

کنترل کیفی در بخش میکروپ شناسی



هدف از برنامه کنترل کیفی در بخش میکروبیشناسی:

اطمینان از صحت و دقت روش انجام آزمایشات تشخیصی و تعیین حساسیت و نتایج گزارش شده
اطمینان از کیفیت مواد و وسایل به کار برده شده در این آزمایش
اطمینان از عملکرد فرد انجام داده آزمایش و فرد گزارش دهنده نتایج



کارکنان

○ سابقه کار

○ تحصیلات مرتبط



فضای فیزیکی در میکرب شناسی

- مساحت – مستقل بودن بخش میکروبیشناسی – مستقل بودن بخش محیط سازی – قابل شستشو – وجود شیر آب و سینک مجزا
- نور و تهویه مناسب – فشار منفی – سیستم گرمایش و سرمایش – کابینت بندی استاندارد – هود مناسب



ابزار پایه و تجهیزات (متناسب با M13 فهرست تجهیزات، مواد، محیط های کشت و دیسک های تشخیصی مرجع سلامت)

○ - یخچال (۸- ۲ درجه سانتیگراد) - فریزر ۸- تا ۲۰ - درجه سانتیگراد

○ هود ایمنی بیولوژیک

○ انکوباتور 1 ± 36 درجه سانتیگراد)

○ بن ماری

○ اتوکلاو

○ PH متر

○ سانتریفوژ

○ اون (فور)

○ سمپلر

○ لوپ و آنس

○ کندل جار + شمع

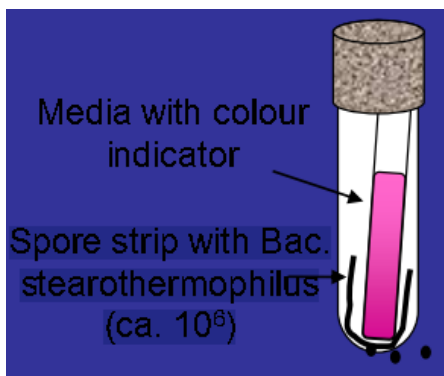
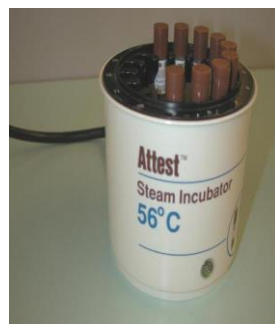
اسپکتروفتومتر



Chemical indicators
Biological indicators

اتو کلاو

دارای دستورالعمل فنی M09
آگاهی کارکنان از دستورالعمل
سوابق پایش



- کنترل صحت عملکرد:
- استفاده از ویال بیولوژیکی دارای تاییدیه
- کنترل دما بخار زمان
- استفاده از نوار بیوشیمیایی دارای تاییدیه
- نظافت در صورت پخش مواد - در شرایط معمولی (آب هر ماه عوض شود)
- کنترل فنی: هر ۶ ماه



انکوباتور

آشنایی کارکنان با نحوه کار با انکوباتور

انکوباتورهای بدون CO₂

- کنترل دما (۳۵-۲+)

- نحوه نظافت:

زمان آلوده شدن

در شرایط معمولی : حداقل هر دو هفته یکبار

- کنترل فنی دستگاه: هر شش ماه

انکوباتورهای CO₂ دار

- کنترل سطح دما و CO₂ و رطوبت

- بررسی رشد نیسریا گونوره (استرپتوکوک پنومونیه)

چایگزین : وجود جار محتوی شمع



هود ایمنی بیولوژیک

- کلاس 2
- دستورالعمل فنی
- تاییدیه
- نصب در محل مناسب
- آگاهی کارکنان از نحوه صحیح کار با هود
- انجام تمامی مراحل کار در داخل هود
- Logbook
- سوابق کالیبراسیون و کنترل کارکرد هود
- عدم استفاده از شعله گاز
- روشن کردن فن ۱۰ دقیقه قبل از شروع و بعد از اتمام کار



فور

- کنترل دما

- کنترل تایمر

- کنترل صحت عملکرد: ۱۶۰ درجه به مدت یک ساعت ۱۸۰ درجه به مدت ۴۰ دقیقه (تست شیمیایی: ویال های شیشه ای BROWN و مشاهده تغییر رنگ کنترل کیفی فور-تست بیولوژیک: نوار کاغذی حاوی باسیلوس سوبتیلیس)

- نظافت داخل: هر ماه

- کنترل فنی: در شرایط عادی هر شش ماه



یخچال

- کنترل دما: روزانه ۲ بار صبح و عصر در ساعات مشخص (دماسنج کالیبره)
- کنترل چینش در قسمت‌های مختلف
- نظافت در شرایط عادی: هر ماه
- کنترل فنی : هر شش ماه
- کارکرد بهتر: در محل سرد-سایه-حفظ فاصله بالا و پشت -فاقد نوسان و لرزش



ترازو

- کنترل صحت: حداقل هر ماه یا قبل از کارهای دقیق با وزنه های کالیبراسیون
- کنترل دقت: تکرار ۱۰ بار توزین وزنه های کالیبراسیون و محاسبه SD , CV
- نظافت
- کالیبراسیون: توسط شرکتهای مجاز یا وزنه های کالیبره
- مکان: دور از ارتعاش-درمحل ثابت-دور از جریان شدید هوانور و سیستمهای برودتی حرارتی-مواد مستقیم روی آن قرار نگیرد



انواع لوپ

- لوپ با حجم های ۱ میکرولیتر یا ۱۰ میکرولیتر
- لوپ های یک بار مصرف پلاستیکی
- لوپ های چند بار مصرف فلزی پلاتینیوم یا نیکروم



روش استفاده از لوپ

- لوپ های فلزی قبل از انتقال و بعد از هربار استفاده سوزانده و خنک شود.
- لوپ های یکبار مصرف برای هر بار انتقال یک لوپ جدید استفاده شود.
- نمونه مایع در ظرف دهانه بزرگ (قطر بیش از ۱ سانتی متر) ریخته شده باشد.
- ظرف نمونه با حرکات چرخشی مخلوط گردد.
- فقط حلقه لوپ به صورت عمودی تا زیر سطح مایع فروبرده شود.
- لوپ به صورت عمودی خارج شده و از نبودن حباب در حلقه لوپ اطمینان حاصل شود
- محتویات لوپ با فشار دادن برروی پلیت به سطح آن منتقل شود و سپس پخش گردد.



کنترل کیفیت لوپ

○ لوپ های فلزی

به طور منظم از نظر ظاهری بررسی گردد.

در ابتدای مصرف و ماهیانه از نظر صحت حجم برداشت شده بررسی گردد.

○ لوپ های یکبار مصرف

بعد از دریافت هر سری ساخت جدید حجم چند عدد از آن بررسی گردد.



روش رنگ سنجی

مواد مورد نیاز:

○ آب مقطر

○ محلول رنگ اوانس بلو (محلول ذخیره)

۰.۷۵ گرم پودر اوانس بلو در ۱۰۰ سی سی آبمقطر

○ محلول رنگ اوانس بلو (محلول های کاری)

✓ ۱ سی سی از محلول ذخیره به ۴۹ سی سی آبمقطر اضافه شود. (رقت ۱/۵۰)

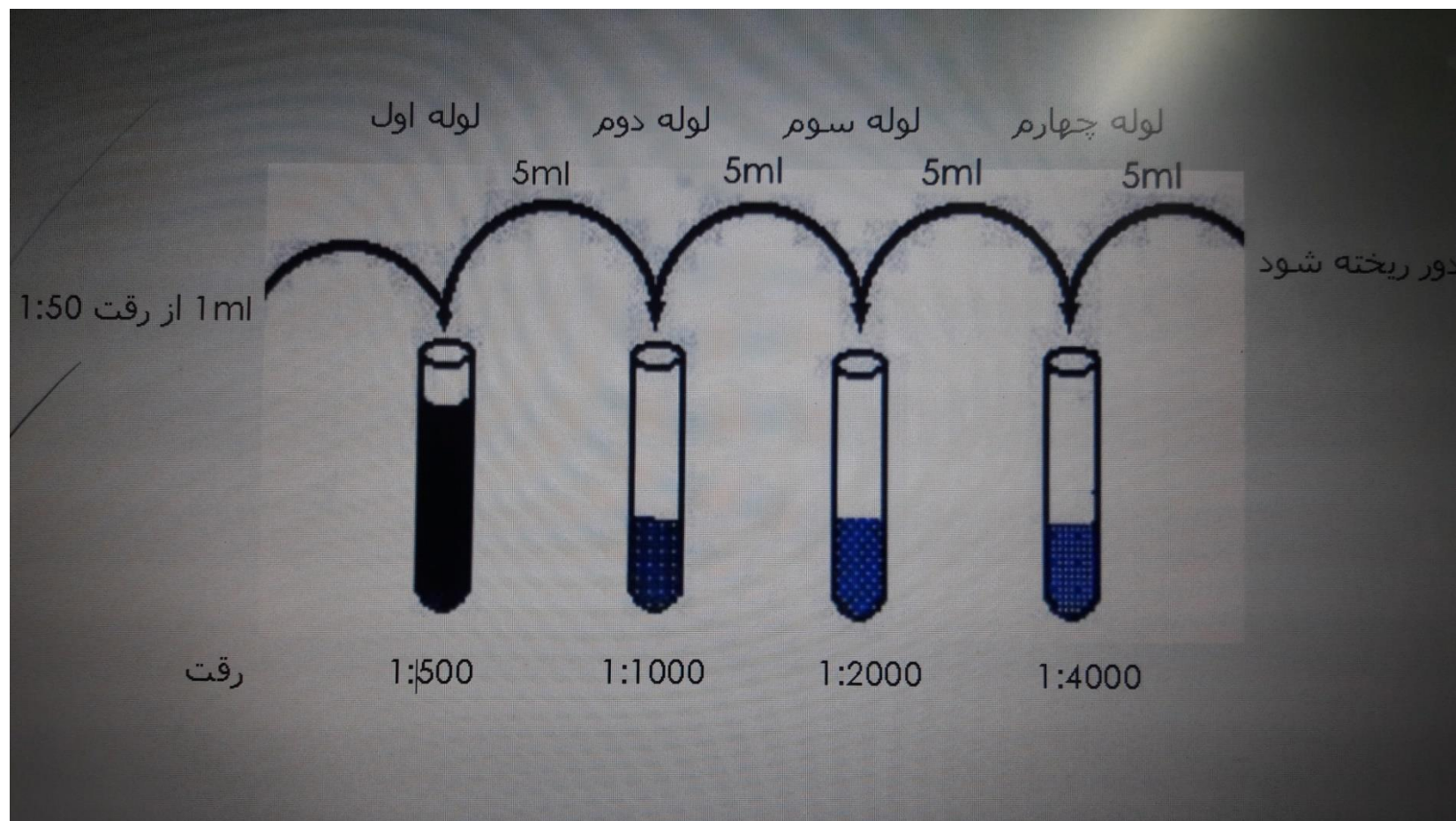
✓ ۴ لوله آزمایش برداشته در لوله اول ۹ سی سی و در لوله های بعدی ۵ سی سی آبمقطر ریخته شود.

✓ ۱ سی سی از رقت ۱/۵۰ برداشته در لوله اول حاوی ۹ سی سی آبمقطر اضافه شود.

✓ ۵ سی سی از لوله اول برداشته در لوله دوم ریخته کاملاً مخلوط گردد. سپس ۵ سی سی از لوله دوم در

لوله سوم و ۵ سی سی از لوله سوم در لوله چهارم و در انتها ۵ سی سی از لوله چهارم دور ریخته شود.





- اسپکتروفتومتر را در حالت جذب با طول موج 620 nm تنظیم کنید.
- اسپکتروفتومتر را با آب مقطر صفر نمایید.
- جذب ۴ رقت فوق را اندازه گیری و ثبت نمایید. جذب نوری (محور عمودی) را برابر هر غلظتی از رقت ها (محور افقی) در کاغذ میلی متری ثبت نمایید.
- یک خط که بیشتر از همه به هر ۴ نقطه نزدیک است را به منظور ساختن منحنی کالیبراسیون، رسم کنید.



روش رنگ سنجی

- برای کالیبراسیون لوپ ۱۰ μl لوله ای انتخاب کرده، ۱۰۰ ml آب مقطر در آن بریزید. با استفاده از لوپ ۱۰ مورد آزمون ده بار از محلول ذخیره اولیه به این لوله منتقل و کاملاً مخلوط نمایید. جذب این محلول را اندازه گیری نمایید که باید برابر با جذب رقت ۱:۱۰۰۰۰ روی منحنی کالیبراسیون باشد. محلول های کاری دیگری برای سه بار آزمایش دیگر تهیه و بررسی کنید. (در کل ۴ خوانده)
- خوانده ها را بر روی برگه کاری ثبت نموده میانگین ۴ خوانده را محاسبه نمایید.
- درصد صحت را بر اساس راهنمای موجود در برگه کاری به دست آورده و ثبت نمایید. اگر میانگین جذب های خوانده شده بیش از $\pm 20\%$ از محلول ذخیره ۱:۱۰۰۰۰ باشد لوپ غیر دقیق بوده و نیاز به اقدامات اصلاحی دارد.
- درصد صحت در محدوده $\pm 20\%$ مورد قبول است و ضریب لوپ ۱۰۰ در نظر گرفته می شود.



روش رنگ سنجی

- برای لوپ ۱ میکرولیتر:
- لوله دیگری انتخاب کرده ml ۱۰ آب مقطر در آن بریزید.
- با استفاده از لوپ مورد آزمون ده بار از محلول ذخیره اولیه را به این لوله منتقل و کاملاً مخلوط نمایید.
- جذب این محلول را اندازه گیری نمایید، که باید برابر با جذب رقت ۱:۱۰۰۰ روی منحنی کالیبراسیون باشد.
- محلول های کاری دیگری برای سه بار آزمایش دیگر تهیه و بررسی نمایید. (در کل ۴ خوانده)
- خوانده ها را بر روی برگه کاری ثبت نموده، میانگین ۴ خوانده را محاسبه نمایید.
- درصد صحت را بر اساس راهنمای موجود در برگه کاری بدست آورده و ثبت نمایید.
- . اگر میانگین جذب های خوانده شده بیش از $\pm 20\%$ از رقت محلول ذخیره ۱:۱۰۰۰ باشد، لوپ غیر دقیق می باشد. اقدامات اصلاحی انجام دهید.



دستورالعمل ها

- دستورالعمل های آماده سازی بیمار قبل از نمونه گیری و آگاهی کارکنان
- دستورالعمل های روش های صحیح نمونه گیری، جمع آوری و انتقال نمونه های مختلف بالینی (حجم و ظروف و...) و آگاهی کارکنان
- دستورالعمل روش های استاندارد انتقال نمونه های عفونی M11
- وجود دستورالعمل معیارهای رد نمونه و آگاهی کارکنان و وثبت موارد
- دستورالعمل های انجام کار و کنترل کیفی در بخش میکروشناسی براساس استانداردهای معتبر و به روز
- فرم اطلاعات بیمار(کاغذی یا الکترونیک)



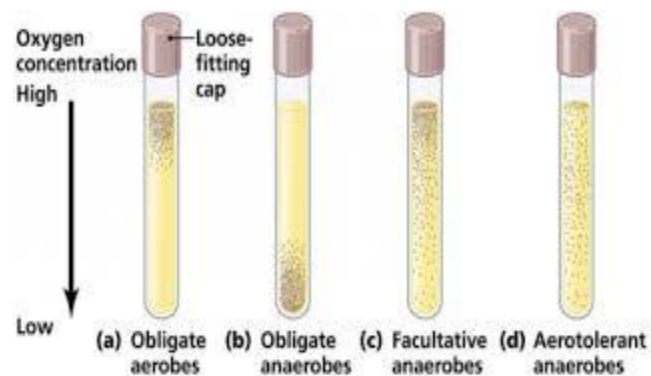
○ محیط های انتقالی

○ ظروف انتقالی سه لایه

Cary and Blair Transport Medium



Thioglycollate Broth



مشاهده < کیف حمل نمونه



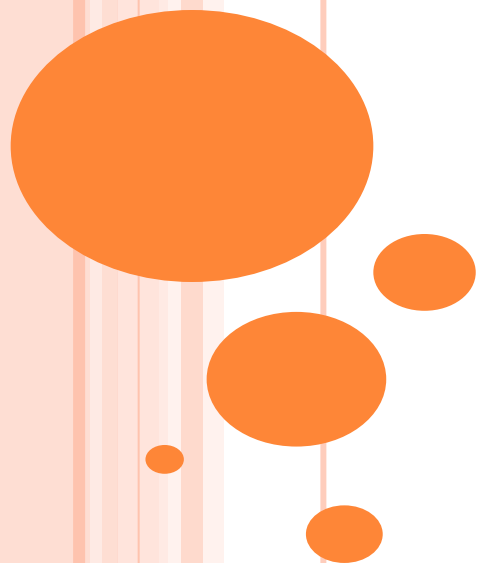
مشاهده < بیوجار (ظرف حمل نمونه عفونی)

مواد مصرفی مورد نیاز

- انواع رنگهای روتین
- انواع محیط های کشت
- انواع دیسکهای تشخیصی
- انواع دیسکهای آنتی بیوتیکی



معرف ها و رنگ ها و دیسک های تشخیصی



کنترل کیفی رنگ ها-معرف ها و آنتی سرماها

- معرفهای کاتالاز-کوآگولاز-اندول-متیل رد-اکسیداز و MR/VP باید هر روزی که مورد استفاده قرار میگیرند با کنترل مثبت و منفی چک شوند.
- رنگ گرم هنگام تهیه و نیز روزانه با باکتری گرم مثبت و گرم منفی کنترل شوند
- آنتی سرماها اولین بار که باز می شوند باید با کنترلهای مثبت و منفی چک شده و سپس ۶ ماهه کنترل مجدد شوند
- جهت کنترل معرفها از سویه های استاندارد که در جدول ذکر شده است استفاده شود.
- کنترل کیفی دیسک های تشخیصی در هر سری ساخت و خرید و هر ماه یکبار



رنگ آمیزی گرم

- دستورالعمل رنگ آمیزی گرم و آگاهی کارکنان
- تهیه لام رنگ آمیزی گرم برای نمونه های تنفسی، تناسلی، مایعات استریل، CSF، زخم، بافت و...
- تهیه لام از تمام کلنی های جدا شده از کشت مایعات استریل
- کنترل کیفی رنگ آمیزی گرم به طور روزانه و زمانی که یک سری ساخت جدید استفاده می شود،
- از آنجا که حفظ مشخصات سلولهای میزبان جهت تفسیر گستره های بالینی ضروری است بهترین روش برای رنگ آمیزی گستره های مستقیم، فیکس کردن با استفاده از متانول است. این امر با ممانعت از لیز گلبول های قرمز و تخریب سلول های میزبان موجب واضح تر شدن زمینه اسلاید می گردد که تفسیر نمونه را آسانتر میکند.



تست های تشخیصی

○ کاتالاز

○ اکسیداز

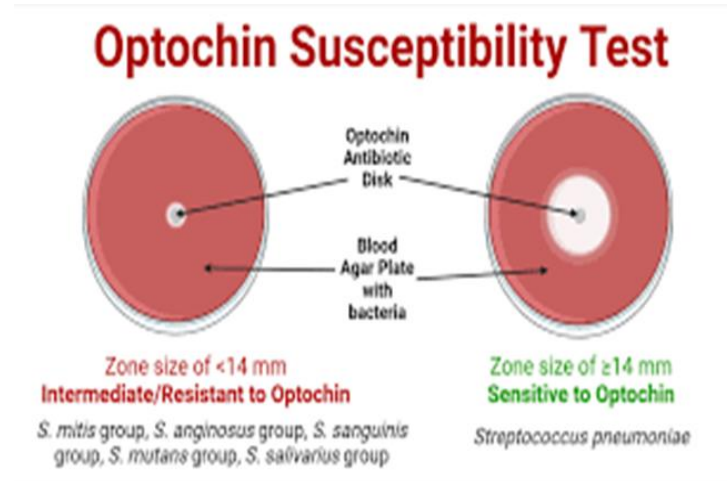
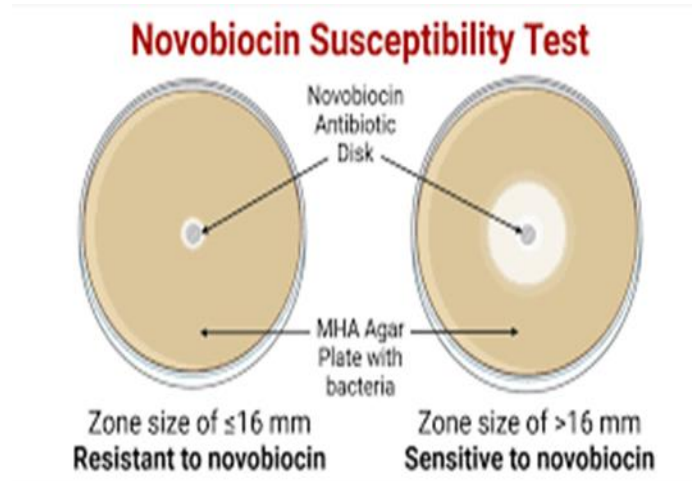
○ کواگولاز

○ اپتوشین

○ باسیتراسین

○ CAMP

○ نووبیوسین



Bacitracin, 0.04U	<i>Strep. pyogenes</i>	19615	هاله عدم رشد (بزرگتر از 10mm)	هر سری ساخت و خرید، سپس هر یک ماه
	<i>Strep. agalactiae</i>	12386	بدون هاله یا هاله کمتر از 10mm	
Catalase (3% H₂O₂)	<i>Staph. aureus</i>	25923	مثبت (ایجاد سریع حباب)	هر سری ساخت و خرید، سپس هر روز کاری
	<i>Strep. pyogenes</i>	19615	منفی (بدون حباب)	
Coagulase test	<i>Staph. aureus</i>	25923	مثبت (ایجاد لخته)	هر سری ساخت و خرید پلاسمای خرگوش، سپس هر روز کاری
	<i>Staph. epidermidis</i>	12228	منفی (عدم ایجاد لخته)	
Deoxycholate (10%) (Bile solubility test)	<i>Strep. pneumoniae</i>	6305	مثبت (حل شدن)	هر سری ساخت و خرید، سپس هر ۳ ماه
	<i>Ent. faecalis</i>	29212	منفی (حل نشدن)	
Ferric chloride (10%)	<i>Proteus mirabilis</i>	43071	مثبت (سبز رنگ)	هر سری ساخت و خرید، سپس هر ۳ ماه
	<i>E. coli</i>	25922	منفی (بدون تغییر رنگ)	
Indole (Kovacs)	<i>E. coli</i>	25922	مثبت (ارغوانی رنگ)	هر سری ساخت و خرید، سپس هر ۳ ماه
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13883	منفی (بدون تغییر رنگ)	
Methyl Red	<i>E. coli</i>	25922	مثبت (قرمز رنگ)	هر سری ساخت و خرید، سپس هر ۳ ماه
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13883	منفی (بدون تغییر رنگ)	



دفعات انجام آزمایش QC	نتیجه مورد انتظار	شماره ATCC	ارگانیسم کنترل	دیسک تشخیصی /معرف
هر سری ساخت و خرید، سپس هر یک ماه	حساس (قطر هاله عدم رشد $\geq 16\text{mm}$ برای دیسک 10mm و قطر هاله عدم رشد $\geq 14\text{mm}$ برای دیسک 6mm) مقاوم (بدون هاله عدم رشد)	6305 19615	<i>Strep. pneumoniae</i> <i>Strep. pyogenes</i>	Optochin, 5μg (in 5 to 10% CO ₂)
	مثبت (بنفش) منفی (بدون تغییر رنگ)	27853 25922	<i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i>	Oxidase
هر سری ساخت و خرید، سپس هر ۳ ماه	مثبت (صورتی پررنگ تا قرمز) منفی (صورتی کمرنگ یا بدون تغییر رنگ)	29212 25922	<i>Ent. faecalis</i> <i>E. coli</i>	PYR test
	مثبت (قرمز) منفی (بدون تغییر رنگ)	13047 25922	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>E. coli</i>	Voges- Proskauer
هر سری ساخت و خرید، سپس هر ۶ ماه	-	-	مطابق دستورالعمل کنترل کیفیت هر آنتی سرم	Antisera



جدول ۱- استانداردهای کنترل کیفیت رنگ ها و محیط های کشت

دفعات انجام آزمایش QC	نتیجه مورد انتظار	شماره ATCC	ارگانیسم کنترل	رنگ / محیط کشت
هر سری ساخت و خرید، سپس هر روز کاری	باسیل صورتی-قرمز	25177	<i>M. tuberculosis</i> (or BCG)	Acid-Fast (Ziehl-Neelsen)
	باسیل آبی	25922	<i>E. coli</i>	
هر سری ساخت و خرید، سپس حداقل یک بار در هفته	کوکسی بنفش	25923	<i>Staph. aureus</i>	Gram
	باسیل صورتی	25922	<i>E. coli</i>	
هر سری ساخت و خرید، سپس هر یک ماه	باسیل های پلی مورف آبی رنگ با دانه های متاکروماتیک	-	<i>Corynebacterium spp.</i>	Methylene Blue
	باسیل آبی	25922	<i>E. coli</i>	
	مشاهده نشدن باکتری		Saline	
هر سری ساخت و خرید، سپس هر ۶ ماه	-	-	مطابق دستورالعمل کنترل کیفیت هر محیط کشت	Dehydrated Culture Media
هر سری ساخت و خرید	-	-	مطابق دستورالعمل کنترل کیفیت هر محیط کشت	Commercially Prepared Culture Media

Ninhydrin (Hippurate hydrolysis test)	<i>Strep. agalactiae</i>	12386	مثبت (آبی پررنگ)	هر سری ساخت و
	<i>Strep. pyogenes</i>	19615	منفی (بنفش کمرنگ یا بدون تغییر رنگ)	خرید، سپس هر ۳ ماه
Novobiocin, 5µg, on BAP or MH agar	<i>Staph. aureus</i>	25923	≥22 mm	هر سری ساخت و
	<i>Staph. saprophyticus</i>	15305	≤15 mm	خرید، سپس هر یک ماه
ONPG	<i>E. coli</i>	25922	مثبت (زرد رنگ)	هر سری ساخت و
	<i>Proteus mirabilis</i>	29245	منفی (بدون تغییر رنگ)	خرید، سپس هر ۳



کاتالاز

- - تشخیص استافیلوکوک و میکروکوک (کاتالاز مثبت) از استرپتوکوک (کاتالاز منفی)
- - افتراق کلستریدیوم از باسیلوس ها (کاتالاز مثبت)
- - افتراق لیستریامونوسیتوژنز (کاتالاز مثبت) از استرپتوکوک بتاهمولیتیک
- پراکسید هیدورژن باید هر روز یا قبل از تست نمودن باکتری مجهول با سوش های کنترل مثبت و منفی تست شود.
- سوش کنترل مثبت : aureus. Staphylococcus
- سوش کنترل منفی : pyogenes. Streptococcus



کواگولاز

- لامی
- لوله ای
- پلاسمای خرگوش



اکسیداز

- جداسازی انتروباکتریاسه ها (که همه اکسیداز منفی هستند) از باکتری هایی مثل ویبریوناسه، آئروموناس، سودوموناس، نیسریا، کمپیلوباکتر و پاستورلا (که همه اکسیداز مثبت اند) - شناسایی ارگانسم هایی که فاقد آنزیم سیتوکروم اکسیدازند یا بی هوازی اجباری می باشند.
- در باکتری های اکسیداز مثبت در محل تلقیح کلنی در عرض ۱۰ ثانیه رنگ آبی تیره (مایل به بنفش) ایجاد می شود (زمان بسیار مهم است). اما باکتری های اکسیداز منفی در عرض ۱۰ ثانیه بیرنگ باقی می ماند. باکتری هایی که در مدت ۶۰ - ۱۰ ثانیه رنگ بنفش ایجاد می کنند، نیاز به انجام تست های بیشتری دارند، زیرا احتمالاً متعلق به خانواده آنتروباکتریاسه نمی باشند.
- کنترل کیفی باید برای هر سری جدید و هر زمان که این تست انجام می شود، صورت گیرد.
- نباید از محیط های کشت رنگی مثل مک کانکی استفاده شود زیرا نتیجه مثبت کاذب می دهد. - برای انتقال باکتری روی کاغذ صافی یا دیسک اکسیداز نباید از لوپ فلزی مثل استیل یا نیکروم استفاده شود، زیرا بر اثر سوزاندن لوپ، مقدار کمی اکسید آهن بر روی آن ایجاد می شود، که ممکن است نتیجه مثبت کاذب دهد.

دیسک نووبیوسین جهت افتراق استافیلوکوکهای کوآگولاز منفی

- تعیین حساسیت به نووبیوسین، جهت غربالگری استافیلوکوکهای کوآگولاز منفی جدا شده از کشت‌های ادرار، بکار می‌رود.
- **saprophyticus.S** به نووبیوسین مقاوم بوده و هاله عدم رشد ۶mm تا ۱۲mm ایجاد میکند. – سایر استافیلوکوکهای کوآگولاز منفی و **aureus.S**، به نووبیوسین حساس بوده و هاله عدم رشد ۱۶mm یا بزرگتر ایجاد می‌کنند.



CAMP

- شناسایی و افتراق استرپتوکوک گروه (B آگالاکتیه) از سایر استرپتوکوکها
- استرپتوکوک گروه B پروتئین خارج سلولی به نام factor CAMP ترشح می نماید که با بتا لیزین استافیلوکوک اورئوس بصورت سینرژیک عمل نموده و سبب افزایش لیز گلبول های قرمز خون می شود.
- حساسیت این تست بسیار بالا است و حتی سویه های بدون همولیز استرپتوکوک گروه B در ۱۰٪ موارد، CAMP مثبت می باشند.
- اگر پلیت تست در کندل جار یا اتو CO₂ و یا در شرایط بی هوازی انکوبه شود بعضی از استرپتوکوک های گروه A ایجاد واکنش CAMP مثبت می کنند، بنابراین پلیت تست، باید حتماً در حضور O₂ اتوو گذاری شود.
- سویه کنترل مثبت: استرپتوکوک گروه B سویه کنترل منفی: استرپتوکوک گروه A و استرپتوکوک بوویس



حساسیت به باسیتراسین و SXT

- استرپتوکوک بتاهمولیتیک گروه A به دیسک باسیتراسین حساس ولی به تریمتوپریم - سولفامتوکسازول SXT مقاوم است. استرپتوکوک بتاهمولیتیک گروه B به هر ۲ آنتی بیوتیک مقاوم است



حساسیت به باسیتراکسین

- افتراق میکروکوک و استوماتوکوک از استافیلوکوک
- می توان از محیط بلاد آگار یا مولر هیتتون آگار استفاده نمود. بعد از یک شبانه روز انکوباسیون، قطر هاله عدم رشد اندازه گرفته می شود، استافیلوکوک ها به باسیتراکسین مقاومند و هیچ هاله عدم رشدی مشاهده نمی شود. اما میکروکوک ها به آن حساسند. (قطر هاله عدم رشد $< 10 \text{ mm}$)



روش تهیه معرف MR

○ پودر متیل رد : $1/0$ g

○ اتانول : 300 ml

پودر متیل رد را در اتانول حل کرده، با آب مقطر حجم آنرا به 500 ml برسانید.
➤ معرف را در ظرف تیره و در یخچال نگهداری کنید.



روش تهیه معرف های VP

❖ تهیه α نفتول (معرف A):

○ پودر α نفتول : ۵ g

○ اتانول : ۱۰۰ ml

❖ تهیه KOH (معرف B):

○ KOH : ۴۰ g

○ کراتین : ۳/۰ g

○ آب مقطر : ۱۰۰ ml

➤ معرفها را در ظروف تیره و در یخچال نگهداری کنید.



روش تهیه معرف کواکس

○ P- دی متیل آمینو بنزآلدئید : ۱۰g

○ ایزوآمیل الکل : ۱۵۰ ml

○ اسید کلریدریک غلیظ و تازه : ۵۰ ml

P- دی متیل آمینو بنزآلدئید را به آمیل الکل اضافه نموده و به آرامی اسید کلریدریک را به آنها اضافه نمایید.

برای تهیه این معرف از هود استفاده نمایید.

➤ معرف را در ظرف تیره و در یخچال نگهداری کنید.



روش تهیه معرف کلرور فریک

- ❖ روش غیر اسیدی :
- کلرور فریک : ۱۰g
- آب مقطر : ۱۰۰ ml
- ❖ روش اسیدی :
- کلرور فریک : ۱۲ g
- اسید کلریدریک غلیظ : ۵/۲ ml
- آب مقطر : ۱۰۰ ml
- معرف را در ظرف تیره و در یخچال نگهداری کنید.



روش تهیه معرف اکسیداز

- تترا متیل - P - فنیلن دی آمین هیدروکلراید : ۱ g
- آب مقطر : ۱۰۰ ml
- یک گرم از پودر مورد نظر را در کمتر از ۱۰۰ ml آب مقطر حل کنید، به آرامی حرکت دهید، حجم را به ۱۰۰ ml برسانید. ۱۵ دقیقه ثابت نگه دارید. در ویال های کوچک تقسیم کنید و فریز کنید.



روش تهیه معرف کاتالاز (3% H₂O₂)

- محلول آب اکسیژنه ۳۰٪ را به نسبت ۱:۱۰ با آب مقطر رقیق کنید تا محلول آب اکسیژنه ۳٪ حاصل شود.
- معرف را در ظرف تیره و در یخچال نگهداری کنید.



روش تهیه کریستال ویوله

❖ تهیه کریستال ویوله ذخیره :

○ پودر کریستال ویوله : ۲۰ g

○ اتانول : ۱۰۰ ml

❖ هنگام مصرف محلول کریستال ویوله ذخیره را به نسبت ۱۰:۱ با آب مقطر رقیق کنید، سپس محلول حاصل را با ۴ حجم از محلول اگزالات آمونیم رقیق کنید.

➤ محلول ذخیره و مصرفی کریستال ویوله را در ظروف تیره و در دمای اتاق نگهداری کنید.



روش تهیه لوگل

○ ید : 1 g

○ یدور پتاسیم : 2 g

○ محلول آبی بیکربنات سدیم 5 % : 60 ml

○ آب مقطر : 240 ml

در مقدار کمی از آب مقطر، ید و یدور پتاسیم را کاملاً حل کرده، حجم را با آب مقطر به 240 ml برسانید. 60 ml محلول 5 % بیکربنات سدیم را نیز به آن اضافه نمایید.

➤ محلول را در ظرف تیره و در دمای اتاق نگهداری کنید.



روش تهیه محلول الكل - استن

○ اتانول : ۲۵۰ ml

○ استن : ۲۵۰ ml

حجم مساوی از اتانول را با استن مخلوط نمایید.



روش تهیه فوشین یا سافرانین ذخیره

○ پودر فوشین : ۲ g

○ اتانول : ۱۰۰ ml

و یا

○ پودر سافرانین : ۲.۵ g

○ اتانول : ۱۰۰ ml

هنگام مصرف محلول ذخیره فوشین یا سافرانین را به نسبت ۱۰:۱ با آب مقطر رقیق کنید.

➤ محلول های ذخیره و مصرفی را در ظروف تیره و در دمای اتاق نگهداری کنید.



محیط سازی



آب مصرفی در بخش میکروبیشناسی

- وجود دستورالعمل کنترل کیفیت آب مصرفی
- آگاهی کارکنان از دستورالعمل
- سوابق سنجش هدایت الکتریکی
- سوابق بررسی عدم آلودگی میکروبی
- سوابق اندازه گیری PH برای آب درجه ۳
- مناسب ترین آب برای محیط سازی درجه ۲ (دیونیزه)



نکات مهم در رابطه با محیطهای کشت

- دقت در خرید (حتما تاریخ دار باشد - از شرکتهای معتبر خریداری شود)
- دقت در نگهداری پودرها
- دقت در تهیه محیط در آزمایشگاه
- دقت در نگهداری محیطهای تهیه شده
- کنترل عملکرد محیط کشت
- به میزان نیاز شش ماه تا یک سال خریداری شود
- نام کارخانه و تاریخ خرید و سریال پودر ثبت شود



نکات مهم در نگهداری پودرها

- در جای خشک نگهداری شوند
- در دمای کمتر از ۲۵ درجه نگهداری شوند
- محیطهای حاوی رنگ در فضای تاریک قرار گیرند
- محل نگهداری نباید رطوبت داشته باشد
- میزان مصرف دو ماه از ذخیره در دسترس باشد



تهیه 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 تهیه محیط کشت درج گردیده است.
- این دستورالعمل ها بر حسب نوع محیط کشت و شرکت تولید کننده متفاوت است.



توزین پودر محیط کشت

- در تهیه 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 و به دقت وزن کنید.
- درب قوطی محیط کشت را هر چه سریعتر ببندید.



افزودن آب

- نصف حجم آب مورد نیاز را داخل ظرف بریزید، سپس مقدار توزین شده محیط کشت را به آن اضافه نمایید و برای چند دقیقه به تندی تکان دهید.
- باقیمانده 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.
- اندازه ظرف برابر با ۲ تا ۳ برابر حجم نهایی محیط کشت در نظر گرفته شود تا بتوان آنرا بخوبی تکان داد و مخلوط نمود.



حل کردن پودر محیط کشت

- محیط های کشت فاقد آگار معمولاً 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 121°C انجام می گیرد.
توصیه می شود مقادیر زیاد محیط کشت را در حجم های کوچکتر تقسیم نمایید.

□ 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 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ یا $0.45\text{ }\mu\text{m}$ استفاده کنید.
این فیلترها قبل از استفاده باید در اتوکلاو استریل شوند.



روش تهیه انواع محیطهای حاوی قندها

- از قند مورد نظر، محلول ۱۰٪ تهیه نمایید.
- در صورت امکان محلول های قندی را به روش فیلتراسیون، استریل نمایید.
- در غیر اینصورت، انواع لاکتوز، مالتوز، زایلوز، ساکاروز، ترهالوز، آرابینوز و سالیسین را در دمای 121°C ، فشار **15 lb** به مدت ۳ دقیقه استریل نمایید. سایر قندها را در دمای $116-118^{\circ}\text{C}$ فشار **10-12 lb** به مدت ۱۵ دقیقه استریل نمایید.
- اضافه کردن به محیط پایه اتوکلاو شده
- تقسیم کردن در لوله های استریل شده



نکات مهم در تهیه محیط کشت

- از محیط تغییر رنگ داده و به هم چسبیده استفاده نشود
- از ترازوی مناسب استفاده شود
- از یک سریال تهیه گردد
- ظروف تهیه محیط باید عاری از دترجنت باشد (آبکشی شود)
- موقع حرارت سر نرود
- به شکل مناسب استریل شوند (محیط اوره یا قند با فیلتراسیون)
- محیط انتخابی نیاز به اتوکلاو ندارند مانند سلنیت یا S.S
- در حرارت مناسب خون اضافه شود (۵۰-۴۵ برای بلاداگار و ۸۰ درجه برای شکلات)
- مقدار و نوع خون مناسب باشد
- ۷-۵ درصد خون برای بلاداگار (خون گوسفندی استفاده شود)
- آنتروککها و استرپتوککهای گروه D در بلاداگار با خون گوسفند همولیز آلفا میدهند در حالیکه در خون انسان و خرگوش واسب همولیز بتا میدهند

اندازه گیری و تنظیم PH

- اگر محیط های کشت دهیدراته بطور مناسب تهیه شوند، نیازی به تنظیم PH توسط مصرف کننده نیست.
- PH نهایی محصول استریل شده را می توان روی پلیت یا بطری اندازه گیری کرد، اما باید آن را پس از سنجش PH دور ریخت.
- پس از استریل و خنک شدن محیط کشت تا دمای 25°C ، مقدار PH را در حد مورد نظر (± 0.2) تنظیم کنید.
- تنظیم PH معمولاً با استفاده از NaOH و یا با استفاده از HCl انجام می شود.



○ تقسیم محیط های کشت

- اجازه دهید محیط خنک شود-حدود ۴۰درجه
- شرایط استریل رعایت شود
- به مقدار مناسب در پلیت یا لوله ریخته شود
- هنگام ریختن کف ایجاد نشود
- در محلی آرام و بدور از کوران هوا(باد کولر) تقسیم شود



آماده سازی جهت مصرف

- بعد از استریلیزاسیون و پس از آنکه دمای محیط کشت به حدود 50°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 50°C رسید، در شرایط آسپتیک به آن اضافه نمود.
- دمای مکمل (سایلمنت) استریل نیز باید قبل از افزودن به محیط کشت به دمای اتاق برسد.
- جهت کنترل استریل بودن پلیتها، ۳-۵٪ آنها را برای ۲۴ ساعت انکوبه کنید.



کنترل کیفیت محیط کشت

- کنترل (PH) در شرایط عادی لازم نیست.

- کنترل استریل بودن محیط:

- قرار دادن ۳ تا ۵ درصد از محیطهای تهیه شده در ۳۵ درجه به مدت ۵-۳ روز
- قرار دادن تعدادی از محیطها در حرارت اتاق



ذخیره سازی

- محیط های کشت آماده شده را سریعاً مصرف نموده یا تحت شرایطی که محتویاتشان تغییر نکند یعنی دور از نور و در دمای یخچال ذخیره نمایید.
- در صورت بسته بندی پلیتها در کیسه های پلاستیکی، زمان نگهداری آنها افزایش می یابد. برای جلوگیری از تجمع رطوبت در پلیتها، آنها را قبل از قرار دادن در کیسه، خنک کنید.
- برای تلقیح سطحی محیط کشت جامد، سطح پلیت مربوطه باید خشک باشد.



نگهداری محیطهای کشت تهیه شده

- محیطها در ۲ تا ۸ درجه نگهداری شوند
- محیط تایو در حرارت اتاق نگهداری شود
- محیطها در کیسه پلاستیکی تا ۴ هفته قابل مصرفند
- لوله های در پیچ دار حاوی محیط تا سه ماه قابل مصرفند
- لوله های حاوی محیط با در پنبه ای تا دو هفته قابل مصرفند
- اگر درب لوله های پیچ دار شل باشد تا دو هفته قابل مصرفند



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

➤ (۱) ثبت اطلاعات محیط های کشت

➤ (۲) بررسی ظاهری

➤ (۳) بررسی آلودگی

➤ (۴) انجام آزمایش کنترل کیفیت



۱. محیط های آماده مصرف تجاری:

منبع تهیه آن (شرکت سازنده)، شماره ساخت، تاریخ انقضاء، تاریخ دریافت، تاریخ شروع به استفاده

نگهداری هر محیط مطابق دستورالعمل سازنده

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

مقدار محیط ساخته شده، منبع تهیه آن، شماره ساخت، روش استریل نمودن آن، تاریخ ساخت، pH، تاریخ شروع به استفاده از آن، تاریخ انقضاء و نام فرد سازنده آن ثبت



- 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
- پر شدن ناصاف پلیت ها
- مقدار ناکافی آگار در پلیت ها (کمتر از ۳mm عمق) و لوله ها (عمق و سطح ناکافی)
- وجود همولیز در محیط های حاوی خون
- تغییر در رنگ مورد انتظار برای هر محیط (احتمال وجود مشکل در pH محیط)
- وجود حباب یا ناهمواری در سطح محیط
- رطوبت اضافی یا از دست رفتن آب محیط
- آلودگی قابل مشاهده
- وجود رسوب



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

مشکلات	علل ممکن
رنگ یا تیرگی غیر طبیعی محیط کشت (Abnormal color/darkening)	- آب ناخالص - ظروف شیشه‌ای کثیف - افت کیفیت محیط کشت دهیدراته - حرارت زیاد یا نادرست در طی استرایلیزاسیون - pH اشتباه یا تغییر و انحراف pH - حل نشدن کامل محیط کشت - 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)	- آب ناخالص یا ظروف شیشه‌ای کثیف - حرارت زیاد در طی استرایلیزاسیون - ذوب مجدد یا ذخیره‌سازی طولانی مدت در دمای ۵۰°C - آلودگی شیمیایی - کالیبراسیون نادرست pH متر - حل نشدن کامل محیط کشت - اندازه‌گیری pH در دمای بالای ۲۵°C - افت کیفیت محیط کشت دهیدراته - ذخیره‌سازی نادرست یا بیش از نیمه عمر محیط کشت دهیدراته - کیفیت پایین آب یا ظروف





مشکلات	علل ممکن
ایجاد رسوب یا کدورت (Percipitation/Turbidity)	- حرارت بیش از اندازه در طی استریلیزاسیون - ذخیره سازی طولانی مدت (بیش از ۴ ساعت) در حالت مذاب (بیش از 50°C) - افت کیفیت محیط کشت دهیدراته - pH اشتباه - آب ناخالص یا ظروف شیشه ای کثیف - حل نشدن کامل محیط کشت - داغ بودن محیط کشت در هنگام افزودن مکمل به آن - کیفیت پایین آب یا ظروف
سمیت (Toxicity)	- حرارت بیش از اندازه در طی استریلیزاسیون - افت کیفیت محیط کشت دهیدراته - قرارگیری در معرض نور مستقیم خورشید - حجم اشتباه مکمل اضافه شده
رشد باکتریولوژیک ضعیف یا اثر روی خواص انتخابی / افتراقی	- توزین یا مخلوط کردن نادرست - آب یا ظروف آلوده - مواد مهارکننده در آب یا ظروف - افت کیفیت محیط کشت دهیدراته - داغ بودن محیط کشت در هنگام افزودن مکمل به آن - داغ بودن محیط کشت در هنگام کشت نمونه بر روی آن - ذخیره سازی طولانی مدت محیط کشت - خشک شدن بیش از حد سطح محیط کشت - حل نشدن کامل محیط کشت - تیرگی محیط کشت و تغییر و انحراف pH - حرارت بیش از اندازه و طولانی مدت
شل بودن آگار (Soft agar)	- حرارت بیش از اندازه (به ویژه در مقایر pH پایین) - هیدرولیز اسید در محیط کشت یا pH پایین - توزین یا مخلوط کردن نادرست - حل نشدن کامل آگار - حجم نادرست آب - رقیق سازی زیاد با مایه تلقیح یا مکمل های محیط کشت - ذخیره سازی طولانی مدت در دمای 50°C

تعداد

برای batch های ۱۰۰ تا یا کمتر، به تعداد ۵٪ نمونه

برای batch های بیشتر از ۱۰۰ تا، ۱۰ نمونه

انتخاب تصادفی

انکوباسیون

به مدت ۴۸ ساعت در دمایی که استفاده خواهند شد (معمولا 35 ± 2)

و سپس به مدت ۴۸ ساعت دیگر در دمای اتاق



بررسی هر محیط کشت از نظر میزان رشد قابل قبول و/یا خصوصیت مهارکنندگی، با میکروارگانیسم های کنترل مناسب

A. محیط های کشت غیر انتخابی

B. محیط های کشت انتخابی

C. محیط های لوله ای

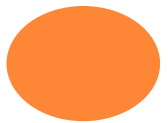
D. محیط های بیوشیمیایی

E. محیط های انتقالی



بررسی عملکرد محیط های کشت TESTING PERFORMANCE

- آزمایش **ظرفیت مغذی بودن** محیط های کشت پلیتی غیرانتخابی مانند بلاد آگار سوسپانسیون اولیه را به نسبت ۱ به ۱۰۰ در نرمال سالین یا آب مقطر استریل رقیق نموده و مقدار $10 \mu\text{l}$ یا 0.1 ml سوسپانسیون رقیق شده را به محیط کشت مورد آزمایش تلقیح کنید. تعداد کلنی های مورد انتظار در پلیت (10^3 - 10^4) می باشد. برای اجتناب از رشد زیاد باکتری در بعضی از محیطهای کشت ۳ انتخابی ممکن است نیاز باشد که سوسپانسیون را ده بار رقیق تر تهیه نمایید.
- آزمایش **ظرفیت مهار کنندگی** محیط های کشت پلیتی انتخابی مانند مکانکی آگار سوسپانسیون اولیه را به نسبت ۱ به ۱۰ در نرمال سالین یا آب مقطر استریل رقیق نموده و مقدار $10 \mu\text{l}$ یا 0.1 ml سوسپانسیون رقیق شده را به محیط کشت مورد آزمایش تلقیح کنید. تعداد کلنی های مورد انتظار در پلیت (10^4 - 10^5) می باشد. برای اجتناب از رشد زیاد باکتری در بعضی از محیطهای کشت ۴ انتخابی ممکن است نیاز باشد که سوسپانسیون ده بار رقیق تر تهیه شود.



بررسی مغذی بودن محیط کشت غیر انتخابی performance Test

○ تهیه سوسپانسیون از کشت تازه و خالص هر سویه کنترل در سرم فیزیولوژی استریل مطابق کدورت استاندارد نیم مک فارلند ($10^7 - 10^8$ cfu/mL)

- رقیق سازی این سوسپانسیون در سرم فیزیولوژی استریل به نسبت ۱:۱۰۰
- تلقیح (0.01 mL) 10 µl از رقت بدست آمده روی هر پلیت مورد آزمون، و کشت به گونه ای که کلنی های ایزوله به دست آید
- اگر با تلقیح رقت ۱:۱۰۰ روی پلیت کلنی های متراکم رشد کند، برای ایجاد کلنی های ایزوله از رقت ۱:۱۰۰۰ استفاده کنید.
- انکوباسیون پلیتها تفسیر:
- کیفیت یک محیط غیر انتخابی زمانی قابل قبول است که سویه های کنترل روی آن محیط رشد کافی داشته و اندازه و مورفولوژی کلنی ها متناسب با نتایج مورد انتظار باشد.

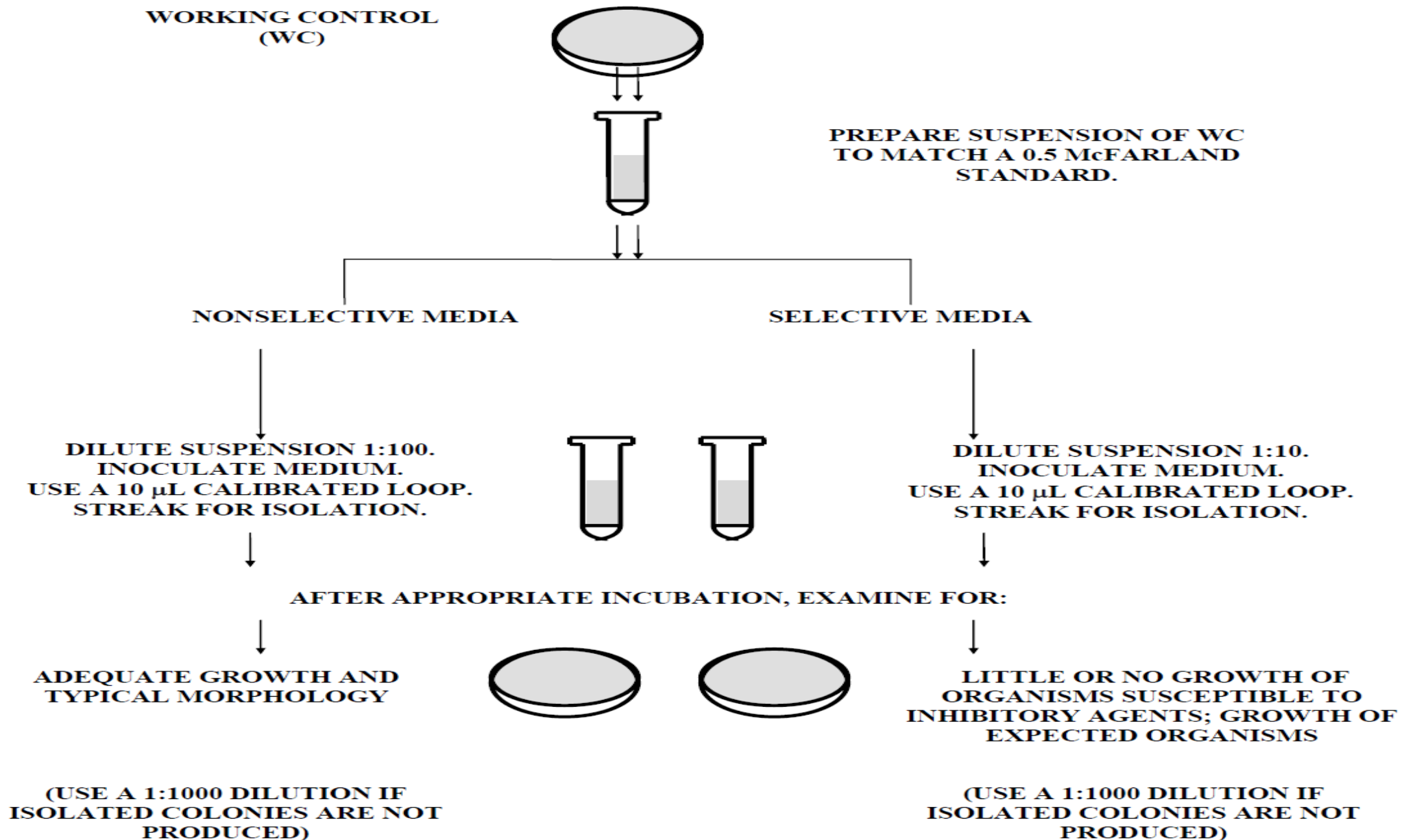


بررسی مهارکنندگی محیط کشت انتخابی

تهیه سوسپانسیون از کشت تازه و خالص هر سویه کنترل در سرم فیزیولوژی استریل مطابق کدورت استاندارد نیم مک فارلند ($10^7 - 10^8$ cfu/mL)

- رقیق سازی این سوسپانسیون در سرم فیزیولوژی استریل به نسبت ۱:۱۰
- تلقیح (0.01 mL) 10μ L از رقت بدست آمده روی هر پلیت مورد آزمون، و کشت به گونه ای که کلنی های ایزوله بدست آید
- اگر با تلقیح رقت ۱:۱۰ روی پلیت کلنی های متراکم رشد کند، برای ایجاد کلنی های ایزوله از رقت ۱:۱۰۰ استفاده کنید.
- انکوباسیون پلیتها تفسیر:
- کیفیت یک محیط انتخابی زمانی قابل قبول است که سویه های کنترل روی آن محیط رشد کافی داشته، اندازه و مورفولوژی کلنی ها متناسب با نتایج مورد انتظار باشد، ضمن اینکه رشد بعضی از سویه ها را مهار کند.





بررسی کیفیت محیط های کشت لوله ای

روش انجام آزمایش:

- تهیه سوسپانسیون از کشت تازه و خالص هر سویه کنترل در سرم فیزیولوژی استریل مطابق کدورت استاندارد نیم مک فارلند ($10^7 \times 1 - 10^8$ cfu/mL)
- تلقیح (0.1mL) $10\text{ }\mu\text{l}$ سوسپانسیون در محیط لوله ای بدون رقیق نمودن
- انکوباسیون لوله ها

○ تفسیر:

- کیفیت محیط های لوله ای زمانی قابل قبول است که سویه های کنترل روی آن رشد کافی داشته باشند



کنترل کیفیت محیط های بیوشیمیایی

○ از کلونی باکتری کنترل مثبت و کنترل با آنس برداشت کرده

- تلقیح و سپس انکوباسیون هر محیط مطابق روشی که بصورت معمول از آن استفاده می شود

○ تفسیر:

- کیفیت محیط های بیوشیمیایی زمانی قابل قبول است که سویه های کنترل روی آن رشد کافی داشته باشند و با سویه های کنترل مثبت و کنترل منفی واکنشهای بیوشیمیایی مورد انتظار ایجاد گردد.



کنترل کیفیت محیط های انتقالی

- تهیه سوسپانسیون از کشت تازه و خالص هر سویه کنترل در سرم فیزیولوژی استریل مطابق کدورت استاندارد نیم مک
- فرو بردن یک سواب استریل در این سوسپانسیون، با فشردن به دیواره لوله آب اضافی آن را خارج کنید. سواب را در محیط انتقالی غوطه ور نمایید.
- انکوباسیون محیط در دمای اتاق
- سپس کشت سواب روی محیط پلیتی مناسب

○ تفسیر:

- وجود رشد کافی



○ دلایل عدم استفاده از خون انسان در ساخت محیط کشت

- ضد انعقاد اکسالات و یا سترات در کیسه خون برای استرپها سمی اند
- امکان وجود آنتی بیوتیک در خون
- امکان وجود آنتی استرپتولیزین O در خون انسان و در نتیجه ممانعت از فعالیت همولیزی استرپ بتا همولیتیک
- وجود گلوکز در خون باعث افزایش اسید و در نتیجه مانع تولید همولیزین توسط استرپ



کنترل کیفی محیط کشت

E.coli ATCC25922 •

E.M.B-Macconkey-T.S.I-XLD-MA/VP –

Gram stain –

Staph.ATCC 25923 •

Coagulase-indol-catalase-DNase –

Staph.epidermitis •

Control negative of coagulase and DNase –

Strep pyogenes •

Beta hemolyse-Bacitracin –

Strep.groupB •

CAMP-sodium hyporate- and negative control for Bacitracine –

Strep. Group D •

Bile sculin and negative control for starch hydrolysis –



محیط کشت	شرایط ، مدت زمان و دمای انکوباسیون	سویه های کنترل کیفی (شماره ATCC)	نتایج مورد انتظار
Blood Agar	هوازی یا وجود CO ₂ ۳۵°C ، ۱۸-۲۴ ساعت	S.pyogenes (19615) S.pneumoniae (6305) S.aureus (25923) E.coli (25922)	رشد ، باهمولیز بتا رشد ، باهمولیز آلفا رشد رشد
Brain Heart Infusion (BHI) Agar	هوازی یا وجود CO ₂ ۳۵°C ، ۱۸-۲۴ ساعت	S.pyogenes (19615) S.pneumoniae (6305) S.aureus (25923) S.flexneri (12022)	رشد رشد رشد رشد
Nutrient Agar(NA)	هوازی یا وجود CO ₂ ۳۵°C ، ۱۸-۲۴ ساعت	E.faecalis (29212) E.coli (25922) P.aeruginosa (27853)	رشد رشد رشد
Tryptic Soy Agar(TSA)	هوازی یا وجود CO ₂ ۳۵°C ، ۱۸-48 ساعت	S.pyogenes (19615) S.aureus (25923) E.coli (25922)	رشد رشد رشد



محیط کشت	شرایط، مدت زمان و دمای انکوباسیون	سویه های کنترل کیفی (شماره ATCC)	نتایج مورد انتظار
Eosin Methylen Blue (EMB) Agar	هوازی ۳۵°C، ۱۸-۲۴ ساعت	<i>S.Typhimurium</i> (14028) <i>S flexneri</i> (12022) <i>E.coli</i> (25922) <i>E.faecalis</i> (29212)	رشد، کلنی های بی رنگ تا کهربایی رشد، کلنی های بی رنگ تا کهربایی رشد، کلنی های آبی سیاه با درخشش سبز متالیک مهار رشد (جزئی)
Hektoen Enteric (HE) Agar	هوازی ۳۵°C، ۱۸-۲۴ ساعت	<i>S.Typhimurium</i> (14028) <i>S flexneri</i> (12022) <i>E.coli</i> (25922) <i>E.faecalis</i> (29212)	رشد، کلنی های آبی تا سبز_آبی با مرکز سیاه رشد، کلنی های سبز تا آبی_سبز مهار رشد (جزئی تا کامل); کلنی های زرد تا نارنجی رنگ مهار رشد (جزئی); کلنی های زرد
MacConkey Agar	هوازی ۳۵°C، ۱۸-۲۴ ساعت	<i>E.coli</i> (25922) <i>P.mirabilis</i> (12453) <i>S.Typhimurium</i> (14028) <i>E.faecalis</i> (29212)	رشد، کلنی های صورتی رنگ رشد، کلنی های بی رنگ، مهار جزئی سوآرمینگ رشد، کلنی های بی رنگ مهار رشد (جزئی)
Thiosulfate Citrate Bile Sucrose (TCBS) Agar	هوازی ۳۵°C، ۱۸-۲۴ ساعت	<i>V.cholerae</i> <i>V.parahaemolyticus</i> <i>E.coli</i> (25922) <i>P.mirabilis</i> (12453) <i>P.aeruginosa</i> (27853)	رشد، کلنی های زرد رنگ رشد، کلنی های سبز آبی مهار رشد مهار رشد مهار رشد
Xylose Decarboxylate (XLD) Agar	هوازی ۳۵°C، ۲۴ ساعت	<i>S.Typhimurium</i> (14028) <i>S flexneri</i> (12022) <i>E.faecalis</i> (29212) <i>E.coli</i> (25922)	رشد، کلنی های قرمز با مرکز سیاه رشد، کلنی های قرمز مهار رشد (جزئی) مهار رشد (جزئی تا کامل); کلنی های زرد تا زرد_قرمز



نتایج مورد انتظار	سویه های کنترل کیفی (شماره ATCC)	شرایط ، مدت زمان و دمای انکوباسیون	محیط کشت
رشد روی ساب کالچر رشد روی ساب کالچر رشد روی ساب کالچر مهار رشد (جزئی تا کامل) روی ساب کالچر	S.Typhimurium(14028) S flexneri (12022) E.coli (25922) E.faecalis (29212)	هوازی ۳۵°C ، ۱۸-۲۴ ساعت	GN Broth
رشد روی ساب کالچر رشد یا امکان مهار رشد روی ساب کالچر مهار رشد (جزئی تا کامل) روی ساب کالچر	S.Typhimurium(14028) S.flexneri (12022) E.coli (25922)	هوازی ۳۵°C ، ۱۸-۲۴ ساعت	Selenite Broth
رشد روی ساب کالچر رشد روی ساب کالچر رشد روی ساب کالچر	V.cholerae Ogawa V.cholerae Inaba V.parahaemolyticus	هوازی ۳۵°C ، ۱۸-۲۴ ساعت	Alkaline Peptone Water



نتایج مورد انتظار				سویه های کنترل کیفی (شماره ATCC)	شرایط ،مدت زمان و دمای انکوباسیون	محیط کشت
H2S	گاز	عمق/سطح	رشد	<i>E.coli</i> (25922) <i>S.Typhimurium</i> (14028) <i>S flexneri</i> (12022) <i>P.mirabilis</i> (12453) <i>P.aeruginosa</i> (27853)	هوازی ۳۵°C ، ۱۸-۲۴ ساعت	Kligler Iron Agar (KIA)
-	+	Acid/Acid	خوب			
+	+	Alk/Acid	خوب			
-	-	Alk/Acid	خوب			
+	-	Alk/Acid	خوب			
-	-	Alk/Inet	خوب			
H2S	دآمیناسیون (سطح)	دکربوکسیلاسیون (عمق)	رشد	<i>E.coli</i> (25922) <i>S.Typhimurium</i> (14028) <i>S flexneri</i> (12022) <i>P.mirabilis</i> (12453)	هوازی ۳۵°C ، ۱۸-۲۴ ساعت	Lysine Iron Agar (LIA)
-	-(بنفش)	-(زرد)	خوب			
+	-(بنفش)	+(بنفش)	خوب			
-	-(بنفش)	-(زرد)	خوب			
+	+(قرمز)	-(زرد)	خوب			
VP		MR	رشد			
-(زرد)		+(قرمز)	خوب			
+(قرمز)		-(زرد)	خوب			
حرکت	اندول	H2S	رشد	<i>E.coli</i> (25922) <i>S.Typhimurium</i> (14028) <i>S flexneri</i> (12022)	هوازی ۳۵°C ، ۱۸-۲۴ ساعت	SIM
+	+	-	خوب			
+	-	+	خوب			
-	-	-	خوب			

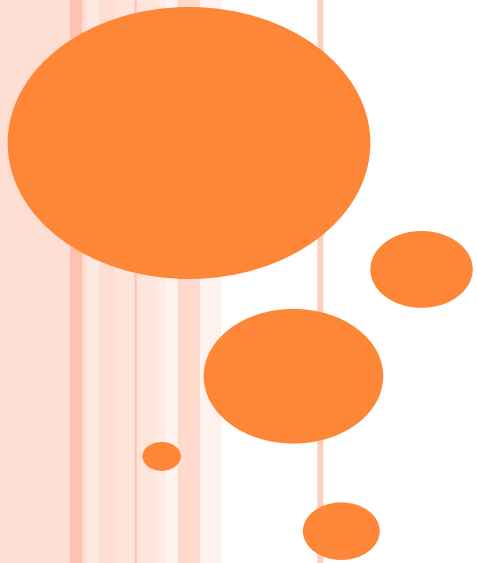


جدول کنترل کیفی محیطهای افتراقی

نتایج مورد انتظار				سویه های کنترل کیفی (شماره ATCC)	شرایط ،مدت زمان و دمای انکوباسیون	محیط کشت
citrate		رشد		E.coli (25922) S.Typhimurium(14028) E.aerogenes (13048)	هوازی ۳۵°C ، ۱۸-۴۸ ساعت	Simmons Citrate Agar
سبز/-		عدم رشد				
آبی/+		خوب				
آبی/+		خوب				
H2S	گاز	عمق/سطح	رشد	E.coli (25922) S.Typhimurium(14028) S flexneri (12022)	هوازی ۳۵°C ، ۱۸-۲۴ ساعت	Triple Sugar Iron (TSI) Agar
-	+	Acid/Aci	خوب			
+	+	Alk/Acid	خوب			
-	-	Alk/Acid	خوب			
-	-	Alk/Inert	خوب	P.aeruginosa (27853)		
تولید اوره آز				E.coli (25922) K.pneumoniae (13883) P.mirabilis (12453)	هوازی ۳۵°C ، 6-48 ساعت	Urea Agar
- / بدون تغییر رنگ						
+ ضعیف/ رنگ ارغوانی در سطح						
+ شدید/ رنگ ارغوانی در عمق و سطح						



خطاها و مشکلات در محیط های کشت تهیه شده و بررسی علل



رنگ یا تیرگی غیر طبیعی

- آب ناخالص
- ظروف شیشه ای کثیف
- کیفیت بد محیط کشت دهیدراته
- حرارت زیاد در طی استریلیزاسیون
- **PH** نادرست
- حل نشدن کامل محیط کشت



رگه رگه شدن

- رگه رگه سیاه : آگار نیم سوز شده است.
- رگه رگه روشن : وقتی مکمل ها اضافه شده اند که آگار سرد شده بوده است.



PH نادرست

- آب ناخالص یا ظروف شیشه ای کثیف
- حرارت بیش از حد، ذوب مجدد یا ذخیره طولانی محیط کشت در دمای C ۵۰ °
- آلودگی شیمیایی
- کالیبراسیون نادرست PH متر
- حل نشدن کامل محیط کشت
- کیفیت بد محیط کشت دهیدراته
- اندازه گیری PH در دمای بالای C ۲۵ °



رسوب، کدورت

- حرارت بیش از حد
- ذخیره طولانی (بیش از ۴ ساعت) در حالت مذاب (دمای 50°C)
- کیفیت بد محیط کشت دهیدراته
- **PH** نادرست
- آب ناخالص یا ظروف شیشه ای کثیف
- حل نشدن کامل محیط کشت
- وقتی مکمل ها اضافه شده اند که محیط کشت خیلی داغ بوده
- کیفیت پایین آب یا ظروف



رشد باکتریایی ضعیف یا اثر روی خواص انتخابی / افتراقی

- توزین / مخلوط کردن نامناسب
- آب، ظروف شیشه ای یا لوله ای آلوده
- وجود مواد مهار کننده در آب یا ظروف
- کیفیت بد محیط کشت دهیدراته
- وقتی مکمل ها اضافه شده اند که محیط کشت خیلی داغ بوده
- محیط هنگام کشت نمونه بر روی آن، خیلی داغ بوده
- ذخیره طولانی و بیش از حد خشک شدن محیط کشت
- حل نشدن کامل محیط کشت، تغییر PH محیط کشت
- حرارت طولانی مدت و مفرط



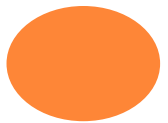
آگار نیم بند

- حرارت بیش از حد (به خصوص در PH پایین)
- هیدرولیز اسید در آگار در محیط های کشت با PH پایین
- توزین / مخلوط کردن نادرست
- حل نشدن کامل آگار
- حجم نادرست آب، رقیق سازی زیاد با مایع تلقیح یا مکمل های محیط کشت
- ذخیره طولانی محیط کشت در دمای ۵۰ °C



○ کنترل محیط های ساخته شده تجاری (آماده مصرف):

- ۱-رطوبت: محیطهای کشت باید بدون هر گونه رطوبت اضافی بوده، همچنین هیچ نشانه ای از خشک شدن اطراف محیط کشت نباید مشاهده گردد.
- ۲-سترون بودن: محیطهای کشت باید عاری از آلودگی باشند.
- ۳-رنگ: محیطهای کشت آگار خوندار نباید هیچ نشانه ای از همولیز داشته باشند و محیطهای کشت دیگر نباید هیچگونه تغییر رنگ غیر طبیعی داشته باشند.
- محیطهای کشت آماده مصرف باید از نظر موارد زیر نیز بررسی شوند:
- شکستگی ظروف پتری
- پر شدن ناصاف پلیتها
- ترک خوردگی محیط کشت در پلیتها
- وجود همولیز (برای بلاد آگار)
- یخ زدگی
- وجود مقدار زیاد حباب یا حفره در سطح محیط کشت

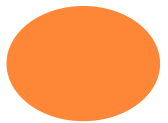


محیط های کشت افتراقی



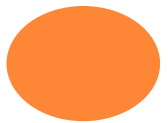
سیترات

- مقدار خیلی کم از ارگانسیم مورد نظر (۲-۱ کلنی ایزوله) را در سطح آگار شیب دار سیمون سیترات تلقیح نمایید. فرو بردن سوزن مخصوص کشت، به ته لوله جهت کشت لازم نمی باشد. سپس ۴۸-۲۴ ساعت (حد اکثر ۷ روز) لوله را در ۳۷-۳۵ درجه انکوبه نمایید. ایجاد رنگ آبی نشان دهنده واکنش مثبت است. گاهی ممکن است تغییر رنگ در محیط دیده نشود اما در مسیر خط کشت باکتری، رشد دیده شود که این حالت نیز مثبت در نظر گرفته می شود. بهتر است در این شرایط مجدداً با مقادیر کم باکتری، آزمایش را تکرار نمایید.
- مقدار تلقیح باکتری باید به میزان خیلی کم باشد زیرا در غیر این صورت ترکیبات آلی موجود در دیواره باکتری های در حال تخریب، کربن و نیتروژن زیادی آزاد کرده و می توانند واکنش مثبت کاذب حاصل نمایند.
- کنترل مثبت: انتروباکتر آئروژینوزا
- E. coli ATCC 25922 کنترل منفی



MR

- ابتدا چند کلنی از کشت خالص باکتری را در لوله حاوی ۲.۵ میلی لیتر Broth VP/MR تلقیح نمایید.
- ۴۸-۷۲ ساعت (حداکثر ۵ روز) در 35°C انکوبه نمائید. سپس ۵ قطره از معرف متیل رد را به Broth اضافه نمایید و نتیجه واکنش را بر اساس تغییر رنگ حاصله بررسی کنید.
- ایجاد رنگ زرد واکنش منفی
- ایجاد رنگ قرمز واکنش مثبت در نتیجه تولید اسید زیاد.
- ایجاد رنگ نارنجی واکنش منفی
- جهت کوتاه تر کردن زمان نتیجه گیری می توان حدود ۰.۵ میلی لیتر Broth VP/MR را در لوله ای ریخته و مقدار نسبتاً زیادی از میکروب را در آن تلقیح نمود و پس از انکوباسیون ۲۴-۱۸ ساعته در 35°C درجه ۲ - ۱ قطره معرف متیل رد را به آن اضافه کرده، واکنش را مشاهده نمود
- E. coli ATCC 25922 کنترل مثبت
- 13048، *Klebsiella Pneumoniae* ATCC 13883 آئروژینوزا انتروباکتر: کنترل منفی



VP

- ک لوله درپیچ دار حاوی ۲.۵ml Broth VP/MR را توسط کشت خالص باکتری مورد نظر تلقیح میکنیم و مدت ۲۴-۴۸ ساعت در اتوو ۳۵ قرار می دهیم. سپس یک قطره آلفا نفتول ۵٪ و دو قطره ۴۰٪ KOH به آن اضافه می نماییم. لوله را به آرامی تکان داده و آن را به طور ثابت به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه قرار می دهیم. ایجاد واکنش و تولید رنگ قرمز در مدت ۱۵ دقیقه یا بیشتر نشانگر وجود دی استیل و مثبت بودن تست VP می باشد. رنگ زرد یا عدم واکنش نشانگر منفی بودن تست VP است.
- این آزمایش نباید بیش از یک ساعت بعد از ریختن معرف ها خوانده شود زیرا می تواند نتیجه مثبت کاذب دهد



فنیل آلانین دآمیناز

- سطح محیط با کلنی ایزوله تلقیح شده ، در لوله به صورت شل بسته شود.
- بعد از انکوباسیون محیط در 35 °C به مدت ۲۴-۱۸ ساعت یا تا هرزمان که رشد واضحی مشاهده گردد ، ۴ تا ۵ قطره کلرورفریک ۱۰٪ مستقیماً به سطح آگار اضافه می کنیم. لوله را می چرخانیم تا کلنی ها در آن غوطه ور شوند.
- ظهور بلافاصله رنگ سبز بعد از ریختن معرف، بیانگر مثبت بودن این تست است.



TRIPLE SUGAR IRON AGAR (TSI AGAR)

- در این محیط کشت، ساکاروز به دو قندی (دکستروز و لاکتوز) که در محیط کلایگلر آیرون آگار وجود دارد، اضافه می شود
- برای تسهیل در جداسازی ارگانیسم هایی که فقط دکستروز را تخمیر می کنند، غلظت دکستروز یک دهم غلظت لاکتوز یا ساکاروز است
- به هنگام تهیه محیط کشت باید دقت نمود که طول سطح شیب دار و عمق محیط کشت در لوله، حدوداً ۳ سانتی متر باشد.
- با استفاده از آنس سوزنی استریل خنک، رشد را از مرکز یک کلونی که به تازگی روی پلیت محیط مورد استفاده برای کشت انتروباکتریاسه رشد کرده است، به سطح شیب دار محیط انتقال دهید و آن را با حرکت آنس در امتداد سطح شیب دار، کشت دهید و سپس عمق را با سوراخ کردن محیط، تلقیح نمایید. لوله ها را با در پوش های شل شده به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ در اتمسفر هوازی انکوبه نمایید.
- اگر محیط در عمق لوله زرد شود (اسیدی) اما در سطح شیب دار قرمز شود (قلیایی)، ارگانیسم تحت بررسی فقط دکستروز (گلوکز) را تخمیر می کند.

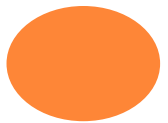


○ رنگ زرد (اسیدی) در سطح شیب دار و عمق نشان می دهد که ارگانیسم تحت بررسی، دکستروز، لاکتوز و یا ساکاروز را تخمیر می کند. رنگ قرمز (قلیایی) در سطح شیب دار و عمق، نشان می دهد که ارگانیسم تحت بررسی، یک غیر تخمیر کننده **Nonfermenter** است. تولید سولفید هیدروژن سبب تولید رسوب سیاه در عمق لوله می شود. تولید گاز با شکاف و ترک خوردگی محیط نشان داده می شود.



اوره آز

- محیط کشت Broth یا سطح شیبدار محیط کشت جامد را با مقدار نسبتاً زیادی از کلنی های ایزوله تلقیح می کنیم. هر دو لوله محیط کشت را با در پیچ شل به مدت ۴۸ ساعت تا هفت روز در ۳۵ C انکوبه می نماییم. ارگانیسیم هایی که اوره را سریع هیدرولیز می کنند، در عرض ۲-۱ ساعت واکنش مثبت می دهند و سویه هایی که کمتر فعالند، به ۳ روز یا بیشتر انکوباسیون نیاز دارند.
- اوره براث: - ایجاد رنگ قرمز نشان دهنده واکنش قلیایی و هیدرولیز اوره می باشد.
- اوره آگار: - سوش های اوره آز مثبت سریع: ایجاد رنگ قرمز در تمام محیط - سوش های اوره آز مثبت ضعیف: ایجاد رنگ قرمز ابتدا فقط در سطح و بتدریج در عمق لوله - سوش های اوره آز منفی: محیط کشت به رنگ اولیه خود باقی می ماند.



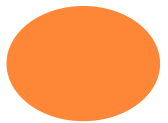
آزمایش دکربوکسیلاسیون (لیزین، اورنیتین و آرژنین)

- تغییر رنگ زرد در اندیکاتور برموکرزول در لوله کنترل، بیانگر زنده بودن ارگانیسم و تخمیر کننده بودن آن می باشد که در اثر تخمیر گلوکز، PH محیط اسیدی شده و برای عملکرد آنزیم دکربوکسیلاز شرایط فراهم شده است
- در طی مراحل ابتدایی انکوباسیون، هر ۲ لوله زرد می شوند که به دلیل تخمیر مقدار کم گلوکز در محیط کشت است. اگر اسید آمینه مصرف شود رنگ محیط حاوی اسید آمینه به رنگ اولیه خود (بنفش) بر می گردد. اگر اسید آمینه مصرف نشود رنگ محیط زرد باقی می ماند.
- Lysine Enterobacter aerogenes Enterobacter cloacae
- Ornithine Enterobacter cloacae Klebsiella pneumoniae
- Arginine Enterobacter cloacae Enterobacter aerogenes
- ایجاد رنگ سیاه در عمق و رنگ بنفش در سطح محیط، نشان دهنده مثبت بودن لیزین و H_2S است



بایل اسکولین آگار

- جهت افتراق استرپتوکوک های گروه D از استرپتوکوک های غیر گروه D به کار می رود.
- استرپتوکوک های گروه D شامل انتروکوک ها گلیکوزید اسکولین را به اسکولتین و دکستروز تجزیه می کنند. اسکولتین با نمک آهن به شکل کمپلکس قهوه ای تیره یا سیاه واکنش می دهد.
- نکته: حدود ۳۰٪ از استرپتوکوک های ویریدنس بایل اسکولین مثبت هستند.
- محیط کشت را با دو یا سه کلنی تلقیح کنید (اگر محیط کشت در لوله تهیه شده، باید سطح و عمق را تلقیح ° نمایش دهید) و به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در دمای $C \pm 35$ ، در شرایط هوازی یا اتمسفر محتوی دی اکسید کربن، انکوبه نمایید (بعضی از سویه ها به انکوباسیون بیشتری، نهایتاً ۴۸ ساعت، نیاز دارند). سیاه شدن محیط دلالت بر مثبت بودن نتیجه آزمایش دارد. نتیجه مثبت اغلب در طی ۴ ساعت ظاهر می شود. اما در نهایت همه استرپتوکوک های گروه D در طی ۴۸ ساعت، مثبت خواهند شد.
- **faecalis Streptococcus** : رشد می کند و اطراف کلونی ها سیاه می شود (کنترل مثبت)
- **pyogenes Streptococcus** : رشد بطور جزئی تا کامل مهار می شود (کنترل منفی)
- **D group not, viridans Streptococcus** : عدم تغییر رنگ محیط کشت (کنترل منفی)



محیط کشت 6.5% NACL (براث/ آگار)

- محیط پایه، همان برین هارت اینفیوژن براث / یا آگار است. این محیط کشت حاوی ۰.۵٪ نمک است، بنابراین ۰.۶٪ نمک کلرید سدیم به این محیط پایه اضافه می شود تا مقدار نهایی ۰.۵٪ نمک حاصل شود. سپس محلول حاصل را در لوله تقسیم کرده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای C ۱۲۱ استریل نمایید.
- به همراه بایل اسکولین برای افتراق انتروکوک ها به کار کی رود.



DNASE TEST AGAR

- این محیط کشت در ارزیابی فعالیت دزوکسی ریبونوکلاز DNase باکتری ها و قارچ ها و خصوصاً به عنوان کمک در تشخیص استافیلوکوک های بیماریزا بکار می رود.
- اگر استافیلوکوک آنزیم DNase داشته باشد این آنزیم، اسیدنوکلیک را هیدرولیز می نماید که با استفاده از معرف و ایجاد هاله شفاف در اطراف محل رشد باکتری می توان به این موضوع پی برد.
- حساسیت: ۹۹٪ استافیلوکوک های کواگولاز مثبت، DNase مثبت نیز هستند. اختصاصیت: ۲۰٪ استافیلوکوک های کواگولاز منفی، DNase مثبت هستند.
- پلیت های DNase را با نمونه مورد نظر به صورت نقطه ای (یا خطی) تلقیح نمایید. پلیت ها را به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای $35 \pm 2^{\circ}$ سانتیگراد انکوبه نمایید. پس از انکوباسیون، روی پلیت های DNase اسید کلریدریک ۱ نرمال بریزید به گونه ای که سطح پلیت را کاملاً بپوشاند و سپس آن را بر روی زمینه تیره قرار داده و بررسی نمایید. تلقیح باید نقطه ای باشد، چون بعضی از سویه های استافیلوکوک اورئوس به خوبی بر روی محیط، رشد نمی کنند و در نتیجه میزان رشد برای ارزیابی فعالیت DNase کافی نخواهد بود. در صورت تلقیح نقطه ای، حتی اگر در محل تلقیح، رشدی ایجاد نشود می توان فعالیت DNase را ارزیابی نمود.



آنتی بیو گرام



کنترل کیفی در آنتی بیوگرام

- محیط کشت مولر هینتون

- علت انتخاب مولر هینتون:

- کم بودن میزان مهار کننده سولفانامیدها و تری متوپریم ها و تتراسیکلین ها
- کم بودن و تنظیم دقیق کلسیم یونیزه و منیزیم که اثر مهارى روی پلی میکسین و تتراسیکلین و آمینو گلیکوزیدها دارند



نکاتی در مورد تهیه مولر هینتون

- PH محیط ۷.۲-۷.۴
- حجم محیط در پلیت:
 - پلیت با قطر ۹ سانتیمتر: ۲۵ تا ۳۰ سی سی
 - پلیت با قطر ۱۴ سانتیمتر: ۶۰ تا ۷۰ سی سی
- عمق مناسب محیط : حدود ۴ میلی متر
- از استریل بودن محیط مطمئن شوید ۳ تا ۵ درصد از محیطهای تازه تهیه شده در ۳۵ درجه
- سطح محیط قبل از دیسک گذاری مرطوب نباشد



- انتخاب محیط مناسب
- تهیه سوسپانسیون میکربی طبق استاندارد نیم مک فارلند
- پخش مناسب روی پلیت
- انتخاب دیسک مناسب
- کاشتن صحیح دیسکها
- قرار دادن در ۳۵ درجه بدون CO2 (بجز هموفیلوس و نایسریا)
- قرائت دقیق هاله ها
- گزارش صحیح



منابع خطا در آزمایش آنتی بیوگرام

- تاریخ گذشته بودن یا خراب بودن محیط
- تهیه نا درست محیط
- عمق کمتری یا بیشتر از ۴ میلیمتر
- آلوده بودن محیط
- مرطوب بودن سطح محیط هنگام کاشتن دیسک
- خالص نبودن باکتری
- تهیه نادرست سوسپانسیون (رقیق یا غلیظ باشد)
- افزایش CO_2 که باعث کاهش pH محیط شده و همین باعث زون وسیع برای تتراسیکلین و زون کوچک برای سایر آنتی بیوتیکها میشود
- کاهش CO_2 که باعث افزایش pH محیط شده که عکس حالت فوق ایجاد میکند
- نگهداری نا مناسب دیسکها (باعث کاهش قدرت آنتی بیوتیک میشود)



TURBIDITY STANDARD

○ 0.5 McFarland standard

- (0.5 ml of 0.048 mol/ml BaCl₂ added to
- 99.5 ml of 0.18 mol/L H₂SO₄(1% v/v)
- density in 625 nm = 0.08 - 0.1
- Keep in 4-6 ml aliquots in screw cap
- tubes in dark , room temperature
- Replace or verify density monthly

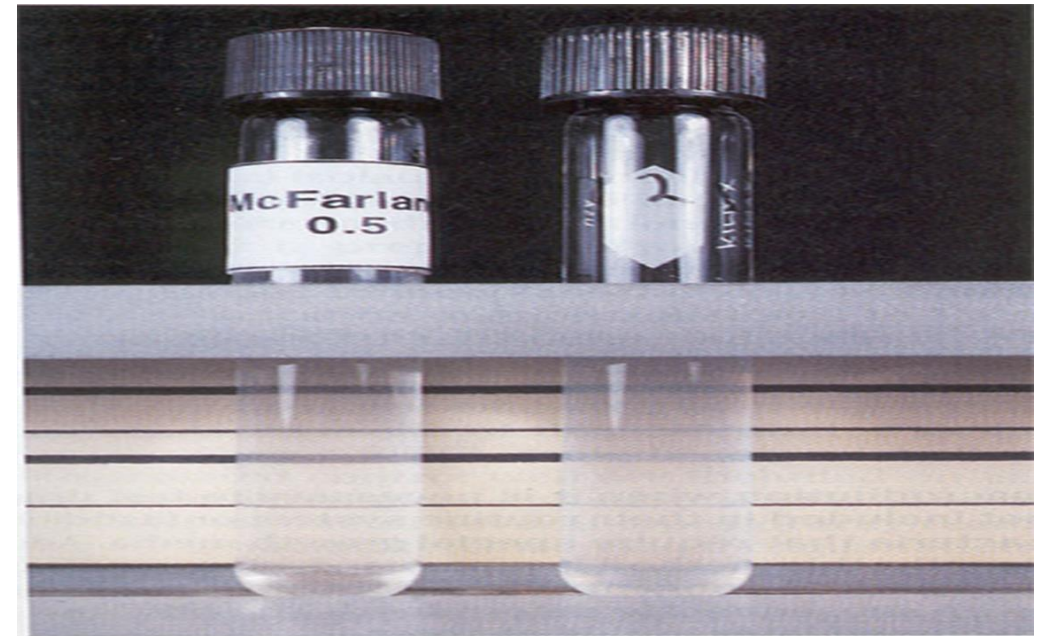


Figure 3-4

کنترل صحت عملکرد دیسکها

- استفاده از میکربهای مشخص
- میکربهایی که برای این منظور استفاده میشوند:
 - E.coli A.T.C.C 25922
 - S.aureus A.T.C.C 25923
 - P.aeruginose A.T.C.C 27853
- در هر سری ساخت محیط مولر هینتون باید از انتروکک فکالین A.T.C.C 29212 و دیسک کوتریموکسازول به عنوان کنترل استفاده کرد
- در محیط مطلوب قطر زون باید به اندازه ۲۰ میلیمتر باشد



MIC

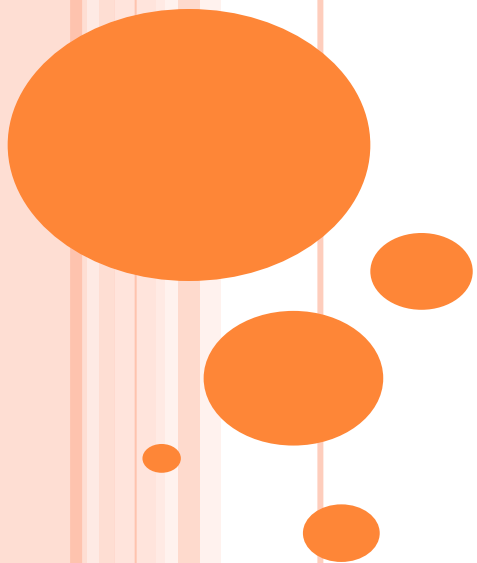
○ E تست

○ Micro dilution MIC

○ کنترل کیفیت



کنترل کیفی دیسک های آنتی بیوتیکی



در دسترس داشتن سویه های کنترل کیفی تهیه شده از مراکز معتبر ضروری است.

ATCC نشان ثبت شده کلکسیون کشت آمریکایی می باشد.

تهیه این سویه ها باید از شرکت های معتبر صورت گیرد.

باید از تعداد مناسب سویه ها استفاده شود.

باید با روش های ذخیره و نگهداری سویه های استاندارد آشنا باشیم.



سویه های کنترل کیفی پیشنهادی توسط CLSI عبارتند از:

- Enterococcus faecalis ATCC 29212 ☐
- Escherichia coli ATCC 25922 ☐
- Escherichia coli ATCC 35218 ☐
- Haemophilus influenzae ATCC 49247 ☐
- Haemophilus influenzae ATCC 49766 ☐
- Klebsiella pneumoniae ATCC 700603 ☐
- Neisseria gonorrhoeae ATCC 49226 ☐
- Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 ☐
- Staphylococcus aureus ATCC 25923 ☐
- Streptococcus pneumoniae ATCC 49619 ☐



□ Enterococcus faecalis ATCC 29212 یا E.faecalis ATCC 33186 برای ارزیابی محیط مولر هینتون آگار با دیسک تری متوپریم / سولفامتوکسازول استفاده می شود. در محیط کشت قابل قبول ، هاله عدم رشد واضحی به قطر 20 mm یا بزرگتر ایجاد می شود در حالیکه در محیطهای کشت غیر قابل قبول ، هاله عدم رشد ایجاد نمی شود یا در داخل هاله ، رشد کم مشاهده می شود و یا هاله ای با قطر کمتر از 20 mm ایجاد میگردد. این کار به منظور بررسی مقادیر غیر قابل قبول تیمیدین در محیط کشت مزبور است .

□ E.coli ATCC 35218 قط به عنوان یک میکروارگانیزم کنترلی برای ترکیبات ممانعت کننده بتالاکتاماز، مثل ترکیبات حاوی کلاولانیک اسید، سولباکتام یا تازوباکتام پیشنهاد می شود .

□ Klebsiella pneumoniae ATCC 700603 به عنوان یک سویه کنترلی برای آزمایشات ESBL به کار برده می شود.

□ برای کنترل کیفی دیسکهای آمینو گلیکوزید با دوز بالا (دیسک جنتامایسین ۱۲۰µg) از سویه Enterococcus faecalis ATCC 29212 استفاده شود. قطر هاله ۱۶-۲۳ مورد قبول است.



دیسکهای آنتی بیوتیکی

- دیسک ها باید از برند معتبر تهیه گردند.

- دیسکها باید در فریزر 20° - و پایین تر تا زمان مصرف نگهداری شوند.

- تمامی دیسکهای گروه بتالاکتام مانند پنی سیلین ، آمپی سیلین ، کربنی سیلین ، تیکارسیلین ، اگزا سیلین و نسل اول ، دوم و سوم سفالوسپورین ها و ... باید در فریزر نگهداری شوند ، و فقط می توان مقداری از آن را بر اساس کار روزانه آزمایشگاه حداکثر به مدت یک هفته در یخچال نگهداری نمود .

- بعضی آنتی بیوتیکهای حساس مثل ایمپنم و ترکیبات کلانولانیک اسید یا سولباکتام اگر تا هنگام مصرف در فریزر نگهداری شوند ، پایداری بیشتری خواهند داشت .

- دیسکها باید در ظروف دارای درپوش محکم و حاوی مواد جاذب رطوبت نگهداری شوند .

- دیسکهای آنتی بیوتیکی باید یک تا دو ساعت قبل از استفاده از یخچال یا فریزر خارج شوند تا به درجه حرارت اتاق برسند .



کنترل کیفیت قطر هاله عدم رشد سویه کنترلی / دیسک آنتی بیوتیکی

سویه های کنترل کیفی را باید به روش استاندارد disk diffusion و با استفاده از همان مواد و روشی که برای سویه های جدا شده از نمونه های کلینیکی استفاده می شود آزمایش و نتایج را با جداول CLSI مقایسه و بررسی نمود . محدوده قطر هاله عدم رشد قابل قبول برای هر سویه کنترلی نسبت به یک دیسک آنتی بیوتیکی در جداول فوق فهرست شده است .

قطر هاله ممانعت از رشد را از پشت پلیت در حالیکه آن را چند سانتی متر بالاتر از یک سطح سیاه مات و در حضور نور انعکاسی نگه داشته اید، با خط کش اندازه گیری کنید.
اگر پلیت اگر خوندار باشد در پلیت رابرداشته و با نور انعکاسی بخوانید.
برای سفوکسیتین از نور انعکاسی استفاده کنید.
برای خوانش اگزاسیلین و و نکومایسین از نور عبوری اسفاده کنید.
برای لینزولید از نور عبوری استفاده کنید.



آزمایش کنترل کیفیت را باید درچه فواصل زمانی انجام داد ؟

الف _ انجام آزمایش روزانه

برای هر سویه کنترلی با یک دیسک آنتی بیوتیکی باید ۱۵ روز (یا ۲۰ روز یا ۳۰ روز) متوالی آزمایش تعیین حساسیت انجام و نتایج با مقادیر قابل قبول اشاره شده در جداول فوق مقایسه گردد . بر اساس ضریب اطمینان ۹۵٪ تنها یک مورد از ۱۵ نتیجه (یا ۲۰ نتیجه) قرائت شده می تواند خارج از محدوده کنترل باشد. چنانچه بیشتر از یک مورد خارج از محدوده کنترل باشد نیاز به اقدامات اصلاحی خواهد بود.

ب _ انجام آزمایش هفتگی

در صورتیکه تنها یک مورد از ۱۵ یا ۲۰ نتیجه قطر هاله عدم رشد برای هر سویه کنترلی / دیسک آنتی بیوتیکی خارج از محدوده قابل قبول مندرج در جداول قرار گیرد، کنترل کیفی روزانه را به هفتگی تغییر دهید.

آزمایش کنترل کیفی هفتگی را یکبار در هفته و همچنین زمانیکه یکی از عوامل آزمایش (مانند سری ساخت آگار یا دیسکهای تهیه شده از یک سازنده) تغییر کند، انجام دهید .

اگر هر یک از نتایج کنترل کیفی هفتگی خارج از محدوده قابل قبول باشد ، انجام اقدامات اصلاحی مورد نیاز است .



اگر مشکل شناسایی و اصلاح شد برای بازگشت به آزمایش کنترل کیفیت هفتگی لازم است برای ۵ روز متوالی دیگر عملکرد مطلوب آزمایش ثبت شود.
اگر نتایج در محدوده کنترل قرار گیرد عملیات اصلاحی بیشتری مورد نیاز نمی باشد.



مثال هایی از علل نتایج خارج از کنترل

استفاده از سویه کنترلی اشتباه

انبارش نامناسب

نگهداری نامناسب (برای مثال استفاده از یک کشت کاری به مدت طولانی تر از یک ماه)
آلودگی

تازه نبودن کشت (عدم تهیه سوسپانسیون میکروبی از کلنی کشت ۲۴ ساعته)

استفاده از دمای انکوباسیون نامناسب

تهیه غلظت نامناسب باکتری

تهیه سوسپانسیون میکروبی از کلنی هایی که بر روی محیط های افتراقی یا انتخابی حاوی عوامل
ضد عفونی یا سایر ترکیبات مهارکننده رشد کرده اند.

استفاده از دیسک اشتباه

جایگذاری نامناسب دیسک (برای مثال تماس ناکافی با سطح آگار)

قرائت یا تفسیر نادرست نتایج

خطا در ثبت و انتقال اطلاعات



اقدامات اصلاحی : Corrective actions

الف _ نتایج خارج از محدوده به دلیل خطاهای گفته شده :

در این حال باید دلیل ایجاد خطا مکتوب و پس از اصلاح، آزمایش دوباره تکرار شود. اگر نتایج گزارش شده در محدوده مورد نظر قرار گرفت، عملیات اصلاحی بیشتری مورد نیاز نمی باشد.

ب _ نتایج خارج از محدوده به دلیل نامشخص :

در این حال باید اقدامات اصلاحی فوری بشرح زیر انجام شود:

- آزمایش را جهت یک سویه کنترلی / دیسک آنتی بیوتیکی برای ۵ روز متوالی تکرار و همه نتایج را ثبت کنید. - اگر اندازه هر ۵ قطرها مطابق در محدوده قابل قبول باشد ، عملیات اصلاحی بیشتری مورد نیاز نمی باشد.

- اگر اندازه هر یک از ۵ قطر هاله عدم رشد خارج از محدوده قابل قبول باشد ، به عملیات اصلاحی اضافی نیاز است.

- آزمایشهای کنترلی روزانه باید ادامه داده شود تا به دلیل نهایی مشکل پی برده شود.



عملیات اصلاحی اضافی

وقتی عملیات اصلاحی فوری مشکل را حل نکرد ، احتمالاً خطای مشاهده شده بعلت بروز یک اشکال کلی در سیستم و نه یک خطای تصادفی ایجاد شده است . در این حالت باید موارد بیشتری بررسی شوند.مانند:

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

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



توجه:

اگر معیار تبدیل آزمایش از روزانه به هفتگی وجود ندارد یا اگر تست هفته ای یکبار انجام میشود باید به صورت روزانه در کنار نمونه بالینی تست شود.



صحه گذاری و تصدیق

به کارگیری هر آزمایش تشخیصی جدید در آزمایشگاه نیاز به تصدیق دارد. هر آزمایشگاهی که سیستم جدید تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی را معرفی میکند یا آنتی بیوتیک جدیدی به سیستم اضافه می نماید، باید قبل از گزارش نتایج بیماران، خصوصیات عملکردی سیستم تایید و تصدیق شود.

بهترین روش برای تصدیق استفاده از سویه های کنترل کیفی با رنج هاله یا MIC مشخص می باشد.



FASTIDIOUS OR PROBLEM ORGANISMS

- Antibiotic susceptibility of ***Streptococcus . Pneumoniae***
- Antibiotic susceptibility of other ***Streptococcus spp.***
- Antibiotic susceptibility of ***Haemophilus spp.***
- Antibiotic susceptibility of ***Neisseria gonorrhoeae***



ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY OF *S. PNEUMONIA*

- **Media** : Muller- Hinton with 5 % Sheep blood agar
- **inoculum** : Direct colony
- Inoculated plates containing disks are incubated at 35C 20–24h and % 5 CO₂.
- The zone measurement is from the top of plate with the lid removed.
- Amoxicillin , Ampicillin , cefepime , cefotaxime, ceftriaxone , imipenem , meropenem may be used to treat pneumococcal infections , but they should be determined by MIC (not DDM)
- Isolates of *S. pneumonia* with oxacillin disk zone $\geq 20\text{mm}$ (MIC < 0.06) are susceptible to Penicillin , and can be considered susceptible to : ampicillin , amoxicillin , clavulanic – acid , cepheims , imipenem, meropenem and these agents need not to be tested.
- Oxacillin zone sizes $\leq 19\text{ mm}$ occur with penicillin – resistant , intermediate strains , so isolates should not be reported as penicillin – resistant or intermediate until Penicillin , ampicillin , cepheims , imipenem, meropenem MICs be determined.
- Penicillin , cefotaxime or ceftriaxone , and meropenem should be tested by MIC Method and
- reported routinely for CSF isolates of *S. pneumonia* . These isolates should be tested for vancomycin also.



ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY OF OTHER *STREPTOCOCCUS SPP*

- Medium : Mueller Hinton agar / Muller- Hinton with 5 % Sheep blood agar
- Inoculum ; direct method
- Incubation ; 35C , ambient air , 16-18 h
- Susceptibility testing of penicillins and other β - lactams for treatment of *Streptococcus pyogenes* or *Streptococcus agalactiae* is not routinely necessary.
- Disk diffusion for penicilin , ampicillin , quinolones are for reporting isolates of beta-hemolytic streptococci only.
- Viridans streptococci isolated from blood ,CSF ,... Should be tested for penicilin , ampicillin susceptibility testing bu MIC method.



ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY OF *HAEMOPHILUS SPP.*

- **Medium** : *Haemophilus* Test Medium (HTM)
- Muller- Hinton agar
- 15 µg/ml β -NAD
- 15 µg/ml bovine hematin
- 5 µg/ml yeast extract
- **Inoculum** : Direct colony **Incubation** ; 35 C , % 5 CO₂ , 16 – 18 h.
- Only results of ampicillin , one of 3rd generation cepheims ,chloramphenicol , meropenem should be reported routinely for CSF isolates of *Haemophilus influenzae*.
- B – lactamase test can provide a rapid means for detecting ampicillin,amoxicillin resistance.



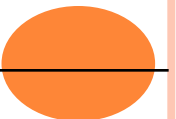
ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY OF *NEISSERIA GONORRHOEAE*

- Medium : GC agar
- Inoculum ; Direct colony
- Incubation ; 35 C , 5% CO₂ , 20-24h
- Disk diffusion tests with ampicillin , penicillin , rifampin are unreliable for *Nisseria meningitidis* , MIC is necessary.
- Positive β - lactamase test predicts resistance to ampicillin , penicillin , amoxicillin.
- Gonococci with 10-unit penicillin disk zone $\leq$ 19 mm are likely to be β - lactamase producing strains.
- β - lactamase test remains preferable to other susceptibility methods for rapid , accurate penicillin resistance.



ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY OF *STAPHYLOCOCCUS SPP.*

- Medium : Mueller – Hinton agar
- **Incubation** : 35C ambient air , 16-18h , 24h for oxacillin , methicillin , nafcillin ,and vancomycin.
- Penicillin- susceptible staph are also susceptible to other penicilins, carbapenems, cepheims.
- Penicillin- resistant , oxacillin – susceptible strains are also resistant to β - lactamase –labile penicillins ,but susceptible to other β -lactamase stable penicillins, β -lactamase inhibitors , cepheims , carbapenems.
- Oxacillin – resistant are resistant to all β -lactam antibiotics.
- Susceptibility or resistance to β -lactam antibiotics may be deduced from testing only penicillin and oxacillin ,routine testing of others is not advised.



- Penicillin- resistant , oxacillin – susceptible strains staphs produce β - lactamase and testing of 10-unit penicillin disk instead of ampicillin is preferred.
- Penicillin should be tested for all of β - lactamase –labile penicillins.
- From β - lactamase- stable penicillins oxacillin is the choice , because is more resistant to degradation in storage, is able to detect heteroresistant strains. Cloxacillin disks should not be used, because they may not detect oxacillin – resistant strains.
- For intermediate results perform oxacilin – salt agar test.
- Routine testing of urine isolates of *S. saprophyticus* is not advised if there is not complicated UTI. They usually respond to concentrations achieved in urine by commonly used antibiotics (F/M, SXT, Quinolone,..)
- MRS are often resistant to multiple classes of antibiotics , like : Aminoglycosides , Quinolones , clindamycin, SXT, macrolides, tetracycline ,....



QUALITY CONTROL PROCEDURES

- Storing Quality Control strains
- Zone Diameter Quality Control Limits
- Frequency of Quality Control Testing
 - Daily Testing
 - Weekly Testing



گزارش الگوی مقاومت های آنتی بیوتیکی

MRSA ○

VRE ○

ESBL ○

CRE ○

D-Zone ○

MDR ○

نرم افزار WHONET ○



کنترل کیفی دیسک های تشخیصی ESBL

سویه های استاندارد

Escherichia coli ATCC 25922

Klebsiella pneumoniae ATCC 700603

دیسک ها

سفتازیدیم و سفتازیدیم-کلاونات

و سفوتاکسیم و سفوتاکسیم-کلاونات



Tests for Extended-Spectrum β -Lactamases in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* spp and *Shigella* spp. (continued)

Test	Criteria for Performance of ESBL Test	ESBL Test
QC recommendations	زمانی که عوامل ضد میکروبی برای تشخیص ESBL به کار می‌روند، <i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603 سویه مکمل برای کنترل کیفیت می‌باشد (به عنوان مثال، برای آموزش عملی، سنجش صلاحیت یا ارزیابی آزمایش). بنابراین هر یک از دو سویه <i>E. coli</i> یا <i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603 می‌تواند برای کنترل کیفیت داخلی (برای مثال، روزانه یا هفتگی) به کار رود.	زمانی که آزمایش ESBL انجام می‌شود، باید از سویه‌های <i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603 و <i>E. coli</i> ATCC 25922 برای کنترل کیفیت داخلی (روزانه یا هفتگی) استفاده گردد.
	برای سویه <i>E. coli</i> ATCC 25922 (محدوده قابل قبول کنترل کیفیت در جدول 4A-1 ملاحظه شود)	نتایج کنترل کیفیت قابل قبول برای: <i>E. coli</i> ATCC 25922 افزایش ۲ میلی‌متری یا کمتر (≤ 2 mm) در قطر هاله مهار رشد عامل ضد میکروبی در ترکیب با کلاولانات، آزمایش شده در مقابل هاله مهار رشد همان عامل به تنهایی.
	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603: Cefpodoxime zone 9–16 mm Ceftazidime zone 10–18 mm Aztreonam zone 10–16 mm Cefotaxime zone 17–25 mm Ceftriaxone zone 16–24 mm	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603: افزایش ۵ میلی‌متری یا بیشتر (≥ 5 mm) در قطر هاله مهار رشد برای سفتازیدیم-کلاولانات در مقابل سفتازیدیم به تنهایی؛ افزایش ۳ میلی‌متری یا بیشتر (≥ 3 mm) در قطر هاله مهار رشد سفوتاکسیم-کلاولانات در مقابل سفوتاکسیم به تنهایی.

سویه های استاندارد میکروبی

به منظور تایید سالم بودن سویه استاندارد میکروبی هنگامی که اولین ساب کالچر از کشت ذخیره میکروبی تهیه شد آن را با یکی از عوامل بتالاکتام غیر ترکیبی بررسی کنید.

چنانچه تغییر در میانگین قطر هاله عدم رشد ناشی از خطا در روش انجام آزمایش نباشد ، احتمالاً "ناشی از تغییر در حساسیت ذاتی باکتری نسبت به آن آنتی بیوتیک می باشد. در این صورت لازم است کشت تازه از سوش کنترل تهیه شود .



نگهداری باکتریها

- نگهداری طولانی مدت باکتریها: در این روشها باکتری به مدت طولانی (ماهها و یا سالها) زنده خواهد ماند از بهترین روشها می توان روش لیوفیلیزه یا فریز در -70°C و یا نیتروژن مایع را نام برد
- نگهداری کوتاه مدت: در این روش می توان باکتری هایی که مشکل پسند نبوده و در کارهای روتین استفاده می شوند را نگهداری نمود



نگهداری طولانی مدت باکتری ها

استفاده از گلیسرول در -۲۰ درجه

- کشت خالص روی محیط جامد
- بعد از رشد کامل برداشت توده کوچک از آن با لوپ
- تهیه سوسپانسیونی از کلنی های فوق در گلیسرول استریل
- به میزان ۱-۲ سی سی در لوله های در پیچ دار
- نگهداری در -۲۰ درجه
- خودداری از ذوب و فریز مکرر
- تجدید کشت بعد از ۱۲ تا ۱۸ ماه



استفاده از روغن معدنی در دمای اتاق

- محیط هارت اینفیوژن آگار با سطح کم در لوله تهیه شود
- برای باکتری سخت پسند از خون استفاده شود
- روغن معدنی (یا پارافین مایع) را در ۱۷۰ درجه به مدت یکساعت استریل نمایید
- بر روی سطح محیط، باکتری کشت شود
- بعد از رشد کافی باکتری، روغن استریل به اندازه یک سی سی روی سطح محیط ریخته شود
- در کشت مجدد از قسمت زیرین روغن برداشت شود
- در حرارت اتاق نگهداری شود
- بعد از ۶ تا ۱۲ ماه تجدید کشت انجام گیرد



کشت عمقی و نگهداری در اتاق

- این روش برای باکتری هایی که مشکل پسند نیستند مانند استاف و انتروباکتریاسه ها کاربرد دارد
- محیط تریپتی کیس سوی آگار در لوله و بدون سطح شیب دار پیشنهاد میشود
- کشت عمقی باکتری در محیط
- ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه
- درب لوله با درپیچ یا چوب پنبه بسته شود
- درب لوله یا چوب پنبه درپارافین ذوب شده فرو برده تا بعد از بسته شدن، کاملاً مسدود گردد
- محیط کشت در اتاق نگهداری شود
- بعد از یک سال کشت مجدد صورت گیرد



کشت عمقی در محیط سیستمین تریپتیکس آگار

- برای نیسریا و استرپها استفاده میشود
- کشت عمقی در محیط
- ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه
- بستن کامل در لوله
- در مورد نیسریا ها نگهداری در ۳۵ درجه و تجدید کشت هر دو هفته
- در مورد استرپها نگهداری در اتاق و تجدید کشت در هر ماه



نگهداری کوتاه مدت باکتری

نگهداری کوتاه مدت باکتری

- باکتری سریع الرشد:
- کشت روی تریپتی کیس سوی آگار سطح دار، در لوله درپیچ دار
- ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه
- نگهداری در یخچال
- هر دو هفته تجدید کشت



کشت کوتاه مدت استرپها

- کشت روی بلاد آگار سطح دار در لوله درپیچ دار
- ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه
- هر دو هفته تجدید کشت



کشت هموفیلوس و مننگوکک (کوتاه مدت)

- کشت روی پلیت یا سطح محیط شکلات آگار
- ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه
- در دمای اتاق نگهداری شود
- هر دو هفته تجدید کشت شود



کشت کوتاه مدت گونوкок

- کشت روی شکلات آگار
- ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه
- نگهداری در ۳۵ درجه
- تجدید کشت هر دو روز
- در صورت جداسازی باکتری جدید با قبلی جایگزین شود



○ به این موارد توجه فرمایید:



آنتی سرم ها

- تاییدیه
- کنترل کیفی در هر سری ساخت و خرید و هر شش ماه یکبار
- ثبت مشخصات



- استفاده از محیط های کشت شکلات آگار برای نمونه های تناسلی، تنفسی، خون، CSF
- استفاده از محیط کشت مک کانگی آگار و XLD/هکتون برای نمونه های مدفوع
- استفاده از محیط های غنی کننده GN/SF برای بازیابی تعداد کم پاتوژن های روده ای
- استفاده از آنتی سرم ها برای تعیین سروگروه
- گزارش کلنی کانت برای نمونه های BAL
- رعایت تعداد دفعات نمونه گیری خون و رعایت نسبت حجم خون به محیط کشت
- دو نمونه کشت خون ترجیحا از دو رگ متفاوت به فاصله ۱۵ دقیقه
- کودکان ۱-۳ سی سی بزرگسالان ۵-۱۰ سی سی
- بررسی روزانه محیط های کشت خون از نظر وجود علائم رشد
- ساب کالچر حداقل یکبار در ۷۲ ساعت اول و نگهداری پلیت شکلات آگار در انکوباتور ۲ CO
- ساب کالچر یا رنگ آمیزی گرم در ۱۲-۴۸ بعد از ساب کالچر اولیه
- نگهداری موارد مشکوک به بروسلا به مدت ۲۱ روز



- گزارش نتایج کشت های مثبت اولیه
- استفاده از بن ماری ۸۰ درجه برای تهیه شکلات آگار و ثبت در **log book**
- بررسی میزان آلودگی کشت های خون
- استفاده از محیط انتخابی مانیتول سالت آگار
- شرکت در برنامه کنترل کیفی خارجی
- وجود جدول معیار هاله بر اساس آخرین رفرنس
- ثبت مشخصات دیسک ها و رنگ ها و معرف ها و محیط های کشت و آنتی سرم ها
- عدم وجود مواد تاریخ گذشته



گزارش نتایج

- وجود دستورالعمل گزارش دهی موارد بحرانی
- آگاهی کارکنان
- مکتوب کردن گزارش موارد بحرانی
- گزارش نهایی کشت مدفوع
- نگهداری اطلاعات نتایج گزارش شده
- آنالیز و گزارش دوره ای نتایج



THANK YOU