بسم الله الرحمن الرحيم

کنترل کیفی محیط کشت، رنگها و معرفها در آزمایشگاه میکروب شناسی

دکتر نصراله سهرابی- عضو هیات علمی گروه علوم آزمایشگاهی

Laboratory Quality Assurance

تعریف :

ایجاد اطمینـــان در پزشـک ، بیمـار و خـود پرسـنل آزمایشـگاه در مـورد اعتبـار ، ارزش ، دقت و صحت آزمایشاتی است که در آزمایشگاه انجام میگیرد.

نکات زیر در استقرار یک برنامه کنترل کیفی در آزمایشگاه میکروبیولوژی می باید پی گیری شود :

۱- تهیه متد مناسب برای انتقال و جمع آوری نمونه

۲- انتخاب پرسنل مناسب برای انجام آزمایش

۳- فراهم نمودن وسایل و امکانات لازم برای آزمایشات میکروبیولوژی

۴- توجه و دقت بر روی روشهای آزمایشگاهی و گزارشات برای تعیین درستی و اطمینان از نتایج

۵- شناسائی خطاهای آزمایش و تصحیح آنها

کنترل کیفی محیط کشت

الف – قبل از ساخت
تاریخ مصرف محیط کشت
ثبت زمان دریافت و کارخانه سازنده
تاریخ استفاده
بررسی ظاهر محیط
نگه‌داری محیط در حرارت مساوی یا کمتر از ۲۵ درجه سانتی‌گراد

ب – هنگام ساخت
ترازوی دقیق
نکات نوشته شده بر روی قوطی
عدم مخلوط کردن محیط‌های جدید و قدیم
آب‌کشی ارلن و سایر ظروف با آب مقطر
استفاده از ارلن با ظرفیت بیشتر از نصف حجم محیط
عدم حرارت‌دهی زیاد
بررسی پلیت‌ها

جدول شماره ۱-۴ : علل اشکالات رایج در محیط های کشت

اشکال	علت
نرم بودن آگار	حرارت بیش از حد، pH پائین کـه موجـب هیـدرولیز آگـار می گردد. توزین غلط، مخلوط نکردن خوب و عدم حل شدن
pH نامناسب	استفاده از شیشه های قلیائی، آب ناخالص، حرارت بـیش از حـد، آلـودگی شـیمیائی، انـدازه گیـری pH در حـرارت نامناسب، استفاده از pH متر استاندارد نـشده و اسـتفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده
رنگ نامناسب	ناخالص بودن آب، استفاده از شیشه آلات کثیف، استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شـده، حـرارت دادن بـیش از حد و pH نامناسب
تیره شدن محیط	حرارت دادن بیش از حد، استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده
سمیت	حرارت دادن بـیش از حـد (سـوزاندن محـیط)، اسـتفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده
رشد ضعیف میکرو ارگانیسم	استفاده از آب و یا شیشه آلات آلوده، اسـتفاده از پودرهـای محیط کشت خراب شده، توزین غلـط و عـدم بـه هـم زدن کافی محیط و حرارت بیش از حد.
داشتن خاصیت ضعیف انتخابی و یا افتراقی	استفاده از آب و یا شیشه آلات آلوده، اسـتفاده از پودرهـای محیط کشت خراب شده ، توزین غلط و عـدم بـه هـم زدن کافی محیط و حرارت بیش از حد.

نحوه نگه‌داری محیط‌های کشت پس از ساخت

نگه‌داری در یخچال ۸-۲ درجه سانتی گراد
محیط تایوگلیکولات براث در دمای محیط
پلیت‌ها در صورت نگه‌داری در کیسه‌های پلاستیک تا ۴ هفته قابل مصرف هستند.
لوله‌های در پنبه‌ای تا ۳ هفته (قطر پنبه زیاد باشد)
لوله‌های در پیچ‌دار تا ۳ ماه

رطوبت Moisture

- در صورت خيس بودن سطح آگار در زمان مصرف، ظرف پتري را به مدت ۳۰- ۱۰ دقيقه در انكوباتور و يا با درپوش نيمه باز، زير هود كلاس II در حرارت اتاق قرار دهيد تا رطوبت اضافی آن تبخير گردد. براي تلقيح باكتری، سطح محيط كشت بايد مرطوب ولی فاقد قطرات آب بر روی آگار يا درپوش ظرف پتري باشد.

کنترل کیفی محیط‌های کشت معمول با باکتری مورد نظر و نتایج مورد انتظار

محیط	زمان	ارگانیسم‌های کنترلی	نتیجه قابل انتظار
بایل اسکولین آگار	۲۴ ساعت	انتروکک استرپتوکک پیوژن	رشد مثبت و محیط سیاهرنگ می‌شود رشد منفی
بلاد آگار	۲۴ ساعت	استرپتوکک پیوژن استرپتوکک پنومونیه	رشد مثبت و دارای همولیز بتا رشد مثبت و دارای همولیز آلفا
شکلات آگار	۲۴ ساعت	هموفیلوس آنفلوانزا نایسریا گونوره	رشد مثبت رشد مثبت
لایزین دکربوکسیلاز محیط به وسیله روغن استریل پوشانده شود	۲۴ ساعت	سالمونلا شیگلا	مثبت بنفش منفی زرد
اورنیتین	۴۸ ساعت	سالمونلا کلبسیلا	مثبت بنفش منفی زرد
آرژینین (دی هیدرولاز)	۴۸ ساعت	سالمونلا پروتئوس میرابیلیس	مثبت بنفش منفی زرد
محیط KIA و TSI	۲۴ ساعت	E. Coli Shigella Salmonella Psudomonas	A/A AlK/A ALK/SH2 ALK/ALK

کنترل کیفی محیط‌های کشت معمول با باکتری مورد نظر و نتایج مورد انتظار

محیط	زمان	ارگانیسم‌های کنترلی	نتیجه قابل انتظار
مک‌کانگی آگار	۲۴ ساعت	E. Coli پروتئوس انتروکک	کلنی‌های قرمز رنگ کلنی‌های بی‌رنگ (بدون سوآرمینگ) رشد منفی
محیط مالونات	۲۴ ساعت	E. Coli کلبسیلاپنومونیه	منفی (سبز رنگ) مثبت (آبی رنگ)
مانیتول سالت آگار	۲۴ ساعت	استافیلوکوک ارئوس استافیلوکوک اپیدرمیدیس اشریشیاکلی	کلنی‌های زردرنگ کلنی‌های قرمز رنگ رشد منفی
MR VP	۴۸ ساعت	E. Coli کلبسیلا پنومونیه	VP- MR+ VP+ MR-
DNASE Agar	۲۴ ساعت	S. Aureus S. Epidermidis	زون شفاف بعد از اضافه کردن اسیدکلریدریک ۱ N بدون زون
فنیل الکل بلادآگار	۲۴ ساعت	Streptococcus spp E. Coli	رشد خوب بدون رشد
نیترات براث یا آگار	۲۴ ساعت	E. Coli Acinetobacter	مثبت قرمز بعد از اضافه کردن معرف منفی عدم رنگ قرمز
محیط of گلوکز بدون روغن	۲۴ ساعت	سودوموناس اسینتوباکتر نوع Lwoffi	در سطح محیط زرد بدون تغییر

کنترل کیفی محیط‌های کشت معمول با باکتری مورد نظر و نتایج مورد انتظار

محیط	زمان	ارگانیسم‌های کنترلی	نتیجه قابل انتظار
Indol (SIM)	۲٤ ساعت	E. Coli کلبسیلا	مثبت – قرمز منفی – بدون رنگ
فنیل آلانین دآمیناز	۲٤ ساعت	E. Coli پروتئوس	منفی مثبت سبز بعد از اضافه کردن کلرور فریک ۱۰٪
سالمونلا – شیگلا آگار	۲٤ ساعت	E. Coli سالمونلا	منفی کلنی‌های بی‌رنگ با مرکز سیاه
هکتون انتریک آگار (HE)	۲٤ ساعت	سالمونلا شیگلا E. Coli	کلنی سبز به مرکز سیاه کلنی سبز شفاف رشد محدود شونده با کلنی نارنجی
XLD	۲٤ ساعت	سالمونلا شیگلا E. Coli	کلنی در مرکز سیاه در اطراف کلنی هالهٔ قرمز کلنی بی رنگ شفاف (قرمز) کلنی زرد
کریستنسنس اوره آگار	۲٤ ساعت	E. Coli پروتئوس کلبسیلا	منفی زرد مثبت صورتی صورتی در سطح
CTA Cystine tripticase agar-dextrose	۲٤ تا ٤۸ ساعت	نایسریا گونوره موراکسلا کاتارالیس	تولید رنگ زرد بدون تغییر رنگ

کنترل کیفی محیط‌های کشت معمول با باکتری مورد نظر و نتایج مورد انتظار

محیط	زمان	ارگانیسم‌های کنترلی	نتیجه قابل انتظار
لایزین آیرون آگار LIA	۲۴ ساعت	E. Coli شیگلا سالمونلا پروتئوس	سطح و عمق بنفش (مثبت) سطح بنفش – عمق زرد (منفی) سطح و عمق بنفش +SH2 (مثبت) سطح قرمز – عمق زرد
سلنیت براث(SF)	۲۴ ساعت	سالمونلا E. Coli	بعد از کشت مجدد رشد می‌کند بعد از کشت مجدد رشد نمی‌کند
سیمونز سیترات	۴۸ ساعت	E. Coli کلبسیلا	رشد منفی رشد مثبت – رنگ آبی
آگارT.C.B.S	۲۴ ساعت	Vibrio cholerae	کلنی‌های زرد رنگ
تتراتیونات براث		E. Coli Salmonella	رشد منفی رشد مثبت
تایر مارتین آگار	۲۴ ساعت با(CO_2)	نایسریا مننژیتیدیس نایسریاگنوره آ E. Coli کاندیدا آلبیکانس	رشد مثبت رشد مثبت رشد منفی رشد منفی
تایوگلیکولات براث	۲۴ ساعت	باکتروئیدس فراجیلیس	رشد مثبت
E.M.B	۲۴ ساعت	E. Coli K. Pneumoniae S. Flexneri	رشد خوب با جلای فلزی رشد خوب کلنی بنفش رشد خوب کلنی شفاف

کنترل کیفی رنگ‌ها و معرف‌ها

محیط	منفی	مثبت	معرف یا رنگ	زمان کنترل
BA	انتروکوک فکالیس	استرپتوکوک پیوژن	دیسک باسیتراسین	هر ویال جدید
Typtic soy Agar (T.S.A)	انتروکک	استافیلوکوک ارئوس	کاتالاز (آب اکسیژنه ۳٪)	هر بار استفاده
T.S.A	استافیلوکوک اپیدرمیدیس	استافیلوکوک ارئوس	کوآگولاز (پلاسما)	هر بار استفاده
T.S.A	کلبسیلا پنومونیه	اشریشیاکلی	بتاگلوکورو نیداز	هر بار استفاده
در لام به صورت مخلوط دیده می‌شود	اشریشیاکلی	استافیلوکک	رنگ‌آمیزی گرم	هر هفته و هنگام ساخت
T.S.I	سالمونلا	E. Coli	ONPG	هر ویال جدید
B.A	استرپتوکک ویریدنس	استرپتوکک پنومونیه	دیسک اپتوچین	هر ویال جدید
T.S.A	E. coli	Pseudomonas	اکسیداز	هر ویال جدید
T.S.A	هموفیلوس آنفلوانزا	هموفیلوس پارا آنفلوانزا	(دیسک یا نوار) فاکتور V	هر ویال جدید

کنترل کیفی رنگ‌ها و معرف‌ها

محیط	منفی	مثبت	معرف یا رنگ	زمان کنترل
T.S.A		هموفیلوس آنفلوانزا	(دیسک یا نوار) فاکتور XV	هر ویال جدید
گسترش تهیه شده از خلط	باکتریهای مخلوط با انواع غیر اسیدفاست	مایکوباکتریوم توبرکلوزیس	رنگ آمیزی Ziehl-neelsen	هر بار استفاده
TSA BA	باکتری مورد نظر	باکتری مورد نظر	آنتی سرم	هر ویال جدید – ماهیانه و هر ٦ ماه
BA	Enteroccus	Group B streptoccus	CAMP	هر بار استفاده
SIM	Klebsiella	E. Coli	کوواکس	هر بار استفاده
MR VP	Klebsiella E. Coli	E. Coli Klebsiella	MR VP	هر بار استفاده
نیترات آگار و یا برات	Acinetobecter	E. Coli	نتیرات	هر بار استفاده

QC OF STAINS

- All stains and reagents must be clearly labelled, dated, and stored correctly.
- Should not be used beyond their expiry date
- Should not be used when they show signs of deterioration like abnormal turbidity and decolouration.
- At regular intervals and whenever a new stain is prepared, control smears should be stained
- Smear should not be too thick.
- Decolourization is often incomplete which can result in gram negative organisms being reported as gram positive

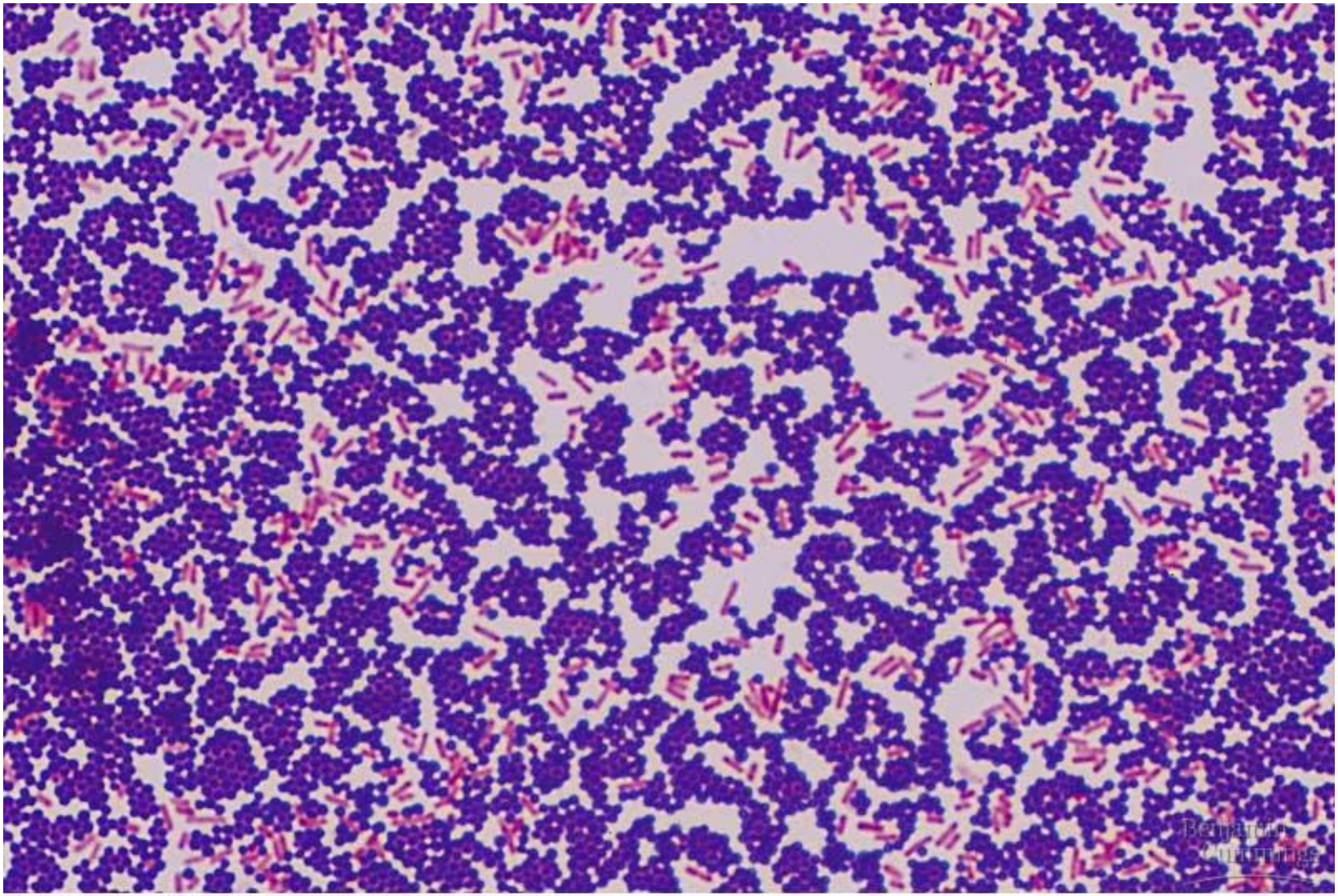
QC OF STAINS

Performance standards for stains

Stain	Control organism/ material	ATCC No	Expected result
Ziehl-Neelsen	*Mycobacterium sp.* *Esch. coli*	25177 25922	Pink red bacilli Blue bacilli
Acridine orange	*Esch. coli* *Staph.aurues*	25922 25923	Fluorescent bacilli/cocci
Giemsa	Thin film blood smear		Distinct staining of WBCs and RBCs
Gram	*Esch. coli* *Staph.aureus*	25922 25923	Gram -ve bacilli Gram +ve cocci
Iodine solution	Formalin treated stool specimen with cysts		Visible cyst nuclei
Spores	*Bacillus species*		Spores stain one colour and bacillus stains with counterstain

Quality control of stains need to be performed on weekly basis and also as and when a new lot of reagents for staining are procured

Gram Stain



Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

نگهداری و استفاده از سویه‌های باکتریایی

برای نگهداری سویه‌های باکتریایی می‌توان از روشهای طولانی مدت و کوتاه مدت استفاده نمود.

نگهداری طولانی مدت

نگهداری طولانی‌مدت باکتریها این امکان را می‌دهد که کلیه سویه‌های میکروبی اعم از هوازی (بارشد سریع ویا سخت رشد) ونیز بیهوازی ، ماهها و حتی سالها به صورت زنده نگهداری شوند. بهترین روشهای نگهداری طولانی مدت شامل لیوفیلیزاسیون (Freeze drying) و نگهداری در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد یا پایین تر (در دیپ فریز یا در نیتروژن مایع) می‌باشد.

۱- نگهداری در دیپ فریز (۵۰- تا۷۰- درجه سانتی‌گراد یا پایینتر) ویا نیتروژن مایع :

باکتری مورد نظر را روی محیط مغذی مانند پلیت (TSA (Trypticase Soy Agar حاوی ۵٪ خون گوسفند و در مورد میکروارگانیسمهای سخت رشد روی محیط آگار شکلاته کشت دهید. پلیتها را به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۲±۳۵ درجه سانتی‌گراد و در صورت نیاز تحت شرایط CO_2 برای هر باکتری انکوبه نمائید.

بعد از انکوباسیون، خالص بودن و مورفولوژی کلنی‌ها را بررسی نموده و در صورت نیاز، تستهای بیوشیمیایی آنرا انجام دهید. سپس از باکتری رشد یافته ، سوسپانسیون غلیظی در ۱۰۰-۵۰ میلی‌لیتر از یک محیط محافظت‌کننده از سرما (Cryoprotective) تهیه نمائید. این محیط برای جلوگیری از تخریب سلولهای باکتری در شرایط انجماد مورد استفاده قرار می‌گیرد. محیط محافظت‌کننده از سرما می‌تواند Skim milk ، خون گوسفند یا خرگوش دفیبرینه استریل یا Tryptic Soy Broth (TSB) حاوی گلیسرول با غلظت نهایی ۱۵-۱۰٪ باشد.

سپس از سوسپانسیون باکتریایی فوق به حجم ۱ mL- ۰/۵ در ویالهای شیشه‌ای یا پلاستیکی کوچک استریل توزیع کنید . ویال های ذخیره خود را به مقدار مصرف یکسال، آماده نمائید.

ویالهای حاوی سویه‌ها را می‌توان در برودت ۵۰- تا ۷۰- درجه سانتی‌گراد به مدت یکسال نگهداری نمود. در صورت عدم دسترسی به فریزر ۷۰- درجه می توان سویه‌های با رشد سریع را در فریزر ۲۰- درجه نیز نگهداری نمود. در این شرایط توجه به نکات زیر ضروری است:

- سویه‌های سخت رشد مانند هموفیلوس انفلوآنزا و نیسریا گنوره در این دما قابل نگهداری نمی‌باشند و باید در فریزر ۷۰- درجه نگهداری شوند.
- سویه‌های بارشد سریع در این دما عمر کوتاه تری دارند. بنابراین توصیه می‌شود برای اطمینان از حیات سویه‌ها، هر چند ماه یکبار ، طبق روش زیر کشت داده شوند:

یک ویال از فریزر بیرون آورده و آنرا سریعاً زیر آب جاری ولرم، ذوب نمائید. سوسپانسیون ذوب شده را روی محیط آگار خوندار یا شکلاته (در مورد باکتریهای سخت رشد) تلقیح کرده و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۲±۳۵ درجه ودر صورت نیاز در شرایط CO_2 انکوبه نمایید. این باکتری برای تهیه کنترل کاری working control بکار می رود. قبل از هر اقدام باید از خالص بودن نمونه ، اطمینان حاصل کرد. **ویال مورد استفاده بعد از ذوب شدن باید دور انداخته شده و بهیچوجه مجددا فریز نگردد.**

کشتهای working control : عبارتست ازکشت مجدد از کشت ذخیره فریز شده که برای کنترل کیفیت محیط کشت و.. استفاده می‌شود.

از کشت ذخیره تا ۳ پاساژ پشت سر هم می‌توان انجام داد . پس از آن ، نمونه باید دور انداخته شده و از یک کشت ذخیره فریز شده دیگر برای تهیه کشتهای working control استفاده شود. پاساژهای مکرر(بیش از ۳ پاساژ)، احتمال تغییر فنوتیپی سویه‌ها را افزایش می‌دهد.

برای تهیه working control ، از کشت ذخیره فریز شده ، روی پلیت یا آگار شیبدار تلقیح و آنرا به مدت یک شبانه‌روز تا زمانی که رشد مناسبی بدست آید، انکوبه نمائید. در مورد ارگانیسمهای با رشد سریع، این پلیت یا آگار شیبدار را می‌توان در ۸-۲ درجه سانتیگراد یا در دمای اتاق تا مدت ۴ هفته نگهداری نمود. بعد از هر پاساژ، خالص بودن و مورفولوژی کلنی‌ها را بررسی نمائید.

۲- استفاده از روغن معدنی در دمای اتاق :

۱- محیط کشت Brain Heart Infusion Agar (BHIA) را با شیب کم در لوله تهیه نمایید. برای باکتریهای مشکل‌پسند مانند گونوکک ، مننگوکک ، استرپتوکوکوس پنومونیه و هموفیلوس آنفلوانزا ، محیط شکلات آگار را پس از خروج محیط BHIA از اتوکلاو و رسیدن به دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد با افزودن ۵٪ خون گوسفند و سپس قرار دادن آن در بن‌ماری ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه تهیه نمائید.

۲- روغن معدنی (یا پاراقین مایع) را در حرارت خشک (۱۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یکساعت) استریل نمائید.

۳- میکروب مورد نظر را روی محیط ، کشت دهید.

۴- بعد از بدست آوردن کشت کافی ، روغن استریل را به مقدار ۱ cc روی سطح محیط بریزید.

۵- در صورت نیاز به کشت مجدد ، نمونه از سطح آگار (زیر روغن) برداشته می‌شود.

۶- بعد از ۱۲-۶ ماه تجدید کشت نمایید.