**11. تایر مارتین آگار**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **اسم آزمایشگاه:** | {{LabName}} | |
| **اسم سند:** | **دستورالعمل ساخت و کنترل کیفی محیط کشت تایر مارتین آگار اصلاح شده** | |
| **کد سند:** | D-003-0013 | |
| **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:**

تایر مارتین آگار اصلاح شده یک محیط انتخابی و غنی‌شده برای کشت و جداسازی نایسریاهای بیماریزا از فلور مختلط با سرکوب اکثر دیپلوکوک‌های گرم منفی دیگر، باسیل‌های گرم منفی، ارگانیسم‌های گرم مثبت و مخمرها می‌باشد. هدف از این دستورالعمل تشریح روش ساخت و کنترل کیفی این محیط می باشد.

## **(2) ترکیبات محیط (بر حسب گرم در لیتر):**

کازئین پپتون (5/7)، پپتون گوشتی(5/7)، نشاسته ذرت (1)، دی‌پتاسیم فسفات (4)، مونوپتاسیم فسفات (1)، کلرید سدیم (5)، محلول هموگلوبین (10)، غنی‌ساز ایزوویتال ایکس تجاری (10 میلی لیتر)، ونکومایسین (300 میکروگرم)، کولیستین (750 میکروگرم)، نیستاتین (U 5/12)، تری‌متوپریم لاکتات (5 میکروگرم) و آب دمینرال شده (1 لیتر)، و آگار (12)،**pH نهایی در دمای 25 درجه سانتی‎گراد: 2/0 ± 2/7**.

**(3) اساس محیط**:

* تایر مارتین آگار اصلاح شده بر پایه آگار شکلات II است که حاوی محیط پایه GC آگار بهبود یافته، هموگلوبین گاوی و یک غنی‌ساز است. پایه محیط حاوی مواد مغذی نیتروژن‌دار به شکل کازئین و پپتون‌های گوشتی، بافر فسفات برای حفظ pH و نشاسته ذرت است که اسیدهای چرب سمی موجود در آگار را خنثی می‌کند.
* دکستروز برای تقویت رشد گونوکوک اضافه می‌شود. هموگلوبین، فاکتور X یا هِمین را فراهم می‌کند. غنی‌ساز ایزوویتال ایکس یک مکمل تعریف‌ شده است که فاکتور V یا نیکوتین‌آمید آدنین دی ‌نوکلئوتید (NAD)، ویتامین‌ها، اسیدهای آمینه، کوآنزیم‌ها، دکستروز، یون آهن و سایر عواملی را که باعث بهبود رشد نایسریاهای بیماری‌زا می‌شوند، فراهم می‌کند.
* این محیط‌ انتخابی حاوی عوامل ضد میکروبی ونکومایسین، کولیستین و نیستاتین (مهارکنندهV-C-N ) برای سرکوب فلور طبیعی است. ونکومایسین عمدتاً علیه باکتری‌های گرم مثبت فعال است، کولیستین باکتری‌های گرم منفی از جمله سودوموناس را مهار می‌کند و نیستاتین کاندیداها را مهار می‌کند. تری‌متوپریم لاکتات از ازدیاد گونه‌های پروتئوس جلوگیری می‌کند.

**(4) مراحل ساخت محیط:**

### **آماده‌سازی GC آگار پایه:** اجزای محیط GC بیس را به آب مقطر اضافه و حجم را به 730 میلی‌لیتر برسانید. خوب آن را مخلوط کنید. محیط را به آرامی حرارت داده تا به جوش آید، سپس در دمای 121 درجه سانتی‌گراد به مدت 15 دقیقه اتوکلاو کنید. اجازه دهید محیط تا دمای 45 تا 50 درجه سانتی‌گراد خنک شود.

### **آماده‌سازی محلول هموگلوبین:** هموگلوبین را به آب مقطر اضافه کنید و حجم آن را به 250 میلی‌لیتر برسانید. کاملاً آن را مخلوط کنید. در دمای 121 درجه سانتی‌گراد به مدت 15 دقیقه اتوکلاو کنید. اجازه دهید محیط تا دمای 45 تا 50 درجه سانتی‌گراد خنک شود.

### **آماده‌سازی غنی‌ساز ایزوویتال ایکس (10 میلی‌لیتر):** مکمل را به آب مقطر اضافه کنید و حجم را به 10 میلی‌لیتر برسانید. کاملاً مخلوط کنید. با فیلتر سرنگی آن را استریل کنید (اتوکلاو نشود).

### **تهیه محلول آنتی‌بیوتیک VCNT (10 میلی‌لیتر):** میزان مشخص از آنتی بیوتیک ها را به آب مقطر اضافه کنید و حجم را به 10 میلی‌لیتر برسانید. کاملاً مخلوط کرده و با فیلتر آن را استریل کنید (اتوکلاو نشود).

## **آماده‌سازی محیط:** به 730 میلی‌لیتر از GC آگار بیس سرد شده و استریل، 250 میلی‌لیتر محلول هموگلوبین استریل، 10 میلی‌لیتر غنی‌ساز ایزوویتال ایکس و 10 میلی‌لیتر محلول آنتی بیوتیک VCNT را به صورت آسپتیک اضافه کنید.کاملاً محیط را مخلوط کرده و در ظروف پتری استریل بریزید یا در لوله‌های استریل توزیع کنید.

**(5) کنترل کیفی محیط:**

**ظاهر محیط:** پودر خامه ای تا زرد همگن بدون چسبندگی پودر.

**حالت محیط بعد از ژله شدن**: سفت، قابل مقایسه با ژل آگار 3/1 درصد.

**رنگ و شفافیت محیط آماده شده:**

محیط پایه ​: ژل شفاف تا کمی شیری رنگ (کدر) زرد.

پس از افزودن هموگلوبین یا خون لیز شده استریل و مکمل ها: ژل مات به رنگ شکلاتی.

**الگوی رشد ارگانیسم های کنترل کیفی** (**رقت باکتری:**µL 10 از غلظت 01/0 درصد نیم مک فارلند، **انکوباسیون**:جار شمع دار یا انکوباتور CO2 به مدت 24-18 ساعت در 35 درجه):

|  |  |
| --- | --- |
| **نتایج** | **ارگانیسم کنترل کیفی** |
| رشد خوب**؛** کلنی کوچک، سفید مایل به خاکستری تا بی‌رنگ، موکوئیدی با قوام ملایم و حاشیه مشخص، و معمولاً با قطر 5/0 تا 1 میلی‌متر | نایسریا گونوره‌آ  **ATCC 19424** |
| رشد خوب**؛** کلنی متوسط تا بزرگ، خاکستری آبی و موکوئیدی | نایسریا مننژیتیدیس ATCC13090 |
| **منع کامل رشد** | پروتئوس میرابیلیس ATCC25933 |
| **منع کامل رشد** | **اشریشیاکلی ATCC25922** |

## **(6) محدودیت‌ها و تداخلات:**

* برای تایید نهایی، آزمایشات بیوشیمیایی و سرولوژیکی اضافی توصیه می‌شود.
* جهت کشت نایسریاهای بیماری‌زا، محیط باید در حضور 3 تا 7 درصد CO2 انکوبه شود. غلظت‌های بالاتر CO2 ممکن است برای برخی از سویه‌ها مهار کننده باشد.
* محیط‌های انتخابی برای نایسریاهای بیماری‌زا ممکن است سایر باکتری‌های بیماری‌زا مانند هموفیلوس را مهار کند.
* مهار برخی از سویه‌های نایسریا گونوره‌آ توسط مولفه‌های مهار کننده V-C-N و تری‌متوپریم لاکتات گزارش شده است.
* در حالی که نایسریاهای ساپروفیت به طور کلی توسط محیط‌های انتخابی سرکوب می‌شود، گاهی رشد نایسریا لاکتامیکا در محیط کشت تایر مارتین آگار اصلاح شده، گزارش شده است.
* برخی از سویه‌های گونه کاپنوسیتوفاگا ممکن است در این محیط‌های انتخابی در صورت تلقیح با نمونه‌های حلقی، رشد کنند.

**(7) 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. Quality Assurance for commercially prepared Microbiological Culture Media- Second Edition; CLSI, 2022.