بسم الله الرحمن الرحيم

تهیه وکنترل کیفی محیط های کشت میکرب شناسی

تهیه وتنظیم: شادی جوان

محيط هاي كشت، نقش اساسي در آزمايشگاه ميكربشناسي ايفا ميكنند. محيط هاي كشت به طور گسترده جهت جداسازي، تعيين هويت وآنتي بيوگرام مورد استفاده قرار ميگيرد.
بسياري ازآزمايشگاهها به طور روتين محيط هاي كشت مورد نياز مصارف تشخيصي وتحقيقاتي را خودشان تهيه ميكنند.جهت اطمينان ازاينكه محيطهاي كشت كيفيت خوب ومطلوب داشته باشند. بايستي كنترل كيفي مناسبي به كارگرفته شود. براي رسيدن به اين هدف بايستي در تهيه و مصرف محيطهاي كشت معيارهاي مختلفي رادرنظر گرفت كه مختصري به آن اشاره مي شود.

محيطهاي كشت، دهيدراته به طور تجارتي با ماركهاي متنوع قابل دسترس مي باشد. اينگونه محيط هاي كشت در برابر حرارت و نور و رطوبت حساس مي باشند. بنابراين دقت در موارد زير ضروري است:

۱- تاريخ ورود محيط كشت به آزمايشگاه را در روي برچسب آن در كنار تاريخ مصرف مي نويسيم

۲- برطبق دستورالعمل آن را نگهداري مي كنيم اغلب محيطهاي كشت رادردماي كمتراز۲۵درجه و دور ازتابش نور مخصوصا UV ،اتوكلاو، فور وساير منابع گرمازاودرمحل خشك نگهداري ميكنيم در صورت قيدشدن بر روي برچسب آن را در دماي۸-۲ درجه نگهداري مي كنيم.

۳- تاريخ اولين باز كردن قوطيها رانيز برآنها قيدمي نماييم وتااتمام قوطي درحال مصرف ازبازكردن قوطي ديگر خودداري ميكنيم.

۴-پس ازاستفاده بلافاصله در قوطي رامحكم ببنديد وآن رادرقفسه مربوطه قراردهيد.

۵- هرگزجهت نگهداري وياارسال پودرازقوطي هاي ديگر(Urine bottle) استفاده نكنيد.
۶- سفارش محيط كشت كه متناسب با ميزان مصرف باشد محيطهاي كشت موجود درقوطيهاي بزرگ كه به دفعات متعدد در آنها باز ميشود زود خراب ميشوند (مثل MR)
۷- ازمصرف محيطهاي كشتي كه رنگ آن تغييركرده يا به صورت كلوخ درآمده وهيدراته شده است اجتناب كرده وآنها رادور ميريزيم.
۸-آب مهمترين ماده اي است كه درتهيه محيطهاي كشت استفاده ميشود مي بايست ازآب مقطر يا ديونيزه تازه استفاده كرد همچنين ظروفي كه قرار است محيط كشت درون آنهادرست شود را۲باربا‌آب مقطرآب كشي كنيم تاكاملا تميز شودوازعدم وجودناخالصي (مس،تلوريت سلنيت واملاح صفراوي) ودترجنتها مطمئن شويم.

۹-PH محيط رابعدازاتوكلاو با كاغذ PH مترهنگامي كه محيط داغ نيست (۲۵ درجه) بايستي كنترل نمود.
۱۰- محيطها را ۲-۱ ساعت در انكوباتور مي گذاريم تارطوبت در پليت ازبين برود.
۱۱- ۵% پليتهاي تهيه شده رابهتر است ۱روز دراتو۳۷ درجه گذاشت تا ازعدم آلودگي مطمئن شد. اگربيش از ۱۰%پليتهاي آزمايش شده آلوده باشند كل محيط بايددورريخته شود.
۱۲- محيط كشت ازلحاظ فيزيكي بايستي در پليتهاي ترك نخورده وبدون آلودگي بصورت يكنواخت ريخته شود. ضخامت آگار ۴/۲-۳/۸ ميلي متر،سطح وعمق بدون حباب، حفره ،كريستال، صاف، ترك نخورده، يخ نزده، خشك نشده، فاقدقطرات آب و در بلاد آگار بدون همووليزباشد.
۱۳- محيط كشت راقبل ازمصرف بايستي به دماي اتاق رساند.

براي كنترل كيفي محيط هاي كشت از سويه هاي خاص كه كليه خصوصيات آنها بدست آمده است استفاده مي شود.
يكي از منابع ATCC (American Type Culture Collection) مي باشد كه براساس خصوصيات بيوشيميايي، نتايج GC;HPLC وحساسيت به آنتي بيوتيكها و.... طبقه بندي وكدگذاري شده اند وبه شكل ليوفيليزه درآمپولهايي قابل تهيه اند. (از آزمايشگاه رفرانس)
يك منبع ديگر(Persian Type Culture Collection)PTCC كه همان بالايي هاهستند كه كدگذاري ديگر شده اند (قابل تهيه ازبخش كلكسيون سازمان پژوهشهاي علمي صنعتي كشور)
منبع ديگر(Razes Type Culture Collection)RTCC كلكسيون متعلق به انستيتو رازي است.
مجموعه سويه هاي وحشي كه مختص هرآزمايشگاه مي باشد وجهت تستهاي بيشتر به كاربرده ميشوند.
اصولا بايد هر آزمايشگاه تشخيص طبي سويه هاي كنترلي جهت بخش ميكربشناسي خودتهيه ونگهداري بنمايد (جهت تست كمپ، كنترل كيفي آنتي بيوگرام،محيط ها،رنگها و...)

محیط های کشت

برای بررسی وتعیین هویت میکروارگانیسم ها در نمونه ارسالی به آزمایشگاه

انتخاب وتولید انواع محیط کشت براساس نیازهای بیولوژیکی خاص باکتریها می باشد

تکثیر باکتریها درمحیط وشرایط مناسب جهت رشد عمدتا در موارد زیر انجام می شود:

۱. بدست آوردن کشت خالص از باکتری در مواقعی که بیش از یک نوع باکتری دربدن بیماروجودداشته باشد
۲. تعیین حساسیت ومقاومت باکتری دربرابرمواد ضد میکروبی

تقسیم بندی انواع محیط کشت

۱. براساس فرم وحالت فیزیکی محیط
۲. براساس ترکیب موادمحیط
۳. براساس منظور وخواسته استفاده (چگونگی رشدباکتریها)
۴. براساس فرم تولید

انواع محیط کشت از نظر حالت فیزیکی:

۱. محیط کشت نیمه جامد:درصد آگار ۲-۰/۵درصد مثل ترانسپورت وSIM
۲. محیط کشت مایع: جهت بدست آوردن رشد زیاد از یک باکتری خاص ,فاقد اگار,مثل VP-MR,SF,TSB
۳. محیط کشت جامد: برای بدست آوردن کلنی تک، وجود آگار ۲%

انواع محیط کشت از نظر ترکیبات:

۱. محیط باترکیب شیمیایی معین
- دارای ترکیبات شیمیایی با وزن مولکولی معین ودرجه خلوص مشخص میباشند

۲. محیط باترکیب شیمیایی نامعین
- شامل مخلوطی از مواد طبیعی به همراه ترکیبات شیمیایی می باشند

محیط کشت براساس چگونگی رشد باکتریها

۱. **محیط پایه** :اجازه رشد به بسیاری از میکروبها .اما نیاز غذایی اختصاصی میکروبهای پر توقع رافراهم نمی کند

۲. **محیط غنی شده** :اضافه کردن موادی چون خون وسرم وآسیت وپپتون به محیط پایه جهت رشد باکتریهای مشکل پسند مثل BA

۳. **محیط غنی کننده** :این محیط دارای مواد مغذی جهت افزایش پاتوژنها وممانعت کننده از رشدمیکروبهای ناخواسته مثل SF

۴. **محیط های انتخابی** :افزودن ترکیبات شیمیایی مانند آنتی بیوتیکها ورنگهابه محیط پایه یا ایجاد تغییراتی درفشاراسمزی ومیزان اکسیژن وPH.جهت جدا کردن یک نوع باکتری خاص مثل SSAوXLD

۵. **محیط افتراقی** :این محیط ها حاوی معرفهای مختلفی هستند که باتغییر رنگ آنها میکروارگانیسمهای مختلف رامیتوان ازهم افتراق داد مثل:BA,EMB,MC,XLD,TCBS

۶. **محیط انتقالی** :محیط مناسب جهت نمونه هایی که سریعا کشت نمی شوند.ممانعت از رشد باکتریهای کمونسال وحفظ شرایط بقا میکروبهاازنظرهوازی و بیهوازی مثل Amis,Stuart,Carry Blair

۷. **محیط بیوشیمیایی** :برای نشان دادن فعالیت آنزیمی کشتهای خالص بکار میروند مثل TSI,SIM,SC,MR-VP

انواع محیط کشت براساس چگونگی رشد

۱. محیطهای نگاهدارنده:

جهت نگهداری سویه های میکروبی,Skimed milk,Dorset egg medium

۲. محیطهای غنی شده

رشدمیکروبها راتقویت میکندمثل N.Bنوع سلکتیو آن رشدانواعی راتقویت ومانع رشدبعضی دیگرمی شود مثل Sf

۳. محیطهای جداکننده

اکثرا جامد هستندوبرای دیدن تک کلنی بکار میروندمثل NAفرم سلکتیو آن مثل MC

۴. خواص فیزیولوژیکی وبیوشیمیایی میکروبها درآن بررسی میشودمثل محیط اوره

- بعض ازمحیطها هم جداکننده هستند وهم افتراقی مثلXLD

۵. محیطهای چندمنظوره

هم غنی کننده ،هم جداکننده و هم افتراقي مثل BA

انواع محیط کشت براساس فرم تولید

۱. محیطهای کشت آماده جهت استفاده

- آندسته راشامل میشودکه به صورت پلیت یالوله های حاوی محیط کشت آماده میباشد

۱. محیطهای کشت دهیدراته

- شامل موادبه صورت خشک وبه فرم پودری یا گرانوله میباشد

محیط های کشت دهیدراته

- تولیدمحیط های کشت دهیدراته مرک (MERCK) باستثنای چند مورد به شکل گرانوله می با شد
- مزیت محیط کشت گرانوله به محیط پودری :

۱. عدم تولید گرد وغبار درموقع استفاده از محیط
۲. آسان تر وزن کردن آن
۳. کاهش زمان حل شدن بدلیل بهتردربرگرفته شدن گرانوله توسط آب
۴. پخش یکنواخت محتویات حتی پس از نگهداری طولانی
۵. طول عمر نگهداری بالابعلت محتوای کم آب وپخش یکنواخت محتویات واستفاده از ظروف شیشه ای

کنترل کیفی محیط کشت

۱. محیط کشت آماده مصرف توسط شرکت تولید کننده باید کنترل کیفی گردد
۲. محیط کشت دهیدراته

- شرکت سازنده بایدکنترل خودرابه صورت مستندازنام وکدمحیط, PH, تاریخ انقضا, شرایط نگهداری و اطلاعات از سوشهای استفاده شده برای کنترل سایر اطلاعات تکنیکی ,سمی وخطرناک بودن ویاً بی خطر بودن آن راگزارش کند

چک کردن لیست بوسیله آزمایشگاه

- آزمایشگاه موظف است موارد زیر رادر رابطه بامحیط تحویل گرفته شده کنترل نماید

۱. نام محیط وکدآن را(batch code)
۲. تاریخ انقضا
۳. شرایط وسلامت بسته بندی
۴. خرابی ویاسالم بودن ظرف حاوی محیط

- محیطها به هنگام استفاده بایدمجددا کنترل شوند

۱. تاریخ اولین بازکردن محیط
۲. ارزیابی ظاهری ازمحتویات داخل ظرف
۳. خصوصا بعد ازبازکردن ظرف جدید سلامت محیط به شرایط نگهداری مرتبط است که درصورت تغییررنگ,عدم یکنواختی دراثررطوبت محیط غیر قابل استفاده میگردد

نگهداری

۱. نگهداری در جای خشک وتاریک ودر دما ی بین ۱۵تا ۲۵درجه
۲. نگهداری در ظروف دربسته وکاملا مسدود برای جلوگیری از نفوذ رطوبت(جذ ب آب باعث تغییر PHو چسبندگی محیط می شود)

- تغییرات شیمیایی سبب تشکیل توده در محیط کشت میشود
- عموما تحت شرایط مطلوب این محیط ها به مدت پنج سال بعد از ساخت قابل نگهداری هستند.

روش تهیهٔ محیط های کشت دهیدراته و استریلیزاسیون آنها

- روش کار بر اساس دستورالعمل موجود بر روی قوطیهای حاوی انواع محیط های کشت می باشد.
- روش استریلیزاسیون نیز بر روی برچسب دستورالعمل تهیهٔ محیط کشت درج گردیده است.
- این دستورالعمل ها بر حسب نوع محیط کشت و شرکت تولید کننده، متفاوت است.

رعایت نکات مهم در تهیه محیط هاي کشت

آب

- آب مورد استفاده در محیط سازی باید دارای کیفیت مناسب باشد یعنی فاقد مواد مهار کنندۀ رشد میکروبی (یونهای سمی مثل مس) یا تأثیرگذار در رشد میکروبی باشد. آب شیر نامناسب است چون دارای ناخالصی های ذاتی(منیزیم، کلسیم، کلر، فلور) است.

- آب خوب و تازه را با تقطیر یا دیونیزاسیون تهیه کنید. برای نگهداری آبمقطر از ظرفی استفاده کنید که از مواد خنثی (شیشۀ خنثی، پلی اتیلن) تهیه شده باشد. ضریب هدایت آب باید کمتر از 15 µs باشد. PH آب معمولاً کنترل نمی شود مگر آنکه در PH محیط های کشت تهیه شده، مشکلی بوجود آید.

توزین پودر محیط کشت

- در تهیهٔ محیط کشت طبق دستورالعمل شرکت سازنده که بر روی قوطی نصب شده، مقدار مناسبی از پودر را با دقت وزن کنید.
- ظرف محیط کشت را دور از کوران هوا و رطوبت باز کنید.
- از استنشاق پودرها بخصوص 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. هنگام کار از ماسک مناسب استفاده کنید.
- درب قوطی محیط کشت را هر چه سریعتر ببندید.

افزودن آب

- نصف حجم آب مورد نیاز را داخل ظرف بریزید، سپس مقدار توزین شدهٔ محیط کشت را به آن اضافه نمایید و برای چند دقیقه به تندی تکان دهید.

- باقیماندهٔ آب را به دیواره های ظرف بریزید تا ذرات محیط کشت چسبیده به دیوار، وارد محلول شوند. این مرحله بسیار مهم است چون ممکن است پودر خشک محیط کشت در بالای سطح آب در اتوکلاو استریل نشود و منبع آلودگی بعدی گردد.

- آب را در ظرف مناسب، با حجم ۲ تا ۳ برابر حجم نهایی محیط کشت بریزید تا بتوان آنرا بخوبی تکان داد و مخلوط نمود.

حل کردن پودر محیط کشت

- محیط های کشت فاقد آگار معمولا به راحتی در آب حل میشوند.

- محیط های کشت حاوی آگار را باید قبل از حرارت دادن، چند دقیقه با آب مخلوط نمود، سپس حرارت داد تا آگار قبل از اتوکلاو کردن کاملاً حل شود. محیط های کشت را بجوشانید بدون آنکه بسوزند.

- محیط های کشتی که نباید اتوکلاو شوند بعد از حل شدن آگار، برای توزیع در ظروف نهایی آماده خواهند بود اما اکثر محیطهای کشت به استریلیزاسیون نهایی دارند.

استریلیزاسیون

- **استریلیزاسیون با حرارت مرطوب:**

در اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای C ۱۲۱° انجام می گیرد.
توصیه می شود مقادیر زیاد محیط کشت را در حجم های کوچکترتقسیم نمایید.

- خروج سریع محیط کشت ازاتوکلاو بعد از پایین آمدن فشارو قرار دادن آن در زیر آب خنک وجاری
- درصورت در دسترس نبودن اتوکلاو محیطها بایستی در دوتاسه روز متوالی به مدت ۳۰دقیقه در دمای ۱۰۰درجه در حمام جوش یا دیگ بخار حرارت داده شود

- **استریلیزاسیون با صافی غشایی:**

استریلیزاسیون تحت شرایط خلأ یا افزایش فشار انجام می گیرد.
برای استریلیزاسیون مواد و ترکیبات حساس به حرارت بکار میرود.
از غشاءها و صافی های با قطر منفذ μm ۲۲/۰ یا ۴۵/۰ استفاده کنید.
این فیلترها قبل از استفاده باید در اتوکلاو استریل شوند.

تنظیم PH

- میزان PHمحیط به ترکیبات آن ودرجه حرارتی که در آن PHاندازه گیری میشود بستگی دارد لذا بایدبعد از استریلیزاسیون PHاندازه گیری شود

- استفاده از PH مترویا نوارهای معرف مخصوص PH ۰/۴تا ۰/۷(مرک) و ۶/۵ تا۱۰ (مرک)

- تعیین PHدر محیطهای جامد دردمای ۴۵درجه ودر محیطهای مایع در دمای اتاق صورت بگیرد.

- تنظیم PHبا استفاده از HCLو NAOH نرمال یا۰/۱ نرمال

آماده سازی جهت مصرف

- بعد از استریلیزاسیون و پس از آنکه دمای محیط کشت به حدود ۵۰ °C رسید، با رعایت شرایط آسپتیک آنرا در ظروف نهایی استریل توزیع کنید.
- باید مکمل های حساس به حرارت را بعد از آنکه دمای محیط کشت به حدود ۵۰ °C رسید، درشرایط آاستریل به آن اضافه نمود.
- دمای مکمل (ساپلمنت) استریل نیز باید قبل از افزودن به محیط کشت به دمای اتاق برسد.
- جهت کنترل استریل بودن پلیتها، ۵-۳٪ آنها را برای ۲۴ ساعت انکوبه کنید. در طول انکوباسیون ممکن است رطوبت محیط آگار از بین برود. از دست دادن بیش از ۱۵٪ محتویات آب، ممکن است روی رشد میکروارگانیسم اثر نامطلوب بگذارد.

پخش محیط در پلیت

- به منظور ممانعت از تشکیل ذرات متراکم آب در سطح داخلی پلیت پخش آن در دمای ۴۵تا۵۵درجه صورت گیرد

- گرفتن مختصر شعله گاز روی محیط برای از بین بردن حبابهای هوای موجود روی پلیتها

- از بین بردن رطوبت سطح آگار باانکوباسیون پلیتها در۳۰تا۴۰درجه به مدت ۲۰تا۳۰دقیقه به منظور جلوگیری از سوارمینگ باکتریایی وسیال شدن کلنی ها

محیط کشتهای اسیدی

محیط کشتهای آگار که PHآنها زیر ۰/۶می باشد باید تحت شرایط معتدلی تهیه شوندچون آگاراگر در یک محیط اسیدی حرارت داده شوند هیدرولیز شده ومقاوت ژل محیط کاهش می یابد بنابراین از آب کردن مجدد باید خودداری کرد

منابع احتمالی خطا در طول تهیه واستفاده از محیط کشت

۱. **گلوله شدن محیط کشت دهیدراته**

- رطوبت بالا در طول نگهداری
- باز بودن طولانی ظرف محیط کشت
- خیلی کهنه بودن محیط کشت

۲. **تغییر PH**

- خنثی نبودن آب مقطر
- بیش از حدحرارت دیدن محیط در طول حل کردن
- خیلی کهنه بودن محیط ومحکم نبودن درب ظرف محیط

ادامه

- **۳.کدورت ورسوب**

کدورت در پلیت ولوله آزمایش خطا تلقی می شود

- عاری نبودن آب از املاح وصحیح نبودن PH
- تمیز نبودن ظروف مورداستفاده حل کردن
- بیش از حد حرارت دیدن محیط در طول حل کردن
- در مورد محیط های از پیش مخلوط شده ترکیبات اصلی ناخالصی های رسوب کننده داشته اند.

ادامه

۴. پایین بودن بیش از حدمقاومت ژل

- محیط کشت دهیدراته به مقدار ناکافی وزن شده
- محیط کشت دهیدراته کاملا حل نشده است
- محیط کشت در طول حل شدن احتمالا در PHپایین بیش از حد حرارت دیده است.
- قبل از ریختن محیط در پلیت تکان داده نشده است
- درمورد محیط های از پیش مخلوط شده آگار نا مناسب بوده
- محیط کشت اسیدی در شرایط معتدل تهیه نشده

ادامه

۵. تغییر رنگ

- صحیح نبودن PHدر مورد محیطهای حاوی اندیکاتور
- بیش از حد حرارت دیدن محیط در طول حل کردن :

الف) محیط کشت تیره شده

ب) قند سوخته است

ج)پیگمانهای رنگی از بین رفته

- تمیز نبودن ظرف مورداستفاده برای حل کردن

ادامه

۶. رشد خیلی ظعیف

- وجود موادمهار کننده رشددر ظرف ویا آب مورد استفاده برای حل کردن ویا درمواد نمونه کشت داده شده
- آسیب دیدن قبلی میکروبهای موجود در نمونه
- تغییر PH
- در محیط کشت پایه مقادیر اضافه شونده درست نبوده
- محیط در طول حل کردن بیش از حد حرارت دیده
- در مرحله پخش در پلیت درجه حرارت بالا بوده است

ادامه

۷. رشد خیلی قوی

- محیط کشت در طول حل کردن بیش از حد حرارت دیده وموجب از بین رفتن مهار کننده های انتخابی شده است
- در مورد محیط های کشت پایه مقادیر اضافه شونده نادرست بوده است
- محیط کشت به مقدار زیادی از ماده مورد آزمایش تلقیح شده است

۸. رشد آتیپیک

- محیط کشت بطور نادرست حل شده است.
- محیط کشت دهیدراته خیلی کهنه بوده .
- جهت کشت شرایط غلطی مورد استفاده قرار گرفته.
- باقیمانده مواد خارجی در ظرف مورد استفاده برای حل کردن یا در آب ویا در مواد نمونه وجود دارد.

نگهداری محیط کشت آماده شده

- محیط تهیه شده دریخچال ۸-۲درجه نگاهداری شوند به جزمحیط تیوگلیکولات برات که دردمای اتاق بدون تماس بانور نگهد اری میشودبعلت وجودگازهای موجود دراتمسفردرمایع ودردمای یخچال درصورت حل شدن اکسیژن در محیط تایوباعث سمیت آن می شود

- نباید درزیرصفر درجه نگهداری شوند چون ساختمان ژلی آنها خراب میشود.

- برای جلوگیری از خشک شدن پلیتها استفاده از نوار چسب به دور محل اتصال در پوش وبسته بندی کردن در کیسه های پلاستیکی غیر قابل نفوذ هوا تا۴هفته قابل مصرف میباشند

- لوله های درپنبه ای تا۳هفته ولوله های بادرشل تا۳ماه ولوله های درپیچ دار به مدت ۳تا۶ ماه قابل مصرف هستند.

کنترل کیفی محیطهای کشت تهیه شده

- استفاده از سوشهای کنترل وشرایط انکوباسیون فاکتورهای مهم تضمین کیفیت بشمار می روند.
- منبع سوشهای کنترل شامل :

۱. (ATCC)
۲. منبع تجاری
۳. آزمایشگاههای مرجع
۴. ایزوله های بیماران

نگهداری سوشهای کنترل

۱. محیط Trypticase Soy agarاغلب میکروبها در این محیط با گلیسرول ۱۵%وقرارگرفتن در فریزرتا مدت ۵سال نگهداری میشوند.

- کشت عمقی انتروباکتریاسه ها در این محیط ورشد در۳۷درجه وسپس قرارگرفتن در یخچال حداقل ۶ماه قابل نگهداری میشود

۲. Deep freeze نگهداری در دمای زیر ۷۰درجه

۳. Lyophilization

مراحل انجام تست

- تهیه نیم مک فارلند از سوش استاندارد

- تهیه سوسپانسیون ۰/۰۱از نیم مک فارلند برای محیط کشت غنی مثل NA و BA و تلقیح۱۰ میکرولیترازآن به محیط که باید ۲x۱۰۰۰۰CFU کلنی بدهد

- برای آزمایش ظرفیت بازدارندگی مثل محیط EMB سوسپانسیون ۰/۱از نیم مک فارلند و تلقیح ۱۰میکرولیتر از آن به محیط که باید ۲x۱۰۰۰۰۰CFU کلنی بدهد

کنترل کیفی محیطهای آماده تجارتی

- بایدازجهات زیرموردبررسی قرار گیرند:

۱. پلیت های ترک خورده
۲. پخش شدن نامساوی محیط درپلیتها
۳. ترک خوردن محیط درپلیتها
۴. همولیز(آگار خونی)
۵. انجماد
۶. وجود تعدادزیاد حفرات یا حباب های هوا
۷. آلودگی

محيط هاي رايج
ميكرب شناسي

Chocolate Agar

کشت در Chocolate Agar

هدف : جداسازی باکتری های سخت رشد

اساس آزمایش : محیط شکلات آگار یک محیط غنی شده میباشد . در هنگام ساخت محیط بعلت لیز شدن گلبول های قرمزفاکتورهای X (هماتین) و V(نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید) آزاد می شوند و بدین ترتیب باکتریهای سخت رشدی مثل هموفیلوس و نایسریای پاتوژن قادر به رشد در آن می شوند . بعلت سالم نبودن سلول RBCبررسی همولیز در این محیط امکان پذیر نمی باشد .

◄ **نحوه ی ساخت محیط کشت Cho.A :**

¤ طبق دستور شرکت سازنده ی پودر محیط کشت که بر روی ظرف مربوطه درج شده است و با توجه به میزان مورد نیاز آزمایشگاه ، بیس بلاد آگار را بسازید .

¤ بعد از پایان اتوکلاو و پائین آمدن دمای محیط پایه تا حد 70-80ºc، به نسبت 5 درصد از خون دفیبرینه ی گوسفند را در شرایط استریل به آن افزوده و در پلیت استریل تقسیم کنید .

کنترل کیفی قبل و حین انجام کار:

بعد از ساخت محیط کشت از باکتری های زیر جهت کنترل کیفی استفاده کنید :

مشاهده ی رشد Neisseria gonorrhoeae ATCC®43069

مشاهده ی رشد و همولیز آلفا Streptococcus pneumoniae ATCC®6305

Blood Agar

کشت در Blood Agar

هدف : تشخیص و جداسازی باکتری ها ازروی فعالیت همولیتیک آنها

اساس آزمایش : محیط بلاد آگاریک محیط افتراقی است بدین معنی که باکتریها از روی فعالیت همولیتیک در محیط به دو دسته ی همولیتیک و غیر همولیتیک تقسیم میشوند ولی از آنجائیکه محیط با وجود خون گوسفند غنی شده است اغلب باکتریها روی آن رشد میکنند لذا محیط غیر انتخابی است . میتوان با افزودن مواد دیگری به محیط بلاد آگار آنرا انتخابی کرد

موارد کاربرد : جداسازی اولیه ی نمونه های محتوی فلورمخلوط از روی فعالیت همولیتیک آنها و جداسازی باکتری های سخت رشد ، انجام تست کمپ ، انجام آنتی بیوگرام با دیسک های تشخیصی

کنترل کیفی قبل و حین انجام کار :

محیط کشت را بعد از ساخت از نظر فعالیت همولیتیک با باکتری های زیر کنترل کنید :

رشد به همراه همولیز بتا Streptococcus pyogenes ATCC® 19615

رشد به همراه همولیز آلفا Streptococcus pneumoniae ATCC® 6305

تفسیر(علل تکرار،چگونگی ونحوه ی گزارش) مشخصات عملکردی آزمایش،محدودیت ها وعوامل مداخله گر در آزمایش :

♠ محیط پایه ی مورد استفاده برای ساخت محیط بلاد آگار باید عاری از قند باشد . وجود قند در محیط و مصرف آن توسط باکتری باعث ایجاد PHاسیدی در محیط می شود .

ازآنجائیکه استرپتولایزین S به شرایط اسیدی حساس میباشد در چنین محیطی غیر فعال شده و بصورت نان همولیتیک ظاهر میشود .

♠ استفاده از خون انسان در تهیه ی محیط بلاد آگار جایز نمی باشد . وجود مواد ی مثل آنتی بیوتیک در خون انسان ، رشد کیسه های حاوی خون باعث ایجاد شرایط اسیدی در محیط باکتری ها را تحت تأثیر قرار میدهد . همچنین قند موجود درمیشود . همچنین با استفاده از خون انسان برخی از باکتری ها از نظر همولیز الگوهای متفاوتی را نشان میدهند انتروککها روی این محیط بتاهمولیتیک خواهند بود .

Peptone Water

عنوان : **Peptone Water media Alkaline**

هدف :غنی سازی ویبریو کلرا موجود در نمونه ی بالینی

اساس آزمایش : آزمایش بر اساس توانائی رشد ویبریو کلرا در PH قلیائی استوار است . در این PHاز رشد سایر باکتری های کومنسال روده بطور موقت جلوگیری میشود . در واقع محیط کشت پپتون واتر به نوعی غنی کننده ی گونه های ویبریو و آئرومونـاس می باشد . بدیهی است رعایت زمان توصیه شده برای کشت مجدد از محیط مذکور در گرفتن نتیجه ی مطلوب کمک کننده میباشد .

نوع نمونه : رکتال سوآب و نمونه ی مدفوع اسهالی

موارد کاربرد : جداسازی ویبریو کلرا از نمونه ی بالینی

◄ **نحوه ی ساخت محیط کشت APW :**

◘ طبق دستور شرکت سازنده ی پودر محیط کشت که بر روی ظرف مربوطه درج شده است و با توجه به میزان مورد نیازآزمایشگاه محیط کشت را بسازید .

◘ محیط کشت را قبل ازاتوکلاو کردن به میزان 2cc درون هرلوله آزمایش تقسیم کنید.

کنترل کیفی قبل و حین انجام کار :

بعد از ساخت محیط کشت با سویه های زیر آنرا کنترل کنید :

کنترل مثبت Vibrio cholerae ATCC 9459 ®

کنترل منفی Escherichia coli ATCC 25922®

مراحل اجرائی کار : نمونه ی رکتال سوآب را بعد از کشت در محیط TCBSبدرون لوله ی محیط کشت APWمنتقل کنید .

لوله را بمدت 6-8 ساعت در 35-37ºc انکوبه نمائید . بعد از گذشت زمان مذکور از سطح لوله نمونه برداری کرده و روی پلیت دوم TCBS کشت استریک انجام دهید .

مشخصات عملکردی آزمایش ، محدودیت ها وعوامل مداخله گر در آزمایش :

- نسبت مقدار نمونه ی تلقیحی به محیط با حجم محیط کشت درون هر لوله باید متناسب باشد . (10%) یا یک سواب در یک لوله ی حاوی 2cc محیط کشت پپتون واتر قلیائی
- در صورتیکه امکان انجام کشت مجدد از APW را بعد 6-8 ساعت ندارید ، لوله را به مدت 18 ساعت انکوبه نموده و سپس در لوله ی APW دیگری کشت مجدد را انجام دهید . حال میتوانید بعد از رعایت زمان توصیه شده، کشت مجدد روی TCBS را انجام دهید .

TCBS Media

عنوان : کشت در محیط TCBS

هدف : بررسی نمونه ی مدفوع ورکتال سوآپ از نظر وجود ویبریو کلرا

اساس آزمایش: محیط کشت شامل نمک صفراوی، تیوسولفات سدیم ،سیترات فریک و قند سوکروز است . وجود نمک صفراوی محیط را انتخابی می کند به این ترتیب رشد باکتریهاي گرم مثبت مهار میشود .وجود منبع سولفور(تیوسولفات سدیم) و اندیکاتور سیترات فریک تولید سولفید هیدروژن توسط باکتری را مشخص میکند وقند سوکروز بعنوان منبع کربوهیدرات برای باکتری هائی که قدرت تخمیر آنرا داشته باشند موجود است . معرف PH برم تیمول بلو است .

با توجه به اینکه ویبریو کلرا لاکتوز منفی و سوکروز مثبت است با تخمیر قند سوکروز در پلیت TCBS، کلنی های زرد رنگ ، کدر ونسبتاً بزرگ بوجود می آورد . انجام صحیح کشت با تکنیک Streaking، ایجاد کلنی های ایزوله را امکان پذیر میکند .

تست های افتراقی بعدی مثل KIA روی کلنی های ایزوله انجام میشود .

موارد کاربرد: جدا سازی ویبریو کلرا از کشت مدفوع و رکتال سوآب

کنترل کیفی قبل و حین انجام کار:

بعد از ساخت محیط کشت جهت کنترل کیفی از سویه های زیر استفاده کنید :

رشد متوسط تا زیاد، کلنی زرد

Vibrio cholerae ATCC 9459 ®

رشد متوسط تا زیاد، کلنی زرد Vibrio parahaemolyticus ATCC 17802

مهار رشد یا رشد جزئی با کلنی های زرد کوچک و شفاف

Escherichia coli ATCC 25922 ®

مهار رشد یا رشد جزئی با کلنی های آبی

Pseudomonas aeruginosa ATCC 10145

مهار رشد یا رشد جزئی با کلنی های کوچک وزرد

Streptococcus faecalis ATCC 29212®

مراحل اجرائی کار:

به کمک یک سوآپ مقدار زیادی از نمونه (مدفوع یا نمونه غنی شده در محیط پپتون واتر) را به محیط کشت انتقال دهید .

رکتال سوآپ را مستقیماً به محیط کشت انتقال دهید .به کمک لوپ استریل وبا تکنیک Streaking نمونه را در تمام سطح پلیت پخش کنید . پلیت را در دمای 35±2ºc به مدت 24 ساعت انکوبه کنید . درصورت منفی بودن رشد، انکوباسیون را یک روز دیگر ادامه دهید .

مشاهده ی کلنی های زرد رنگ در پلیت تنها به معنی سوکروز مثبت بودن باکتری بوده و جهت شناسائی دقیقتر از تست هائی مثل کشت در KIA وSIM و تست اکسیداز استفاده کنید .

مشخصات عملکردی آزمایش،محدودیت ها وعوامل مداخله گر در آزمایش :

♠ بدلیل اینکه محیط کشت به شدت انتخابی می باشد لذا حجم نمونه ای که به محیط کشت منتقل میشود باید زیاد باشد .

♠ جهت انجام تست اکسیداز از کلنی های موجود در پلیت TCBS استفاده نکنید . بعلت وجود مهار کننده ی قوی در محیط احتمال منفی کاذب وجود دارد.

♠ بتدریج که از تاریخ ساخت محیط کشت میگذرد به علت کم شدن رطوبت محیط ،غلظت مهار کننده درآن افزایش می یابد . به همین دلیل استفاده از محیط کهنه در جداسازی ویبریو کلرا کمک کننده نخواهد بود . بنابراین از زمان تهیه ی محیط کشت نباید بیشتر از یک هفته گذشته باشد .

♠ حتی الامکان به محض دریافت نمونه ، آنرا کشت دهید . نمونه هائی مثل سوآب مقعد ، مدفوع ، ماده استفراغ شده،ماهی یا غذاهای دیگر را میتوان با سوآب بطور مستقیم روی پلیت کشت داد .

♠ تلقیح زیاد مخصوصا اگر نمونه ها تازه نیستند، توصیه می شود .

♠ اگر تاخیری در رسیدن نمونه به آزمایشگاه پیش بینی می شود ، سوآبهای محتوی نمونه را باید در محیط انتقالی کری-بلر به آزمایشگاه ارسال کرد .

Carry Blair

عنوان : کشت در Carry Blair

هدف : انتقال نمونه ی سوآب مدفوع و یا رکتال

اساس آزمایش : این محیط کشت جزء محیط های کشت ترانسپورت می باشد و با دارا بودن حداقل مواد مغذی بقای ارگانیسم را بدون پاسخ و دفاع افزایش می دهد . تایوگلیکولات سدیم در محیط کشت پتانسیل اکسید و احیاء را فراهم می کند . بالا بودن PH محیط از نابودی باکتری ها بعلت تشکیل اسید جلوگیری می کند .

موارد کاربرد : انتقال نمونه مدفوع جهت کشت از نظر ویبریو ،سالمونلا، شیگلا و .....

◄نحوه ی ساخت محیط کشت کری بلر :

¤ طبق دستور شرکت سازنده ی پودر محیط کشت که بر روی ظرف مربوطه درج شده است و با توجه به میزان مورد نیازآزمایشگاه محیط کشت را بسازید .

¤ محیط کشت را قبل از اتوکلاو کردن درون لوله های آزمایش تقسیم کنید .

در صورتی که درب لوله ها را محکم بسته باشید ، می توانید محیط های آماده را تا یک سال در دمای اتاق نگهداری کنید .

کنترل کیفی قبل و حین انجام کار:

برای کنترل کیفی محیط از باکتری های زیر استفاده کنید :

ساب کالچر روی محیط مغذی و مشاهده ی رشد بعد از 18ساعت

Shigella flexneri ATCC 9199

ساب کالچر روی محیط مغذی و مشاهده ی رشد بعد از 18 ساعت

Neisseria gonorrhoeae ATCC 19424

مراحل اجرائی کار :

سوآب رکتال یا سوآب های فرورفته در مدفوع را، داخل لوله های محتوی محیط کشت ترانسپورت قرار دهید بطوریکه کاملاً درون محیط قرار گیرد . قسمت انتهای سوآب را بشکنید تا درب لوله کاملاً بسته شود . لوله را در طی حمل به آزمایشگاه مقصد در دمای اتاق نگهدارید . به محض دریافت لوله ی کری بلر حاوی سوآب ، نمونه را با همان سوآب روی پلیت های مربوطه انتقال دهید . برای ادامه ی کار به دستورالعمل مربوط به کشت مدفوع و ویبریو کلرا مراجعه کنید .

KIA

عنوان : تست تخمیر قند در محیط KIA

هدف : بررسی توانائی باکتری در تخمیر قند لاکتوز

اساس آزمایش : واکنش تخمیر قند با تولید اسید وتغییر رنگ معرف PHمحیط (فنل رد) از قرمز به زرد مشخص میشود .

محیط KIAدارای دو قند گلوکز و لاکتوز می باشد .از اینرو جهت شناسائی باکتری های لاکتوز منفی مورد استفاده قرار می گیرد .

لازم به ذکر است میزان قند گلوکز در محیط یک دهم قند لاکتوز میباشد .

ازآنجائیکه خانواده ی انتروباکتریاسه همگی قدرت تخمیر قند گلوکز را دارند و واکنش تخمیردرغیاب اکسیژن صورت میگیرد، بنابراین عمق محیط همیشه زرد رنگ دیده میشود . با مشاهده ی عمق قرمز رنگ در محیط ، مشخص می شود باکتری مورد بررسی غیر تخمیری است.اگر باکتری قادر به استفاده از قند لاکتوزباشد تولید اسید درمحیط ادامه می یابد و سطح وعمق لوله به رنگ زرد دیده میشود .

ولی اگر باکتری به اصطلاح لاکتوزمنفی باشد، شروع به استفاده از پپتون محیط می کند . مصرف پپتون نیاز به اکسیژن داشته پس فقط در سطح محیط انجام میشود . محصول واکنش قلیائی بوده وایجاد PH قلیائی با تغییررنگ سطح محیط از زرد به قرمز مشخص می شود .

در حالیکه عمق لوله همچنان بدلیل فقدان اکسیژن ، شرایط اسیدی (رنگ زرد) خود را حفظ کرده است .

موارد کاربرد : تشخیص پاتوژن های لاکتوز منفی روده ای .

کنترل کیفی قبل و حین انجام کار :

هر بار بعد از ساختن محیط کشت آنرا با کنترل مثبت و منفی چک کنید .

کنترل لاکتوز مثبت (عمق زرد / سطح زرد) Escherichia coli ATCC® 25922

کنترل لاکتوز منفی (عمق زرد / سطح قرمز) Shigella flexneri ATCC® 12022

کنترل غیر تخمیری(عمق قرمز/ سطح قرمز)

Pseudomonas aeruginosa ATCC® 27853

کنترل لاکتوزمنفی SH2 مثبت (عمق سیاه/ سطح قرمز)

Proteus vulgaris ATCC® 8427

مراحل اجرائی کار :

با استفاده از یک آنس استریل از کلنی خالص باکتری در عمق و سطح محیط KIA کشت دهید .سپس لوله را به مدت 18-24 ساعت در دمای 35±2ºc انکوبه کنید . اگر باکتری قادر به مصرف لاکتوز باشد واکنش بصورت عمق و سطح اسیدی (A / A) مشاهده میشود ودر صورتی که باکتری لاکتوز منفی باشد واکنش بصورت عمق اسیدی و سطح قلیائی (K / A) مشاهده می شود و اگر باکتری نان فرمنتر باشد فقط رشد در سطح لوله مشاهده میشود ورنگ لوله در عمق وسطح قرمز(K / K) خواهد بود .

مشخصات عملکردی آزمایش،محدودیت ها وعوامل مداخله گر در آزمایش :

- درب لوله باید شل بسته شود تا برای استفاده از پپتون، اکسیژن در اختیار باکتری قرار گیرد و شرایط قلیائی ظاهر شود. در صورت محکم بسته شدن درب لوله ، یک واکنش اسیدی که فقط با تخمیر گلوکز ایجاد شده است ، سطح شیبدار را نیز در بر خواهد گرفت .
- محیط عمق مناسبی برای ایجاد شرایط بیهوازی جهت تخمیر قند ها داشته باشد . درعمق کم یا نامناسب تخمیرانجام نمی گیرد .(نان فرمنتر کاذب)
- جهت حفظ شرایط بی هوازی در هنگام کشت ،آنس را کاملاً از وسط محیط وارد کنید وتلقیح را حتماً تا انتهای لوله ادامه دهید .
- تفسیر تست حداکثر در مدت 24 ساعت انجام شود . در غیر اینصورت احتمال تغییر رنگ سطح در اثر مصرف پپتون وجود دارد (لاکتوز منفی کاذب)
- به علت وجود سدیم تیو سولفات بعنوان منبع سولفور در محیط TSI، امکان بررسی تولید SH2نیز وجود دارد تولید SH_2 بصورت ایجاد رنگ سیاه در تمام عمق یا تشکیل حلقه سیاه در نزدیکی عمق دیده می شود .

- تولید گاز در اثر تخمیر بصورت ایجاد حباب یا پارگی و جابجا شدگی در محیط قابل مشاهده است .
- عمق لوله با تخمیر گلوکز اسیدی می شود و در صورت تولید SH_2 ، سیاه شدن از ته لوله آغاز می شود . بنابراین اگر عمق لوله سیاه است باید آنرا اسیدی در نظر گرفت .
- سولفات فروس بعنوان معرف SH_2 گاهی دارای حساسیت کمتری نسبت به سایر نمک های فریک میباشد . بنابراین ممکن است در ایجاد سولفید هیدروژن در محیط TSI و KIA یا سایر محیط های کشت مثل SIMمغایرت هائی دیده شود .
- بعضی از ارگانیسم ها ممکن است تولید سولفید هیدروژن را روی KIA نشان دهند ، اما روی TSI نشان ندهند ، چون استفاده از سوکروز در TSI Agar مکانیسم آنزیمی را که در تولید SH_2 اثر می گذارد مهار می کند . بویژه سالمونلای تولید کننده ی SH_2 و بعضی از اعضاء انتروباکتریاسه نمی توانند روی TSI Agarسولفید هیدروژن تولید کنند .

SF Media

عنوان : کشت در سلنیت براث SF

هدف : غنی سازی بعضی از پاتوژن های روده ای

اساس آزمایش : محیط SF از جمله محیط های غنی کننده میباشد. بدین معنی که باعث تقویت رشد و تکثیر باکتری مورد نظردرنمونه که معمولاً به تعداد کم وجود دارد، میشود واز طرفی از رشد و تکثیر باکتری های ناخواسته و فلور نرمال جلوگیری میکند . البته خاصیت غنی کنندگی محیط در یک محدوده ی زمانی خاص (8-12 hrs)معنی پیدا میکند و در زمانهای طولانی تر باکتری های فلور نرمال شروع به رشد و تکثیر خواهند کرد . بنابراین کشت مجدد از این محیط ها باید با رعایت زمان یاد شده انجام بگیرد .

موارد کاربرد : غنی سازی پاتوژن های روده ای بخصوص سالمونلا در کشت مدفوع و برخی گونه های شیگلا

◄ **نحوه ی ساخت محیط کشت SF :**

◘ طبق دستور شرکت سازنده ی پودر محیط کشت که بر روی ظرف مربوطه درج شده است و با توجه به میزان مورد نیاز آزمایشگاه محیط کشت را بسازید .

◘ محیط کشت را درون لوله های آزمایش تقسیم کنید . هر لوله باید حاوی 5cc براث باشد . این محیط نیازی به اتوکلاو کردن ندارد .

کنترل کیفی قبل و حین انجام کار :

بعد از ساخت محیط باکتری های زیر را در آن کشت دهید و بعد از 12-8 ساعت از روی محیط SF به روی مکانکی آگار کشت مجدد انجام دهید .

کنترل مثبت (رشد متوسط تا زیاد با کلنی های بی رنگ)

Salmonella typhimurium ATCC ® 14028

کنترل منفی (مهار جزئی تا کامل رشد)

Escherichia coli ATCC ® 25922

مراحل اجرائی کار :

مقدار یک الی دو گرم مدفوع را در محیط سلنیت براث حل کنید . لوله ها را در دمای 35- 37ºC انکوبه کنید . بعد از 8-12 ساعت روی محیط افتراقی و انتخابی مناسب مثل XLD ساب کالچررا انجام دهید . انجام کشت ایزوله روی پلیت در جداسازی بهتر پاتوژن ها کمک کننده است .

مشخصات عملکردی آزمایش،محدودیت ها وعوامل مداخله گر در آزمایش :

♠ محیط SF برای غنی سازی سالمونلا بسیار مناسب است ولی بر روی شیگلا اثر مهاری دارد . لذا احتمال جدا شدن شیگلا از پلیت مرحله ی اول کشت مدفوع بیشتر از پلیت ساب کالچرمیباشد . بهتر است جهت غنی سازی شیگلا از محیط GN Broth استفاده شود .

♠ بعد از انتقال نمونه به محیط سلنیت براث و حل کردن آن بهتر است سوآپ را از محیط خارج نمائید .

♠ در هنگام انجام کشت مجدد از تکان دادن محیط خودداری کرده و جهت برداشت نمونه از سطح محیط اقدام کنید .این کار بدلیل تمایل قرار گرفتن سالمونلا در سطح براث ، به جداسازی باکتری کمک میکند .

EMB

عنوان : کشت در EMB

هدف : جداسازی باسیل های گرم منفی

اساس آزمایش : محیط کشت EMB یک محیط افتراقی و انتخابی میباشد .رنگهای ائوزین بعنوان معرف PH و متیلن بلو مانع رشد باکتری های گرم مثبت شده و بعنوان عامل انتخابی در محیط عمل می کنند .دو قند لاکتوزوسوکروزدرمحیط وجود دارد و بدین ترتیب باکتری ها بر اساس تخمیر لاکتوز از هم تفریق می شوند . کاهش PH محیط در اثر تخمیر قند ها باعث رسوب رنگ در محیط میشود . اگر کاهش PH در اثر رشد باکتری هائی مثل اشریشیا کلای باشد بعلت مسیر انتخابی باکتری در تخمیر قند ها کولونی های آبی – سیاه در محیط ایجاد میکنند و علاوه بر این بعلت کاهش شدید PHرسوب رنگ با ایجاد جلای سبز فلزی در محیط ، قابل مشاهده است . سایر باکتری های لاکتوز مثبت ایجاد رنگ صورتی در محیط می کنند . لاکتوز منفی ها کلنی های بی رنگ ایجاد میکنند .

موارد کاربرد: جداسازی پاتوژن های روده ای از کشت مدفوع ، جداسازی باسیل های گرم منفی عامل عفونت ادراری و ....

کنترل کیفی قبل و حین انجام کار:

از باکتری های زیر جهت کنترل کیفی محیط کشت استفاده کنید :

کنترل لاکتوز مثبت (کلنی های آبی – سیاه با جلای فلزی)

Escherichia coli ATCC® 25922

کنترل لاکتوز منفی (کلنی های بیرنگ تا کهربائی)

Salmonella typhimurium ATCC® 14028

MaCCankey Agar

عنوان : کشت در MacConkey Agar

هدف : جداسازی باسیل های گرم منفی از روی تخمیر لاکتوز

اساس آزمایش : محیط مک کانکی یک محیط انتخابی و افتراقی است . اما در مقایسه با سایر محیط های انتخابی به علت پائین بودن غلظت نمک های صفراوی خاصیت انتخابی آن ضعیف است .علاوه بر نمک صفراوی محیط دارای کریستال ویوله نیز میباشد . بدین ترتیب از رشد باکتری های گرم مثبت جلوگیری میشود. وجود قند لاکتوز باعث افتراق باکتری های لاکتوزمثبت و منفی میشود . محیط کشت حاوی دو قند گلوکز و لاکتوز میباشد . باکتری های لاکتوز مثبت با تخمیر قند لاکتوزوایجاد اسید باعث رسوب نمک های صفراوی میشوند و معرف PH محیط نوترال رد است. واکنش مصرف قند لاکتوز را با ایجاد کلنی های صورتی پررنگ در محیط میتوان مشاهده کرد . باکتری های لاکتوز منفی ایجاد کلنی های بی رنگ در محیط می کنند .

اگر یک باسیل گرم منفی روی بلاد آگار رشد کند اما روی مکانکی آگار رشد نکند یا بطور ضعیف رشد کند ، مشکوک به گروه نان فرمنترها است .

موارد کاربرد : جدا سازی کولی فرم ها و پاتوژن های روده ای در کشت مدفوع، جداسازی باسیل های گرم منفی از کشت ادرار

◄نحوه ی ساخت محیط کشت Mac :

¤ طبق دستور شرکت سازنده ی پودر محیط کشت که بر روی ظرف مربوطه درج شده است و با توجه به میزان مورد نیازآزمایشگاه محیط کشت را بسازید .

¤ بعد از پایان اتوکلاو محیط را در پلیت استریل تقسیم کنید .

کنترل کیفی قبل و حین انجام کار:

بعد از ساخت محیط کشت جهت کنترل کیفی از سویه های زیر استفاده کنید :

کنترل لاکتوز مثبت (کلنی های صورتی تا قرمز)

Escherichia coli ATCC® 25922

کنترل لاکتوز منفی (کلنی های بی رنگ) و مهار سوآرمینگ

Proteus mirabilis ATCC®12453

مراحل اجرائی کار : مقداری از نمونه ی مدفوع را بطور مستقیم و یا بعد از غنی شدن به پلیت مک کانکی انتقال دهید . با تکنیک Streaking نمونه را در تمام سطح پلیت پخش کنید . سایر نمونه ها را طبق روش مربوطه کشت دهید . پلیت را دردمای 35±2ºc به مدت 24-18 ساعت انکوبه کنید . در صورت منفی بودن کشت، انکوباسیون رایک روز دیگر ادامه دهید . براساس نوع نمونه ی کشت داده شده، روی کولونی های مشکوک اقدامات بعدی را انجام دهید .

مشخصات عملکردی آزمایش،محدودیت ها وعوامل مداخله گر در آزمایش :

برخی ازانتروباکتریاسه و سودوموناس آئروژینوزا وقتی در محیط دارای CO_2 انکوبه شوند ، رشدشان روی این محیط مهار می شود .

انکوباسیون پلیت در دمای اتاق جداسازی یرسینیا انتروکولیتیکا را افزایش میدهد .

پلیت ها را بیش از 48 ساعت انکوبه نکنید زیرا در تفسیر نتایج اشکال پیش می آید .

Oxidation / Fermentation (OF)

عنوان : تست اکسیداسیون و تخمیر Oxidation / Fermentation (OF)

هدف : بررسی توانائی باکتری در مصرف قند ها بصورت اکسیداتیو و فرمنتاتیو

اساس آزمایش: در صورت مصرف قند توسط باکتری اسید تولید میشود . ایجاد اسید با تغییر رنگ اندیکاتورPH محیط (برم تیمول بلو) از سبز به زرد مشخص میشود . در این میان باکتری های بیهوازی اختیاری(فرمنتر) در شرایط فقدان اکسیژن در محیط نیز قادر به تخمیر قند و ایجاد اسید هستند در حالیکه باکتری های نان فرمنتر برای استفاده از قند باید اکسیژن در اختیار داشته باشند . باکتریهای نان ساکارولیتیک نیز به شرط حضور اکسیژن از پپتون محیط استفاده کرده و با ایجاد PH قلیا ئی رنگ محیط را آبی می کنند. میزان پپتون در محیط OFحدود یک پنجم گلوکز است وبدین ترتیب از مصرف پپتون توسط ارگانیسم اکسیداتیو و تولید یک واکنش قلیائی (که اسیدیته ی ناچیز تولید شده توسط ارگانیسم هوازی را خنثی میکند) جلوگیری خواهد شد .

موارد **کاربرد:** جدا سازی خانواده ی انتروباکتریاسه از باکتریهای غیر تخمیری و جنس استافیلوکوک از میکروکوک

◄ **روش استریل کردن پارافین مایع :**

پارافین مایع را درون شیشه های درب دار کوچک بریزید تا جائیکه ارتفاع مایع بیش از یک سانتی متر نشود شیشه ها را درون فور به مدت 2 ساعت در دمای 160ºc قرار دهید تا استریل شوند .

◄ **نحوه ی ساخت محیط کشت OF با قند گلوکز :**

طبق دستور شرکت سازنده ی پودر محیط کشت که بر روی ظرف مربوطه درج شده است و با توجه به میزان مورد نیاز آزمایشگاه ، محیط کشت پایه را بسازید .

در ازای 100ccمحیط پایه مقدار یک گرم از قند گلوکز را توزین کنید . بهتر است قند گلوکز را ابتدا در مقداری از آب مقطر مورد نیاز حل کنید و محیط پایه را در بقیه آب مقطر بسازید و بعد از خنک شدن محیط پایه، محلول قند را به آن افزوده و خوب مخلوط کنید .

سپس محیط را درون لوله ها تقسیم کرده و اتوکلاو کنید .

برای ساخت محیط OF با سایر قند ها باید بعد از استریل شدن و خنک شدن محیط پایه، محلول قند مورد نظر را به کمک فیلتر استریل به محیط پایه افزوده و سپس در لوله های استریل تقسیم کنید .

کنترل کیفی قبل و حین انجام کار :

محیط کشت را بعد از هر بار ساختن با کنترل مثبت و منفی چک کنید .

کنترل فرمنتاتیو (هر دو لوله زرد) Enterobacter aerogenes ATCC 13048 ®

کنترل اکسیداتیو (فقط لوله هوازی زرد) Pseudomonas aerogenes ATCC 27853

کنترل نان ساکارولیتیک(لوله هوازی آبی یا سبز) Alcaligenes faecalis ATCC 8750

- **مراحل اجرائی کار:**

با یک لوپ استریل مقداری از کشت خالص باکتری را درون دو لوله از محیط کشت OF با قند مشخص انتقال دهید . بهتر است تلقیح چند بار انجام شود. سپس روی یکی از لوله ها را تا ارتفاع یک سانتی متر با پارافین مایع استریل بپوشانید . لوله ها را در دمای 37ºc به مدت 4 روز انکوبه کنید . هر روز لوله ها را از نظر تولید اسید بررسی کنید . ایجاد رنگ زرد در هر دو لوله بمعنی بیهوازی اختیاری بودن باکتری می باشد .اگررنگ زرد فقط در لوله ی هوازی مشاهده شود ، یعنی باکتری غیر تخمیری می باشد . درصورت مشاهده ی رنگ آبی در لوله ی هوازی وجود یک باکتری نان ساکارولیتیک تأیید می شود .

مشخصات عملکردی آزمایش،محدودیت ها وعوامل مداخله گر در آزمایش :

- وجود غلظت بالائی از کربوهیدرات در محیط ، از بروز واکنش منفی کاذب که در اثر مصرف پپتون محیط توسط ارگانیسم اکسیداتیو بوجود می آید ، جلوگیری می کند .
- برخی از باکتری های سخت رشد در محیط OF به راحتی رشد نمیکنند و نیاز به انکوباسیون یک هفته ای دارند .
- دی پتاسیم فسفات ظرفیت بافری محیط را افزایش میدهد و تولید اندک اسید نیز مشخص میشود .
- وجود آگار کمتربه انتشار اسید تولیدی درمحیط کمک میکندو همچنین حرکت باکتری را نیز میتوان تعیین کرد .

آنتي بيوگرام يا تست تعيين حساسيت باكتري نسبت به مواد ضد ميكربي

آنتی بیوگرام به روش Disk Diffusionبراساس انتشار آنتی بیوتیک در آگار پایه ریز شده است و به نام روش Kirby- Bauerنیز نامیده می شود . در این آزمایش از دیسکهای کاغذ صافی که به مقدار مناسب و مشخصی از آنتی بیوتیک آغشته هستند استفاده میشود .
محیط کشت مورد استفاده مولر هینتون آگار است که نسبت به سایرمحیط ها حداقل اثر مهار کنندگی را بر روی دیسک ها داشته وبرای باکتریهای آسان رشد مثل استافیلوکک ،انتروکک ، انتروباکتریاسه و نان فرمنترها مناسب است .
برای باکتری های سخت رشد مثل هموفیلوس، نیسریا و استرپتوکک ها و... باید از محیط های اختصاصی استفاده شود ویا مکمل هائی مثل 5% خون گوسفند و..... به محیط اضافه شود .
از آنجائیکه حداقل قطر ناحیه ممانعت از رشد باکتری برای دیسک های مختلف متفاوت است لذا برای تعیین اینکه باکتری نسبت به یک آنتی بیوتیک حساس ، میانه یا مقاوم است ،قطر هاله ی عدم رشد اندازه گیری میشود وبا قطرهاله ی تفسیر شده در جداول CLSI مقایسه میشود .
موارد کاربرد : راهنما ئی پزشک برای انتخاب داروی مناسب جهت درمان و مطالعات اپیدمیولوژیک در هنگام پیدایش مقاومت های داروئی .

اقدامات وابسته:

۱. دانستن تاثیرات متقابل یا Cross Reaction ها بر روی تست .

۲. آشنایی با اصول کنترل کیفی و حدود مجاز طرح کیفیت در این آزمایشگاه و آگاهی از تفسیر نتایج حاصله از کنترل کیفی .

۳. آشنایی با اپراتوری تجهیزات لازمه برای انجام تست از قبیل آنس ، اتو ، لوپ و ...

۴. آشنایی با روشهای سترون سازی و دانستن مکان و حساسیت کار در آزمایشگاه میکروب شناسی .

۵. آگاهی کامل نسبت به اصول ایمنی و کارکرد در آزمایشگاه و نیز دستورالعملهای دفع پسماند .

۶. آگاهی از دقت ادوات و تجهیزات مورد نیاز ، چراکه تجهیزاتی که دقت لازمه را نداشته باشند قابل کالیبر و کنترل صحت نمیباشند .

نحوه ی آماده سازی دیسک ها :

دیسکهای آنتی بیوگرام مورد نیاز را یک ساعت قبل از آزمایش از یخچال یا فریز خارج کنید تا به دمای اتاق برسند .

◄ **روش تهیه استاندارد نیم مک فارلند :**

ابتدا 1.175گرم از پودر کلرور باریوم دو آبه را با آب مقطر به حجم 100cc برسانید .سپس 1cc اسید سولفوریک غلیظ را با آب مقطر به حجم 100cc برسانید . 10cc از اسید سولفوریک 1% را درون لوله بریزید وبا استفاده ازسمپلر ، 50میکرولیتر از اسید را از لوله خارج کنید . سپس 50 میکرولیتر ازمحلول کلرور باریوم به لوله اضافه کنید. جذب نوری محلول رابا استفاده از اسپکتروفتومتر کالیبر و کووت با قطر یک سانتی متری اندازه بگیرید. جذب نوری محلول در طول موج 620nm باید در محدوده ی 0.13 – 0.08 باشد .

محلول را در لوله هائی هم قطر با لوله هائیکه جهت تهیه سوسپانسیون میکروبی استفاده می کنید، تقسیم نموده وبا قید تاریخ ساخت، آنرا در تاریکی ودر دمای اتاق نگهداری کنید .

در این شرایط محلول تا 6 ماه پایدار است اما باید هر ماه جذب نوری آن کنترل شود .

کدورت استاندارد نیم مک فارلند معادل $1\text{-}1.5.10^{8}CFU/ml$ باکتری میباشد. قبل از استفاده از استاندارد مک فارلند آنرا با ورتکس به شدت تکان دهید و درصورت مشاهده ی ذرات درشت از آن استفاده نکنید .

کنترل کیفی قبل و حین انجام کار :

◄ کنترل کیفی نیم مک فارلند : هر ماه جذب نوری محلول را اندازه گیری کنید .

در هر ران کاری قبل از استفاده محلول را به شدت تکان دهید و سپس ظاهر سوسپانسیون را از نظر وجود ذرات معلق و نا محلول بررسی کنید .

◄ کنترل کیفی محیط کشت مولر هینتون آگاراز نظر میزان تایمین و تایمیدین یکبار برای هر Lot . no جدید :

دیسک کوتریموکسازول و Enterococcus faecalis ATCC® 33186

ایجاد قطر هاله ی عدم رشد ≥20 قابل قبول است .

◄ کنترل کیفی محیط کشت مولر هینتون آگاراز نظر میزان یون های Ca و Mg یکبار برای هر Lot . no جدید : یک دیسک از آمینوگلیکوزیدها و Pseudomonas aeruginosa ATCC ® 27853

◄ کنترل کیفی دیسک ها برای هر Lot . no جدید :

♠ در صورت استفاده از محیط مولر هینتون آگار Staphylococcus aureus ATCC® 25923

Escherichia coli ATCC ® 25922

ATCC® 27853 Pseudomonas aeruginosa

(جهت تفسیر نتایج به جداول CLSI Document M100-S16 مراجعه کنید)

♠ در صورت استفاده از محیط مولر هینتون بلاد آگار Staphylococcus pneumoniae ATCC® 6303

♠ در صورت استفاده از محیط مولر هینتون چاکلت آگار Haemophilus influenzae ATCC ® 10211

مراحل اجرائی کار :

◄ **<u>تهیه سوسپانسیون میکروبی با غلظت استاندارد</u> :**

♠ **Direct method :**

به کمک یک لوپ یا سوآپ استریل مقداری از کشت خالص باکتری را درون لوله ی حاوی سرم فیزیولوژی استریل انتقال دهید.

لوله را با دست یا به کمک ورتکس به شدت تکان دهید تا سوسپانسیون کاملاً یکنواختی به دست آید . کدورت سوسپانسیون را با کدورت استاندارد نیم مک فارلند مقایسه کنید برای این کار لوله ها را در مقابل صفحه ای با خطوط سیاه رنگ بگیرید . میتوانید با افزودن باکتری یا سرم فیزیولوژی به لوله کدورت آنرا تنظیم کنید. بعد از تهیه ی سوسپانسیون فقط 15 دقیقه فرصت دارید تا آنرا به محیط کشت انتقال دهید . این روش بعلت هزینه ی کمتر و سرعت مناسب بیشتر در آزمایشگاه ها استفاده می شود .

اگر کلنی باکتری در سرم فیزیولوژی حل نشود یا کشت باکتری کهنه باشد و یا مقدار کمی از باکتری در اختیار داشته باشید بهتر است از روش Growth method جهت تهیه سوسپانسیون میکروبی استفاده کنید . روش مذکور نسبت به روش مستقیم از صحت بالاتری برخوردار است زیرا کدورت ایجاد شده فقط مربوط به باکتری های زنده میباشد اما بدلیل زمانبر بودن و هزینه ی بیشتربصورت روتین درآزمایشگاه اجرا نمی شود .

♠ **Growth method :**

مقداری از کلنی باکتری را به درون لوله ی حاوی محیط کشت TSB انتقال دهید . لوله را تکان دهید تا باکتری در براث حل شود . سپس لوله را به مدت 6-2 ساعت در انکوباتور قرار داده و هر ساعت کدورت آنرا با کدورت استاندارد مقایسه کنید . بعد از مطابقت کدورت سوسپانسیون میکروبی با استاندارد مک فارلند بلا فاصله آنرا روی محیط کشت MHA انتقال دهید .

◄ **<u>انتقال باکتری روی محیط کشت</u> :**

سوآپ استریل را به سوسپانسیون میکروبی استاندارد آغشته کنید . با فشردن سوآپ به جدار لوله ،رطوبت اضافی آنرا بگیرید . سوآپ را در سه جهت با زاویه 60 درجه روی محیط کشت حرکت دهید . در پایان یکبار سوآپ را به دور حاشیه پلیت بکشید . سوآپ را روی شعله بگیرید و سپس درون ماده ی ضد عفونی کننده اوت کنید .اجازه دهید رطوبت حاصل از تلقیح باکتری جذب محیط شود . از این به بعد 15 دقیقه فرصت دارید تا دیسک گذاری را انجام دهید .

◄ **<u>دیسک گذاری</u> :**

با توجه به نوع باکتری جداشده ، محل عفونت و شرایط بیمار(سن، شرایط فیزیولوژیک و ....) و نیزبا توجه به تفاوت عملکرد داروها در شرایط Invivoو Invitro ، دیسک های مرتبط را انتخاب کنید .

به کمک پنس استریل و با رعایت فاصله ی مناسب ، دیسک ها را روی محیط مولر هینتون تلقیح شده قرار دهید کمی با پنس روی دیسکها فشار دهید تا در جای خود ثابت بمانند .

پلیت را دردمای 35º C حد اکثر به مدت 16-18 ساعت انکوبه کنید . سپس قطر هاله ی عدم رشد را با خط کش و بر حسب میلی متر اندازه بگیرید و پس از مقایسه ی آنها با جداول CLSI نتایج را به صورت حساس، میانه و مقاوم گزارش کنید .

مشخصات عملکردی آزمایش،محدودیت ها وعوامل مداخله گر در آزمایش :

♣تست حساسیت داروئی برای باکتری هائی با الگوی حساسیت نامشخص انجام میگیرد .بنا براین برای باکتری هائی مثل استرپتوکک پیوژن و آگالاکتیه که تا به حال مقاومتی از آنها نسبت به پنی سیلین گزارش نشده است، آنتی بیوگرام انجام نمیگیرد .

♣ درهنگام آنتی بیوگرام باکتری هموفیلوس آنفلوآنزا، پنوموکک، و گنوکک ; باکتری را بطور مستقیم و بدون تهیه سوسپانسیون میکروبی به محیط کشت مربوطه انتقال دهید وبعد از دیسک گذاری پلیت را در مجاورت 5%CO2 به مدت 20-24 hrs در 35ºc قرار دهید .

زمان انکوباسیون در مورد هموفیلوس آنفلوآنزا کوتاهتر است(16-18 hrs) .

♣ اگر پنوموکک از مایعات استریل جدا شود آنتی بیوگرام باید به روش MICانجام شود .

♣ برای آنتی بیوگرام پنوموکک بدست آمده از CSF به روش MIC از آنتی بیوتیک های پنی سیلین ،سفوتاکسیم یا مروپنم یا سفتریاکسون استفاده کنید . استثناً ونکومایسین را میتوانید به هر دو روش تعیین حساسیت کنید .

♣ در صورت جدا شدن باکتری های بی هوازی آنتی بیوگرام باید به روش MIC انجام شود

♣در مورد پروتئوس ها ،حلقه ی اول ممانعت از رشد را حساب کنید ودر صورت مشاهده ی سوآرمینگ در هاله ی عدم رشد از آن چشم پوشی کنید .

♣در صورت مشاهده ی کلنی های ریز در هاله ی عدم رشد(حساس) سولفونامید ها و کوتریموکسازول از آنها چشم پوشی کنید و آنها را حساس گزارش کنید .

♣ در صورت مشاهده ی کولونی های درشت در هاله ی عدم رشد احتمال خالص نبودن باکتری وجود دارد . در چنین مواقعی کلنی های مذکور را مورد آزمایش قرار دهید .اگر نتیجه ی بررسی شما با باکتری مورد نظر مغایرت نداشت دیسک مربوطه را مقاوم گزارش کنید ودر صورت وجود مغایرت تکرار آزمایش با باکتری خالص الزامی میباشد .

♣با توجه به اینکه دردرمان عفونت CSF از داروهای خوراکی استفاده نمی شود ضمن توجه به عدم استفاده از این دسته از دیسک ها در آنتی بیوگرام ، از نسل اول و دوم سفالوسپورین ها(به جز سفوروکسیم سدیم که یک داروی تزریقی است)، کلیندامایسین، ماکرولیدها، تتراسایکلین و فلوروکینولونها نیز استفاده نکنید .

♣ در آنتی بیوگرام سالمونلا و شیگلا ازدیسکهای آمینوگلیکوزید ، نسل اول و دوم سفالوسپورین ها وسفامایسین استفاده نکنید . حتی اگر به اشتباه در پانل آنتی بیوگرام قرار گرفتند و حساس بودند نیز مجاز به گزارش نتیجه نمی باشید .

♣ در صورت جدا شدن انتروباکتریاسه از ادرار به هیچ وجه از دیسک کلرامفنیکل و اریترومایسین استفاده نکنید .

♣ در صورتیکه ثابت شود باکتری بدست آمده جزء باکتریهای تولید کننده ی ESBLs(کلبسیلا اکسی توکا و نومونیه، اشریشیا کولای وپروتئوس میرابیلیس)باشد باید نسبت به پنی سیلین ها سفالوسپورین ها و آزترونم مقاوم گزارش شود .

♣ در آنتی بیوگرام انتروکک از دیسک های آمینوگلیکوزید (به جز دوزهای بالای آن) سفالوسپورین ها ، کلیندامایسین و SXT استفاده نکنید و آنها را حساس گزارش نکنید .

- اگر استافیلوکک به پنی سیلین مقاوم وبه اگزاسیلین حساس باشد بدین معنی است که باکتری فقط به پنی سیلین های ناپایداردر مقابل بتالاکتاماز مقاوم است ولی اگر به اگزاسیلین هم مقاومت نشان دهد به این معنی است که به تمام گروه بتالاکتام مقاوم است . (MRSA)
- میتوانید از دیسک سفوکسی تین برای شناسائی MRSAاستفاده کنید ولی حساسیت یا مقاومت باید نسبت به اگزاسیلین گزارش شود .
- هنگام بررسیMRSA (MRS) دمای انکوباتور نباید از 35ºC بالاتر رود وانکوباسیون باید تا 24 ساعت ادامه یابد .

◄ **نکاتی در مورد مقدار باکتری تلقیحی :**

♣ لوله ای که برای تهیه ی سوسپانسیون میکروبی انتخاب میشود باید از نظر قطر همانند لوله ی حاوی استاندارد نیم مک فارلند باشد .

♣ در صورت استفاده از یک سوسپانسیون میکروبی بیش از حد متراکم ، قطر هاله ی عدم رشد بطور کاذب کوچکتر میشود و سوسپانسیون بیش از حد رقیق نیز باعث بزرگتر شدن کاذب قطر هاله ی عدم رشد خواهد شد .

♣ در صورت عدم استفاده از استاندارد مک فارلند و تلقیح مستقیم باکتری روی محیط MHA در مورد دیسک های GM و FMمقاومت مشاهده می شود .

◄ **نکاتی در مورد محیط کشت :**

♣ محیط MHAرا پس از ساخت و انتقال به یخچال در عرض یک هفته استفاده کنید . می توانید با قرار دادن پلیت ها در پوشش پلاستیکی این زمان راتا یک ماه افزایش دهید .
♣ سطح پلیت باید عاری از قطرات آب باشد زیرا آب باعث خروج سریع آنتی بیوتیک از دیسک می شود . لذا اگر بلافاصله بعد از ساخت محیط کشت مجبور به استفاده از آن هستید میتوانیدآنرا به مدت 30-20 دقیقه در انکوباتور قرار دهید تا رطوبت اضافی تبخیر شود . همچنین میتوان پلیت را زیر هود قرار داد تا جریان هوا سطح پلیت را خشک کند .
♣ محیط کشت باید یکنواخت وبا عمق 4mm باشد . در صورت استفاده از محیط با عمق بیشتر ، قطر هاله ی عدم رشد بطور کاذب کوچکتر خواهد شد و در محیط با عمق کمتر ، قطر هاله عدم رشد بطور کاذب بزرگتر خواهد شد .
♣ بالا بودن سطح مهار کننده های تایمین و تایمیدین در محیط باعث کوچکتر شدن هاله ی عدم رشد در دیسک sxt میشود

♣ میزان کاتیون های دو ظرفیتی منیزیوم و کلسیم در محیط کشت ، روی نفوذ پذیری سل وال باکتری نسبت به آنتی بیوتیک موثر است. به این ترتیب که در صورت وجود مقدار زیاد آنها در محیط کشت، باکتری سودوموناس آئروژینوزا در مجاورت دیسک های آمینوگلیکوزید و تتراسایکلین زون حساسیت کوچکتری نشان میدهد و برعکس .

توجه داشته باشید که وجود این کاتیونها در حد فیزیولوژیک در محیط کشت ضروری میباشد

♣ جهت کنترل استریل بودن حدود 5%از محیط های ساخته شده را در انکوباتور 37ºc قرار دهید .

♣ PHمحیط کشت باید بین 7.4 - 7.2 باشد .بعضی از آنتی بیوتیک ها در PH اسیدی فعالیت خود را ازدست میدهند مثل آمینوگلیکوزید ها، کینولون ها و ماکرولید ها که هاله ی ایجاد شده کوچکتر خواهد بود وبعضی هم مثل تتراسایکلین و نووبیوسین و متی سیلین فعالتر شده وهاله ی آنها بزرگتر میشود .در PH قلیائی عکس موارد فوق اتفاق می افتد .

♣ فاصله ی زمانی میان تلقیح باکتری روی محیط کشت و دیسک گذاری نباید از 15 دقیقه بیشتر شود زیرابا گذشت زمان باکتری ها شروع به تکثیر در محیط خواهند کرد و مقاومت کاذب نشان خواهند داد .

♣ انتشار آنتی بیوتیک از دیسکها به محض قرار گرفتن روی محیط کشت ،آغاز میشود. لذا بعد از دیسک گذاری آنها را از محل خود جابجا نکنید زیرا کاهش غلظت دیسک منجر به ایجاد مقاومت کاذب خواهد شد .

♣ تعداد دیسک ها باید با قطر پلیت متناسب باشد. برای پلیتی با قطر 9cmحداکثر 7دیسک ودر پلیت 15 سانتی متری بیشتر از 12 دیسک قرار ندهید .

♣ دیسک ها از لبه ی پلیت 15mm وازدیسک مرکزی پلیت واز همدیگر 25mmفاصله داشته باش ند.

♣ برای سهولت قرائت نتیجه آنتی بیوگرام ،هنگام دیسک گذاری دیسک هائی با زون حساسیت وسیعتر را،کنار همدیگر قرار ندهید .

♣ بعد از پایان دیسک گذاری حد اکثر 30 دقیقه فرصت دارید تا پلیت را در انکوباتور قرار دهید .

♣ پلیت را هرگز در کندل جار قرار ندهید. CO_2باعث کاهش PHمحیط کشت شده ودر نتیجه فعالیت دیسک ها تحت تأثیر قرار خواهد گرفت .

♣ قرار دادن پلیت در دمای کمتراز 35ºcباعث کوچکتر شدن هاله ی عدم رشد خواهد شد .

♣ در صورت استفاده از محیط بلاد آگار احتمال باند شدن آنتی بیوتیک با پروتئین محیط وجود دارد مثلاً سفالوتین در این محیط ،مقاوم گزارش می شود .

◄ نکاتی در مورد دیسک ها ی آنتی بیوگرام :

♣ تمامی دیسک های گروه بتالاکتام باید در فریزر نگهداری شوند و فقط میتوان به اندازه ی مصرف یک هفته آنها را در دمای یخچال نگهداری کرد .
♣ بعضی از دیسک های گروه بتا لاکتام مثل ایمی پنم ، مروپنم ، سفاکلر و دیسک های حاوی کلاوولانیک اسید و سولباکتام بعلت شکنندگی زیاد بهتر است تا زمان مصرف در فریزر نگهداری شوند .
♣ رطوبت باعث خروج آنتی بیوتیک از دیسک ها میشود بنابراین باید آنها را در کنار مواد جاذب الرطوبه ی فعال و داخل ظروفی با در پوش محکم نگهداری کنید . ?
♣ دیسک های مورد استفاده باید از potencyمناسبی برخوردار باشند.استفاده ازدیسک های با قدرت کم هاله ی عدم رشد کوچکتری بوجود خواهد آورد و برعکس .
♣ استفاده از یکی از اعضاء یک گروه ضد میکروبی در آنتی بیوگرام کافی بوده و میتوان نتیجه را به سایر اعضاء تعمیم داد .
♣ 1-2 ساعت قبل از استفاده از دیسکها، آنها را از یخچال یا فریزر خارج کنید تا به دمای محیط برسند .
♣ به تاریخ مصرف دیسک ها توجه کنید، از دیسک های تاریخ گذشته استفاده نکنید .

◄ در انتخاب دیسک باید به مقاومت های داروئی باکتری، قیمت دارو ودر دسترس بودن آن و شرایط سنی و فیزیولوژیک بیمار نیز توجه کنید .

◄ در انتخاب دیسک باید علاوه بر نوع باکتری ، به محل بدست آمدن باکتری نیز توجه کرد به این ترتیب که :

♣ در صورت جدا شدن سالمونلا و شیگلا از کشت مدفوع فقط از دیسکهای آمپی سیلین ، کوتریموکسازول و یک کینولون استفاده کنید .

♣ در صورت جدا شدن سالمونلا ازکشت خارج از روده مثلاً خون علاوه بر دیسکهای فوق الذکر از کلرامفنیکل و یکی از دیسکهای نسل سوم سفالوسپورین ها نیز استفاده کنید .

♣ در صورت جدا شدن انتروباکتریاسه از نمونه از دیسک های آمپی سیلین ، سفازولین، آموکسی سیلین کلاوولانیک اسید یا آمپی سیلین سولباکتام ،جنتامایسین، ایمی پنم یا مروپنم، سیپروفلوکساسین ، سفپیم، تتراساکلین، کلرامفنیکل ، آمیکا سین، کوتریموکسازول ،سفوتاکسیم یا سفتریاکسون یاسفتی زوکسایم استفاده کنید.

◘ اگر انتروباکتریاسه از ادرارجدا شود ، ضمن حذف کلرامفنیکل از پانل آنتی بیوگرام فوق الذکر حتماً از نیتروفورانتوئین ، سیپروفلوکساسین یا افلوکساسین نیزاستفاده کنید .

♣ اگر سودوموناس از نمونه جدا شود از ایمی پنم یا مروپنم، جنتامایسین، پیپراسیلین، سیپروفلوکساسین یا لووفلوکساسین سفپیم، سفتازیدیم، کربنی سیلین و آمیکاسین استفاده کنید .
اگر نمونه ی مورد آزمایش ادرار بود افلوکساسین نیز به موارد فوق اضافه شود .

♣ اگر اسنیتوباکتر از نمونه جدا شود از سفتازیدیم، ایمی پنم یا مروپنم، آمیکا سین، جنتامایسین ،پیپراسیلین یا تیکارسیلین ، کوتریموکسازول، سیپروفلوکساسین، سفپیم، سفوتاکسیم یا سفتریاکسون استفاده کنید .

♣ برای باکتری بورخولدیا سپاسیا از دیسک های سفتازیدیم، مروپنم و کوتریموکسازول استفاده کنید .

♣ برای باکتری استنوتروفوموناس مالتوفیلیا از دیسک های لووفلوکساسین، مینوسایکلین و کوتریموکسازول استفاده کنید .

♣ اگر ویبریو کلرا از کشت مدفوع جدا شود از دیسک های آمپی سیلین، سیپروفلوکساسین ،کلرامفنیکل ،کوتریموکسازول ،فورازولیدون، تتراسایکلین ،اریترومایسین و نالیدیکسیک اسید استفاده کنید .

♣ اگر استرپتوکک (بغیر از پنوموکک) از نمونه جدا شود از دیسک های پنی سیلین یا اگزاسیلین، لینزولید ، ونکومایسین، اریترومایسین، کلرامفنیکل ،کلیندامایسین ،افلوکساسین، سفپیم، سفتریاکسون، سفوتاکسیم استفاده کنید .

♣ اگر پنوموکک از نمونه جدا شود از دیسک های پنی سیلین یا اگزاسیلین، لینزولید ،ونکومایسین، اریترومایسین، کلرامفنیکل، کوتریموکسازول، کلیندامایسین ،افلوکساسین و تتراساکلین استفاده شود .

♣ اگر انتروکک از نمونه جدا شود از دیسک های آمپی سیلین یا پنی سیلین، ونکومایسین، لینزولید، جنتامایسین، کلرامفنیکل و استرپتومایسین استفاده کنید اگرنمونه مورد آزمایش ادرار بود دیسک های نیتروفورانتوئین و سیپروفلوکساسین به موارد فوق اضافه شود . در صورت مشاهده ی زون حساسیت کمتر از 14mmنسبت به دیسک ونکومایسین احتمال اینکه باکتری جزء انتروکک های مقاوم به ونکومایسین باشد ، وجود دارد .

♣ در بررسی انتروکک مقاوم به ونکومایسین پلیت باید به مدت 24ساعت انکوبه شود .
♣ انتروکک مقاوم به ونکومایسین با دیسک های کلرامفنیکل، اریترومایسین، تتراسایکلین یاداکسی سایکلین یا مینومایسین و ریفامپین آنتی بیوگرام شود .
♣ اگر انتروکک از خون یا CSF جدا شود بهتر است از نظر تولید بتالاکتاماز مورد بررسی قرار گیرد .
♣ اگراستافیلوکک ازنمونه جدا شود از اگزاسیلین، پنی سیلین، کلیندامایسین، ونکومایسین، لینزولید، جنتامایسین، کلرامفنیکل ، سیپروفلوکساسین یا لووفلوکساسین، کوتریموکسازول، جنتامایسین و تتراسایکلین استفاده شود .
◘ اگر استافیلوکک از نمونه ادرارجدا شود،دیسک نیتروفورانتوئین را حتما به پانل فوق اضافه کنید .
♣ اگر بروسلا از نمونه جدا شود از دیسک های تتراسایکلین، استرپتومایسین، ریفامپین، جنتامایسین، کوتریموکسازول و سفتی زوکسیم استفاده کنید .
♣ اگر هموفیلوس آنفلوآنزا از نمونه جدا شود آنتی بیوگرام رابا دیسک های آمپی سیلین، کلرامفنیکل، مروپنم و یکی ازآنتی بیوتیک های نسل سوم سفالوسپورین ها روی محیط کشت اختصاصی HTM انجام دهید .

♣ اگر نایسریا گنوره آ از نمونه جدا شود، آنتی بیوگرام را با دیسک های آمپی سیلین ، پنی سیلین و ریفامپین در محیط کشت اختصاصی GC Agarانجام دهید .
♣ اگر نایسریا منتژایتیدیس از نمونه جدا شود باید به روش MIC آنتی بیوگرام شود .
♣ اگر ائروموناس از نمونه جدا شود باید به روش MIC آنتی بیوگرام شود .
♣ در بررسی ESBLsدر پانل آنتی بیوتیکی حداقل دو دیسک از سه دیسک سفتازیدیم، سفوتاکسیم ، سفپودوکسیم رااستفاده کنید در صورت مشاهده ی مقاومت یا زون حساسیت کاهش یافته و در تأیید تشخیص ESBLsاز دیسکهای فوق الذکر به همراه محافظ کلاوولانیک اسید استفاده کنید و در صورت مشاهده ی افزایش زون به اندازه ی 5 mm درحداقل یک دیسک حاوی کلاوولانیک اسید باکتری بعنوان ESBLs معرفی میشود .
♣ در صورت جدا شدن پروتئوس میرابیلیس از کشت خون آنرا از نظر ESBLsبررسی کنید .

تفسیر(علل تکرار،چگونگی ونحوه ی گزارش):

۱- هرگونه مواردی که سوپر وایزر و یا مسئول فنی آزمایشگاه تکرار آن را گوشزد می نماید.

۲- به هر دلیلی که تکرار اتفاق میافتد ،نتایج حاصله مربوط به قبل و بعد از تکرار آن نتیجه گزارش نهائی و نیز علت تکرار در فرم ثبت نتایج علل تکرار تست ها ثبت و مرقوم گردد .

۳- تکرار روی همان نمونه با علامت R1* و تکرار بر روی نمونه ی جدید با علامت R2* در برگه ثبت نتایج گزارش گردد .

روش اجرايي تضمين كيفيت نتايج آزمايشات باكتري شناسي

۱-هدف: ارائه سياستها وخط مشي آزمايشگاه در اجراي هماهنگ و نظام يافته فعاليتهاي مربوط به تضمين كيفيت نتايج آزمايشها ميباشد.

۲- دامنه كاربرد: اين روش در مورد تمامي واحدهاي آزمايشگاه كاربرد دارد.

۳- تعاريف، مفاهيم و واژگان :

۱-۳- تضمين كيفيت نتايج آزمايش : مجموعه فعاليتهاي نظام يافته اي است كه در تمامي مراحل آزمايش تا گزارش دهي به انجام ميرسد تا ازحصول نتيجه مطلوب اطمينان حاصل شود.

۲-۳- كنترل كيفيت: مجموعه فعاليتهاي فني است كه به منظور حصول اطمينان از صحت و دقت آزمايشها، عملكرد تجهيزات و يا قابل قبول بودن اقلام و مواد آزمايشگاهي انجام ميشود.

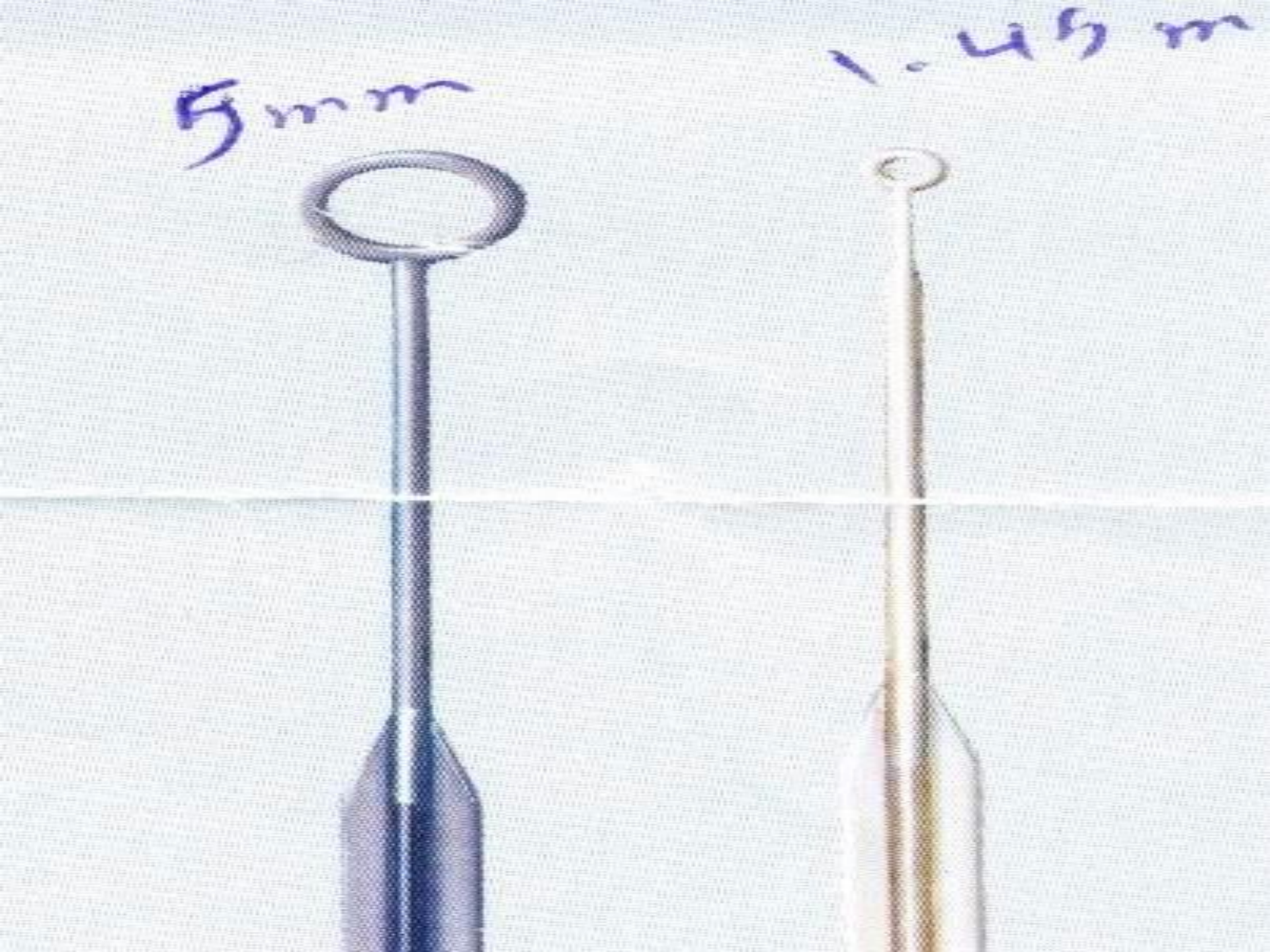
روش تعیین حجم لوپ

عنوان تجهیز : لوپ استاندارد **Calibrated Loop**

هدف : انتقال حجم معین سوسپانسیون حاوی میکروب به محیط کشت و گسترش کشت های میکروبی روی محیط های جامد

دامنه کاربرد : بخش میکروب شناسی

مسئولیت اجراء : پرسنل بخش میکروب شناسی


5mm
1.45m

مشخصات عملکردی دستگاه :

لوپ میکروب شناسی از جنسهای متفاوت ساخته می شود و معمول ترین آنها پلاتین ،نیکل و کروم است . به طور کلی لوپ باید از فلزی باشد که به سادگی شکل پذیربوده و بر اثر سرد وگرم شدن مکرر خراب نشود . سر لوپ باید به شکل دایره پیچیده شود ودرمحل تماس شروع دایره ومیله نباید فاصله ایجاد شود .

با توجه به اینکه علاوه بر قطردایره سر لوپ، عوامل دیگری همچون جنس لوپ وقطر میله مورد استفاده ،در تعیین گنجایش حلقه موثر می باشند اندازه گیری ظرفیت حجمی لوپ (کنترل صحت آن)درشروع وادامه کار لازم است .همچنین با توجه به تغییر قطر لوپ در استفاده های بعدی، درفواصل زمانی مناسب باید نسبت به تعویض آن اقدام شود .

درحال حاضر لوپ های با حجم مشخص به صورت آماده نیز وجوددارد که می تواند مورد استفاده قرار گیرد .

چگونگی کاربری :

از آنجائیکه استفاده از لوپ استاندارد با حجم معین، جهت شمارش کلنی های به دست آمده از کشت نمونه ادرار، به منظور تشخیص عفونت واقعی ضروری است ، جهت کشت ادرار با لوپ استاندارد به این روش اقدام کنید :

۱- ابتدا لوپ را با استفاده از شعله استریل کنید .

۲- اجازه دهید لوپ در معرض هوا قرار گرفته و سرد شود .

۳- لوپ را به طور عمودی وارد نمونه کنید. در صورت غیرعمود بودن به علت کشش سطحی مایعات ، حجم مایع حلقه به طور کاذب تغییر می کند .

۴- دقت کنید فقط قسمت حلقه ی لوپ وارد نمونه شود .

۵- لوپ را از نمونه خارج کنید و بعد از اطمینان یافتن از برداشت نمونه، آنرا روی محیط کشت مربوطه انتقال دهید و طبق روش توصیه شده کشت دهید .

۶- اگریک نمونه ی واحد را روی چند محیط مختلف کشت میدهید، نیازی به استریل کردن مجدد لوپ نمی باشد.

۷- بعد از اتمام کشت نمونه، لوپ را مجدداً با استفاده از شعله استریل کنید .

۸- نمونه های بعدی را نیز به همین ترتیب کشت دهید .

نحوه نگهداری :

- در هنگام عدم استفاده از لوپ آنرا در جای مناسب قرار دهید .
- بهتر است از لوپ استاندارد فقط برای کشت ادرار استفاده کنید و برای استریک کردن ، پاساژ دادن و سایر کارهای میکروب شناسی از لوپ های معمولی استفاده کنید . بااین کارحجم لوپ کالیبره دیرتر تغییر می کند .
- لوپ را همواره مورد بازرسی قرار دهید تا از نظر باز نشدن محل جوش حلقه ی آن مطمئن شوید .

نحوه کنترل کیفیت :

برای بررسی حجم لوپ از روش هایی مانند رنگ سنجی ،توزین و مقایسه آنالیت خاص توسط لوپ و سمپلر کالیبره استفاده می شود.

◄ روش رنگ سنجی :

ساده ترین روش برای بررسی حجم لوپ استفاده از روش رنگ سنجی با استفاده از اسپکتروفتومتر یا فتومتر به کمک مواد رنگی مانند متیلن بلو، کریستال ویوله واوانس بلو است .

۱- تعیین حجم لوپ به روش مقایسه ی حجم منتقله توسط لوپ و سمپلر استاندارد به روش رنگ سنجی :

- در پنج لوله تمیز و خشک 3mlآب مقطر بریزید.
- با لوپ مجهول ازیک محلول رنگی (رنگ سبز خوراکی ،سافرانین رقیق شده، بلودومتیلن ،اوانس بلو و غیره) برداشته وبه هر یک از لوله ها اضافه کنید .
- مراحل فوق را یکبار دیگر با کمک سمپلر هم حجم لوپ ، انجام دهید .
- حالا با اندازه گیری میانگین جذب نوری لوله ها در طول موج مشخص (مثلا 630mبرای رنگ سبز خوراکی) و استفاده از رابطه زیرحجم لوپ را بدست آورید :

حجم سمپلر / میانگین جذب سمپلر= حجم لوپ / میانگین جذب لوپ

۲ـ تعیین حجم لوپ با استفاده از ماده رنگی اوانس بلو :

- **ابزارو مواد مورد نیاز :**

ـ پودر اوانس بلو(Evans Blue) این ماده به صورت پودر تجاری قابل دسترس بوده و به آسانی در آب حل میشود.

ـ آب مقطر

ـ لوله آزمایش

ـ پی پت یا سمپلر

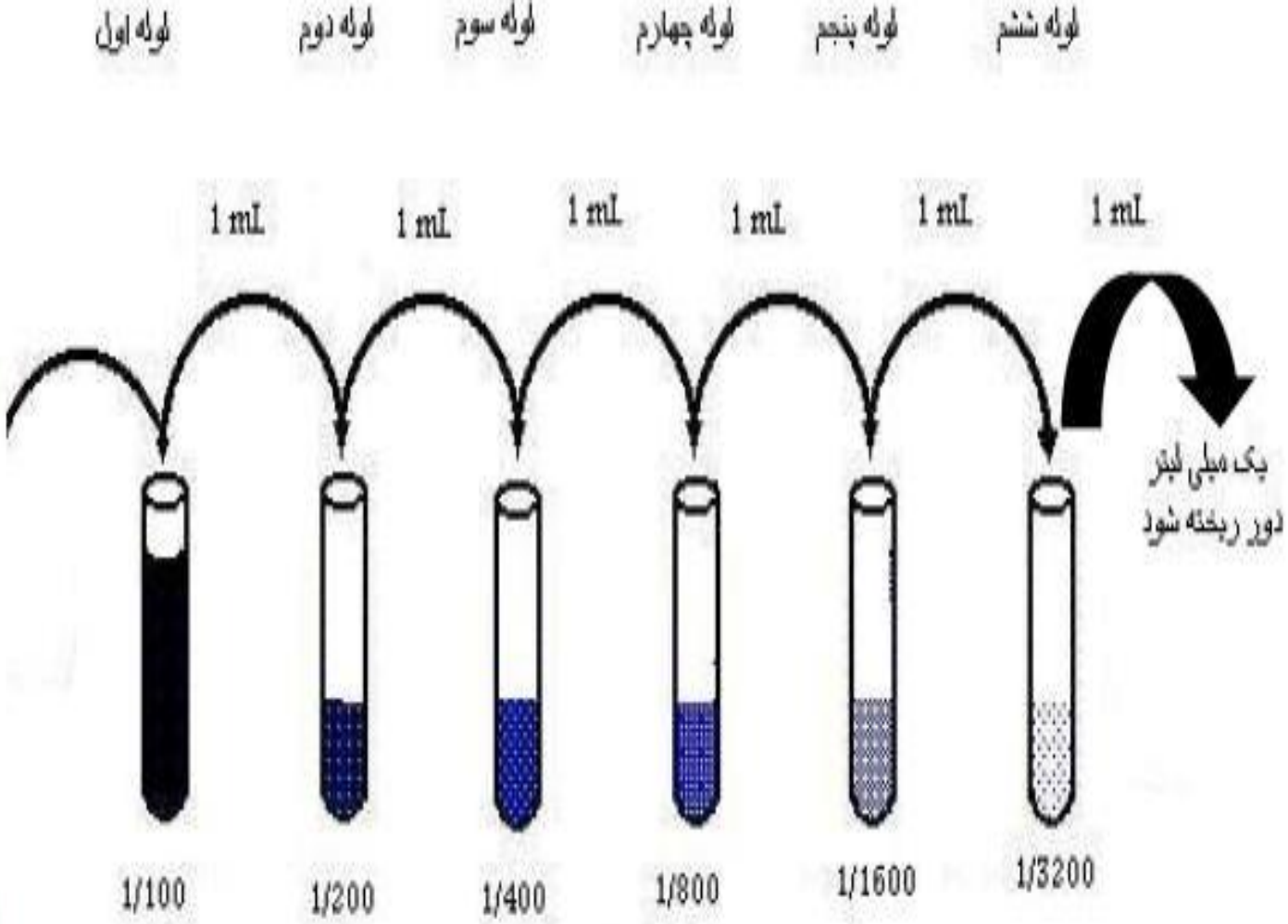
ـ اسپکتروفتومتریا فتومتر کالیبره

ـ کاغذ میلیمتری

- **روش انجام :**

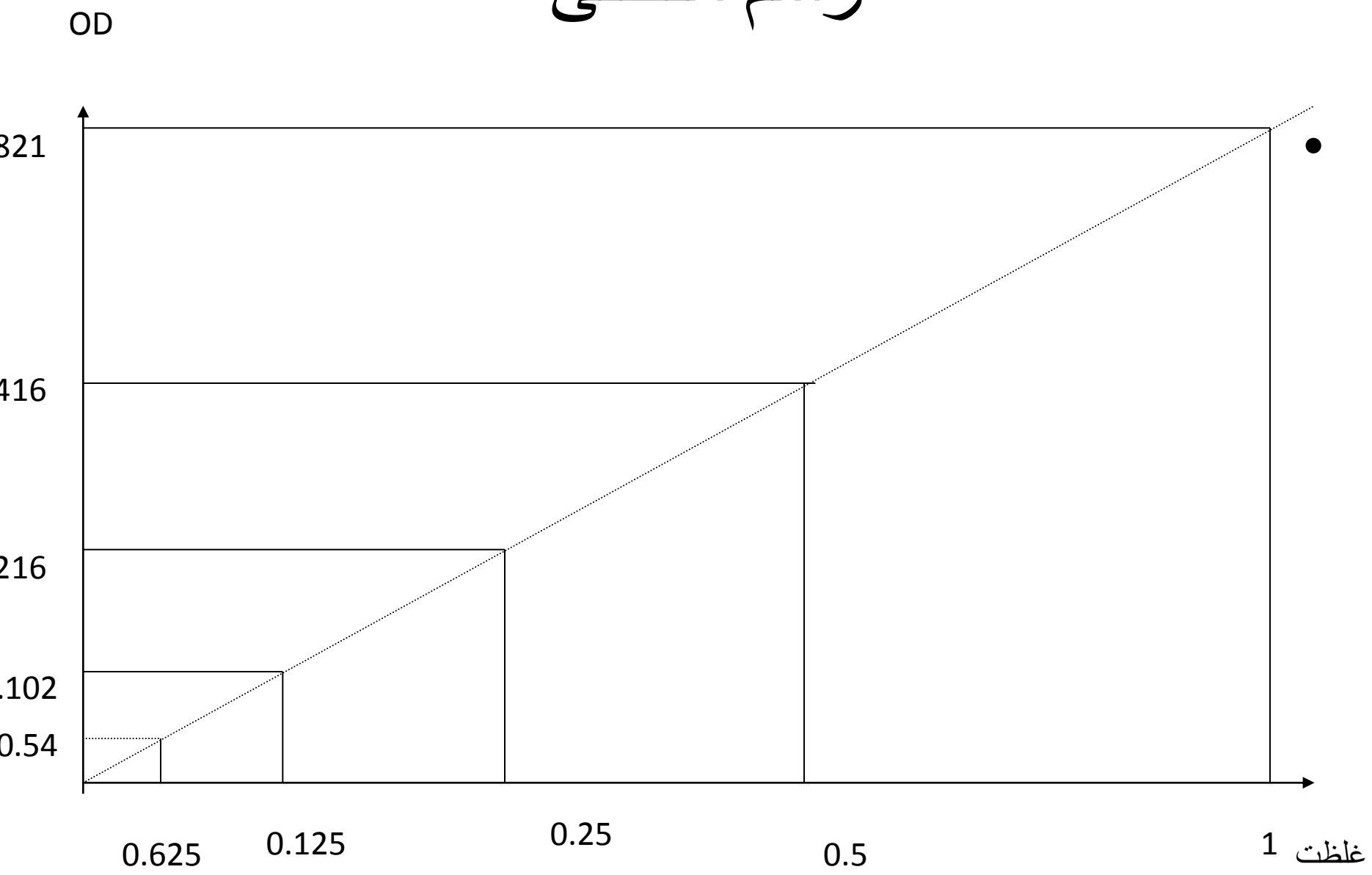
۱- 20mg از پودر رنگی اوانس بلو را در ده میلی لیتر آب حل نمایید. غلظت این محلول 0.2گرم درصد است.

۲- شش لوله آزمایش انتخاب کرده درلوله اول 2mlودر هریک ازلوله های باقی مانده 1mlآب مقطر بریزید. 20میکرولیتر ازمحلول ذخیره اولیه (0.2 گرم درصد) برداشته درلوله اول ریخته و کاملا مخلوط نمایید. سپس 1ml از لوله اول برداشته ودرلوله دوم بریزید از لوله دوم درلوله سوم واین عمل را تا آخر ادامه دهید. در انتها یک میلی لیتر ازلوله ششم را برداشته ودوربریزید. به این ترتیب شش محلول ذخیره خواهید داشت که رقت نهایی بدست آمده در هریک و میزان ماده رنگی موجود در آن به شرح زیر خواهد بود.


لوله اول
لوله دوم
لوله سوم
لوله چهارم
لوله پنجم
لوله ششم
1 mL
1 mL
1 mL
1 mL
1 mL
1 mL
20λ از محلول ذخیره 0.2g/100
یک میلی لیتر
دور ریخته شود
رقت
1/100
1/200
1/400
1/800
1/1600
1/3200
مقدار ماده رنگی
10λ
5 λ
2.5λ
1.25λ
0.625λ
0.3125λ

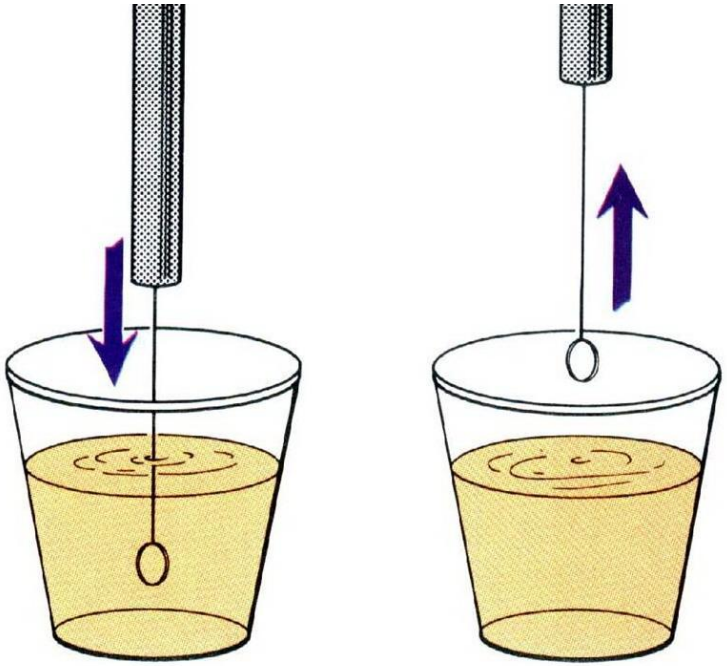
۳- میزان جذب نوری (OD) هر یک از شش محلول حاصله را به کمک اسپکتروفتومتر درطول موج 620nm به دست اورید .
۴- جهت تعیین حجم لوپ مورد کنترل درده لوله آزمایش یک میلی لیتر آب مقطر بریزید.
۵- لوپ موردنظر را به طور کاملا عمودی وارد محلول ذخیره مربوطه نموده ودرلوله آزمایش اول (ذخیره) فروببرید. سپس لوپ را روی کاغذ خشک کن قرار دهید تا کاملا خشک شود از سوزاندن لوپ خودداری نمایید. این عمل را برای ده لوله تکرار کنید.
۶- بعداز مخلوط کردن جذب هر یک ازلوله ها را در طول موج 620nm قرائت نمایید.
۷- برروی کاغذ میلیتری نموداری ترسیم نمایید که در آن محورافقی نشانگررقت های تهیه شده و محور عمودی نمایانگرجذب نوری هر رقت (درشش لوله فوق)باشد.

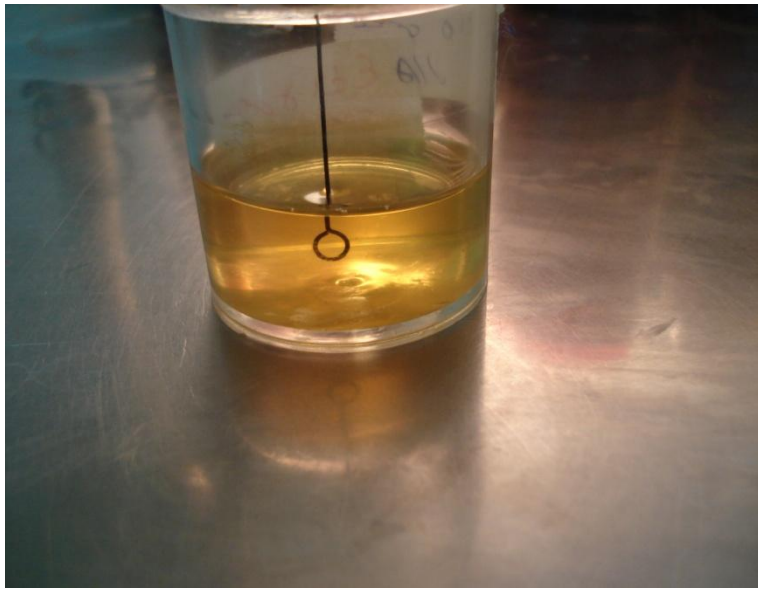
رسم منحنی

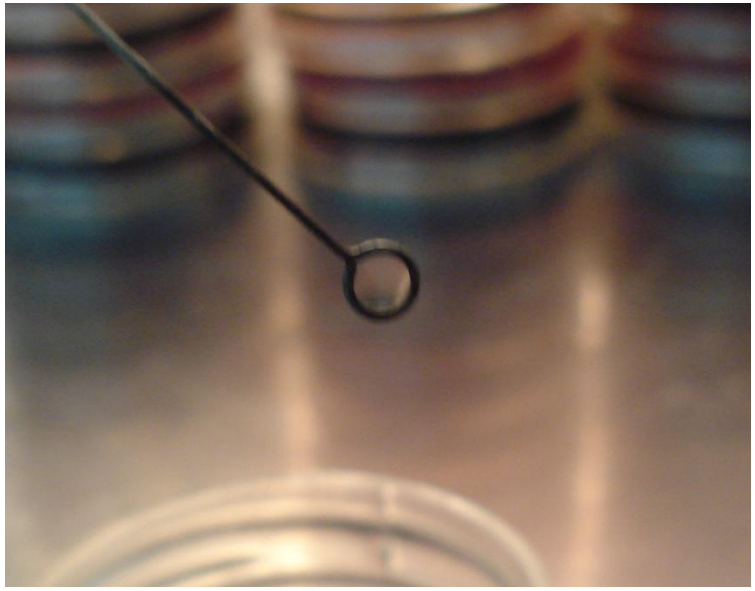


۸- با قرار دادن میانگین جذب نوری ده خوانده لوپ موردنظر برروی محور عمودی می توان ضریب رقت لوپ را از روی محور افقی به دست اورد. جهت تعیین تعداد کلنی در هر میلی لیترادرار باید تعدادکلنی های بدست آمده از کشت روی پلیت را درعکس ضریب رقت لوپ ضرب کرد. به طور مثال اگر ضریب رقت لوپ مجهول ۱/۱۰۰ وتعداد کلنی های روی پلیت ۵۰۰ عدد باشد باید ۵۰۰ رادر ۱۰۰ضرب و نتیجه را به صورت 50000 CFU/mlگزارش نمود.

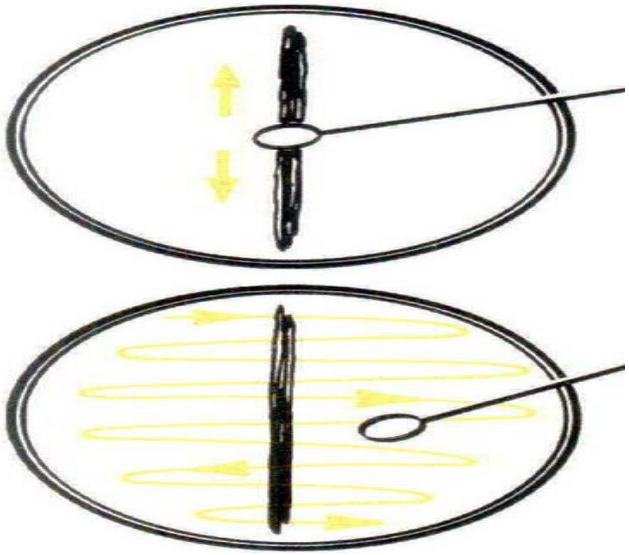
Calibrated Loop Technique

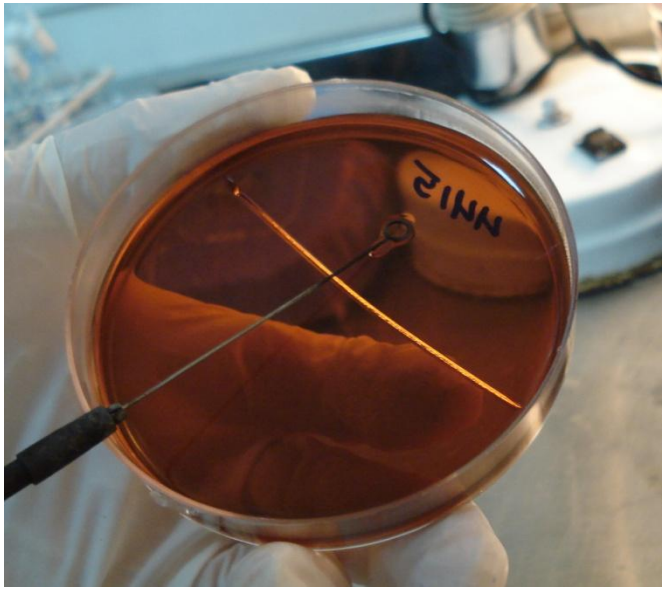


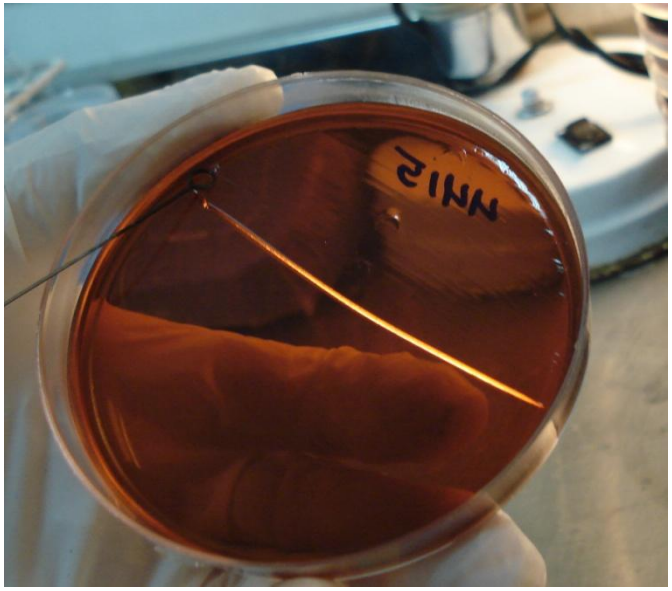




Semiquantitative culture / Surface streak procedure







ملاحظات ایمنی کار با تجهیز :

- در موقع سترون کردن لوپ باید از قرار دادن سریع ان بروی شعله به علت ایجاد ذرات ائروسل خود داری نمود.
- بهتر است ابتدا لوپ به قسمت قاعده شعله (که پایین ترین درجه حرارت شعله را داراست) وارد شده و تدریجاً به نوک شعله انتقال یابد .
- همچنین از داخل کردن لوپ داغ به داخل سوسپانسیون میکروبی نیز باید اجتناب نمود .

دستور العمل فني
اتوكلاو

۶- شرح اقدامات :

۶-۱- مشخصات عملکردی دستگاه : اتوکلاو وسیله ای است که بااستفاده از حرارت بخاراب تحت فشار برای سترون کردن محیط های کشت, محلولها, پسماندهای الوده و موادخشک مورد استفاده قرار میگیرد. این دستگاه دارای تایمر دیجیتال بوده که از زمان رسیدن به نقطه اسقرار , شروع بکار میکند. و....

۶-۲- چگونگی کاربری :

-- دستگاه را به برق شهر وصل میکنیم .

-- وجود اب درمخزن آب را کنترل کرده محفظه فلزی را گذاشته محیط کشت یا وسایل مورد نظر را با کاغذ معرف درون آن نهاده درب اتوکلاو را بسته پیچها را بطورمتقاطع می بندیم . سوپاپ ودریچه خروج هوا را باز می کنیم.

-- باکلید ON دستگاه روشن میشود .

-- صبرمیکنیم تاهوای درون محفظه به طور یکنواخت ومداوم خارج شود . سوپاپ را میبندیم .

-- درجه حرارت 121 درجه سانتیگراد، فشار 15 PSI و زمان 15 دقیقه

-- لازم به توضیح است که زمان را از زمان خاموش شدن لامپ ترموستات (رسیدن به دمای ۱۲۱ درجه) شروع میکنیم.

-- پس از ۱۵ دقیقه ، دستگاه را خاموش می کنیم و بعدازاینکه فشار اتاقک اتوکلاو به صفررسیدودما تاحدود ۶۰ درجه سانتیگرادپائین امد بااستفاده از دستکش مقاوم به حرارت ومحافظ چشم درب راباز کرده و بعداز ۲۰ دقیقه وسایل را به ارامی خارج مینمائیم .

-- کنترل با نوار مخصوص اتوکلاو و ثبت مراحل کاربری در logbook و فرم نگهداری اتوکلاو

چرخهٔ استریلیزاسیون

- مرحلهٔ ۱ : زمان بالا رفتن دما در محفظهٔ اتوکلاو (۲۰ °C-۱۲۱°C)
- مرحلهٔ ۲ : زمان نفوذ گرما به داخل ظرف محیط کشت (<۱۰۰°C -۱۲۱°C)
- مرحلهٔ ۳ : زمان نگهداری در دمای مقرر (۱۲۱°C)
- مرحلهٔ ۴ : زمان پایین آمدن دمای محفظه (۸۰°C-۱۲۱°C)

انواع استریلیزاسیون

- استریلیزاسیون محیط های کشت و محلول ها
- استریلیزاسیون مواد مصرفی آلوده
- استریلیزاسیون مواد خشک بسته بندی شده

***سترون سازی محیط های کشت ومحلولها**

بهتراست ازلوله وارلنهای درپیچ دار استفاده شود. درپیچ انها شل باشد وبیش از دو سوم آنها پرنشده باشند. اشیا ازیکدیگر و از دیواره اتوکلاو ۵ سانتیمتر فاصله داشته باشند . تمامی اشیا وظروف بطور افقی کنار یکدیگر قرارگیرند ودرصورت نیاز به قراردادان انها بروی یکدیگر ازRack استفاده شود تابخار جریان یابد . درب اتوکلاو بسته شده وزمان ودمای ان تنظیم گردد . زمان ۱۵ دقیقه دردمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد با ۱۵ دقیقه زمان خروج توصیه می شود. با استفاده ازدستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده عمل شود.

(زمان پیشنهادی برای ۵۰۰ میلی لیترمحیط کشت ۱۸ دقیقه و۱۰۰میلی لیترمحیط کشت ۲۴ دقیقه است.به طور کلی برای افزودن هر۵۰۰میلی لیترمحیط کشت ۳ دقیقه به زمان سترون سازی افزوده می شود.)

پس از سپری شدن زمان لازم و خاموش کردن دستگاه و بعد از ان که فشار دستگاه به صفر رسید ودما تا حدود ۶۰ درجه پائین آمد با استفاده از دستکش مقاوم به حرارت و محافظ چشم و با ایستادن درکنار اتوکلاو درب اتوکلاو را به ارامی بازکنید ۲۰دقیقه منتظر بمانید تاظروف کمی خنک شودومواد رابه ارامی حل کنید تا ازترشح مایعات داغ جلوگیری کنید.

***سترون سازی پسماندهای الوده**

ابتدا مواد الوده راجداکرده در کیسه هائی که قابلیت اتوکلاوشدن دارند قرار داده برروی آنها برچسب خطرزیستی (Biohazard) نصب نمود. بهتراست قبل از اتوکلاو نمودن برای اطمینان از نفوذ بخاراب به تمامی قسمت های کیسه گره انرا شل بسته یا یک پیمانه (حدود۰/۳لیتر) قبل ازمحکم کردن گره به ان افزود. برای جلوگیری ازمسدود کردن اب گذر اتاقک اتوکلاو با اگار مذاب باید این کیسه ها را در سطل یا ظروف دیگر قرار داد باید توجه داشت که بیش از ۳/۴ کیسه ها پرنشود. فشار۱۵ پوند دردمای ۱۲۱درجه سانتیگراد به مدت ۳۰-۲۵دقیقه ویا دمای ۱۳۴ درجه به مدت۳۰-۱۵ دقیقه مناسب است وپس از ان اگار ذوب شده بعنوان پسماند معمولی دور ریخته شود.

***سترون سازی موادخشک بسته بندی شده**

کیسه ها را به گونه ای دراتوکلاو قرار دهید که حداکثر چرخش بخار را در بین انها ایجاد کند ونیز با دیواره های اتوکلاو تماس نداشته باشد. باید از زمان ۲۵دقیقه دردمای۱۲۱درجه با خروج سریع بخار ویازمان ۳۰دقیقه دردمای ۱۲۱ درجه بدون خروج بخاراستفاده کرد.

۶-۳- نحوه نگهداری:

***به طورروزانه :** بایستی صفحه کف اتوکلاو را ازسوراخ گذر اب اتاقک جدا کرده و کاملا تمیزکرد. لوازم فرعی را با اب و صابون شسته درپوش چاهک(Screen Plug) راتمیزکرد. قبل ازکار سطح اب ونمایشگر ثبت حرارت وفشار راکنترل کرد.

***به طورهفتگی :** تمیزکردن ابگذرها ودرزها بررسی سوپاپ اطمینان.

***به طورماهانه :** تمیزکردن نمایشگر و تعویض اب.

*درصورت نیاز(حداقل هر۳ماه یکبار) داخل وخارج دستگاه وقسمت خروجی اب زاید تمیزشده ولاستیک دوردرب بررسی ودرصورت نیاز تعویض شود.

*هر۶ ماه کنترل اتوکلاوتوسط شرکت پشتیبان انجام شود.

مشکل	علل ممکن	راه حل
درب اتو کلاو با آن که کاملا بسته شده,اما قفل نمیشود.	جسمی فضا را اشغال کرده است. کابل ها خیلی شل هستند. قفل ,خارج از تنظیم است.	جسم را در آورید. کابل ها را تنظیم کنید. قفل را تنظیم کنید
موتور ثبت کننده (حرارت , دما) فعال نیست	فیوز کنترل جریان برق پریده است. موتور ثبت کننده معیوب است	فیوز را بزنید. موتور را تعویض کنید.
جداره بیرونی (Jaket) گرم نمیشود.	منبع تامین کننده بخار و دریچه های قطع کننده(Shut off Valves) باز نیستند. صافی مسدود شده است. دریچه رگولاتور کار نمیکند.	دریچه ها را باز نموده , تمیز یا تعمیر کنید. صافی را تمیز کنید. رگولاتور را تنظیم یا تمیز کنید.
بخار, فشار کافی ایجاد نمیکند.	رگولاتور فشار , مار نمیکند. دریچه (Trap) بخار اتاقک عمل نمیکند. لاستیک دور درب نشت میکند.	رگولاتور را تمیز یا تعمیر کنید. دریچه را تمیز یا تعمیر کنید. لاستیک دور درب را تمیز, لغزنده و یا تعویض کنید.

۶-۴-نحوه کنترل کیفیت:

*برای هربار استفاده از چسب اتوکلاوونشانگر(اندیکاتور)شیمیائی.دونوع نشانگرشیمیائی وجوددارد:

۱-نوار TST که به ۳ عامل زمان و بخار ودما نظارت ی کند.

۲-برچسب Steri-Record که امکان ثبت تاریخ سترون سازی وفرد سترون کننده و نام محیط کشت بروی این برچسب وجوددارد.

*به طورهفتگی برحسب روزهای کاری استفاده از اتوکلاو باید ازاندیکاتور بیولوژیک شامل نوار اسپوردار یا ویال باسیلوس استئاروترموفیلوس استفاده وصحت دماسنج راکنترل نمود. بایدفشارلازم حدود۱/۵بار نیز دردمای مطلوب درهرباراستفاده مد نظر قرار گیرد.

نکته مهم : چسب اتوکلاو بهیچوجه جهت کنترل کیفی کاربری ندارد و فقط نشانه ای است از اینکه ایا بسته مورد نظر درداخل اتوکلاو قرارگرفته است یانه.

۶-۵- نحوه کالیبراسیون :

در صورت عدم پاس شدن موارد کنترل کیفیت , جهت کالیبراسیون و احیانا سرویس و تعمیر از شرکت پشتیبان یاری گرفته شود.

۶-۶- ملاحظات ایمنی کار با تجهیز:

حتما ازدستکش مقاوم به حرارت ومحافظ چشم استفاده شود.

بعد ازاینکه فشاردستگاه به صفرودرجه حرارت به ۶۰ درجه رسید درکناراتوکلاو (نه مقابل آن) ایستاده ودرب را به ارامی بازشود.۲۰دقیقه متنظرمانده تا ظرف کمی خنک شوند ومواد به ارامی حمل شوند تا ازترشح مایعات داغ جلوگیر شود.

هیچگاه درهنگام روشن بودن دستگاه اقدام به بارگذاری یاخارج کردن وسایل نشود.

هیچگاه درهنگام روشن بودن دستگاه واتصال ان به پریزبرق اقدام به تمیز نمودن دستگاه نشود. درصورت ریختن اب یامایعات روی تابلوی برق ان راازپریز برق جداکرده وبعداز خشک شدن استفاده شود.

هیچگاه پیچهای محکم کننده درب به هنگام استفاده شل یا سفت نشود.

رعایت کلیه نکات مندرج در دستورالعمل ایمنی وبهداشت

دستورالعمل فني
دستگاه انکوباتور

۶- مشخصات عملکردی دستگاه :

انکوباتور دستگاهی است برای نگهداری سوسپانسیون یا محیط های کشت حاوی میکرب یا نگهداری مواد در برخی ازمایشها که نیازبه حرارت خاص دارند، استفاده می شود.

۶-۱- چگونگی کاربری :

انکوباتورمحفظه عایق بندی شده ای است که برای نگهداری دما ورطوبت تنظیم شده محیط برای رشد میکروارگانیسم ها مورد نیاز است. بعضی انکوباتورها برای نگهداری میزان دلخواه ازCO2 برای میکروارگانیسم هائی که دی اکسیدکربن دوست هستند (Capnophilic)هستند تجهیز شده اند.

انکوباتورهای بدون CO2 :

* تنظیم کننده دماراروی دمای موردنظرقراردهید.
* وقتی درجه حرارت به دمای مورد نظررسیددمارادرهرروز استفاده روی برگه کنترل کیفی (QC)ثبت کنید.
* نمونه ها را به طورایمن روی سینی ها یاقفسه ها قراردهید.
* می توان باقرار دادن یک تشتک پرازاب متناسب به ندازه اتاقک درکف انکوباتور محیط مرطوب ایجادکرد.

انکوباتورهای CO2دار :

* سطح دما وCo2دربرگه QC درزمان استفاده ازان ثبت می شود.
* درصورت اتمام کپسول گازCO2 تازمان شارژ مجدد ان میتوان ازمحفظه حاوی شمع(Candle Jar) بطور جایگزین استفاده کرد.

۶-۳- نحوه نگهداری:

به طور ماهانه بامحلول صابون ملایم تمیز ودرصورت لزوم ضدعفونی شوند.
زمانی که دمای انکوباتورهای بدون CO2 خارج ازمحدوده قابل قبول برای واحد مورد نظر باشد باید به سوپروایزرفنی اطلاع داده شود تا اقدامات اصلاحی مطابق موارد ذیل انجام شود:
منبع برق، پریزبرق ، و کلیدهای روشن و خاموش بررسی شود.
دمای تنظیمی (Set point) بررسی شود.
درصورت ادامه مشکل به نماینده سرویس دهنده اطلاع داده شود.
تمام عملیات تمیزکردن وتعویض سیلندر باید درجداول مربوطه ثبت گردد.

۶-۴-نحوه کنترل کیفیت:

حرارت انکوباتور با دماسنج کالیبره اندازه گیری و بطور روزانه ودر دو نوبت برروی منحنی حرارت ثبت گردد.

درانکوباتور CO_2دار یک کشت ازنایسریا گونوره را در انکوباتور قرار داده وهر روز انرا پاساژ و رشد انرا بررسی و ثبت کرد . این ارگانیسم برای رشد به CO_2 نیاز دارد.

۶-۵- نحوه کالیبراسیون :

در صورتیکه نتایج کنترل کیفی دستگاه قابل قبول نبود , بایستی دستگاه جهت سرویس و کالیبراسیون به شرکت پشتیبان ارجاع شود .

۶-۶- ملاحظات ایمنی کار با تجهیز:

سیستم برق رسانی مطابق توان و ولتاژ مصرفی باشد تا احتمال وقوع هر حادثه مخاطره امیز کاهش یابد.

در موقع تنظیم فشار و دما به نکات مندرج در دفترچه راهنما وزمان مربوطه توجه گردد.

درزمان اتمام کار با دستگاه رعایت نکات ایمنی ازجمله استفاده از دستکش وخروج تدریجی بخار و درصورت لزوم از محافظ صورت ضروری میباشد.

به منظوررعایت موارد ایمنی کپسول های CO2 بایدبه صورت ایستاده به دیوار با زنجیر محکم شوند. درصورت عدم استفاده سوپاپها و درپوشها باید محکم بسته شوند.

عدم نگهداری سیلندرهای گاز دردمای بالاتراز ۵۲ درجه سانتیگراد وحالت افقی.

دستور العمل فني كار با رفراكتومتر

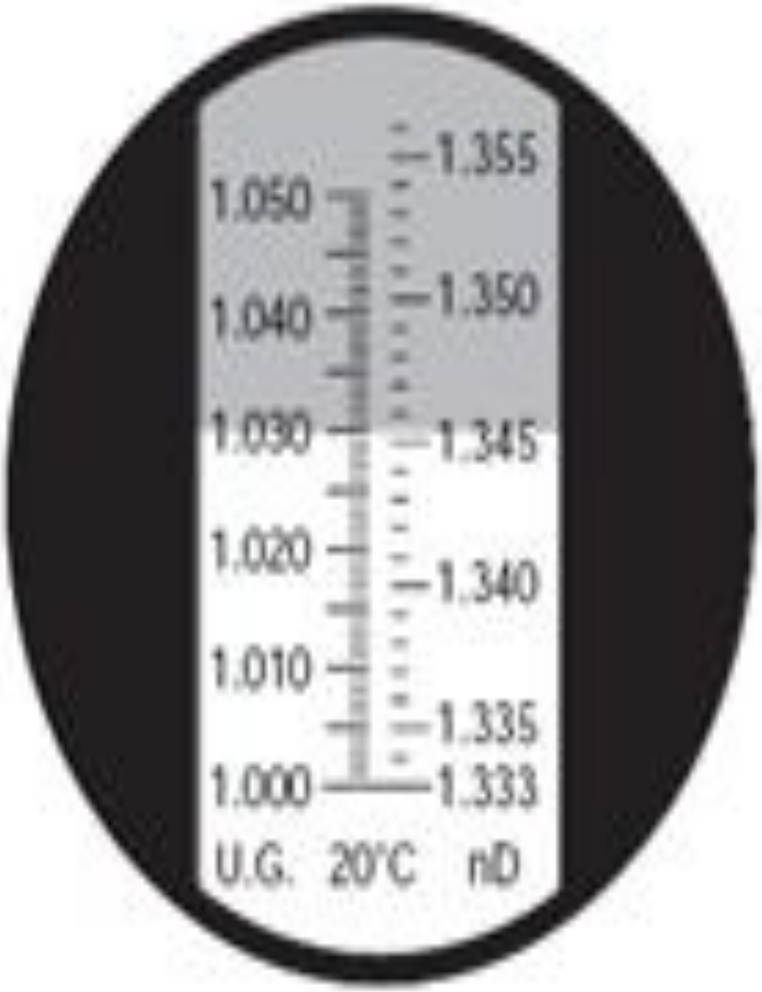
۶-۱- مشخصات عملکردی دستگاه :

دستگاهی است که همانند یورینومتر ، غلظت پارتیکلهای حل شده در نمونه (جرم حجمی) را با کمک اندکس افتراق نور اندازه گیری میکند. اندکس افتراق نور در حقیقت مقایسه شتاب نور در هوا با شتاب نور در محلول است. غلظت پارتیکلهای حل شده در نمونه شتاب و زاویه نور عبوری از محلول را تعیین میکند. رفراکتومترهای پزشکی از این اصل نور با استفاده از یک منشور که نور منوکروماتیک با طول موج نور (Day light) در برابر یک مقیاس جرم حجمی کالیبر شده توسط سازنده دستگاه استفاده میکنند. غلظت نمونه ، زاویه پرتو نوری که به منشور میتابد را تعیین میکند. مقیاسی را با استفاده از جرمهای حجمی معین با زاویه های ایجاد شده ، تهیه نموده اند. این دستگاه با استفاده از حجم کم نمونه (۱ یا دو قطره) میتواند جرم حجمی مشخصی را تعیین کند. برخلاف یورینومتر ، نیازی به اصلاح جرم حجمی بر اساس دما ، وجود ندارد و این دستگاه در دمای ۱۵ تا ۳۸ درجه قادر به تصحیح میباشد.

اگرچه تصحیح برای میزان قند و پروتئین ادرار ، همچون یورینومتر ، همچنان لازم است ، ولی تاثیر پارتیکلهای بزرگ بر خوانشهای رفراکتومتر کمتر از یورینومتر میباشد.

1. Put one or two drops of sample on the prism.

2. Close the daylight plate gently.



5. Read the scale where the boundary line intercepts it.

6. Wipe the sample from the prism clean with a tissue paper and water.

چگونگی کاربری :

ابتدا یک قطره ادرار را با سمپلر بر روی منشور قرار داده و سپس در منشور را میگذاریم. سپس در مقابل یک منبع نوری عدسی را تنظیم کرده و مقیای را نگاه کرده و عدد را ثبت میکنیم.

۶-۳- نحوه نگهداری:

پس از هر بار استفاده ، منشور رفراکتومتر را تمیز میکنیم. از بکار بردن دستمال زبر و الکل خودداری کنید. دستگاه را با دقت استفاده نموده واز ضربه زدن و پرت نمودن آن خودداری نمایید.

۶-۴-نحوه کنترل کیفیت:

نمونه های ادرار کنترلی با مقادیر جرم حجمی بالا ، متوسط و پایین ، جهت کنترل رفراکتومتر در هر نوبت کاری توصیه میشود. ثبت نتایج نمونه های کنترل و کالیبراسیون ها در فرم سرویس و نگهداری رفراکتومتر توصیه میشود.

۶-۵- نحوه کالیبراسیون :

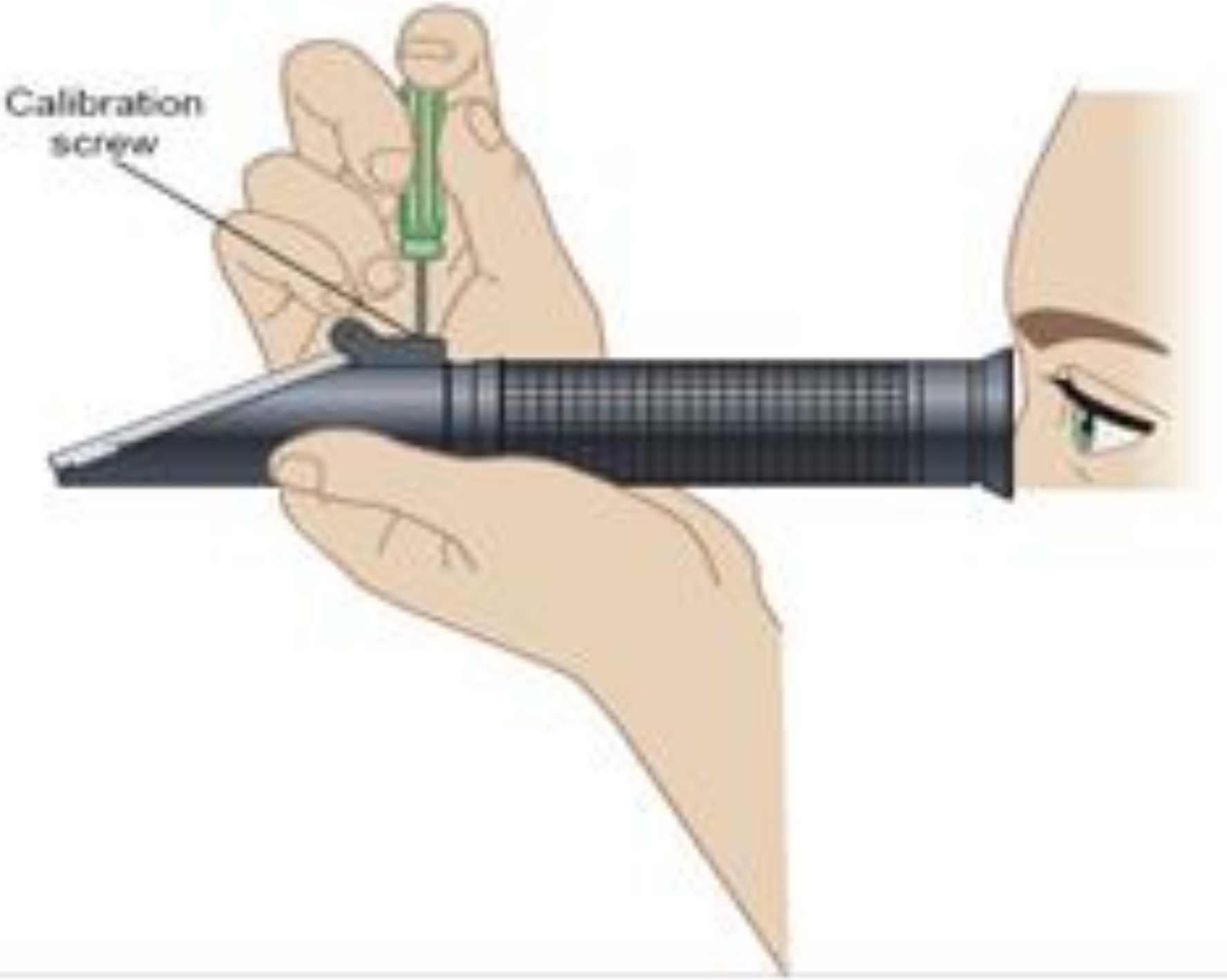
با استفاده از آب مقطر و با استفاده از پیچ تنظیم روی دستگاه ، خوانش را بر روی عدد ۰۰۰/۱ تنظیم میکنیم. شکل زیر :

سپس از دو محلول زیر جهت تصدیق کالیبراسیون دستگاه کمک میگیریم.

Nacl 5% =1.022 ± 0.001

Sucrose 9% =1.034 ± 0.001

در صورتیکه نتایج پس از شستشو و تمیز نمودن منشور و صفر کردن مجدد ، با نتایج بالا تفاوت داشت ، بایستی دستگاه جهت سرویس به شرکت پشتیبان ارجاع شود .


Calibration
screw

GOD THANK YOU