**1. ساخت و کنترل کیفی**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **اسم آزمایشگاه:** | {{LabName}} | |
| **اسم سند:** | **دستورالعمل ساخت و کنترل کیفی محیط های کشت** | |
| **کد سند:** | D-003-0003 | |
| **دسته بندی سند:** | دستورالعمل و کنترل کیفی مواد و تست های تشخیصی | |
| **شماره ویرایش:** | {{EditeNumber}} | |
| **تاریخ ویرایش:** | {{EditeNumber}} | |
| **تاریخ بازنگری سند:** | {{ReviewDate}} | |
| **تهیه کننده:** | **تایید کننده:** | **امضاء :** |
| شرکت دارا ویرا آزما  دکتر داریوش شکری | {{ConfirmerOneName}} | {{ConfirmerTwoName}} |

**(1) هدف:**

تشریح روش ساخت و کنترل کیفیت محیط های کشت در آزمایشگاه میکروب شناسی.

**(2) مسئولیت ها:**

بررسی روزانه کیفیت ظاهری محیط های کشت و مسئولیت کنترل کیفی بر عهده تمامی پرسنل بخش می باشد.مسئولیت نظارت بر کنترل کیفی و تأیید مستندات آن بر عهده مسئول بخش و واحد کنترل کیفی و تضمین کیفیت می باشد.

**(3) تعاریف و اصطلاحات:**

**محيط هاي کشت** دارای نقش اساسي در آزمايشگاه ميکروب شناسي هستند و به طور گسترده اي جهت جداسازي، تعيين هويت و آنتي بيوگرام ميکروارگانيسم هاي بيماريزا استفاده می شوند. محیط های کشت عمدتاً به دو حالت مورد استفاده هستند: جامد (آگاردار) و مایع (براث یا آبگوشت). در برخی موارد (به عنوان مثال، روش های خاص کشت خون)، یک محیط دوفازی که حاوی فاز مایع و جامد است، یا یک محیط نیمه جامد که حاوی درصد کمی آگار است، ممکن است استفاده شود.

**طبقه بندی محیط ها و عملکرد:** محیط ها بر اساس عملکرد و کاربردشان در چهار دسته کلی دسته بندی می شوند: غنی کننده، مغذی، انتخابی و افتراقی.

محیط های **غنی‌کننده** حاوی مواد مغذی خاصی هستند که برای رشد باکتری های پاتوژن خاص مورد نیاز هستند که ممکن است به تنهایی یا با دیگر گونه‌های باکتریایی در نمونه بیمار وجود داشته باشند.

**شکلات آگار** شایع ترین محیط غنی‌کننده مورد استفاده برای افزایش رشد ارگانیسم‌های سختگیر مانند باکتری هموفیلوس می باشد.

**آبگوشت های غنی کننده** که به عنوان آبگوشت پشتیبان یا براث مکمل یا غنی‌کننده شناخته می‌شوند، برای برخی از کشت ها مانند مایعات استریل بدن، بافت‌ها یا آبسه‌های عمیق در بیمار تحت درمان ضد میکروبی همراه با محیط جامد اولیه (آگار) تلقیح می‌شوند تا تعداد کم ارگانیسم‌ها جداسازی شوند. براث تایوگلیکولات، براث عصاره مغز-قلبBHIB)) و براث سویا تریپتیک (TSB) محیط های آبگوشت پشتیبان رایج هستند. آبگوشت های پشتیبان ممکن است دارای خواص انتخابی برای جلوگیری از رشد ارگانیسم های آلوده و رشد ارگانیسم های هدف هم باشند که شامل تیوگلیکولات برای جداسازی بیهوازی ها، براث تاد هویت حاوی کولیستین و نالیدیکسیک اسید (LIM) برای غنی‌سازی انتخابی استرپتوکوک‌های گروهB و براث گرم منفی (GN broth) برای غنی‌سازی انتخابی ارگانیسم‌های بیماری زای روده هستند.

**محیط های** **مغذی** حاوی مواد مغذی هستند که از رشد بیشتر ارگانیسم‌ها حمایت می‌کنند، بدون اینکه به ارگانیسم خاصی مزیت رشد بدهند و غیرانتخابی در نظر گرفته می‌شوند، زیرا، از نظر تئوری، رشد بیشتر ارگانیسم‌ها پشتیبانی می‌شود. محیط های مغذی شامل آگار خوندار (BA)، تریپتیک سویا آگار (TSA) و پلیت های آگار مغذی برای باکتری ها و سابورو دکستروز آگار (SDA) برای قارچ ها هستند. محیط بلادآگار گوسفندی متداول‌ترین محیط مغذی است که برای باکتری‌شناسی تشخیصی استفاده می‌شود، زیرا به اکثر موجودات غیرسخت رشد اجازه رشد می‌دهد.

**محیط های افتراقی** معمولاً تشخیصی بوده و به علت دارا بودن ترکیبات خاص و مواد ضدمیکروبی در اجزای خود منجر به تمایز و جداسازی باکتری خاص به علت ویژگی های متابولیک خاص می شوند، مانند مک کانکی آگار (MAC) و ائوزین متیلن بلو (EMB)که دارای املاح صفراوی، قند و معرف های شیمیایی هستند که باکتری لاکتوز مثبت بر روی آن ها کلنی صورتی رنگ و لاکتوز منفی ها مثل سالمونلا و شیگلا کلنی بی رنگ تشکیل می‌دهند که این مورد باعث افتراق آنها می شود.

**محیط های** **انتخابی** با افزودن مواد ضدمیکروبی، رنگ، الکل یا سایر مواد شیمیایی بازدارنده به یک محیط خاص، از رشد یک گروه از ارگانیسم ها حمایت و گروه دیگر را مهار می کنند. به عبارت دیگر، این محیط ها برای رشد باکتری های خاص انتخاب می شوند. نمونه ای از یک محیط انتخابی، فنیل اتیل الکل (PEA) آگار با 5 درصد خون گوسفند است که از رشد باکتری های گرم منفی میله ای هوازی و غیرهوازی اختیاری جلوگیری می کند و به کوکسی های گرم مثبت اجازه رشد می دهد. کلمبیا آگار با کولیستین و نالیدیکسیک اسیدCNA)) یک محیط انتخابی برای ارگانیسم های گرم مثبت است زیرا مواد ضد میکروبی کولیستین و نالیدیکسیک اسید ارگانیسم های گرم منفی را مهار می کنند. همچنین مک کانکی آگار حاوی رنگ کریستال ویوله است که ارگانیسم های گرم مثبت را مهار می کند و انتخابی برای گرم منفی هاست.

**محیط های** **چندعملکردی**: بسیاری از محیط های مورد استفاده در باکتری شناسی تشخیصی بیش از یک عملکرد را ارائه می دهند. به عنوان مثال MAC هم افتراقی و هم انتخابی (یک محیط ترکیبی) است، زیرا به اکثر باکتری های گرم مثبت اجازه رشد نمی دهد و از طرفی بر اساس تخمیر لاکتوز باکتری های گرم منفی را دسته بندی می کند. همینطور محیط های مغذی می‌توانند افتراقیهم باشند، زیرا میکروارگانیسم‌ها را می‌توان بر اساس ویژگی‌های رشد مشخصی که در محیط قابل تشخیص است، شناسایی کرد. برای مثال آگار خوندارهم یک محیط مغذی و هم یک محیط افتراقی در نظر گرفته می شود زیرا ارگانیسم ها را بر اساس نوع همولیز آلفا (α)، بتا (β) یا گاما (γ) متمایز می کند.

محیط کشت های مورد استفاده در بخش میکروب شناسی و عملکرد آنها به طور خلاصه در جدول 1 آمده است.

جدول 1. محیط کشت های معمول و محيط هاي آگاردار افتراقي و بازدارنده ي رايج قابل استفاده در آزمایشگاه باکتری شناسی.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **محيط آگاردار بازدارنده يا افتراقي** | **تركيبات اضافه شده به محيط** | **ارگانيسم هاي مهارشده** | **ارگانيسم هايي كه غني شوند** | **توضیحات** |
| بلادآگار (BA) | خون گوسفندی |  | اکثر باکتری ها | استفاده روتین برای کشت ارگانیسم های تقریبا مشکل پسند و بررسی کلنی ها برای همولیز و تست اکسیداز |
| شکلات آگار (CHOC) | خون گوسفندی |  | اکثر باکتری ها | رشد اکثر باکتریها و باکتریهای سخت رشد |
| محیط های لیزین آیرون آگار(LIA)، سیترات آگارCIT))، اوره آز، TSI، دکربوکسیلاسیون، محیط بررسی حرکت (SIM)، | جلوتر توضیح داده می شوند. |  |  |  |
| Bacteroides Bile Esculin  (BBE)  هم بازدارنده و هم افتراقي | نمك صفراوي (به عنوان بازدارنده) اسكولين (به عنوان افتراق دهنده) | بيشتر باكتري ها | گروه باكتروئيدس فراژيليس | بایل یا صفرا براي باکتروئید فراژیلیبس تحريك كننده است. |
| Campy-BA    فقط بازدارنده | آنتي بيوتيك هاي باسيتراسين، نووبيوسين، كوليستين، سفالوتين و پلی میکسین B ( به عنوان بازدارنده) | بيشتر باكتري ها | كمپیلوباکتر ژژونی | انكوباسيون در دماي 42 درجه براي انتخاب كمپیلوباکتر ژژونی |
| Cycloserine Cefoxitin Fructose Agar  (CCFA)  هم بازدارنده و هم افتراقي | آنتي بيوتيك هاي سيكلوسرين و سفوكسيتين (به عنوان بازدارنده)  فروكتوز (به عنوان افتراق دهنده) | بيشتر باكتري ها | كلستريديوم ديفيسيل | كلني هاي زرد ؛  بسيار بازدارنده |
| CHROMagar  فقط افتراق دهنده | متغير  (به عنوان افتراق دهنده ) | NA | متغير | شناسايي كلني ها كه با رنگ مشخص مي گردند. |
| Cefsulodin Irgasan  Novobiocin  (CIN)  فقط بازدارنده | سفسولودين، ايرگاسان و نووبيوسين  (به عنوان بازدارنده ) | بيشتر باكتري ها | گونه هاي يرسينيا و آئروموناس | فورمولاسيون هاي متعددي در دسترس. |
| Colistin Nalidixic acid Agar  (CNA)  فقط بازدارنده | كوليستين و ناليديكسيك اسيد  (به عنوان بازدارنده) | باكتري هاي گرم منفي | باكتري هاي گرم مثبت | بيشتر سويه هاي استافيلوكوكوس ساپروفیتیکوس و برخی از سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مهار می شوند. |
| ائوزين متيلن بلو  (EMB)  هم بازدارنده و هم افتراقي | ائوزين (به عنوان بازدارنده)  ائوزين، متيلن بلو، لاكتوز و سوكروز (به عنوان افتراق دهنده) | باكتري هاي گرم مثبت | باكتري هاي گرم منفي | كمي انتخابي (بازدارنده)؛ ارگانيسم هاي تخمير كننده لاكتوز يا سوكروز ، توليد كلني هاي آبي-سياه مي كنند. غیر تخمیری ها: کلنی شفاف، بیرنگ یا کهربایی |
| هکتون انتریک  (HE)  هم بازدارنده و هم افتراقي | نمك صفراوي (به عنوان بازدارنده) لاكتوز، سوكروز، ساليسين، بروموتيمول بلو و فوشين اسيدي، سديم تيوسولفات، آمونيوم فريك سيترات براي توليد H2S (به عنوان افتراق دهنده) | باكتري هاي گرم مثبت | پاتوژن های روده ای | نسبتاً مهار كننده؛ ارگانيسم هاي تخمير كننده لاكتوز (سوكروز، ساليسين) كلني هايي با رنگ سبز توليد مي كنند؛ ارگانيسم هاي توليد كننده H2S كلني هاي سياه رنگ توليد ميكنند. |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| محيط آگاردار بازدارنده يا افتراقي | تركيبات اضافه شده به محيط | ارگانيسم هايي كه مهار مي شوند | ارگانيسم هايي كه غني مي شوند | **توضیحات** |
| مک کانکی آگار  هم بازدارنده و هم افتراقي | نمك صفراوي و كريستال ويوله (به عنوان بازدارنده)، لاكتوز و قرمز خنثي (به عنوان افتراق دهنده) | باكتري هاي گرم مثبت | پاتوژن های روده ای | نسبتا مهار كننده (انتخابي)؛ ارگانيسم هاي تخمير كننده لاكتوز، توليد كلني هاي قرمز رنگ با رسوب نمک های صفراوی اطراف کلنی ها، مي كنند. غیر تخمیر کننده لاکتوز ظاهر بی رنگ یا شفاف را ایجاد می کنند. |
| مک کانکی سوربیتول  هم بازدارنده و هم افتراقي | نمك هاي صفراوي ، كريستال ويوله ( به عنوان بازدارنده)، سوربيتول و قرمز خنثي (به عنوان افتراق دهنده) | باكتري هاي گرم مثبت | *Escherichia* *coli* O157  (سوربيتول منفي) | محیط انتخابی براي*E.coli* توليد كننده Shigatoxin |
| مانیتول سالت آگار  MSA  هم بازدارنده و هم افتراقي | سديم كلريد (به عنوان بازدارنده)  مانيتول و فنول رد(به عنوان افتراق دهنده ) | باكتري هاي گرم منفي ، باكتريهاي گرم مثبت به غير از جنس استافيلوكوكوس | استافيلوكوكوس اورئوس | استافيلوكوك هاي كوآگولاز منفي روي محيط رشد مي كنند اما قادر به تخمير مانيتول نيستند. |
| LKV  فقط بازدارنده | كانامايسين و وانكومايسين  (به عنوان بازدارنده) | باكتري هاي هوازي ؛ باكتري هاي بي هوازي گرم مثبت | باسيل هاي بي هوازي گرم منفي به ويژه باكتروئيدس ها | انتروكوكهاي مقاوم به انكومايسين، ممكن است در اين محيط انتخاب گردند. |
| سالمونلا-شيگلا آگار  (SSA)  هم بازدارنده و هم افتراقي | نمك هاي صفراوي و سبز درخشان (به عنوان بازدارنده)، لاكتوز ، قرمز خنثي، سديم تيوسولفات، آمونيوم فريك سيترات بر اي توليدH2S (به عنوان افتراق دهنده) | باكتري هاي گرم مثبت | پاتوژن های روده ای | تخمیر کننده ها تولید اسید می کنند و رنگ معرف از صورتی به قرمز تغییر می کند. سدیم تیوسولفات به عنوان یک منبع سولفور برای تولید سولفید هیدروژن هم چنین شامل فریک آمونیوم سیترات و واکنش باH2S و تولید یک رسوب سیاه در مرکز کلنی. گونه شیگلا بی رنگ است. سالمونلا بی رنگ با مرکز سیاه |
| گزیلوز-لیزین دئوکسی کولات  XLD | سدیم دئوکسی کولات از رشد کوکسی های گرم مثبت و بعضی باسیل های گرم منفی ممانعت می کند. میزان کمتری نمک های صفراوی از سایر محیط های روده ای (HEK,SS) و بنابراین باعث جداسازی بهتر . | باكتري هاي گرم مثبت | پاتوژن های روده | کلنی ها به رنگ شکل زیر دیده می شوند: **زرد**: تخمیر کربوهیدرات باعث تولید اسید می شود و ارگانیسم ها لیزین را دکربوکسیله نمی کند. حتی آن ها که آنزیم را دارند. **بیرنگ یا قرمز**: ارگانیسم هایی که هیچ قندی را تخمیر نمی کنند.  **زرد به قرمز:** تخمیر گزیلوز(زرد) اما به دلیل اینکه به میزان کمتر است سریع تر استفاده می شود. و ارگانیسم ها به دکربوکسیلاسیون لیزین تبدیل می شود و محیط را به قرمز برمی گرداند. رسوب سیاه به وسیله تولید H2S تشکیل می شود. |
| سفزولودین-ایرگاسان-نووبیوسین آگار  (CIN) | سفزولودین، ایرگاسان و نووبیوسین | از رشد گرم منفی و مثبت ممانعت می کند. | جداسازی یرسینیا انتروکولیتیکا | تخمیر مانیتول در حضور نوترال رد، کلنی: بی رنگ یا صورتی با مرکز قرمز |
| محیط براث گرم منفی (GN Broth) | دئوکسی کولات و نمک های سیترات از رشد گرم مثبت جلوگیری می کند. | فلور طبیعی مدفوع | افزایش جداسازی پاتوژن روده ای از نمونه های مدفوع | افزایش مانیتول که به صورت موقتی باعث رشد تخمیر کننده های مانیتول مثل باسیل های گرم منفی می شود (سالمونلا و شیگلا) |

**(4) شرح دستورالعمل:**

شامل دو قسمت: الف) ساخت محیط های کشت و ب) کنترل کیفی محیط های کشت که به طور کامل تشریح شده است.

**(4) شرح دستورالعمل: الف) ساخت محیط های کشت**

**تجهیزات و وسایل مورد نیاز:**

1-ارلن، 2-محیط کشت، 3-چراغ یا شعله، 4-استوانه مدرج، 5-آب مقطر، 6-اتوکلاو، 7-انکوباتور، 8-یخچال، 9-لوله استریل، 10-ترازو، 11-پلیت های استریل (با سایزهای 60 ، 80 ، 100 و 120 میلی متری بسته به کارکرد)

**1) آب مصرفی**:

انواع آب مورد استفاده در آزمایشگاه شامل آب معمولی، آب مقطر، آب دو بار تقطیر، آب دیونیزه و آب خالص (آب مقطر دیونیزه دو بار تقطیر) می باشد.

**انواع آب بر اساس درجه خلوص و کاربرد:**

بر اساس معيارهاي كميته استاندارد هاي آزمايشگاه باليني بر اساس درجه خلوص و کاربرد در آزمایشگاه، سه نوع آب معرف داريم: نوعI   (گرید 1)، نوع II  (گرید 2) و  نوع III (گرید 3) که ویژگی های آنها به طور خلاصه در جدول 2 آمده است.

**آب نوع 1 :**آبي كه از فيلترهاي ميلي پور و كربن فعال و صافي هاي تكميلي گذشته باشد آب نوع 1 (گاهی CLRW) گفته مي شود و از آن براي تهيه محلول هاي دقيق مثل استاندارد، اندازه گيري غلظت هاي پائين در حد نانوگرم و روش هاي كشت سلولي استفاده مي شود. بهتر است براي شستشوي سر سمپلرها نيز از آب نوع 1 استفاده شود. از اين آب براي كارهايي كه نياز به حداكثر صحت و دقت دارد استفاده مي گردد. آب نوع 1 را فوراً بايد مصرف كرد و نگهداري آن حتي براي زمان كوتاه هم توصيه نمي شود. زيرا به سرعت دي اكسيد كربن  موجود در هوا را جذب مي كند. اين نوع آب داراي مقاومتي معادل 10 مگا اهم مي باشد كه اين مقدار معادل با كمتر از يك قسمت در ميليون از ماده محلول  است .

**آب نوع 2:** براي اكثر آزمايشات بيوشيمي، هماتولوژي، ميكروب شناسی و ايمنولوژي به كار مي رود. اين آب معمولاً براي كارهاي عمومي آزمايشگاه كاربرد دارد .آب تولید شده از طریق تقطیر معمولاً آب نوع 2 است.

**آب نوع 3:** اين آب براي اندازه گيري هاي كيفي مثل بيشتر آزمايشات ادرار، انگل شناسي و شستشوي ظروف مورد استفاده قرار مي گيرد.

**نکته**: برای محیط کشت سازی برخی آزمایشگاهها از آب گرید 2 و برخی از آب گرید 3 استفاده می کنند اما بهتر است از آب گرید 2 استفاده شود.

**کنترل کیفی آب مقطر مورد استفاده در محیط سازی**

* **کنترل هدایت الکتریکی:** هرچه هدایت الکتریکی آب کمتر باشد، کیفیت آب مقطر تولیدی بالاتر است. هدایت الکتریکی توسط کنداکتومتر به صورت ماهانه انجام و ثبت می گردد که باید در آب گرید 2 برابر 5/0 و کمتر و در آب گرید 3 برابر 10 و کمتر میکروزیمنس در هر سانتیمتر باشد (برای آب گرید 3 در برخی منابع تا عدد 15 هم مورد قبول است). برای محاسبه آن ابتدا مقداری آب را در ظرف استریل ریخته و دمای آن را با دماسنج کالیبره چک می کنیم. سپس کنداکتومتر را بر اساس دمای به دست آمده تنظیم می کنیم و اقدام به سنجش هدایت آب بر اساس دستورالعمل دستگاه می کنیم.
* **TDS**: اگر عدد هدایت الکتریکی را در 65/0 ضرب کنیم عدد TDS یا مواد جامد کلی حل شده (total dissolved solids) به دست می آید.
* **کنترل غلظت مس:** بهتر است در هر سری ساخت انجام و ثبت گردد که یون مس به دلیل داشتن خاصیت آنتی باکتریال نباید در آب مقطر وجود داشته باشد و در صورت وجود، حد استاندارد قابل قبول آن mg/l 4/2 می باشد.
* **کنترل pH** به طور هفتگی انجام و ثبت می گردد که محدوده pH قابل قبول برای آب مقطر مورد استفاده در محیط سازی 6 تا 7 می باشد (ترجیحاً خنثی) و نباید کمتر از 5/5 باشد. pH آب نوع I و II به علت عدم وجود یون، غیر قابل اندازه‌گیری است و بنابراین اگر از آب گرید 2 برای محیط کشت سازی استفاده می شود نیازی به اندازه گیری pH آب نیست.
* **بررسی آلودگی میکروبی:** اگر از آب گرید 2 برای محیط کشت سازی استفاده می شود آلودگی میکروبی باید بررسی شود و تعداد ارگانیسم ها کمتر از CFU/mL‌1000 باشد. بررسی آلودگی میکروبی به روش پور پلیت **به طور هفتگی** به روش زیر انجام و ثبت می گردد:

1. میزان 10 میلی لیتر از آب مصرفی داخل ظرف استریل ادرار برای آزمایشگاه ارسال می گردد.

2. در کمتر از 1 ساعت از نمونه گیری، بعد از مخلوط کردن خوب آن، میزان 1 میلی لیتر از آب مقطر به یک پلیت استریل اضافه می گردد. اگر آزمایش در کمتر از 1 ساعت قابل انجام نیست باید نمونه در یخچال حداکثر به مدت 6 ساعت نگه داری شود.

3. میزان کافی از محیط کشت استریل شده TSA یا بیس محیط کشت بلادآگار را که به دمای 50-45 درجه سانتی گراد رسیده را به پلیت فوق اضافه کنید (برای مثال در پلیت 8 سانتی متری میزان 25 میلی لیتر محیط کشت می ریزیم).

4. پلیت استریل را به صورت 8 انگلیسی (8) حرکت می دهیم تا آب مقطر با محیط کشت که هنوز نبسته است به خوبی مخلوط شود.

5. بعد از بستن محیط، انکوباسیون به مدت 24-18 ساعت در دمای 35 درجه سانتی گراد انجام می شود. برای احتمال رشد میکروب های محیطی می توان 24-18 ساعت دیگر انکوباسیون را در دمای محیط (26-20 درجه سانتی گراد) انجام داد.

6. تعداد کلنی بر حسب CFU/mL محاسبه می گردد.

اقدامات اصلاحی در صورت عدم وجود شرایط استاندارد آب مصرفی، می تواند شامل بررسی و تعویض رزین ها، فیلترها و لامپ UV‌ باشد.

**نگهداری آب:**

* نگهداری آب کلاس 1 بیشتر از 2-3 ساعت به دلیل احتمال آلودگی میکروبی و همچنین نفوذ CO2 هوا (و اسیدی pH آن) و نفوذ مواد ارگانیک و فلزی از ظرفی که آب در آن نگهداری می شود مشکل است و بهتر است به مقدار کم و متناسب با مصرف آزمایشگاه در فواصل کوتاه تهیه و بلافاصله استفاده شود.
* آب درجه 2 و درجه 3 را می توان حداکثر به مدت یک هفته در شیشه هایی از جنس بروسیلکات یا ظروف پلاستیکی پلی اتیلن نگهداری کرد اما سریع باید مصرف شود تا از آلودگی با میکروب های موجود در هوا جلوگیری شود.
* در طی نگهداری آب مصرفی، درب ظرف را باید محکم بست تا از جذب گازها جلوگیری شود.

جدول 2. ويژگي انواع آب مصرفي.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **نوع 3** | **نوع 2** | **نوع 1** | **ويژگي آب** |
| 1/0 مگا اهم | 2 مگا اهم | 10 مگا اهم | **مقاومت** |
| 10 | 5/0 | 1/0 | **هدایت الکتریکی (عکس مقاومت)** |
| 7-6 | کاربرد ندارد | کاربرد ندارد | **pH** |
| اهميت ندارد | 1000 | 10 | **تعداد كلني مجاز  (CFU /ml)** |
| اهميت ندارد | اهميت ندارد | با ذغال فعال حذف مي شود | **مواد آلي** |
| حداکثر 1 هفته | حداکثر 1 هفته | کمتر از 3 ساعت | **زمان قابل نگهداری** |

**2) پلیت یا پتری دیش:**

* کیفیت پتری دیش های مورد استفاده در تهیه محیط نیز اهمیت دارد.
* معمولاً پتری دیش ها را با اتیلن اکساید و یا اشعه گاما استریل می کنند.
* در صورت استفاده از پتری دیش هایی که با اتیلن اکساید استریل شده باشند باید به روش کروماتوگرافی وجود یا عدم وجود بقایای این ماده بررسی شود چون دارای خاصیت مهار کنندگی برای میکروارگانیسم ها می باشد (مستندات این بررسی باید توسط شرکت سازنده در اختیار آزمایشگاه قرار گیرد).
* در صورت استفاده از پتری دیش های شیشه ای باید از جنس بوروسیلیکات آنها استفاده کرد.
* استفاده از پتری دیش هایی از جنس قلیائی ممکن است موجب آزادسازی قلیا در داخل محیط کشت گردد.

**3) استریل کردن محیط های کشت:**

استریل کردن، یک مرحله اساسی در تهیه محیط های کشت است. معمولاً برای استریل کردن محیط های کشت از دو روش الف) حرارت مرطوب با استفاده از اتوکلاو و ب) استریل کردن با صافی غشایی (فیلتراسیون) استفاده می کنند.

**الف) استریلیزاسیون با حرارت مرطوب (اتوکلاو):** حرارت بیش از حد ممکن است منجر به تخریب محیط های کشت گردد، بنابراین تنظیم دما و مدت زمان آن اهمیت ویژه ای دارد. ارتباط نزدیکی بین مدت زمان لازم جهت استریل کردن و حجم محیط وجود دارد. در شرایط معمولی دمای 121 درجه سانتیگراد (فشار 2/1 کیلوگرم بر سانتی متر مربع) به مدت 15 دقیقه برای استریل کردن یک لیتر محیط کشت کافی است. در صورتی که حجم محیط کشت بیش از یک لیتر باشد ممکن است مدت زمان بیشتری لازم باشد و چون کنترل این شرایط سخت است بهتر است محیط های کشت با حجم بیشتر از یک لیتر، در ظرف های یک لیتری پخش و استریل شوند. کنترل کیفی اتوکلاو، کنترل دما و فشار اتوکلاو باید به طور مداوم انجام گیرد. برای کنترل اتوکلاو از اندیکاتورهای شیمیایی و بیولوژیکی استفاده می کنند که در قسمت دستورالعمل اتوکلاو به طور کامل آورده شد.

**ب) استریل کردن با صافی غشایی (فیلتراسیون):** این روش برای استریل کردن محیط های کشت یا مواد حساس به حرارت مانند قندهایی که باید به محیط پایه اضافه شوند استفاده می شود. در این روش، استریلیزاسیون به وسیله صافی غشایی تحت شرایط خلاء یا افزایش فشار انجام می پذیرد که از صافی های با قطر 22/0 یا 45/0 میکرومتر استفاده می شود. این فیلترها یا یک بار مصرف هستند و یا چندبار مصرف که قبل از استفاده باید با کمک اتوکلاو به روش قبلی گفته شده استریل شوند. در این روش مواد یا محیط کشت را با سرنگ های بزرگ می کشیم و سر سرنگ را در محل خود بر روی فیلتر می گذاریم و در حالی که فیلتر بر روی دهنه یک ظرف استریل قرار گرفته است با فشار پیستون، مایع یا محیط را به آرامی داخل فیلتر خالی می کنیم. با عبور مواد از این فیلتر که دارای منافذ غیرقابل نفوذ به باکتری ها می باشد موادی که از فیلتر عبور کرده و وارد ظرف استریل می شوند عاری از میکروب ها خواهند شد.

**4) پارامترهای فیزیکی:**

* محیط کشت های تهیه شده باید از لحاظ فیزیکی و ظاهری بررسی شوند.
* معیارهای ظاهری قابل بررسی شامل وجود حباب و حفره، ناصافی سطح محیط، ترک خوردگی و یخ زدگی می باشد.
* ضخامت محیط نیز اهمیت دارد که ضخامت استاندارد محیط های کشت پلیتی 4 میلی متر است.
* pH نیز از مهمترین معیارهای فیزیکی می باشد که باید برای محیط مولر هینتون آگار پس از اتوکلاو با pH متر کالیبره شده اندازه گیری گردد.
* **رطوبت:** در صورت خيس بودن سطح آگار در زمان مصرف، ظرف پتري را به مدت 30-10 دقيقه در انکوباتور C° 35 و يا با درپوش نيمه باز، زير هود كلاس II در حرارت اتاق قرار دهيد تا رطوبت اضافی آن تبخير گردد. براي تلقيح باکتری، سطح محيط كشت بايد مرطوب ولی فاقد قطرات آب بر روی آگار يا درپوش ظرف پتري باشد.

**5) محل تهیه محیط های کشت:**

محل تهیه محیط ها زیر هود میکروب شناسی یا اتاق مخصوص محیط کشت سازی با نور UV می باشد. بدین منظور هود یا اتاق مخصوص را طبق مراحل زیر آماده نمائید:

1-شب قبل از تهیه محیط های کشت ابتدا هود تمیز شود (با مواد ضد عفونی تمیز کنید).

2-سپس UV هود را روشن نمائید و درب اتاق را تا فردا صبح ببندید. روی در یادداشت بگذارید "وارد نشوید".

3-صبح روز بعد اول وقت UV خاموش و اتاق آماده برای محیط سازی می شود (فرم سوابق استفاده از لامپ های UV تکمیل شود).

**6) روش اجرایی ساخت محیط های کشت:**

روش تهیه هر محیط بر اساس دستور العمل موجود بر روی قوطی های آن می باشد. روش استریلیزاسیون نیز بر روی برچسب دستورالعمل تهیه محیط کشت درج گردیده است. این دستورالعمل ها بر حسب نوع محیط کشت و کارخانه تولید کننده، متفاوت است اما به طور کلی به روش زیر تهیه می شوند:

1. طبق دستورالعمل هر محیط کشت که روی لیبل آن آمده است و حجم محیط مورد نیاز، میزان لازم از محیط کشت را وزن کنید.

2. محیط کشت وزن شده را در آب مقطر در یک ارلن با گنجایش دو برابر میزان آب مقطر حل کنید. سپس محیط را خوب تکان دهید که بهتر است از یک همزن مغناطیسی استفاده نمود.

3. محلول به دست آمده را طبق دستورالعمل هر محیط کشت که روی لیبل آن آمده است گرم کرده و یا بجوشانید تا ریز جوش شود.

4. محیط ها را طبق دستورالعمل هر محیط کشت که روی لیبل آن آمده است (معمولاً به مدت 15 دقیقه در 121 درجه) اتوکلاو نمائید (بعضی از محیط ها نیاز به اتوکلاو ندارند که جلوتر آمده است). دقت شود محیط های لوله ای ابتدا در لوله های مخصوص تقسیم شده (هر لوله حدود 5 میلی لیتر) و سپس اتوکلاو می گردند.

5. در مورد محیط کشت های پلیتی، پس از رسیدن دما به 50-45 درجه، محیط ها را به میزان مناسب تحت شرایط استریل در پلیت های استریل بریزید. حباب های احتمالی ایجاد شده را با گرفتن سریع شعله بر روی آنها از بین ببرید.

6. اجازه دهید محیط های جامد کامل بسته شوند و سپس آنها را در یخچال نگهداری نمائید.

**توجه 1.** محیط هایی که باید در لوله ریخته شود (محیط های لوله ای) شامل موارد زیر هستند:

محیط آبگوشت GN، محیط بایل اسکولین آگار (تا یک سوم لوله از محیط پر شده و سپس به صورت کج یا اسلنت قرار داده شود تا جامد شود)، محیط آبگوشت تایوگلیکولات (قسمت بیشتر لوله باید از محیط پر شود)، محیط سیمون سیترات (تا یک سوم لوله از محیط پر شده و سپس به صورت کج یا اسلنت قرار داده شود تا جامد شود)، محیط اوره آگار، محیط TSI (پس از خارج کردن از اتوکلاو لوله ها را به گونه ای به صورت کج یا اسلنت قرار دهید که عمق و سطح شیب دار 3 سانتی متر باشد)، محیط های لایزین و اورنیتن دکربوکسیلاز، محیط MR/VP، محیط آبگوشت TSB با نمک 5/6 درصد، محیط فنیل آلانین دآمیناز یاPAD و محیط OF.

**توجه 2.** محیط هایی که باید در پلیت ریخته شود (محیط های پلیتی) شامل موارد زیر می باشند: محیط گزیلوز لایزین دکربوکسیلاز آگار (XLD Agar)، محیط TCBS آگار، محیط بلادآگار، محیط شکلات آگار، محیط مولر هینتون آگار، محیط ائوزین متیلن بلو یاEMB ، محیط DNAse Agar ، محیط هکتون انتریک آگار.

**توجه 3.** محیط هایی که به اتوکلاو احتیاج ندارند: گزیلوز لایزین دکربوکسیلاز آگار (XLD)، محیط TCBS آگار، محیط هکتون انتریک آگار، قسمت دوم محیط اوره (کریستال اوره).

به طور کلی نکات مهم قبل، هنگام و پس از ساخت محیط های کشت در زیر خلاصه شده است:

**الف – نکات مهم قبل از ساخت:** كنترل تاريخ مصرف محيط كشت، ثبت زمان دريافت و كارخانه سازنده، بررسي ظاهر محيط، نگه‌داري محيط در حرارت مساوي يا كمتر از 25 درجه سانتي‌گراد یا در صورت نیاز در یخچال.

**ب – نکات مهم هنگام ساخت:** استفاده ازترازوي دقيق برای توزین پودر، رعایت دقیق تمامی نكات نوشته شده بر روي قوطي هر محیط کشت، عدم مخلوط كردن محيط هاي جديد و قديم، آب‌كشي ارلن و ساير ظروف با آب مقطر، استفاده از ارلن با ظرفيت بيشتر از 2 برابر حجم محيط، عدم حرارت‌دهي زياد، بررسي پليت‌ها از نظر عدم بازشدن پوشش استریل آنها قبل از استفاده**.**

**ج – بعد از ساخت و هنگام مصرف:** كنترل pH محیط مولر هینتون آگار و استريل بودن محيط و عدم آلودگي، امكان رشد ميكروارگانيسم مورد نظر و ايجاد ويژگي مورد نظر با انجام کنترل کیفی، عدم وجود شيار در محيط، ارتفاع مناسب محيط، عدم انجماد محيط**.**

درجدول 3علل اشکالات رایج در هنگام ساخت یا استفاده از محیط های کشتبه طور خلاصه آمده است.

جدول 3. علل اشکالات رایج در هنگام ساخت یا استفاده از محیط های کشت.

|  |  |
| --- | --- |
| **مشکل** | **علت** |
| نرم بودن محیط آگار | عدم مخلوط کردن کافی محیط و حل نشدن محتویات و آگار، pH پایین که باعث هیدرولیز آگار می شود، هیدرولیز اسید در محیط با pH پایین، و حجم نادرست آب و توزین غلط، رقیق سازي زیاد با مایه تلقیح یا مکمل هاي محیط کشت، ذخیره سازي طولانی مدت در دماي C° 50 |
| pH نامناسب | آب محیط ناخالص، استفاده از شیشه های قلیایی، آلودگی شیمیایی، حرارت بیش از حد، تعیین pH در حرارت نامناسب، استفاده از pHمترسنج غیراستاندارد، استفاده از پودر محیط کشت خراب شده یا تاریخ منقضی |
| رنگ نامناسب و یا تیره شدن محیط | آب محیط ناخالص یا بی کیفیت، استفاده از شیشه های کثیف، pH نامناسب، استفاده از پودر محیط کشت خراب شده یا تاریخ منقضی، حرارت بیش از حد در طی استریلیزاسیون، ذخیره سازي طولانی مدت (بیش از4 ساعت) در حالت مذاب (بیش از دماي C° 50)، افت کیفیت محیط کشت دهیدراته، داغ بودن محیط کشت در هنگام افزودن مکمل به آن |
| سمیت (عدم رشد باکتری ها) | حرارت بیش از حد و سوزاندن محیط، استفاده از پودر محیط کشت خراب شده یا تاریخ منقضی، افت کیفیت محیط کشت دهیدراته، قرارگیري در معرض نور مستقیم خورشید، حجم اشتباه مکمل یا آنتی بیوتیک اضافه شده |
| رشد ضعیف میکروارگانیسم  یا خاصیت ضعیف افتراقی یا انتخابی محیط | استفاده از شیشه های و آب محیط کثیف یا آلوده، وجود مواد مهاری در آب یا ظروف، استفاده از پودر محیط کشت خراب شده یا تاریخ منقضی یا افت کیفیت پیدا کرده، توزین یا مخلوط کردن غلط یا ناکافی، حرارت بیش از حد یا داغ بودن محیط هنگام افزودن مکمل یا کشت باکتری، ذخیره محیط طولانی تر از زمان استاندارد، خشک بودن بیش از حد سطح محیط، تیرگی محیط کشت و تغییر pH استاندارد |

**اقدامات اصلاحی:** درصورت وجود خطا با توجه به جدول فوق، نباید از محیط های تهیه شده استفاده نمود و باید سری جدیدی جایگزین محیط نامنطبق نمود.

**7) ملاحظات فنی ساخت محیط کشت:**

* ارلن مخصوص تهیه محیط کشت باید دو برابر حجم آب مقطر ریخته شده در آن، گنجایش داشته باشد.
* پودر خشک محیط کشت باید به دقت توزین شود.
* برای توزین بهترین وسیله لیوان های کاغذی یک بار مصرف می باشد.
* برای حل کردن محیط های کشت از آب مقطر تازه تهیه شده باید استفاده نمود.
* تهیه محیط های کشت مایع (براث) به دلیل نداشتن آگار آسانتر است.

**8) نگهداری و استفاده از محیط های کشت**

* پودرهای محیط کشت باید در دمای زیر۳۰ درجه سانتیگراد در ظرف دربسته در یک محیط خشک و دارای تهویه مناسب و دور از دمای شدید و منابع اشتعال نگهداری شوند و قبل از تاریخ انقضاء روی برچسب مصرف شوند. پس از باز شدن، محصول باید به طور مناسب و خشک نگهداری شوند، تا از تشکیل توده به دلیل خاصیت رطوبت‌گیری محصول جلوگیری شود.
* تمامی محیط های کشت باید دور از نور نگهداری شوند. تابش نور به محیط های کشت موجب تشکیل مواد باکتریواستاتیک و باکتریساید مانند پراکسیداز می گردد.
* طول عمر محیط های کشت تهیه شده بستگی به نوع اجزای تشکیل دهنده محیط، نحوه نگهداری و انبار کردن آنها دارد.
* اغلب محیط های کشت که در پلیت تهیه می شوند در دمای 4 درجه سانتی گراد حداقل طول عمر آنها یک هفته می باشد ولی اگر در داخل کیسه های پلاستیکی بسته بندی شوند به طوری که هوا داخل آنها نفوذ نکند تا 3 الی 4 هفته قابل نگهداری هستند.
* طول عمر محیط های کشت حاوی آنتی بیوتیک بستگی به پایداری آنتی بیوتیک موجود در آن دارد و چون با گذشت زمان این گونه محیط های کشت رطوبت خود را از دست داده، به دلیل افزایش غلظت آنتی بیوتیک قدرت انتخابی آنها افزایش می یابد و بنابراین در مجموع آنها را در عرض یک هفته باید مصرف کرد.
* محیط هایی که به آنها خون و سایر مواد و یا آنتی بیوتیک اضافه می شود باید در یخچال نگهداری شوند.
* محیط های کشت تهیه شده در لوله در مقایسه با محیط های کشت پلیتی عمر طولانی تری دارند و اگر در دمای 4 درجه سانتی گراد نگهداری شوند و اگر درب پیچ دار باشند، 6-3 ماه و درب پنبه‌اي تا 3 هفته (قطر پنبه زياد باشد) قابل نگهداری و مصرف می باشند.
* **موارد استثناء:** محيط های تايوگليكولات براث، SIM و اندول نیترات براث فقط به مدت یک ماه و محیط های CTA و OF به مدت 6 هفته قابل نگهداری هستند. محيط تايوگليكولات براث در دماي محيط تا تغییر رنگ معرف یا عدم انطباق کنترل کیفی و به طور کلی همانطور که اشاره شد تا یک ماه قابل نگهداری است.
* دمای پلیت ها را باید قبل از مصرف به دمای اتاق رساند. اگر پلیت محیط کشت بیش از 8 ساعت در دمای اتاق باقی بماند برای مصرف مناسب نمی باشد.
* محیط های پودری که به هم چسبیده و یا تیره رنگ شده باشند باید دور ریخته شوند.
* تاریخ هر بسته ای که باز می شود یادداشت کنید.
* ابتدا از محیط هایی که کهنه تر هستند استفاده می کنیم. از محیط کشت های تاریخ مصرف گذشته حتی با وجود کارایی در کنترل کیفی نباید استفاده شود.

**روش تهیه محیط کشت حاوی گلیسرین جهت دیپ فریز:**   
به محیط کشت پایه محیط TSB یا محیط کشت BHIبراث به میزان ۱۵ درصد گلیسرین اضافه می شود و سپس محیط به خوبی تکان داده می شود تا محلول یکنواختی حاصل شود. سپس در مقادیر کم (12 میلی لیتر) در لوله های در پیچ دار تقسیم شده و در شرایط °C121 و فشار Lb ۱۵ به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو استریل می شود. می توان محیط را در میکروتیوب های کوچک 1 تا 2 میلی لیتری توزیع و سپس اتوکلاو نمود.

**روش تهیه محیط کشت NaCl 5/6 درصد براث آگار:**

محیط پایه همان محیط BHI آگار است و از آنجا که این محیط کشت حاوی 5/0 درصد نمک می باشد، بنابراین ۶ درصد نمک به این محیط پایه اضافه می شود تا مقدار 5/6 درصد نمک حاصل شود. محیط را در شرایط °C121 و فشار Lb ۱۵ به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو استریل نمایید.

**روش تهیه انواع قندها:**

محیط های قندی معمولاً به صورت محلول ۱۰٪ تهیه می شوند. میزان 10 گرم از قند مورد نظر در 100 میلی لیتر آب مقطر حل می شود. روش استریلیزاسیون قندها استفاده از فیلتراسیون می باشد، در غیر این صورت می توان همه انواع قندها را در فشار Lb ۵ به مدت ۵ دقیقه استریل نمود. به طور دقیق تر شرایط استریلیزاسیون برای قندهای لاکتوز، مالتوز، گزیلوز، سالیسین، سوکروز، ترهالوز و آرابینوز در فشار Lb ۵، دمای ۱۲۱ به مدت ۳ دقیقه و شرایط استریلیزاسیون برای سایر قندها شامل فشار Lb ۱۲-۱۰، دمای ۱۱۸- ۱۱۶ و زمان ۱۵ دقیقه می باشد.

**روش تهیه محیط کشت ژلاتین ترکیبی:**

پیتون 5 گرم، عصاره گوشت گاو 3 گرم و ژلاتین 120 گرم. مقادیر فوق را به 1000 میلی لیتر آب مقطر اضافه کرده و در بن ماری جوش قرار دهید تا کاملاً حل شوند. از حرارت دادن این محیط کشت بر روی شعله پرهیز کنید. سپس در شرایط °C121 و فشار Lb ۱۵ به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو استریل نمایید. سپس در لوله تقسیم کرده و pH محیط کشت را به 8/6 برسانید.

**روش ﺗﻬﯿﻪ ﻣﺤﯿﻂ کشت آب پپتونه ﻗﻠﯿﺎیی ﯾﺎ APW:**

10 گرم پپتون و 10 گرم کلروسدیم در 1000 میلی لیتر آب مقطر حل شده، سپس pH را ﺑﻪ کمک سود 1 نرمال به 9-6/8 ﺑﺮﺳﺎﻧﯿﺪ و در شرایط °C121 و فشار Lb ۱۵ به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو استریل نمایید**.**

**روش تهیه مکمل هِمین:**میزان 5/0 گرم پودر هِمین را به ۱۰ میلی لیتر NaOH۱ نرمال اضافه و حل کنید و سپس با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی لیتر برسانید. در نهایت در شرایط °C121 و فشار Lb ۱۵ به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو استریل نمایید. محلول در ظرف تیره و در یخچال نگهداری می شود. این محلول ذخیرهmg/ mL ۵ غلظت دارد، ولی هنگام مصرف به عنوان مکمل باید دارای غلظت نهاییg/mL µ 5 باشد.

**روش ﺗﻬﯿﻪ وﯾﺘﺎﻣﯿﻦ K1:**

میزان 2/0 گرم پودر وﯾﺘﺎﻣﯿﻦ K1 را روی یک قطعه کوچک فویل آلومینیومی استریل وزن کرده و در شرایط استریل به 20 میلی لیتر اتانول در یک ظرف استریل اضافه کنید. ﻣﺤﻠﻮل ذﺧﯿﺮهmg/mL 10 اﺳـﺖ. برای رقیق سازی بیشتر از آب ﻣﻘﻄـﺮ اﺳـﺘﺮﯾﻞ اﺳﺘﻔﺎده کنید. 1 میلی لیتر از محلول ذخیره را به یک لیتر محیط آگار دار یاmg/mL 01/0 محیط براث اضافه کنید. ﻏﻠﻈـﺖ ﻧﻬﺎیی ﻣﺤﻠﻮل ﺑﺮاي ﻣﺤﯿﻂﻫﺎي ﻣﺎﯾﻊμg/mL 1/0 و ﺑﺮاي ﻣﺤﯿﻂﻫﺎي آگاردارμg/mL 10 اﺳـﺖ. ﻣﺤﻠﻮل در ﻇﺮف ﺗﯿﺮه و در یخچال نگهداری می شود. درب ﻇﺮف ﺑﺎﯾﺪ کاملاً محکم ﺑﺴﺘﻪ ﺷـﻮد.

**(4) شرح دستورالعمل: ب) کنترل کیفی محیط های کشت**

جهت اطمينان از کيفيت خوب و نتايج مطلوب محيط هاي کشت، باید روش هاي کنترل کيفي مناسبي به کار گرفته شود. محیط های کشت یا توسط خود آزمایشگاه تهیه و ساخته می شوند و یا ممکن است به صورت آماده تجاری خریداری شوند که نحوه کنترل کیفی آنها متفاوت می باشد:

**محیط های تجاری آماده معاف از کنترل کیفیت:** کمیته فرعی CLSI در زمینه کنترل کیفیت محیط های کشت، اعلام کرده که اغلب محیط کشت ‌ها در صورت خرید از سازنده‌ای (کارخانه) که دستورالعمل‌های CLSI را دنبال می‌کند، نیازی به آزمایش مجدد کنترل کیفی در آزمایشگاه ندارند.در این موارد آزمایشگاه فقط باید هر محموله را از نظر ترک خوردگی یا ظروف پتری، همولیز، انجماد، پر شدن نابرابر، حباب های بیش از حد، شفافیت و آلودگی قابل مشاهده بازرسی کند. سازنده باید اطمینان کتبی (مستندات QC) ارائه دهد که استانداردهای CLSI رعایت شده است. این تأییده باید همراه با پروتکل QC آزمایشگاه نگهداری شود .البته توصیه می گردد برای محیط تجاری آماده نیز کنترل کیفی داخلی **در هر سری خرید** به انجام برسد.

**محیط کشت های آماده شده توسط آزمایشگاه:** در صورت ساخت محیط کشت در آزمایشگاه باید فرم‌های کنترل کیفی موجود باشد که منبع هر ماده، شماره سری ساخت، روش استریل‌سازی، تاریخ آماده‌سازی، تاریخ انقضاء (معمولاً 1 ماه برای پلیت های آگار و 6 ماه برای محیط های لوله‌ای) و نام سازنده در آنها ذکر گردد**.** در اینجا نیز محیط های آماده شده باید از نظر رنگ مناسب، قوام، عمق، صافی، همولیز، حباب‌های بیش از حد و آلودگی بررسی شوند.

**روش اجرایی انجام کنترل کیفی محیط های کشت**

آزمایشگاه باید از کیفیت هر شماره ساخت قبل از استفاده از محیط هاي آماده مصرف تجاري و یا محیط هاي دهیدراته، اطمینان

پیدا کند. الزامات عمومی کنترل کیفیت محیط هاي کشت عبارتند از:

**الف) ثبت اطلاعات محیط های کشت**

1. محیط هاي آماده مصرف تجاري:

* منبع تهیه آن، شماره ساخت، تاریخ انقضاء، تاریخ دریافت و تاریخ شروع به استفاده از آن براي هر محیط ثبت شود.
* هر محیط را مطابق دستورالعمل سازنده نگهداري کنید (معمولاً در 8-2 درجه سانتی گراد).

2. محیط هاي 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 شود.

**ب) بررسی مشخصات ظاهری:**

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

* شکستگی یا آسیب دیدگی پلیت ها و لوله ها؛
* جدا شدن آگار از جداره پلیت ها و لوله ها یا ناصاف شدن پلیت ها؛
* یخ زدگی یا ذوب شدن آگار؛
* مقدار ناکافی آگار در پلیت ها (عمق کمتر از 3 میلیمتر) و لوله ها (عمق و سطح ناکافی)؛
* وجود همولیز در محیط هاي حاوي خون؛
* تغییر در رنگ مورد انتظار براي هر محیط (احتمال اشکال در pH محیط)؛
* وجود حباب یا ناهمواري بیش از حد در سطح محیط؛
* رطوبت اضافی یا خشک شدن بیش از حد محیط؛
* آلودگی و وجود رسوب قابل مشاهده؛

**ج) بررسی وجود آلودگی:**

به عنوان یک قاعده کلی، براي سري100تایی یا کمتر (100≥،) باید حداقل 3 تا 5 درصد از محیط ها (لوله ای یا پلیتی) از نظر عدم وجود آلودگی و رشد باکتریایی با انکوباسیون آنها در انکوباتور بررسی شوند. براي مقادیر بیشتر (100<) باید10 لوله یا پلیت به صورت تصادفی انتخاب، و انکوبه شوند. نمونه ها باید براي 48-24 ساعت در دماي 37-35 درجه سانتی گراد انکوبه، و سپس به مدت 48 ساعت در دماي اتاق نگهداري شوند. بعد از این زمان نباید شواهدي از رشد میکروبی (رشد کلنی در محیط های پلیتی یا ایجاد کدورت و تغییر رنگ در محیط های لوله ای) بعد از انکوباسیون مشاهده گردد. بعد از کامل شدن بررسی، باید تمام نمونه هاي بررسی شده دور ریخته شوند.

**د) آزمایش های کنترل کیفی عملکردی محیط های کشت**

قبل از انجام آزمایش کنترل کیفی بر روی هر محیط کشت مورد استفاده و **در هنگام خرید شماره سری** (Lot number) **جدید و سپس هر سری ساخت**، باید دو آزمایش به نام های آزمایش ظرفیت مغذی بودن (Nutritional activity) و آزمایش ظرفیت مهارکنندگی (Inhibitory activity) به انجام برسد. آزمایش ظرفیت مغذی بودن برای محیط های غیرانتخابی مانند بلاد آگار و شکلات آگار به انجام می رسد تا مطمئن شویم این محیط ها دارای میزان کافی مغذی بودن برای رشد باکتری ها هستند. آزمایش ظرفیت مهارکنندگی برای محیط کشت های انتخابی مانند مک کانکی، هکتون انتریک،EMB و XLDبه انجام می رسد تا مطمئن شویم به اندازه کافی و استاندارد دارای توانایی مهاری هستند.

**1. آزمایش ظرفیت مغذی بودن**: سوسپانسیون اولیه برابر استاندارد نیم مک فارلند باکتری استافیلوکوک و یا استرپتوکوک استاندارد را به نسبت 1 به 100 در نرمال سالین ﯾﺎ محیط TSB، رقیق نموده و به هر پلیت 10 میکرولیتر (یا 01/0 میلی لیتر) از سوسپانسیون رقیق شده را تلقیح می نمائیم. چون غلظت نیم مک فارلند برابر 000/000/10 تا 000/000/100 ملیون CFU باکتری هست و آن را یک به صد رقیق کرده ایم و به میزان یک صدم هم از این غلظت کشت داده ایم، از غلظت نیم مک فارلند 4 صفر کم می کنیم و بنابراین تعداد کلنی های مورد انتظار در هر پلیت 000/10 - 1000 (CFU در هر پلیت) می باشد. اگر برای محیط های خاصی کلنی های ایزوله به دست نیاید، سوسپانسیون باید ده بار رقیق تر تهیه شود و در این حالت تعداد نهایی کلنی رشد کرده باید در 10 ضرب شود.

**2. آزمایش ظرفیت مهارکنندگی**: از باکتری اشریشیاکلی استاندارد، سوسپانسیون اولیه برابر استاندارد نیم مک فارلند را به نسبت 1 به 10 در محیط TSB رقیق نموده و در هر پلیت 10 میکرولیتر (یا 01/0 میلی لیتر) سوسپانسیون رقیق شده تلقیح می کنیم. چون غلظت نیم مک فارلند برابر 000/000/10 تا 000/000/100 ملیون CFU باکتری است و آن را یک به 10 رقیق کرده ایم و به میزان یک صدم هم از این غلظت کشت داده ایم، از غلظت نیم مک فارلند 3 صفر کم می کنیم و بنابراین تعداد کلنی های مورد انتظار در هر پلیت 000/100 – 000/10 (CFU در هر پلیت) می باشد. جهت اجتناب از رشد زیاد باکتری در بعضی از محیط های کشت انتخابی ممکن است نیاز باشد که سوسپانسیون ده بار رقیق تر شود و در این حالت تعداد نهایی کلنی رشد کرده باید در 10 ضرب شود.

**3. کنترل کیفی محیط های کشت با استفاده از سویه های کنترل کیفی:**

هر محیط کشت باید **در هنگام خرید شماره سری** (Lot number) **جدید و سپس هر سری ساخت** از نظر میزان رشد قابل قبول و یا خصوصیت مهارکنندگی، یا توانایی ایجاد خصوصیات خاص و ویژه با میکروارگانیسم هاي کنترل استاندارد مناسب (سویه های کنترل کیفی) که جلوتر آمده است بررسی شوند. سویه های کنترل کیفی از منابع مختلف زیر قابل تهیه می باشند:

* مجموعه کشت تیپ آمریکایی (American Type Culture Collection)یا ATCC
* مجموعه کشت تیپ پرشین (Persian Type Culture Collection) یا PTCC
* سویه هاي شناسنامه دار که طی برنامه ارزیابی خارجی کیفیت دریافت می شوند.

يک محيط کشت زماني قابل قبول است که با همه سويه هاي آزمون پيشنهادي براي محيط کشت، رشد کافي داشته و خصوصيات رشد و مورفولوژي کلني ها بارز باشد. در محیط های انتخابی، رشد بعضی از ارگانیسم های خاص مهار می شود، ضمن اینکه اجازه رشد کافی به ارگانیسم های دیگر را می دهد. در بعضی موارد واکنش های رنگی خاص یا همولیز باید ایجاد شود.

برای انجام هر مرحله کنترل کیفی محیط کشت ها در ابتدا لازم است از سویه هاي کنترل کیفی مورد نظر، سوسپانسیون میکروبی تهیه شود تا یک استاندارد تعداد از باکتری ها داشته باشیم.

**تهیه سوسپانسیون استاندارد میکروبی (نیم مک فارلند):** تهیه سوسپانسیون میکروبی برای به دست آوردن استاندارد تعداد از باکتری ها می باشد که به نام استاندارد نیم مک فارلند شناخته می شود. در ابتدا یک کشت تازه از ارگانیسم کنترل را روی پلیت بلاد آگار تهیه کنید. بعد از انکوباسیون و تازه شدن کشت، استاندارد نیم مک فارلند را به یکی از دو روش زیر تهیه کنید: 1) تعداد 5-3 کلنی از باکتری را در 5 میلی لیتر TSB یا BHI استریل سوسپانسیون کرده و آن را برای چهار یا پنج ساعت انکوبه نمائید. کدورت را با استاندارد نیم مک فارلند تنظیم کنید (استاندارد نیم مک فارلند در طول موج nm 625 دارای جذب 08/0 تا 13/0 می باشد). 2) در روش دیگر می توان یک سوسپانسیون در سرم فیزیولوژی از کلنی های 24 ساعته تهیه و کدورت آن را مطابق روش فوق تنظیم نمود. با هر روشی که این استاندارد تهیه می شود باید غلظت نهایی باکتری ها بین CFU/mL‌ 108-107 باشد.

**آزمایش (کشت) محیط های کشت:**

**1. آزمایش (کشت) محیط کشت های پلیتی:**

**محیط های غیرانتخابی:** کشت با غلظت گفته شده در روش آزمایش ظرفیت مغذی بودن به انجام می رسد.

**محیط های انتخابی:** کشت با غلظت گفته شده در روش آزمایش ظرفیت مهارکنندگی به انجام می رسد.

**2. آزمایش محیط کشت های لوله ای آبگوشتی:** هر محیط را با 10 میکرولیتر (یا 01/0 میلی لیتر) از استاندارد نیم مک فارلند باکتری استاندارد (نیاز به رقیق شدن ندارد) تلقیح می کنیم.

**3. محیط های لوله ای جامد یا نیمه جامد:**

**الف. SIM:** با آنس یک کلنی خالص را یک بار تا نصف عمق در وسط لوله به صورت مستقیم فرو کنید.

**ب. OF و CTA:** ازیک کلنی خالص با کمک آنس 4 بار تا حدود یک چهارم پایین عمق در وسط لوله به صورت مستقیم فرو کنید (4 بار کشت).

**ج. بقیه محیط های لوله ای جامد:** با آنس یک کلنی خالص را تا حدود یک چهارم پایین عمق در وسط لوله به صورت مستقیم فرو کنید.

**4. محیط های لوله ای اسلنت دار:**

**الف. محیط های TSI، KIA و LIA:** با آنس یک کلنی خالص را یک بار تا حدود یک چهارم پایین عمق در وسط عمق لوله به صورت مستقیم فرو کنید و همزمان که آنس را بیرون می آورید سطح اسلنت را به صورت زیگزاکی تا بالای اسلنت تلقیح سطحی نمایید. درب همگی این لوله ها باید شل بسته شوند و انکوبه شوند.

**ب. سیمون سیترات و استات:** فقط سطح محیط ها به میزان خیلی کم از یک کلنی خالص به صورت زیگزاکی کشت می شوند.

**ج. اوره آز:** فقط سطح محیط به میزان زیاد از یک یا چند کلنی خالص به صورت زیگزاکی کشت می شود.

**انکوباسیون محیط کشت های مورد کنترل کیفی:**

محیط ها را بعد از تلقیح تحت شرایط انکوبه نمائید. به طور نرمال مدت زمان انکوباسیون 24-18 ساعت یا 48-24 ساعت در 2±35 درجه سانتی گراد می باشد. در جدول 3 دما، اتمسفر مورد نیاز و مدت زمان انکوباسیون برای هر باکتری کنترل کیفی آمده است. برای مثال محیط شکلات آگار و محیط های کشت برای جداسازی انتخابی گونه های نایسریای بیماریزا باید در 10-5 CO2انکوبه شوند (انکوباتور CO2 دار یا جار شمع دار) و در 24-18 ساعت و 48-24 ساعت بررسی شوند.

جدول 3. دما، اتمسفر مورد نیاز و مدت زمان انکوباسیون برای هر باکتری کنترل کیفی.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **زمان انکوباسیون** | **اتمسفر انکوباسیون** | **دمای انکوباسیون** | **سویه های کنترل کیفی** |
| 24-18 ساعت | هواي محیط یا غنی شده با CO2 (بسته به باکتری) | C° 36-35 | باکتري هاي داراي رشد سریع |
| 72-24 ساعت | غنی شده با CO2 | C° 36-35 | باکتري هاي داراي نیازهاي خاص براي رشد |
| 72-24 ساعت | گاز بی هوازی | C° 36-35 | بی هوازي ها |
| 48-24 ساعت | گاز Campy (میکروآئروبیک) | C° 42 | کمپیلوباکتر |
| 21-7 روز | غنی شده با CO2 | C° 36-35 | مایکوباکتریوم ها |
| 72 ساعت و بیشتر | هواي محیط | C° 36-35 | مخمرها |
| 72 ساعت و بیشتر | هواي محیط | C° 30-25 | کپک ها |

**(5) ملاحظات ایمنی:**

* استفاده از روپوش، دستکش نسوز و در صورت نیاز عینک و رعایت الزامات ایمنی در زمان انجام فعالیت کنترل کیفیت محیط های کشت الزامی است.
* هیچگاه محیط کشت حاوی میکروارگانیسم زنده را داخل دستشویی نریزید.

**(6) محدوديت ها و تداخلات:**

برای هر محیط جداگانه توضیح داده شد.

**(7) مستندات و سوابق:**

فرم سوابق یاLog book ساخت و کنترل کیفی محیط های کشت، عدم انطباق ها و اقدامات اصلاحی.

**(8) منابع**:

1. کتاب آزمایشگاه باکتری شناسی پزشکی. جلد اول: تشخیص. دکتر داریوش شکری و همکاران. انتشارات تیمورزاده نوین و کیا. 1402.
2. محیط هاي کشت آزمایشگاهی (موارد مصرف وکنترل کیفی) به انضمام اطلس رنگی محیط هاي کشت؛ گردآوري و ترجمه مهناز صارمی و محمد علی صارمی؛ آزمایشگاه مرجع سلامت، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی؛ 1387.
3. استانداردهای کنترل کیفیت رنگ ها، محیط های کشت، معرف ها و دیسک های تشخیصی. آزمایشگاه مرجع سلامت. وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی. 1397.
4. Isenberg D. Henry: *Clinical Microbiology Procedures Handbook*، American Society for Microbiology. 2007.
5. Koneman، Elmer W، et al. Color Atlas and Text book of Diagnostic Microbiology. *Philedelphia: Lippincott-Raven Publishers. Seventh edition.* 2021.
6. Quality Assurance for commercially prepared Microbiological Culture Media- Second Edition; CLSI, 2022.
7. Oxoid company- General Guide to the use of Oxoid culture Media.
8. Microbiological culture media; second Edition; 2009; Becton, Dickinson and Company.Approved standard- Third edition document M22-A3. Vol. 24, No. 19; 2006.