاد، عدم ایجاد هاله
Enrichment broths for enterics (gram-negative [GN] broth, selenite broths)	هوازی، ۲۴- ۱۸ ساعت، ۳۵˚C	*S. typhimurium* (14028) or *S. sonnei* (9290)	روی ساب کالچر (مکانکی آگار) رشد می کند روی ساب کالچر (مکانکی آگار) رشد می کند (ممکن است روی محیط های دارای سلنیت مهار شود)
		E. coli (25922)	مهار (جزئی تا کامل) بر روی ساب کالچر (مکانکی آگار)، اما از GN broth بر روی ساب کالچر رشد می کند
Eosin methylene blue media (Levine EMB agar; EMB agar, modified)	هوازی، ۲۴- ۱۸ ساعت، ۳۵˚C	*S. typhimurium* (14028) *E. coli* (25922) *E. faecalis* (29212)	رشد می کند، کلنی های بی رنگ تا کهربایی رشد می کند، کلنی های آبی- سیاه با جلای سبز فلزی مهار می شود (به طور جزئی)
Gelatin medium	هوازی، ۴۸- ۱۸ ساعت یا تا ۲ هفته، ۳۵˚C	*S. marcescens* (8100) *E. coli* (25922)	رشد می کند، ژلاتیناز مثبت رشد می کند، ژلاتیناز منفی
Hektoen enteric (HEK) agar	هوازی، ۲۴- ۱۸ ساعت، ۳۵˚C	*S. typhimurium* (14028) *S. flexneri* (12022) *E. faecalis* (29212) *E. coli* (25922)	رشد می کند، کلنی های آبی تا سبز- آبی با مراکز سیاه رشد می کند، کلنی های سبز تا سبز- آبی مهار می شود (به طور جزئی)؛ کلنی های زرد مهار (جزئی تا کامل)؛ کلنی های زرد تا زرد-قرمز
Kligler iron agar (KIA)	هوازی، ۲۴- ۱۸ ساعت، ۳۵˚C	*E. coli* (25922) *S. typhimurium* (14028) *S. flexneri* (12022) *P. aeruginosa* (27853)	A/A، ایجاد گاز، بدون SH_2 Alk/A، با یا بدون گاز، ایجاد SH_2 Alk/A، بدون گاز، بدون SH_2 Alk/Alk، بدون گاز، بدون SH_2
Loeffler medium	هوازی، ۹۶- ۲۴ ساعت، ۳۵˚C	*C. diphtheria* (51696) *P. aeruginosa* (10145)	رشد متوسط تا خوب. در بررسی میکروسکوپی، دانه های متاکروماتیک و باسیل های زنجیره ای بدون اسپور، شکل چماقی متورم و برجسته دارد. رشد کلنی های قهوه ای- سبز با پروتئولیز
Lysine iron agar (LIA)	هوازی، ۲۴- ۱۸ ساعت، ۳۵˚C	*S. typhimurium* (14028) *S. flexneri* (12022) *P. mirabilis* (43071)	Alk/Alk، ایجاد SH_2، بدون گاز Alk/A، بدون SH_2، بدون گاز Red/A، بدون گاز، بدون SH_2
MacConkey agar	هوازی، ۲۴- ۱۸ ساعت، ۳۵˚C	*E. coli* (25922) *P. mirabilis* (12453) *S. typhimurium* (14028) *E. faecalis* (29212)	رشد می کند، کلنی های صورتی رشد می کند، کلنی های بی رنگ، مهار جزئی سوارمینگ رشد می کند، کلنی های بی رنگ مهار می شود (به طور جزئی)
Malonate broth	هوازی، ۴۸- ۲۴ ساعت، ۳۵˚C	*E. aerogenes* (13048) *E. coli* (25922)	قلیایی (آبی) بدون تغییر رنگ (سبز) یا زرد (تخمیر دکستروز)

محیط کشت	اتمسفر، مدت زمان و دمای انکوباسیون	ارگانیسم های کنترلی (شماره ATCC)	نتایج قابل انتظار
Mannitol salt agar	هوازی، ۴۸- ۲۴ ساعت، ۳۵˚C	*S. aureus* (25923) or *S. epidermidis* (12228)	رشد، کلنی ها پس از ۴۸ ساعت هاله زرد دارند رشد، کلنی ها پس از ۴۸ ساعت هاله قرمز دارند
		P. mirabilis (12453)	مهار جزئی در ۲۴ h، مهار سوارمینگ در ۴۸ h
Moeller decaboxylase broth with amino acids (Arginine, Ornithine and Lysine)	بیهوازی، ۹۶- ۲۴ ساعت، ۳۵˚C	*K. pneumoniae* (13883)	دهیدرولاز آرژینین و دکربوکسیلاز اورنیتین، منفی (A) و دکربوکسیلاز لایزین، مثبت (Alk)
		E. aerogenes (13048)	دهیدرولاز آرژینین، منفی و دکربوکسیلاز اورنیتین و دکربوکسیلاز لایزین، مثبت
		S. typhimurium (14028)	دهیدرولاز آرژینین، دکربوکسیلاز اورنیتین و دکربوکسیلاز لایزین، مثبت
		S. flexneri (12022)	دکربوکسیلاز لایزین، منفی
MR-VP broth	هوازی، ۴۸- ۲۴ ساعت، ۳۵˚C	*E. coli* (25922)	MR مثبت (قرمز) و VP منفی (بدون تغییر)
		E. aerogenes (13048)	MR منفی (زرد) و VP مثبت (قرمز)
Mycobacteria media (Lowenstein-Jensen agar and Middlebrook)	CO_2، >۲۱ روز، ۳۵˚C	*M. tuberculosis H37Ra* (25177) or *M. fortuitum* Group IV (6841) or *M. kansasii* Group I (12478)	رشد می کند رشد می کند رشد می کند
		M. scrofulaceum Group II (19981) or *M. intracellulare* Group III (13950)	رشد می کند - ممکن است روی محیط های انتخابی مهار شود رشد می کند- ممکن است روی محیط های انتخابی مهار شود
		E. coli (25922)	مهار (جزئی تا کامل روی محیط های انتخابی)
Nitrate broth	هوازی، ۴۸ ساعت، ۳۵˚C	*E. coli* (25922) *A. baumannii* (19606) *P. aeruginosa* (27853)	احیاء نیترات مثبت، تولید گاز منفی احیاء نیترات منفی احیاء نیترات مثبت، تولید گاز مثبت
Nonselective mycology media	هوازی، ≥ ۷۲ساعت، ۲۵-۳۵˚C	*C. albicans* (60193 or 10231) or *T. mentagrophytes* (9533)	رشد می کند رشد می کند
Nutrient agar (NA)	هوازی، ۴۸- ۲۴ ساعت، ۳۵˚C	*P. aeruginosa* (10145) *S. flexneri* (12022) *S. aureus* (25923)	رشد متوسط تا زیاد، ایجاد پیگمان سبز رشد متوسط تا زیاد رشد متوسط تا زیاد، کلنی های کرم تا طلایی
Nutrient broth (NB)	هوازی، ۲۴- ۱۸ ساعت، ۳۵˚C	*E. coli* (25922) or *S. aureus* (25923)	رشد خوب رشد خوب
OF medium with Dextrose	هوازی، ۴۸- ۲۴ ساعت، ۳۵˚C	*A. calcoaceticus* (19606) or *P. aeruginosa* (27853)	لوله بدون روغن، A (زرد) و لوله دارای روغن Alk (سبز) لوله بدون روغن، A و لوله دارای روغن Alk
		E. aerogenes (13048) *S. flexneri* (12022)	لوله بدون روغن، A (زرد) و گاز، و لوله دارای روغن A (زرد) و گاز لوله بدون روغن و لوله دارای روغن A (زرد)
Phenol red agar/ broth with carbohydrates	هوازی، ۴۸- ۲۴ ساعت، ۳۵˚C	*E. coli* (25922) *E. faecalis* (33186) *P. vulgaris* (8427) *P. aeruginosa* (10145) *S. typhimurium* (14028) *S. flexneri* (9199) *S. aureus* (25923)	دکستروز، لاکتوز و مانیتول AG (اسید و گاز) دکستروز، لاکتوز و ساکاروز A (اسید) دکستروز A ، مانیتول Alk (قلیا) و ساکاروز AG دکستروز Alk لاکتوز و ساکاروز Alk دکستروز و مانیتول A، لاکتوز و ساکاروز Alk مانیتول AG

محیط کشت	اتمسفر، مدت زمان و دمای انکوباسیون	ارگانیسم های کنترلی (شماره ATCC)	نتایج قابل انتظار
Phenylalanine agar	هوازی، ۲۴- ۱۸ ساعت، ۳۵˚C	*P. mirabilis* (43071) *E. coli* (25922)	مثبت (ایجاد رنگ سبز) منفی (بدون تغییر رنگ)
Salmonella-Shigella (SS) agar	هوازی، ۲۴ ساعت، ۳۵˚C	*S. typhimurium* (14028) *S. flexneri* (12022) *E. faecalis* (29212) *E. coli* (25922)	رشد، کلنی های بی رنگ با یا بدون مراکز سیاه رشد می کند، کلنی های بی رنگ مهار می شود (به طور کامل) مهار می شود (جزئی تا کامل؛ کلنی های صورتی تا قرمز با رسوب)
Selective mycology media	هوازی، ≥ ۷ روز، ۲۵˚C	*A. niger* (16404) *E. coli* (25922)	مهار (جزئی تا کامل) روی محیط های حاوی سیکوهگزیماید مهار (جزئی تا کامل) روی محیط های حاوی کلرامفنیکل
		C. albicans (10231) or *T. mentagrophytes* (9533)	رشد می کند رشد می کند
Selective media for pathogenic *Neisseria* spp.	CO_2، ۴۸- ۲۴ ساعت، ۳۵˚C	*N. gonorrhoeae* (43069) *P. mirabilis* (43071) *S. epidermidis* (12228)	رشد می کند مهار (جزئی) فقط برای محیط های حاوی تری متوپریم استفاده شود مهار می شود (به طور جزئی)
Selective media for enterococci, with azide	هوازی، ۴۸- ۲۴ ساعت، ۳۵˚C	*E. faecalis* (29212) *S. pyogenes* (19615) *E. coli* (25922)	رشد می کند، سیاه شدن اطراف کلنی ها مهار می شود (به طور جزئی تا کامل) مهار (جزئی)- کلنی های بی رنگ روی بایل اسکولین آگار
Selective media for enterococci, without azide	هوازی، ۴۸- ۲۴ ساعت، ۳۵˚C	*E. faecalis* (29212) *S. pyogenes* (19615)	رشد می کند، سیاه شدن اطراف کلنی ها مهار می شود (به طور جزئی تا کامل)
SIM medium	هوازی، ۴۸- ۲۴ ساعت، ۳۵˚C	*E. coli* (25922) *S. typhimurium* (13311) *S. sonnei* (9290)	تولید SH_2 منفی، اندول مثبت و حرکت مثبت تولید SH_2 مثبت، اندول منفی و حرکت مثبت تولید SH_2 منفی، اندول منفی و حرکت منفی
Simmons citrate agar	هوازی، ۹۶- ۴۸ ساعت، ۳۵˚C	*E. aerogenes* (13048) *E. coli* (25922)	رشد می کند، سطح شیب دار آبی می شود فاقد رشد تا رشد کم، بدون تغییر رنگ
Thioglycollate broth, with or without indicator	هوازی، ۴۸ ساعت (درپیچ های محکم)، ۳۵˚C	*B. fragilis* (25285) or *S. aureus* (25923)	رشد می کند رشد می کند
Thioglycollate broth, enriched with vitamin K and hemin	هوازی، ۴۸ ساعت (درپیچ های محکم)، ۳۵˚C	*P. anaerobius* (27337) or *B. vulgatus* (8482) or *C. perfringens* (13124)	رشد می کند رشد می کند رشد می کند
Thiosulfate citrate bile salts sucrose (TCBS) agar	هوازی، ۲۴- ۱۸ ساعت، ۳۵˚C	*V. cholerae* (9459) *V. parahaemolyticus* (17802) *E. coli* (25922) *P. aeruginosa* (10145) *E. faecalis* (29212)	رشد متوسط تا زیاد، کلنی های زرد رشد متوسط تا زیاد، کلنی های سبز آبی مهار جزئی یا کامل، کلنی های کوچک و شفاف مهار جزئی یا کامل، کلنی های سبز آبی مهار جزئی یا کامل، کلنی های کوچک و زرد

محیط کشت	اتمسفر، مدت زمان و دمای انکوباسیون	ارگانیسم های کنترلی (شماره ATCC)	نتایج قابل انتظار
Triple sugar iron (TSI) agar	هوازی، ۲۴- ۱۸ ساعت، ۳۵˚C	*E. coli* (25922) *S. typhimurium* (14028) *S. flexneri* (12022) *P. aeruginosa* (27853)	A/A، ایجاد گاز، بدون SH_2 Alk/A، با یا بدون گاز، ایجاد SH_2 Alk/A، بدون SH_2، بدون گاز Alk/Alk، بدون SH_2، بدون گاز
Trypticase soy agar (TSA)	هوازی، ۴۸- ۲۴ ساعت، ۳۵˚C	*S. flexneri* (12022) *S. aureus* (25923) *E. coli* (25922)	رشد می کند، کلنی های متوسط تا بزرگ، سفید مایل به خاکستری و کمی محدب موکوئیدی. رشد می کند، کلنی های متوسط تا بزرگ، مات، مدور، کامل با پیگمان کرم- زرد تا طلایی. رشد می کند
Tubed media (brain heart infusion and tryptic soy broth)	هوازی، ۲۴- ۱۸ ساعت، ۳۵˚C	*E. coli* (25922) or *S. aureus* (25923)	رشد می کند رشد می کند
Urea agar/ broth	هوازی، ۴۸- ۸ ساعت، ۳۵˚C	*P. mirabilis* (43071) *S. typhimurium* (13311)	اوره آز مثبت، رنگ قرمز صورتی اوره آز منفی، بدون تغییر رنگ
Xylose lysine desoxycholate (XLD) agar	هوازی، ۲۴ ساعت، ۳۵˚C	*S. typhimurium* (14028) *S. flexneri* (12022) *E. faecalis* (29212) *E. coli* (25922)	رشد می کند، کلنی های قرمز با مراکز سیاه رشد می کند، کلنی های قرمز مهار جزئی مهار می شود (جزئی تا کامل؛ کلنی های زرد تا زرد- قرمز)

منابع:

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

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

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

4- Microbiological culture media; Second Edition; Becton, Dickinson and Company; 2009.

5- Biochemical tests for identification of medical bacteria; MacFaddin Jean F; Lippincott Williams & Wilkins; 2000.

6- Practical Medical Microbiology; Thirteenth Edition; Mackie & McCartney; Churchill Livinstone; 1989.