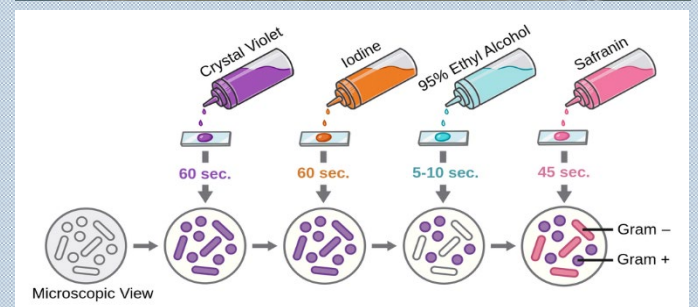


# Quality control in microbiology



# کنترل کیفی در بخش میکروب شناسی

- کنترل کیفیت محیط های کشت
- کنترل کیفیت آزمایشات تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی
- کنترل کیفیت رنگ ها و معرف ها
- کنترل کیفیت ابزار ها و دستگاهها



# کنترل کیفی محیط کشت

- ویژگی های آب مورد استفاده در تهیه محیط کشت
- استانداردهای لازم برای پتری دیش
- نکاتی که در تهیه محیط کشت باید رعایت کنید
- تنظیم PH
- بررسی میزان آلودگی
- بررسی قابلیت مغذی بودن محیط کشت
- بررسی ظرفیت مهارکنندگی محیط کشت
- روش های نگهداری محیط کشت



# کنترل کیفی محیط کشت (معیار های آب مورد استفاده)

- سه معیار مهم برای آب مورد استفاده در تهیه محیط های کشت شامل :
  - وجود یونهای مس، قدرت هدایت الکتریکی و pH می باشد.
  - در شرایط ایده آل یونهای مس بدلیل خاصیت مهارکنندگی برای اغلب میکروارگانیسم ها نباید در آب مورد استفاده جهت تهیه محیط های کشت وجود داشته باشد.
  - قدرت هدایت الکتریکی آب باید کمتر از ۱۰ میکرو زیمنس بر سانتی متر مربع باشد
  - همچنین pH آب مورد استفاده بهتر است کمی اسیدی باشد (۵-۸).



# بررسی کیفیت پتری دیش

- معمولا با اتیلین اکسید یا اشعه گاما پتری دیش ها را استریل می کنند
- در استریل کردن با اتیلن اکسید بایستی پتری دیش را از نظر وجود بقایای اتیلن اکسید به روش کروماتوگرافی بررسی کرد زیرا دارای اثرمهارى روی باکتریهاست
- در صورت شیشه ای بودن پتری دیش بایستی از جنس بروسیلیکات استفاده کرد  
قلیایی بودن پتری دیش سبب آزاد سازی قلیا در محیط کشت خواهد شد.



# پارامترهای فیزیکی در پتری دیش

- فاقد حفره
- ناصافی سطح محیط پذیرفته نیست
- فاقد ترک خوردگی



# ثبت اطلاعات محیط کشت

• الف) محیط آماده مصرف تجاری

منبع تهیه (شرکت سازنده)

شماره ساخت (lot number)

تاریخ انقضا

تاریخ دریافت

تاریخ شروع به استفاده

شرایط نگهداری مطابق دستور العمل سازنده (در ۲-۸ درجه)

• ب) محیط 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.



# بررسی ظاهری محیط کشت

- شکستگی و آسیب دیدگی پلیت و لوله
- جدا شدن آگار از جداره پلیت و لوله
- یخ زدگی یا ذوب شدن آگار
- پر شدن ناصاف پلیت
- مقدار ناکافی آگار در پلیت (نباید عمق کمتر از ۳ میلی متر داشته باشد)
- وجود همولیز در محیط های حاوی خون
- تغییر در رنگ مورد انتظار برای هر محیط کشت
- وجود حباب یا ناهمواری در سطح محیط
- رطوبت اضافی یا از دست رفتن آب محیط
- آلودگی قابل مشاهده
- رسوب در محیط



# PH محیط کشت

- محیط های کشت اگر به طور مناسب تهیه شوند نیازی به تنظیم pH ندارند.
- PH نهایی محصول استریل شده را می توان روی پلیت یا بطری اندازه گیری کرد، اما باید آنها را بعد از سنجش pH دور ریخت.
- بنابراین بعد از استریل شدن و خنک شدن محیط کشت تا دمای  $25^{\circ}\text{C}$  ، مقدار pH را در حد مورد نظر ( $\pm 0.2$ ) تنظیم نمایید.
- تنظیم pH معمولا با استفاده از هیدروکسید سدیم ۴۰ گرم در لیتر (تقریبا" یک مولار) و یا با استفاده از اسید کلریدریک ۳۶/۵ گرم در لیتر (تقریبا" یک مولار) انجام می شود.



# اندازه گیری و تنظیم pH محیط کشت

- روش اول: روش خیساندن (Macerate)
- آگار یک پلیت را در ظرفی کوچک حاوی مقدار کمی آب مقطر ( ۵-۷ ml) له کرده و به مدت ۱۰ دقیقه بخیسانید، سپس نوک الکتروود pH متر را در این مخلوط غوطه ور کنید.
- روش دوم: نوک الکتروود pH متر را در داخل ارلن کوچکی قرار دهید. مقدار اندکی از آگار مذاب را به داخل ارلن ریخته، پس از سفت شدن آگار، pH را اندازه گیری نمایید.
- روش سوم: از الکتروودهای سطحی استفاده نمایید



# بررسی آلودگی در محیط کشت

- برای سری ۱۰۰ تایی یا کمتر، ۳-۵٪ از لوله ها/ پلیت ها باید از نظر عدم وجود آلودگی و رشد باکتریایی بررسی شوند.
- برای مقادیر بیشتر از ۱۰۰ باید ۱۰ لوله یا پلیت برای بررسی آلودگی به صورت رندوم و تصادفی انکوبه شوند.
- نمونه ها باید برای ۲۴-۴۸ ساعت در دمای ۳۵-۳۷°C انکوبه، سپس به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق نگهداری شوند.
- نباید شواهدی از رشد میکروبی بعد از انکوباسیون مشاهده گردد.
- بعد از کامل شدن بررسی، باید تمام نمونه های بررسی شده دور ریخته شوند



## انجام آزمایش کنترل کیفیت خاصیت رشد و مهارکنندگی محیط کشت

- هر محیط کشت باید از نظر میزان رشد قابل قبول و/یا خصوصیت مهارکنندگی، با میکروارگانیسم های کنترل مناسب بررسی شوند.
- میکروارگانیسم های کنترل(ATCC ) که برای کنترل کیفی استفاده می شوند مطابق جدول برای هر محیط کشت مشخص شده است



جدول شماره ۳- الزامات کنترل کیفیت محیط های کشت

نتایج قابل انتظار	ارگانیسم های کنترلی (شماره ATCC)	اتمسفر، مدت زمان و دمای انکوباسیون	محیط کشت
رشد بر روی ساب کالجبر (TCBS) عدم رشد بر روی ساب کالجبر (TCBS)	<i>V. cholerae</i> (9459) <i>E. coli</i> (25922)	هوای، ۶-۱۲ ساعت، ۳۵°C	Alkaline peptone water (APW)
رشد می کند رشد می کند، همولیز بنا رشد می کند رشد می کند رشد می کند	<i>B. fragilis</i> (25285) <i>C. perfringens</i> (13124) <i>F. nucleatum</i> (25586) <i>P. anaerobius</i> (27337) <i>P. melaninogenica</i> (25845)	بی هوای، ۲۴-۴۸ ساعت، ۳۵°C	Anaerobic sheep blood and laked blood agar
			Anaerobic broths— (thioglycolate medium را ملاحظه نمایید)
رشد می کند، اطراف کثیفی ها سیاه می شود (ضعف یا بیشتر محیط سیاه می شود) مهار (جزئی تا کامل) اطراف کثیفی ها سیاه نمی شود	<i>E. faecalis</i> (29212) <i>S. pyogenes</i> (19615)	هوای، ۲۴-۴۸ ساعت، ۳۵°C	Bile esculin agar
رشد کثیفی های سیاه یا درخشندگی رشد کثیفی های سیاه یا خاکستری ملایم به سبز، ممکن است درخشندگی داشته باشند مهار جزئی، کثیفی های قهوه ای تا سبز مهار کامل رشد	<i>S. typhi</i> (19430) <i>S. typhimurium</i> (14028) <i>E. coli</i> (25922) <i>E. faecalis</i> (29212)	هوای، ۲۴-۴۸ ساعت، ۳۵°C	Bismuth sulfite agar
رشد می کند، همولیز بنا رشد می کند، همولیز انفا رشد می کند رشد می کند	<i>S. pyogenes</i> (19615) <i>S. pneumoniae</i> (6305) <i>S. aureus</i> (25923) <i>E. coli</i> (25922)	هوای یا CO <sub>2</sub> ، ۱۸-۲۴ ساعت، ۳۵°C	Blood agar (BA)—nonselective sheep blood agar media
رشد می کند واکنش مثبت (تشکیل نوک پیکان شفاف) واکنش منفی (عدم تشکیل نوک پیکان)	<i>S. aureus</i> (33862) or (25923) <i>S. agalactiae</i> (12386) <i>S. pyogenes</i> (19615)	هوای، ۱۸-۲۴ ساعت، ۳۵°C	Blood agar-CAMP test (trypticase soy agar [TSA] with sheep blood only)
رشد می کند، همولیز بنا رشد می کند، همولیز انفا رشد می کند مهار می شود (به طور جزئی)	<i>S. pyogenes</i> (19615) <i>S. pneumoniae</i> (6305) <i>S. aureus</i> (25923) <i>P. mirabilis</i> (12453)	CO <sub>2</sub> ، ۲۴-۴۸ ساعت، ۳۵°C	Blood agar—Selective sheep blood agar media (Columbia [CNA] agar, phenylethyl alcohol [PEA] agar)
رشد می کند رشد می کند مهار می شود (به طور جزئی)	<i>S. pyogenes</i> (19615) <i>S. aureus</i> (25923) <i>P. mirabilis</i> (12453)	CO <sub>2</sub> ، ۲۴-۴۸ ساعت، ۳۵°C	
رشد می کند رشد می کند	<i>B. fragilis</i> (25285) <i>S. pneumoniae</i> (6305)	بی هوای، CO <sub>2</sub> ، ۵ روز، ۳۵°C هوای، CO <sub>2</sub> ، ۵ روز، ۳۵°C	Blood culture media
رشد متوسط تا زیاد رشد متوسط تا زیاد رشد متوسط تا زیاد	<i>C. albicans</i> (10231) <i>S. flexneri</i> (12022) <i>S. pneumoniae</i> (6305)	هوای، ۲۴-۴۸ ساعت، ۳۵°C	Brain heart infusion agar
رشد می کند مهار می شود (به طور جزئی)	<i>C. jejuni</i> (33291) <i>E. coli</i> (25922)	O <sub>2</sub> کاهش یافته، غنی شده با CO <sub>2</sub> ، ۲۸ ساعت، ۲۲°C	<i>Campylobacter</i> agar
روی ساب کالجبر (شکلات آغز) رشد می کند روی ساب کالجبر (شکلات آغز) رشد می کند روی ساب کالجبر (بلاد آغز) رشد می کند روی ساب کالجبر (بلاد آغز) رشد می کند	<i>N. gonorrhoeae</i> (19424) <i>H. influenzae</i> (10211) <i>S. flexneri</i> (12022) <i>S. pneumoniae</i> (6305)	هوای، ۱۸-۲۴ ساعت، ۳۵°C	Cary-Blair transport medium



نتایج قابل انتظار	ارگانیسم های کنترلی (شماره ATCC)	اتمسفر، مدت زمان و دمای انکوباسیون	محیط کشت
رشد کلتی ها پس از ۴۸ ساعت هاله زرد دارند رشد کلتی ها پس از ۴۸ ساعت هاله قرمز دارند مهار جزئی در ۲۴h، مهار سولامینگ در ۴۸h	<i>S. aureus</i> (25923) <i>S. epidermidis</i> (12228) <i>P. mirabilis</i> (12453)	هوای، ۲۴-۴۸ ساعت، ۳۵°C	Mannitol salt agar
دهیدرولاز آرژینین و دکریوکسیلاز لوریتین، منفی (A) و دکریوکسیلاز لایزین، مثبت (Alk)	<i>K. pneumoniae</i> (33495)  <i>E. cloacae</i> (13047)	بیهوای، ۲۴-۹۶ ساعت، ۳۵°C	Moeller decarboxylase broth with amino acids (Arginine, Ornithine and Lysin)
MR مثبت (قرمز) و VP منفی (بدون تغییر) MR منفی (زرد) و VP مثبت (قرمز)	<i>E. coli</i> (25922) <i>E. aerogenes</i> (13048)	هوای، ۲۴-۴۸ ساعت، ۳۵°C	MR-VP broth
رشد می کند رشد می کند رشد می کند - ممکن است روی محیط های لتخلی مهار شود رشد می کند - ممکن است روی محیط های لتخلی مهار شود رشد می کند مهار (جزئی تا کامل روی محیط های لتخلی)	<i>M. tuberculosis H37Ra</i> (25177) <i>M. kansasii</i> Group I (12478) <i>M. scrofulaceum</i> Group II (19981) <i>M. intracellulare</i> Group III (13950) <i>M. fortuitum</i> Group IV (6841) <i>E. coli</i> (25922)	CO <sub>2</sub> > ۲۱٪، روز، ۳۵°C	Mycobacteria media (Lowenstein-Jensen agar and Middlebrook)
احیاء نیترات مثبت، تولید گاز احیاء نیترات منفی، عدم تولید گاز	<i>P. stutzeri</i> (17588) <i>A. calcoaceticus</i> (19606)	هوای، ۴۸ ساعت، ۳۵°C	Nitrate broth
رشد می کند رشد می کند	<i>C. albicans</i> (60193 or 10231) <i>T. mentagrophytes</i> (9533)	هوای، ۲۴-۷۲ ساعت، ۲۵-۳۵°C	Nonselective mycology media
رشد متوسط تا زیاد، ایجاد پیگمان سبز رشد متوسط تا زیاد رشد متوسط تا زیاد، کلتی های گرم تا حلالی	<i>P. aeruginosa</i> (10145) <i>S. flexneri</i> (12022) <i>S. aureus</i> (25923)	هوای، ۲۴-۴۸ ساعت، ۳۵°C	Nutrient agar (NA)
رشد خوب رشد خوب	<i>E. coli</i> (25922) <i>S. aureus</i> (25923)	هوای، ۲۴-۱۸ ساعت، ۳۵°C	Nutrient broth (NB)
لوله بدون روغن، A (زرد) و لوله دارای روغن (سبز) لوله بدون روغن، A (زرد) و گاز و لوله دارای روغن A (زرد) و گاز لوله بدون روغن، A (زرد) و لوله دارای روغن (سبز) لوله بدون روغن و لوله دارای روغن A (زرد)	<i>A. calcoaceticus</i> (19606) <i>E. aerogenes</i> (13048) <i>P. aeruginosa</i> (27853) <i>S. flexneri</i> (12022)	هوای، ۲۴-۴۸ ساعت، ۳۵°C	OF medium with Dextrose
دکستروز، لاکتوز و ماییتول AG (اسید و گاز) دکستروز، لاکتوز و ساکاروز A (اسید) دکستروز A، ماییتول Alk (قلبی) و ساکاروز AG دکستروز Alk لاکتوز و ساکاروز Alk دکستروز و ماییتول A، لاکتوز و ساکاروز Alk ماییتول AG	<i>E. coli</i> (25922) <i>E. faecalis</i> (33186) <i>P. vulgaris</i> (8427) <i>P. aeruginosa</i> (10145) <i>S. typhimurium</i> (14028) <i>S. flexneri</i> (9199) <i>S. aureus</i> (25923)	هوای، ۲۴-۴۸ ساعت، ۳۵°C	Phenol red agar/ broth with carbohydrates
مثبت (ایجاد رنگ سبز) منفی (بدون تغییر رنگ)	<i>P. vulgaris</i> (8427) <i>E. coli</i> (25922)	هوای، ۲۴-۱۸ ساعت، ۳۵°C	Phenylalanine agar



محیط کشت	اتمفسفر، مدت زمان و دمای انکوباسیون	ارگانسیم های کنترلی (شماره ATCC)	نتایج قابل انتظار
<i>Salmonella-Shigella (SS) agar</i>	هواری. ۲۴ ساعت، ۳۵°C	<i>S. typhimurium</i> (14028) <i>S. flexneri</i> (12022) <i>E. faecalis</i> (29212) <i>E. coli</i> (25922)	رشد کلتی های بی رنگ یا با بدون مراکز سیاه رشد می کند کلتی های بی رنگ مهار می شود (به طور کامل) مهار می شود (جزئی تا کامل، کلتی های صورتی تا قرمز با رسوب)
Selective mycology media	هواری. ۷ روز، ۲۵°C	<i>A. niger</i> (16404)  <i>C. albicans</i> (10231) <i>T. mentagrophytes</i> (9533) <i>E. coli</i> (25922)	مهار (جزئی تا کامل) روی محیط های جلوی سیکوهگرماید رشد می کند رشد می کند مهار (جزئی تا کامل) روی محیط های جلوی کلرامفنیکل
Selective media for pathogenic <i>Neisseria</i> spp.	CO <sub>2</sub> . ۴۸-۲۴ ساعت، ۳۵°C	<i>N. gonorrhoeae</i> (43069) <i>P. mirabilis</i> (43071)  <i>S. epidermidis</i> (12228)	رشد می کند مهار (جزئی) فقط برای محیط های حاوی تری متوریم استفاده شود مهار می شود (به طور جزئی)
Selective media for enterococci, with azide	هواری. ۴۸-۲۴ ساعت، ۳۵°C	<i>E. faecalis</i> (29212) <i>S. pyogenes</i> (19615) <i>E. coli</i> (25922)	رشد می کند، سیاه شدن اطراف کلتی ها مهار می شود (به طور جزئی تا کامل) مهار (جزئی). کلتی های بی رنگ روی بایل اسکولین آگار
Selective media for enterococci, without azide	هواری. ۴۸-۲۴ ساعت، ۳۵°C	<i>E. faecalis</i> (29212) <i>S. pyogenes</i> (19615)	رشد می کند، سیاه شدن اطراف کلتی ها مهار می شود (به طور جزئی تا کامل)
SIM medium	هواری. ۴۸-۲۴ ساعت، ۳۵°C	<i>E. coli</i> (25922) <i>S. typhimurium</i> (13311) <i>S. sonnei</i> (9290)	تولید SH <sub>2</sub> منفی، لندول مثبت و حرکت مثبت تولید SH <sub>2</sub> مثبت لندول منفی و حرکت مثبت تولید SH <sub>2</sub> منفی، لندول منفی و حرکت منفی
Simmons citrate agar	هواری. ۹۶-۴۸ ساعت، ۳۵°C	<i>E. aerogenes</i> (13048) <i>E. coli</i> (25922)	رشد می کند، سطح نیب در آبی می شود قلدرشد تا رشد کم بدون تغییر رنگ
Thioglycollate broth, with or without indicator	هواری. ۴۸ ساعت (در بیج های محکم)، ۳۵°C	<i>B. fragilis</i> (25285) <i>S. aureus</i> (25923)	رشد می کند رشد می کند
Thioglycollate broth, enriched with vitamin K and hemin	هواری. ۴۸ ساعت (در بیج های محکم)، ۳۵°C	<i>P. anaerobius</i> (27337) <i>B. vulgatus</i> (8482) <i>C. perfringens</i> (13124)	رشد می کند رشد می کند رشد می کند
Thiosulfate citrate bile salts sucrose (TCBS) agar	هواری. ۲۴-۱۸ ساعت، ۳۵°C	<i>V. cholerae</i> (9459) <i>V. parahaemolyticus</i> (17802) <i>F. coli</i> (29077) <i>P. aeruginosa</i> (10145) <i>E. faecalis</i> (29212)	رشد متوسط تا زیاد کلتی های زرد رشد متوسط تا زیاد کلتی های سبز آبی مهار جزئی تا کامل، کلتی های کوچک و شفاف مهار جزئی تا کامل، کلتی های سبز آبی مهار جزئی تا کامل، کلتی های کوچک و زرد
Triple sugar iron (TSI) agar	هواری. ۲۴-۱۸ ساعت، ۳۵°C	<i>E. coli</i> (25922) <i>S. typhimurium</i> (14028) <i>S. flexneri</i> (12022) <i>P. aeruginosa</i> (27853)	A/A، ایجاد گاز SH <sub>2</sub> /A، یا با بدون گاز، ایجاد SH <sub>2</sub> Alk/A Alk/A Alk/Alk



نتایج قابل انتظار	ارگانیسم های کنترلی (شماره ATCC)	اتمسفر، مدت زمان و دمای انکوباسیون	محیط کشت
رشد می کند، کفنی های متوسط تا بزرگ، سفید مایل به خاکستری و کمی محدب مویکیدی رشد می کند، کفنی های متوسط تا بزرگ، مات، مدور، کامل با پیچمان گرم-زرد تا طلایی رشد می کند	<i>S. flexneri</i> (12022)  <i>S. aureus</i> (25923)  <i>E. coli</i> (25922)	هوای، ۲۴-۴۸ ساعت، ۳۵°C	Trypticase soy agar (TSA)
رشد می کند رشد می کند	<i>E. coli</i> (25922) <i>S. aureus</i> (25923)	هوای، ۱۸-۲۴ ساعت، ۳۵°C	Tubed media (brain heart infusion and tryptic soy broth)
لوره از مثبت، رنگ قرمز صورتی لوره از منفی، بدون تغییر رنگ	<i>P. vulgaris</i> (8427) <i>S. typhimurium</i> (13311)	هوای، ۴۸-۸ ساعت، ۳۵°C	Urea agar/ broth
رشد می کند، کفنی های قرمز با مراکز سیاه رشد می کند، کفنی های قرمز با مراکز سیاه مهار جزئی مهار می شود (جزئی تا کامل)، کفنی های زرد تا زرد- قرمز	<i>S. typhimurium</i> (14028) <i>S. flexneri</i> (12022) <i>E. faecalis</i> (29212) <i>E. coli</i> (25922)	هوای، ۲۴ ساعت، ۳۵°C	Xylose lysine desoxycholate (XLD) agar



# تهیه سوسپانسیون میکروبی

- مرحله ۱) یک کشت از ارگانیزم کنترل کیفی مورد نظر روی پلیت بلاد آگار تهیه کنید.  
بعد از انکوبا سیون پلیت به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ، ۳-۵ کلنی ایزوله را در ۳-۵ میلی لیتر سرم فیزیولوژی ۱ استریل حل کرده و کدورت آن را با کدورت اساتاندارد نیم مک فارلند تنظیم نمایید.
- مرحله ۲) بررسی عملکرد محیط های کشت شامل بررسی :
  - الف : قابلیت مغذی بودن محیط کشت
  - ب: قابلیت مهار کنندگی محیط کشت



# بررسی عملکرد محیط های کشت

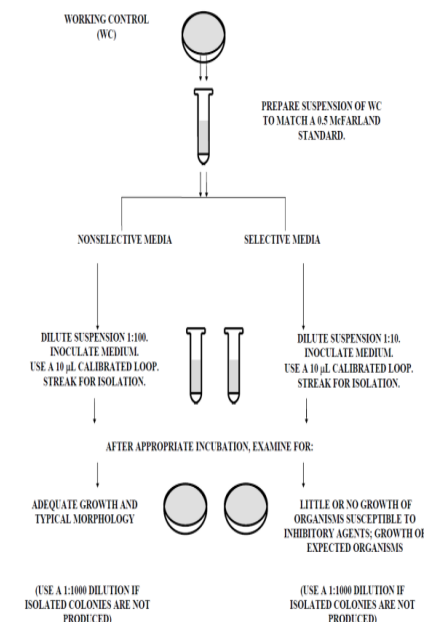
C. زمان انکوباسیون (جدول شماره ۱۲):

مدت انکوباسیون	انستر انکوباسیون	دمای انکوباسیون	سویه های کنترل کیفی
۱۸-۲۴ ساعت	هوای محیط یا غنی شده با CO <sub>2</sub>	۳۵-۳۶°C	باکتری های دارای رشد سریع
۲۴-۴۸ ساعت	غنی شده با CO <sub>2</sub>	۳۵-۳۶°C	باکتری های دارای نیازهای خاصی برای رشد
۲۴-۴۸ ساعت	گاز بی هوایی	۳۵-۳۶°C	بی هوایی ها
۲۴-۴۸ ساعت	گاز Campy	۳۳°C	کامپوباکتر
۲-۴۱ روز	غنی شده با CO <sub>2</sub>	۳۵-۳۶°C	ماکوپلازما
۳۲-۳۶ ساعت	هوای محیط	۳۵-۳۶°C	مخمر
۳۲-۳۶ ساعت	هوای محیط	۲۵-۳۰°C	کیک ها

\* انستور به نوع محیط بستگی دارد توصیه های سازنده را بررسی نمایید.

- (۱) بررسی ظرفیت مغذی بودن (nutritional activity) محیط های کشت غیر انتخابی پلیتی مانند بلاد آگار، نوترینت آگار، تریپتیک سوی آگار و ...
- سوسپانسیون اولیه میکروبی مطابقت یافته با کدورت نیم مک فارلند را مطابق شکل ۱ به نسبت ۱:۱۰۰۰ در سرم فیزیولوژی استریل رقیق نموده و مقدار ۱۰ μl یا ۰.۱ ml سوسپانسیون رقیق شده را به محیط کشت مورد آزمایش، تلقیح نموده و به گونه ای کشت دهید که کلنی های ایزوله بدست آید.
- پلیت ها را انکوبه نمایید.
- تعداد کلنی های مورد انتظار در هر پلیت بعد از انکوباسیون (plate/CFU) هزار تا ده هزار می باشد. برای اجتناب از رشد زیاد باکتری در بعضی از محیط های کشت غیر انتخابی و برای داشتن کلنی های ایزوله، ممکن است لازم باشد رقت ۱:۱۰۰۰۰ تهیه شود.

شکل ۱- تهیه سوسپانسیون میکروبی برای کنترل کیفیت محیط های کشت



# بررسی ظرفیت مهار کنندگی (activity Inhibitory) محیط های کشت انتخابی پلیتی مانند مکانکی آگار، EMB آگار، XLD آگار و ...

- سو سپانسیون اولیه میکروبی مطابقت یافته با کدورت ۰/۵ مک فارلندرا به نسبت ۱:۱۰ در سرم فیزیولوژی استریل رقیق نموده و مقدار ۱۰ μl یا ۰/۱ ml سو سپانسیون رقیق شده را به محیط کشت مورد آزمایش تلقیح نموده و به گونه ای کشت دهید که کلی های ایزوله بدست آید.

- پلیت ها را انکوبه نمایید. تعداد کلی های مورد انتظار در هر پلیت بعد از انکوباسیون (plate/CFU) ده هزار تا صد هزار می باشد.

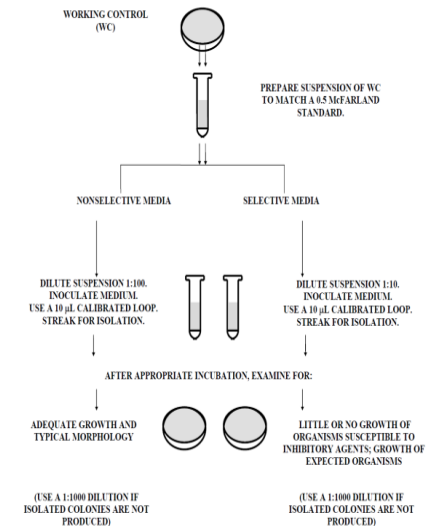
- برای اجتناب از رشد زیاد باکتری در بعضی از محیط های کشت انتخابی و برای داشتن کلی های ایزوله ممکن است لازم باشد رقت ۱:۱۰۰ تهیه شود.

C. زمان انکوباسیون (جدول شماره ۲):

سویه های کنترل کیفی	دماهای انکوباسیون	انحصار انکوباسیون	مدت انکوباسیون
باکتری های دارای رشد سریع	۳۵-۳۷°C	محیطی که با CO <sub>2</sub> غنی شده یا غنی شده با CO <sub>2</sub>	۱۸-۲۴ ساعت
باکتری های دارای نرخهای خاصی برای رشد	۳۵-۳۷°C	غنی شده با CO <sub>2</sub>	۲۴-۷۲ ساعت
بی هوازی ها	۳۵-۳۷°C	گاز بی هوازی	۲۴-۷۲ ساعت
کمپوباکتر	۲۲°C	گاز Campy	۲۴-۶۸ ساعت
ماکروباکتریوم ها	۳۵-۳۷°C	غنی شده با CO <sub>2</sub>	۲-۲۱ روز
مخمر	۳۵-۳۷°C	محیطی که با CO <sub>2</sub> غنی شده	۲۴-۷۲ ساعت
کیت ها	۳۵-۳۰°C	محیطی که با CO <sub>2</sub> غنی شده	۲۴-۷۲ ساعت

\* انحصار به نوع محیط بستگی دارد. توصیه های سازنده را بررسی نمایید.

شکل ۱- تهیه سو سوسپانسیون میکروبی برای کنترل کیفیت محیط های کشت



## تفسیر نتایج:

- عملکرد محیط های غیر انتخابی (بلادآگار ، نوترینت آگار، ...) در صورتی رضایت بخش است که سویه های کنترل کیفی، رشد کافی، سایز مورد انتظار کلنی، مرفولوژی بارز کلنی را نشان دهند.
- عملکرد محیط های انتخابی (مک کانکی ، EMB،XLD) در صورتی رضایت بخش است که سویه های کنترل کیفی، رشد کافی، سایز مورد انتظار کلنی، مرفولوژی بارز کلنی و مهار رشد بعضی از ارگانیزم های خاص را نشان دهند.
- در بعضی موارد، واکنش های رنگی خاص یا همولیز، باید ایجاد شود.
- مثلاً در مورد محیط کشت بلاد آگار ایجاد همولیز مناسب ضروری است و یا برای محیط مکانکی آگار ایجاد واکنش های رنگی برای سویه های میکروبی مشخص ضروری می باشد.
- عملکرد محیط های لوله ای در صورتی رضایت بخش است که سویه های کنترل کیفی در آن رشد کافی نموده یا کدورت لازم را ایجاد کنند و واکنش های بیوشیمیایی مورد انتظار را نشان دهند.



# نگهداری محیط های کشت تهیه شده

- طول عمر وابسته به اجزای تشکیل دهنده محیط کشت
- نحوه نگهداری و ذخیره سازی محیط کشت
- محیط های کشت باید دور از نور نگهداری شوند (تابش نور سبب آزادسازی مواد ضدباکتریایی مثل پراکسیداز می شوند)
- طول عمر محیط های پلیتی دردمای یخچال یک هفته است
- طول عمر محیط های پلیتی در بسته بندی پلاستیکی در یخچال ۳-۴ هفته است .
- محیط حاوی آنتی بیوتیک رابتر است در طی یک هفته استفاده کرد
- پلیت ها را قبل از مصرف بایستی به دمای اتاق رساند
- اگر پلیت محیط کشت بیش از ۸ ساعت دردمای اتاق بماند قابل استفاده نیست .
- محیط کشت لوله ای دردمای یخچال ۳-۶ ماه قابل مصرف است .



# مشکلات احتمالی در ساخت محیط کشت و علل ممکن

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 استریلیزاسیون - 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 رگه سیاه، نیوسوز شدن آگار رگه رگه 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 استریلیزاسیون - 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

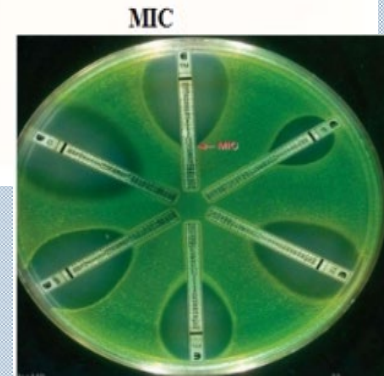
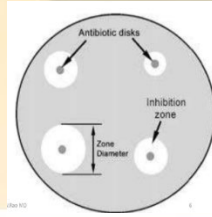
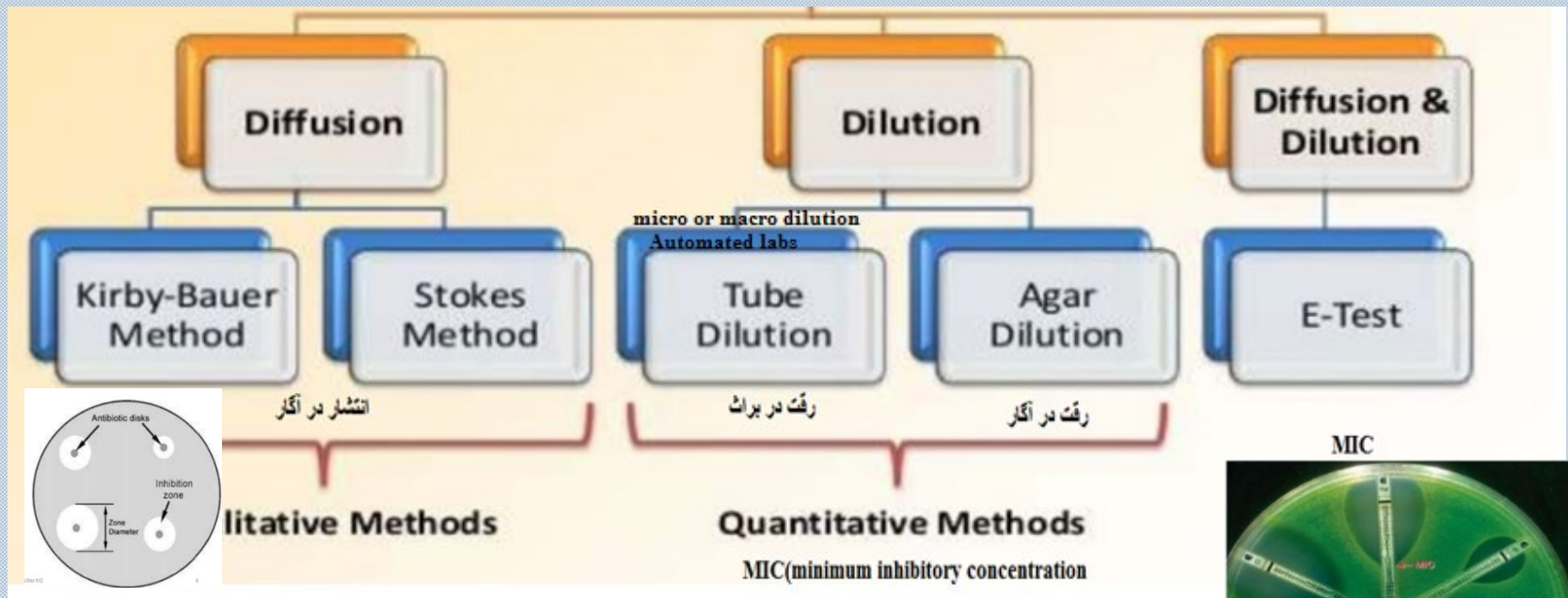
مشکلات	علل ممکن
ایجاد رسوب یا کدورت (Precipitation/Turbidity)	- حرارت بیش از اندازه در طی استریلیزاسیون - ذخیره‌سازی طولانی مدت (بیش از ۴ ساعت) در حالت مذاب (بیش از ۵۰°C) - افت کیفیت محیط کشت دهیدراته - pH اشتباه - آب ناخالص یا ظروف شیشه‌ای کثیف - حل نشدن کامل محیط کشت - داغ بودن محیط کشت در هنگام افزودن مکمل به آن - کیفیت پایین آب یا ظروف
سختی (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 - ذخیره‌سازی 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 مقایسه pH پایین) - هیدرولیز اسید در محیط کشت با pH پایین - توزین یا مخلوط کردن نادرست - حل نشدن کامل آگار - حجم نادرست آب - رقیق‌سازی زیاد یا مایه تلقیح یا مکمل‌های محیط کشت - ذخیره‌سازی طولانی مدت در دمای ۵۰°C



# آزمایشات تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی کنترل کیفی



# Antibiogram (Antibiotic sensitivity test) AST



# درچه مواردی انجام تست حساسیت میکروبی لازمست

- در مواردی که باکتری قادرست با مکانیسم هایی مقاومت به عوامل ضد میکروبی را دریافت کنند مانند تولید آنزیم های غیرفعال کننده دارو  
تغییر در محل اثر دارو  
تغییر در ورود و خروج دارو از باکتری
- در این موارد نمی توان حساسیت یک باکتری را به عامل ضد باکتریایی به طور قطع پیش بینی کرد
- در مطالعات اپیدمیولوژی مقاومت های دارویی



## درچه مواردی درمان تجربی پذیرفته شده و انجام تست حساسیت آنتی بیوتیکی ضروری نیست

- حساسیت استرپتوکوکوس پیوژنز نسبت به پنی سیلین
- در صورت آلرژی بیمار به پنی سیلین و لزوم استفاده از ماکرولید ها انجام تست حساسیت توصیه می شود
- در مواردی که ماهیت عفونت مشخص نیست و نمونه دارای مخلوط باکتریایی و یا فلور طبیعی است انجام تست حساسیت ضد میکروبی ممکن است گمراه کننده باشد.



# کنترل کیفی آزمایش تعیین حساسیت ضد میکروبی

- کنترل کیفی محیط کشت
- کنترل کیفی دیسک
- استاندارد سازی سوسپانسیون باکتری



الزامات انجام آنتی بیوگرام به روش انتشار دیسک در آگار (Ddtest) روش کربی - باوئر

• محیط مولر هینتون آگار

در سال ۱۹۴۱ توسط مولر و هینتون این محیط برای جداسازی گونه های بیماری زایی نایسریا پیشنهاد شد .

امروزه برای انجام تست های سنجش حساسیت آنتی بیوتیکی به روش انتشار در آگار تکنیک کربی - باوئر در مورد میکروارگانیزم هایی که سخت رشد نمی باشند ، به طور روتین مورد استفاده است .

برای سنجش حساسیت آنتی بیوتیکی گونه های استرپتوکوکوس و کامپیلوباکتر افزودن ۵ درصد خون گوسفندی و نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید توصیه می شود.

باید از محیط مولر هینتونی استفاده کرد که فرمول ساخت آن بر مبنای CLSI M۰۶ تعریف شده است



ویژگی محیط مولر هینتون که آن را برای تست آنتی بیوگرام مناسب ساخته است

- محیط غیر انتخابی و غیر افتراقی است که اجازه رشد به اغلب باکتری ها را می دهد
- دارای نشاسته است که می تواند سم آزاد شده از باکتری را جذب کند و مانع تداخل اثر سم با آنتی بیوتیک ها شود
- نشاسته واسطه انتشار آنتی بیوتیک در آگار محیط کشت است
- دارای آگار شل است که به انتشار بیشتر آنتی بیوتیک کمک می کند و باعث می شود که هاله مهاری واضح تر شود
- این محیط قابلیت تکرار پذیری قابل قبولی دارد
- این محیط دارای حداقل مقادیر تیمین ، تیمیدین و پارا آمینو بنزویک اسید (PABA) است که نقش مهاری برای آنتی بیوتیک های سولفانامید و تری متوپریم و تتراسایکلین دارند



# Limitations of MHA

- عواملی به روی نتایج تاثیر می گذراند
- میزان تلقیح باکتری ، میزان رشد باکتری، فرمولاسیون محیط، pH،
- برای بدست آوردن نتایج قابل اعتماد باید روش کار به دقت رعایت شود.
- درمورد باکتری هایی که دیررشد هستند، زمان بالای انکوباسیون ممکن است موجب غیرفعال شدن آنتی بیوتیک شود.
- تغییرات درمیزان کاتیون های دوظرفیتی مانند کلسیم و منیزیم ممکن است به روی نتایج آمینوگلیکوزیدها و تترا سایکلین و کولیستین و تاثیرشان به روی سودوموناس آئروژنزا تاثیر بگذارند.



# مشخصات قابل قبول برای محیط مولر هینتون آگار

- pH را برای هر نوبت ساخت بایستی کنترل نمود
- pH پس از ژله ای شدن در دمای اتاق بایستی بین ۷/۲ تا ۷/۴ باشد
- به اندازه ی یک پتری از مولر هینتون آگار را له کرده می توان ۲-۳ میلی لیتر آب مقطر اضافه کرد و به مدت ۱۰ دقیقه بخیسانید سپس نوک الکتروود pH متر را در این مخلوط غوطه ور کنیم
- نوک الکتروود pH متر را داخل ارلن کوچکی قرار داده مقدار اندکی از آگار مذاب را به داخل ارلن ریخته پس از سفت شدن آگار pH را اندازه گیری کنید
- از الکتروود های سطحی استفاده کنید
- سوابق اندازه گیری pH ثبت شود
- برای اندازه گیری pH نباید از اندیکاتور کاغذی استفاده شود.



# رطوبت

- برای تلقیح باکتری در محیط مولر هینتون آگار سطح آگار بایستی مرطوب ولی فاقد قطرات آب در روی سطح آگار یا در پوش ظرف پتری دیش باشد.
- برای گرفتن رطوبت اضافی می توان پتری دیش را با در پوش نیمه باز بمدت نیم ساعت زیر هود کلاس II در دمای اتاق یا انکوباتور ۳۵ درجه سانتی گراد نگهداشت .



## ارزیابی تیمین و تیمیدین

- برای ارزیابی هر بسته از محیط مولر هینتون برای مقادیر تیمین و تیمیدین بایستی از:
  - Enterococcus faecials ATCC ۲۹۲۱۲
  - Enterococcus faecials ATCC ۳۳۱۸۶
  - ودیسک تری متوپریم سولفامتوکسازول
  - هاله عدم رشد:
- بزرگتر یا مساوی ۲۰ میلی متر با حاشیه واضح نشانگر کیفیت مناسب محیط کشت
- قطر هاله عدم رشد کمتر از ۲۰ میلی متر یا عدم وجود هاله یا رشد کلنی در وسط هاله عدم رشد نشانگر کیفیت نامناسب محیط کشت .



# تأثیر غلظت کاتیون های دوظرفیتی

• افزایش غلظت کاتیون های دوظرفیتی مثل کلسیم و منیزیم قطرهایه عدم رشد را کوچکتر.

• کاهش غلظت قطرهایه عدم رشد را به صورت غیرقابل قبولی بزرگتر خواهد کرد.

• مقادیر زیاد یون روی (Zn) قطرهایه کرباپنم ها را کاهش می دهد.

• سند M100

Clinical and Laboratory Standards Institute. All rights reserved.

Table 4D. (Continued)

Antimicrobial Agent	QC Strain	Observation	Probable Cause	Comments/Action
Clindamycin	<i>S. aureus</i> ATCC <sup>®</sup> 25923	Zone too small	pH of media too low	Acceptable pH range = 7.2-7.4 Avoid CO <sub>2</sub> incubation, which lowers pH.
Clindamycin	<i>S. aureus</i> ATCC <sup>®</sup> 25923	Zone too large	pH of media too high	Acceptable pH range = 7.2-7.4
Macrolides	<i>S. aureus</i> ATCC <sup>®</sup> 25923	Zone too small	pH of media too low	Acceptable pH range = 7.2-7.4 Avoid CO <sub>2</sub> incubation, which lowers pH.
Macrolides	<i>S. aureus</i> ATCC <sup>®</sup> 25923	Zone too large	pH of media too high	Acceptable pH range = 7.2-7.4
Quinolones	Any	Zone too small	pH of media too low	Acceptable pH range = 7.2-7.4 Avoid CO <sub>2</sub> incubation, which lowers pH.
Quinolones	Any	Zone too large	pH of media too high	Acceptable pH range = 7.2-7.4
Tetracyclines	Any	Zone too large	pH of media too low	Acceptable pH range = 7.2-7.4 Avoid CO <sub>2</sub> incubation, which lowers pH.
Tetracyclines	Any	Zone too small	pH of media too high	Acceptable pH range = 7.2-7.4
Tetracyclines	Any	Zone too small	Ca <sup>++</sup> and/or Mg <sup>++</sup> content too high	Use alternative lot of media.
Tetracyclines	Any	Zone too large	Ca <sup>++</sup> and/or Mg <sup>++</sup> content too low	Use alternative lot of media.
Sulfonamides	<i>E. faecalis</i> ATCC <sup>®</sup> 29212	Zone ≤ 20 mm	Media too high in thymidine content	Use alternative lot of media.
Trimethoprim-sulfamethoxazole	Various	Zone too small	Contamination	Measure zone edge with visible growth detected with unaided eye. Subculture to determine purity and repeat if necessary.
Various	Any	Many zones too large	Use of magnification to read zones Inoculum too light Error in inoculum preparation Media depth too thin MHA nutritionally unacceptable	Repeat using McFarland 0.5 turbidity standard or standardizing device. Check expiration date and proper storage if using barium sulfate or latex standards. Use agar with depth approximately 4 mm. Recheck alternate lots of MHA.
Various	Any	Many zones too small	Inoculum too heavy Error in inoculum preparation Media depth too thick MHA nutritionally unacceptable	Repeat using McFarland 0.5 turbidity standard or standardizing device. Check expiration date and proper storage if using barium sulfate or latex standards. Use agar with depth approximately 4 mm. Recheck alternate lots of MHA.
Various	Any	One or more zones too small or too large	Measurement error Transcription error Random defective disk Disk not pressed firmly against agar	Recheck readings for measurement or transcription errors. Retest. If retest results are out of range and no errors are detected, initiate corrective action.
Various	Various	Zone too large	Did not include lighter growth in zone measurement (eg, double zone, fuzzy zone edge)	Measure zone edge with visible growth detected with unaided eye.

159

Antimicrobial Agent	QC Strain	Observation	Probable Cause	Comments/Suggested Actions
Aminoglycosides	Any	MIC too high	pH of media too low	Acceptable pH range = 7.2-7.4 Avoid CO <sub>2</sub> incubation, which lowers pH.
Aminoglycosides	Any	MIC too low	pH of media too high	Acceptable pH range = 7.2-7.4
Aminoglycosides	<i>P. aeruginosa</i> ATCC <sup>®</sup> 27853	MIC too high	Ca <sup>++</sup> and/or Mg <sup>++</sup> content too high	Acceptable range = Ca <sup>++</sup> 20-25 mg/L, Mg <sup>++</sup> 10-12.5 mg/L
Aminoglycosides	<i>P. aeruginosa</i> ATCC <sup>®</sup> 27853	MIC too low	Ca <sup>++</sup> and/or Mg <sup>++</sup> content too low	Acceptable range = Ca <sup>++</sup> 20-25 mg/L, Mg <sup>++</sup> 10-12.5 mg/L
Amoxicillin-clavulanate	<i>E. coli</i> ATCC <sup>®</sup> 35218 <i>K. pneumoniae</i> ATCC <sup>®</sup> 70663	MIC too high	Clavulanate is labile Antimicrobial agent is degrading.	Use alternative lot. Check storage and package integrity.
Ticarcillin-clavulanate	<i>K. pneumoniae</i> ATCC <sup>®</sup> 70663 <i>E. coli</i> ATCC <sup>®</sup> 35218	MIC too high	Clavulanate is labile. Antimicrobial agent is degrading.	Use alternative lot. Check storage and package integrity.
β-Lactam group	Any	MIC initially acceptable, but increases possibly out of range over time	Antimicrobial agent is degrading.	Use alternative lot. Check storage and package integrity. Imipenem, cefazolin, and clavulanate are especially labile.
Aztreonam Cefotaxime Cefepime Cefazidime Ceftazidime Ceftiofur	<i>K. pneumoniae</i> ATCC <sup>®</sup> 70663	MIC too low	Spontaneous loss of the plasmid encoding the β-lactamase.	See general comment (1) on QC organism maintenance.
Cefotaxime-clavulanate Ceftazidime-clavulanate	<i>K. pneumoniae</i> ATCC <sup>®</sup> 70663	Negative ESBL test	Spontaneous loss of the plasmid encoding the β-lactamase.	See general comment (1) on QC organism maintenance.
Carbapenems	<i>P. aeruginosa</i> ATCC <sup>®</sup> 27853	MIC too high	Ca <sup>++</sup> concentration in media is too high.	Use alternative lot.



# دیسک های ضد میکروبی

• دیسک ها از منابع تجاری مشخص تهیه شود.

• دیسک ها باید دارای تاییدیه ارزیابی شامل

• ذکر غلظت دیسک ها

• شماره سری ساخت

• مدارکی دال برانجام کنترل کیفی با سویه های کنترل

Antimicrobial Agent	Disk Content	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 35218 <sup>ac</sup>
Amikacin	30 µg	19-26	20-26	18-26	-
Amoxicillin-clavulanic acid	20/10 µg	18-24	28-36	-	17-22
Ampicillin	10 µg	16-22	27-35	-	6
Ampicillin-sulbactam	10/10 µg	19-24	29-37	-	13-19
Azithromycin	15 µg	-	21-26	-	-
Azlocillin	75 µg	-	-	24-30	-
Aztreonam	30 µg	28-36	-	23-29	-
Carbenicillin	100 µg	23-29	-	18-24	-
Cefaclor	30 µg	23-27	27-31	-	-
Cefamandole	30 µg	26-32	26-34	-	-
Cefazolin	30 µg	21-27	29-35	-	-
Cefdinir	5 µg	24-28	25-32	-	-
Cefditoren	5 µg	22-28	20-28	-	-
Cefepime	30 µg	31-37	23-29	24-30	-
Cefetamet	10 µg	24-29	-	-	-
Cefixime	5 µg	23-27	-	-	-
Cefmetazole	30 µg	26-32	25-34	-	-
Cefonicid	30 µg	25-29	22-28	-	-
Cefoperazone	75 µg	28-34	24-33	23-29	-
Cefotaxime	30 µg	29-35	25-31	18-22	-
Cefotetan	30 µg	28-34	17-23	-	-
Cefoxitin	30 µg	23-29	23-29	-	-
Cefpodoxime	10 µg	23-28	19-25	-	-
Cefprozil	30 µg	21-27	27-33	-	-
Ceftaroline	30 µg	26-34	26-35	-	-
Ceftazidime	30 µg	25-32	16-20	22-29	-
Ceftibuten	30 µg	27-35	-	-	-
Ceftizoxime	30 µg	30-36	27-35	12-17	-
Ceftobiprole	30 µg	30-36	26-34	24-30	-
Ceftriaxone	30 µg	29-35	22-28	17-23	-
Cefuroxime	30 µg	20-26	27-35	-	-
Cephalothin	30 µg	15-21	29-37	-	-
Chloramphenicol	30 µg	21-27	19-26	-	-
Cinoxacin	100 µg	26-32	-	-	-
Ciprofloxacin	5 µg	30-40	22-30	25-33	-
Clarithromycin	15 µg	-	26-32	-	-
Clinafloxacin	5 µg	31-40	28-37	27-35	-
Clindamycin <sup>d</sup>	2 µg	-	24-30	-	-
Colistin	10 µg	11-17	-	11-17	-
Daptomycin <sup>e</sup>	30 µg	-	18-23	-	-
Dirithromycin	15 µg	-	18-26	-	-
Doripenem	10 µg	27-35	33-42	28-35	-
Doxycycline	30 µg	18-24	23-29	-	-
Enoxacin	10 µg	26-36	22-28	22-28	-
Ertapenem	10 µg	29-36	24-31	13-21	-
Erythromycin <sup>f</sup>	15 µg	-	22-30	-	-
Faropenem	5 µg	20-26	27-34	-	-
Fleroxacin	5 µg	28-34	21-27	12-20	-
Fusidic acid	200 µg	22-30	26-33	-	-
Garenoxacin	5 µg	28-35	30-36	19-25	-



## ذخیره سازی دیسک های میکروبی

- دیسک ها را باید در یخچال (دمای ۸ درجه سانتیگراد یا کمتر) یا در فریزر (-۱۴ درجه سانتیگراد یا کمتر) نگهداری کنید.
- دیسک های آنتی بیوتیک نباید در فریزر هایی با قابلیت ذوب یخ خود بخودی ذخیره شوند.
- آنتی بیوتیک های بتالاکتام باید در فریزر نگهداری شده و فقط برای مصرف حداکثر یک هفته از فریزر خارج و در یخچال نگهداری شوند.
- آنتی بیوتیک هایی مانند سفاکلروت ترکیبات حاوی کلوانیک اسید در فریزر پایداری بیشتری دارند.
- بسته های دیسک را ۱-۲ ساعت قبل از مصرف از یخچال یا فریزر خارج کرده تا به دمای اتاق برسد.
- دیسک ها را به میزان مصرف باز کنید و حتما در همان لوله های محتوی ماده جاذب رطوبت نگهداری کنید.
- دیسک ها را با پایان تاریخ انقضا دور بریزید.



# انتخاب سویه های کنترل کیفی برای تضمین کیفیت

- هر سویه کنترلی باید از یک منبع شناخته شده مثلا ATCC تهیه شود.
- تمام سویه های کنترلی مطابق استاندارد CLSI بسته به نوع عامل ضد میکروبی باید انتخاب شوند.
- نتایج بایستی مطابق با CLSI M23 ثبت شود.
- سویه های کنترلی به صورت روزانه یا هفتگی باید آزمایش شوند



## سویه های کنترل کیفی برای آزمایش های تعیین حساسیت ضد میکروبی

پیوست C. سویه های کنترل کیفی برای آزمایش های تعیین حساسیت ضد میکروبی

Quality Control Strain	Organism Characteristics	Disk Diffusion Tests	MIC Tests	Screening Tests	Other
<i>E. faecalis</i> ATCC® 29212			• Nonfastidious gram-positive bacteria	• Vancomycin agar HLAR	• Assess suitability of medium for sulfonamide or trimethoprim MIC tests <sup>d</sup> • Assess suitability of cation content in each batch/lot of Mueller Hinton for daptomycin broth microdilution
<i>E. faecalis</i> ATCC® 51299	• Resistant to vancomycin ( <i>VanB</i> ) and high-level aminoglycosides			• Vancomycin agar HLAR	
<i>E. coli</i> ATCC® 25922	• $\beta$ -Lactamase negative	• Nonfastidious gram-negative bacteria • <i>Neisseria meningitidis</i>	• Nonfastidious gram-negative bacteria • <i>Neisseria meningitidis</i> • Potential agents of bioterrorism		
<i>E. coli</i> ATCC® 35218	• Contains plasmid-encoded TEM-1 $\beta$ -lactamase (non-ESBL) <sup>a,b,e,f</sup>	• $\beta$ -lactam/ $\beta$ -lactamase inhibitor combinations	• $\beta$ -Lactam/ $\beta$ -lactamase inhibitor combinations		
<i>H. influenzae</i> ATCC® 49247	• BLNAR	• <i>Haemophilus</i> spp.	• <i>Haemophilus</i> spp.		
<i>H. influenzae</i> ATCC® 49766	• Ampicillin susceptible	• <i>Haemophilus</i> spp. (more reproducible with selected $\beta$ -lactams)	• <i>Haemophilus</i> spp. (more reproducible with selected $\beta$ -lactams)		
<i>H. pylori</i> ATCC® 43504			• <i>H. pylori</i>		
<i>K. pneumoniae</i> ATCC® 700603	• Contains SHV-18 ESBL <sup>b,e,f</sup>	• ESBL screen and confirmatory tests	• ESBL screen and confirmatory tests		
<i>N. gonorrhoeae</i> ATCC® 49226	• CMRNG	• <i>N. gonorrhoeae</i>	• <i>N. gonorrhoeae</i>		
<i>P. aeruginosa</i> ATCC® 27853 <sup>c</sup>	• Contains inducible AmpC $\beta$ -lactamase	• Nonfastidious gram-negative bacteria	• Nonfastidious gram-negative bacteria • Potential agents of bioterrorism		• Assess suitability of cation content in each batch/lot of Mueller-Hinton for gentamicin MIC and disk diffusion
<i>S. aureus</i> ATCC® 25923	• $\beta$ -Lactamase negative • <i>mecA</i> Negative • Little value in MIC testing due to its extreme susceptibility to most drugs	• Nonfastidious gram-positive bacteria			



## تهیه سوسپانسیون میکروبی برای انجام آزمایش تعیین حساسیت به روش انتشار از دیسک

- برای استاندارد کردن غلظت مایه میکروبی برای آزمایش تعیین حساسیت باید از کدورت استاندارد استفاده شود
- کدورت استاندارد ۰/۵ مک فارلند
- محلول استوک ۰/۴۸ مول در لیتر کلرورباریم (۰/۱۱۷۵٪  $\text{BaCl}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ )
- محلول استوک ۰/۱۸ مول در لیتر (۰/۳۶ نرمال) اسید سولفوریک ۱٪ (حجمی)
- ۰/۵ میلی لیتر از کلرور باریم را در حال هم زدن مداوم به ۹۹/۵ میلی لیتر از محلول استوک اسید سولفوریک اضافه نمایید تا سوسپانسیون تشکیل شود.
- صحت غلظت سوسپانسیون را از طریق اندازه گیری جذب نوری با استفاده از اسپکتروفتومتر با طول مسیر ۱ سانتی متر در طول موج ۶۲۵ نانومتر معادل ۰/۰۸ - ۰/۱۳ اندازه بگیرید
- استاندارد ساخته شده را به مقدار ۴-۶ میلی لیتر در لوله های در پیچ داری که از لحاظ قطر و اندازه مشابه لوله های حاوی سوسپانسیون باکتری خواهد بود، بریزید
- در پوش لوله را محکم ببندید و با پارافیلیم درزگیری نمایید
- لوله ها را در حرارت اتاق و در پوشش تیره نگهداری کنید
- قبل از هر بار مصرف سوسپانسیون نیم مک فارلند را با استفاده از ورتکس یا بادست به شدت تکان دهید تا ظاهری یکنواخت پیدا کند
- در صورت ظهور ذرات درشت استاندارد را تعویض کنید
- سوسپانسیون تهیه شده از ذرات لاتکس را با سروته کردن به طور آرام مخلوط کنید و از ورتکس کردن خودداری کنید
- لازمست سوسپانسیون لاتکس به طور ماهیانه تعویض شود و یا جذب آن اندازه گیری شود.

McFarland Standard No.	0.5	1	2	3	4
1.0% barium chloride (ml)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4
1.0% sulfuric acid (ml)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6
Approx. cell density ( $1 \times 10^8$ CFU/mL)	1.5	3.0	6.0	9.0	12.0
% transmittance*	74.3	55.6	35.6	26.4	21.5
Absorbance*	0.08 to 0.1	0.257	0.451	0.582	0.669

\*at wavelength of 600 nm



# تهیه سوسپانسیون میکروبی از نمونه بالینی

در صورت کهنه بودن کشت و فقط در مورد باکتری های کم نیاز مثل استافیلوکوکوس

## Growth method

بین سه تا ۵ کلنی ایزوله یکسان را از سطح پلیت انتخاب کنید

از قله کلنی ها با لوب برداشته و به لوله حاوی ۴-۵ میلی لیتر محیط کشت مناسب مثل تریپتیکاز سوی براث منتقل کنید

کشت مایع بدست آمده را در انکوباتور ۳۵ درجه به مدتی قرار دهید تا کدورت معادل نیم مک فارلند بدست آید. زمان لازم بین ۲-۶ ساعت است.

## Direct colony suspension method (DCS)

سوسپانسیون را به طور مستقیم در سرم فیزیولوژی یا محیط کشت مناسب از محیط کشت ۱۸-۲۴ ساعته (محیط کشت غیر انتخابی مثل بلاد آگار) تهیه کنید.

کدورت سوسپانسیون بدست آمده را با کدورت استاندارد نیم مک فارلند مقایسه نمایید. بهتر است از وسیله نورسنجی استفاده شود در غیر اینصورت در نور مناسب در کاغذ سفید با خطوط سیاه دو لوله را باهم مقایسه نمایید.



# کنترل کیفی دستگاه‌های بخش میکروپ شناسی



# اتوكلالو

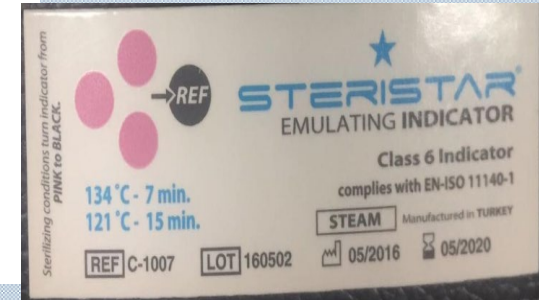
- روزانه: صفحه كف اتوكلالو را از سوراخ آبگذر اتاقلك جدا کرده، تمیز کنید. لوازم فرعي مثل طبقات و سيني ها را با آب و صابون بشویید.
- سطح آب ژنراتور را کنترل کنید.
- هفتگی: آبگذر و درزها را تمیز کنید. سوپاپ اطمینان را بررسی کنید.
- ماهانه: آب دستگاه را تعویض نمایید.
- هر ۳ ماه: داخل و خارج دستگاه و قسمت بیرونی آبگذر را تمیز کنید.
- هر ۶ ماه: دستگاه توسط نماینده خدمات سرویس و تعمیر، بازرسی شود.



## کنترل کیفیت

### اندیکاتور شیمیایی:

اندیکاتور شیمیایی کلاس ۶ (TST): برای پایش مستمر اتوکلاو در هر بار استفاده، از این اندیکاتور استفاده کنید. این اندیکاتور سه عامل زمان، بخار و دما را کنترل می کند و تغییر رنگ می دهد. مشاهده تغییر رنگ مناسب اندیکاتور پس از پایان مرحله سترون سازی، نشان دهنده عملکرد مطلوب دستگاه است.



اندیکاتور شیمیایی صرفاً نشان دهنده اینست که دمای درون اتوکلاو به ۱۲۱ درجه سانتی گراد رسیده است.

برای اثبات فرایند استریلیزاسیون به ویژه در هنگامیکه هدف سترون سازی زباله های بیولوژیک است، استفاده از اندیکاتورهای بیولوژیک توصیه می شود.

### اندیکاتور بیولوژیک:

استفاده از ویال اندیکاتور بیولوژیک حاوی اسپور *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 حداقل به طور هفتگی یا فواصل بیشتر، متناسب با بار کاری اتوکلاو برای پایش عملکرد آن توصیه می شود. در ته یک ظرف کوچک مقاوم به حرارت و نفوذپذیر نسبت به بخار مثل **Safety Box** چند لایه تنزیب قرار داده، تست شیمیایی و بیولوژیک را داخل آن قرار داده، در **Safety Box** را ببندید و آن را به همراه سایر مواد و وسایل داخل دستگاه قرار دهید. برنامه سترون سازی را اجرا کنید. پس از پایان سیکل، ویال اندیکاتور بیولوژیک را بیرون بیاورید و طی مدت ۲ ساعت آمپول شیشه ای داخل آن را بشکنید تا محیط کشت و اندیکاتور pH داخل آمپول شیشه ای با کاغذ آغشته به اسپور باسیلوس در تماس قرار گیرد، سپس ویال را به مدت ۲۴-۷۲ ساعت در دمای  $56 \pm 1^{\circ}\text{C}$  انکوبه نمایید و تغییر رنگ در آن را بررسی کنید. تغییر رنگ محیط کشت به رنگ اعلام شده توسط سازنده، نشانگر رشد باکتریایی و تغییر pH محیط کشت و عدم صحت عملکرد دستگاه است و عدم تغییر رنگ، نشان دهنده از بین رفتن باسیلوس و صحت عملکرد



کنترل مثبت: چند وقت یکبار برای بررسی زنده بودن میکروارگانیسم داخل ویال از کنترل مثبت استفاده کنید. برای این کار، یک ویال اندیکاتور بیولوژیک را بدون آن که اتوکلاو شود، به همراه سایر ویال های بیولوژیک که از اتوکلاو خارج کرده اید، بشکنید و به مدت ۲۴-۷۲ ساعت در دمای  $56 \pm 1^{\circ}\text{C}$  انکوبه نمایید. باسیلوس موجود در این ویال حتماً باید رشد کند و رنگ محیط کشت را تغییر دهد.



## موارد ایمنی در هنگام استفاده از اتوکلاو

- از دستکش مقاوم به حرارت و محافظ چشم استفاده کنید.
- بعد از آن که فشار اتاقک اتوکلاو به صفر و دمای آن به حدود ۶۰ درجه سانتی گراد رسید، آن را به آرامی باز کنید.
- منتظر بمانید تا ظروف کمی خنک شوند، سپس آنها را حمل کنید.
- هرگز در هنگام روشن بودن دستگاه اقدام به بارگذاری یا خارج نمودن وسایل و مواد ننمایید، همیشه ابتدا دستگاه را خاموش نموده و سپس اقدام به گذاردن و برداشتن وسایل نمایید.
- هرگز در هنگام روشن بودن دستگاه و اتصال آن به پریز برق اقدام به تمیز نمودن آن نکنید.
- در صورت سهل انگاری و ریختن آب یا مایعات بر روی تابلوی برق، فوراً دستگاه را از پریز جدا نموده و سپس اقدام به خشک کردن تابلوی برق نمایید، از دستگاه استفاده نکنید تا مواد ریخته شده، کاملاً خشک شود.
- هرگز پیچ های محکم کننده در را در هنگام کار دستگاه شل و سفت



# آون

- به طور ماهانه داخل آن تمیز شود.
- هر ۶ ماه توسط نماینده سرویس تعمیر، بازرسی شود.
- قبل از انجام هر گونه اقدام برای نگهداری معمول، اطمینان حاصل کنید که آون به دمای اتاق رسیده و به پریز برق متصل نیست.



### کنترل کیفیت:

اندیکاتور شیمیایی: برای پایش مستمر اون در هر بار استفاده، از این اندیکاتور استفاده کنید. مشاهده تغییر رنگ مناسب اندیکاتور پس از پایان مرحله سترون سازی، نشان دهنده عملکرد مطلوب دستگاه است.

اندیکاتور بیولوژیک: استفاده از نوار کاغذی حاوی اسپور *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 حداقل به طور هفتگی یا فواصل بیشتر، متناسب با بار کاری اون برای پایش عملکرد آن توصیه می شود. پس از پایان سیکل، پاکت نوار کاغذی اندیکاتور بیولوژیک را از داخل اون بیرون بیاورید و طی مدت ۲ ساعت نوار اندیکاتور را در کنار شعله با پنس استریل (شرایط آسپتیک) خارج نمایید و در داخل لوله حاوی محیط کشت تریپتیک سوی برات (TSB) یا سوی بین کازئین دایجست برات تلقیح کنید. لوله را حداقل به مدت ۴۸ ساعت در دمای  $1^{\circ}\text{C} \pm 36$  انکوبه نمایید. لوله محیط کشت را هر روز از نظر ایجاد کدورت که علامت رشد باکتریایی است، بررسی نمایید. مشاهده هرگونه رشد باید از نظر وجود این باسیلوس بررسی گردد، بنابراین باید آن را بر روی محیط های کشت مناسب، کشت مجدد دهید. نتیجه را ثبت کنید.



### ایمنی:

- نباید از مواد قابل اشتعال یا انفجار در داخل اون استفاده شود.
- باید از پاشیده شدن محلول های اسیدی یا بخارات خورنده در داخل اون جلوگیری نمود، تا از خوردگی سطوح و قفسه های داخلی پیشگیری شود.
- باید برای برداشتن وسایل از داخل اون، از وسایل حفاظت فردی مثل دستکش های عایق و مقاوم به حرارت، عینک ایمنی یا محافظ چشم استفاده گردد.



- ۱۰- به دلیل عایق بودن دستگاه، چند ساعت طول می کشد تا اشیاء داخل آن خنک شوند، مگر آنکه دستگاه مجهز به فن باشد. در اون را باز نکنید تا اتاقک، ظروف و مواد داخل آن تا دمای حدود  $60^{\circ}\text{C}$  خنک شوند. اگر هوای سرد به طور ناگهانی وارد دستگاه شود، ممکن است ظروف شیشه ای ترک بخورند.
- ۱۱- برای خشک کردن وسایل معمولاً از دمای کمتر از  $100^{\circ}\text{C}$  استفاده می گردد.

#### نحوه نگهداری:

به طور ماهانه داخل آن تمیز و هر ۶ ماه توسط نماینده سرویس تعمیر، بازرسی شود.

**توجه:** قبل از انجام هر گونه اقدام برای نگهداری معمول، اطمینان حاصل کنید که اون به دمای اتاق رسیده و به پریز برق متصل نیست.



# انکوباتور

- همه انکوباتورها باید به طور ماهانه و نیز بعد از ریختن مواد عفونی، با استفاده از محلول گندزدای مناسب (اتانول ۷۰ درصد) تمیز شوند.
- قبل از تمیز کردن، انکوباتور را از پریز برق جدا کنید.
- از مواد تمیز کننده ای استفاده کنید که خراش ایجاد نمی کنند. سطوح داخلی و خارجی انکوباتور را با پارچه آغشته به محلول تمیز کننده ملایم تمیز کنید.
- از تماس بین مواد پاک کننده و ساختارهای الکتریکی خودداری نمایید.
- قبل از اتصال مجدد انکوباتور به برق، منتظر بمانید تا داخل انکوباتور خشک شود.



## انکوباتور CO<sub>2</sub>

قبل از انجام هر گونه تعمیر، مطمئن شوید که انکوباتور، آلودگی زدایی، تمیز و از پریز برق جدا شده است.

به منظور رعایت موارد ایمنی، کپسول های CO<sub>2</sub> باید به صورت ایستاده با زنجیر سنگین به دیوار محکم شود. زمانی که از سیلندرها استفاده نمی شود، سوپاپ ها و درپوش ها باید به طور محکم بسته شوند.

سیلندرهایی خالی را روی حمل کننده سیلندر گاز به طور محکم با زنجیر نگهداری کنید. هرگز سیلندرهایی گاز را در دمای بالاتر از ۵۲°C نگهداری نکنید. سیلندرها را در وضعیت افقی قرار ندهید.



## انکوباتورهاي بدون CO<sub>2</sub>

- دمای انکوباتور را با دماسنج کالیبره اندازه گیری نموده و به طور روزانه و در دو نوبت بر روی منحنی دما، ثبت کنید.
- تمام عملیات نگهداری، تمیز کردن و دمای روزانه را در جداول مربوطه ثبت نمایید.



## کنترل کیفی انکوباتور های دارای CO<sub>2</sub>

- یک کشت از نیسریا گونوره یا هموفیلوس انفلوانزا بر روی پلیت شکلات آگار را در انکوباتور قرار دهید. هر روز آن را پاساژ داده و رشد را بررسی نمایید.
- این ارگانیسم ها برای رشد به CO<sub>2</sub> نیاز دارند.
- تمام عملیات نگهداری، تمیز کردن، تعویض سیلندر و دمای روزانه را در جداول مربوطه ثبت نمایید.

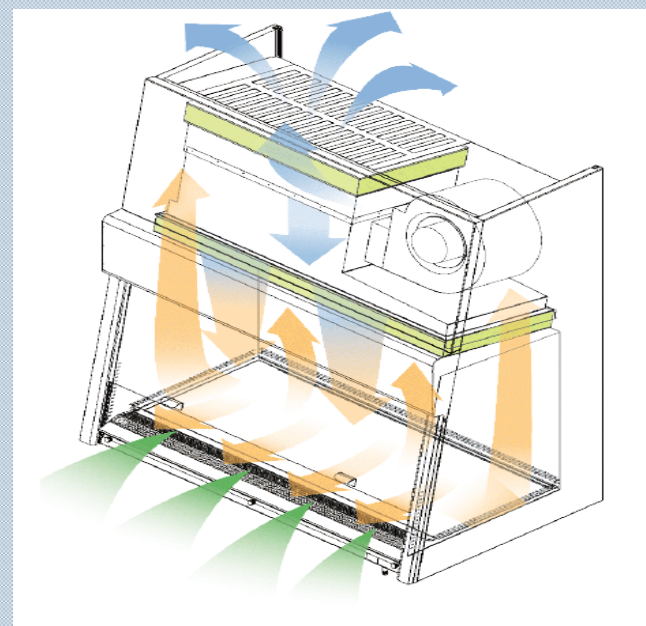


- زمانیکه دمای انکوباتور خارج از محدوده قابل قبول برای واحد مورد نظر باشد، باید به مسئول فنی یا سوپروایزر اطلاع داده شود.
- اقدامات اصلاحی باید مطابق موارد ذیل انجام شود:
- منبع برق، پریز برق و کلیدهای روشن / خاموش را بررسی کنید.
- دمای تنظیمی ( Point Set ) را بررسی کنید.
- اگر دستگاه هنوز درست کار نمی کند، به شرکت پشتیبان اطلاع دهید.



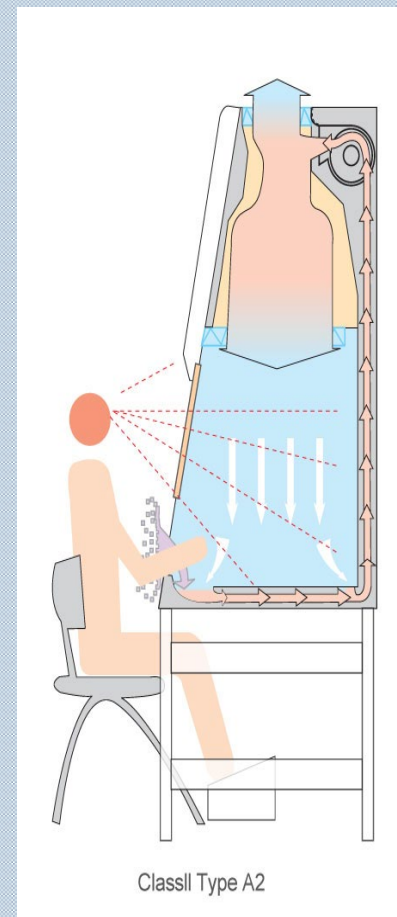
# دستورالعمل فنی هودهای ایمنی بیولوژیک:

- هود ایمنی بیولوژیک باید در مکانی دور از:
  - رفت و آمد افراد
  - دور از در و پنجره
- تعبیه فضای حداقل ۳۰ سانتی متری در اطراف هود جهت دسترسی به آن برای تعمیر و نگهداشت
- تعبیه فضای ۳۰ تا ۳۵ سانتی متری در بالای هود (انجام آزمایش های کنترل کیفیت بررسی سرعت هوا در فیلتر خروجی، تعویض فیلتر)

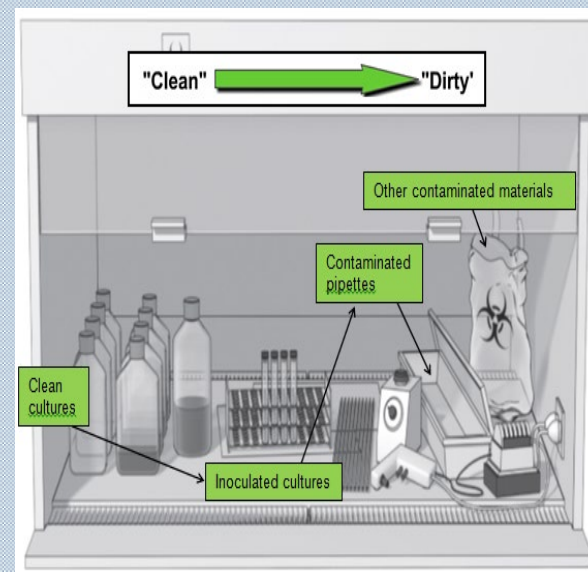


## کار صحیح با هود ایمنی بیولوژیک

- از قبل تمامی وسایل، مواد و غیره باید آماده و در زیر هود قرار داده شوند تا تا تعداد دفعات حرکت دست و یا حرکت افراد به حداقل برسد. می توان بدین منظور چک لیستی تهیه نمود.
- باید از حرکات سریع دست در داخل هود خودداری شود. باید بعد از وارد کردن دست ها، یک دقیقه منتظر ماند تا جریان هوای داخل هود تنظیم گردد.
- هنگام استفاده از هود بیولوژیک نباید در شیشه ای محافظ آن باز و بسته شود.



- باید دقت کرد که سطح مشبک (سوراخ های مختص عبور جریان هوا) هودهای کلاس ۲ با قرار دادن وسایل، کاغذ و غیره مسدود نشود.
- تجهیزاتی مانند سانتریفیوژ، ورتکس و غیره در قسمت عقب هود قرار می گیرند.
- کیسه های مخصوص اتوکلاو Safety Box و غیره باید در داخل هود و در قسمت عقب آن قرار داده شوند.
- در صورت لزوم، می توان در هنگام کار از دستمال های جاذب آغشته به مواد گندزدا بر روی سطح کاری استفاده نمود.
- فن هود باید ۵ دقیقه قبل از شروع کار و یا بعد از اتمام کار، روشن باشد تا هوای آلوده از هود خارج شود.
- بجای شعله می توان از سوزاننده های کوچک (Microincinerator) یا کوره های الکتریکی استفاده کرد، اما بهتر است از لوپ های یکبار مصرف استریل استفاده شود.



## آلودگی زدایی هودهای بیولوژیک

- تمامی وسایل و سطوح داخلی باید قبل و بعد از استفاده به وسیله ماده گندزدای مناسب مانند الکل ۷۰٪ و یامحلول های تجاری گندزدایی شود.
- محلول سفید کننده خانگی با رقت ۱ / ۱۰ و یا ۱ / ۱۰۰ ،
- باید بعد از استفاده از این ماده، به علت خاصیت خورندگی آن، محل را با آب استریل تمیز نمود.
- هودهای ایمنی بیولوژیک باید قبل از تعویض فیلتر و قبل از جابجایی آن، با استفاده از روش هایی مانند بخار دادن با گاز فرمالدئید آلودگی زدایی شوند



# کنترل کیفی معرف ها و رنگ ها



## رنگ آمیزی گرم

- کنترل کیفی:
- روزانه معرف ها را از نظر ظاهری بررسی کنید.
- اگر کریستال ویوله رسوب کرده یا ته نشین شده، قبل از استفاده آن را صاف کنید، حتی زمانی که معرف ها به صورت تجاری خریداری می شوند.
- نکته: بعضی رنگ ها، خصوصاً فوشین بازی و سافرانین می توانند آلوده شوند. در صورت شک به آلودگی ، انجام رنگ آمیزی با استفاده از معرف تازه توصیه میگردد .
- تبخیر شدن مواد ممکن است کارایی و تأثیر معرف ها را دگرگون کند. اگر محلول های کاری با مصرف روزانه تمام



## کنترل کیفی

- گسترش اشرشیا کولی ( ATCC۲۵۹۲۲ )
- استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس ( ATCC۱۲۲۲۸ )
- استافیلوکوکوس اورئوس ( ATCC۲۵۹۲۳ )
- تهیه و فیکس شده و هنگام باز کردن یک سری ساخت جدید رنگ و روزانه به همراه نمونه رنگ شود.
- به عنوان روش کنترل کیفی جایگزین پیشنهاد می شود با یک اپلیکاتور چوبی از بین دندان ها نمونه گیری شود ؛ هم ارگانیسیم های گرم مثبت و هم گرم منفی وجود خواهد داشت.



## خطاهای رایج در رنگ آمیزی گرم

- استفاده از لام های شیشه ای که قبلا تمیز یا چربی زدایی نشده اند.
- توجه: با ذخیره لام ها در ظرف حاوی اتانول ۹۵٪ از تمیز بودن آنها مطمئن خواهیم بود. قبل از استفاده ، الکل اضافی را از روی لام خالی کنید یا آن را روی شعله بگیرید.
- گسترش ها خیلی ضخیم تهیه شده است.
- حرارت دادن زیاد گسترش، زمانی که برای فیکس کردن از حرارت استفاده می شود.
- آب کشی زیاد در طی فرایند رنگ آمیزی



برای اطمینان از صحت تفسیر، سیستمی برای بررسی گزارش های رنگ آمیزی گرم برقرار کنید

- بررسی روزانه تعدادی از رنگ های گرم توسط سوپروایزر
- مقایسه نتایج کشت نهایی با گزارش های رنگ آمیزی گرم
- گردآوری مجموعه ای از لام های مرجع برای آموزش



## مجموعه آنتی سرم ها و معرف ها و دیسک های تشخیصی مورد استفاده در بخش باکتری شناسی

- آنتی سرم ها
- مجموعه آنتی سرم های شیگلا
- مجموعه آنتی سرم های سالمونلا
- مجموعه آنتی سرم های coli. E
- معرف ها
- معرف کاتالاز (آب اکسیژنه ۳ درصد)
- معرف اکسیداز (نترا متیل پارافنیلن دی آمین دی هیدروکلراید)
- ۱% HCl معرف
- معرف کواکس
- معرف MR
- معرف های VP (آلفا نفتول و پتاس) KOH
- معرف کلرور فریک
- معرف های A و B نیترات
- دیسک های تشخیصی
- ONPG دیسک
- دیسک نووبیوسین ۵ میکروگرمی
- دیسک فورازولیدون
- دیسک باسیتراسین ۰۴/۰ واحد
- دیسک اپتوچین
- Polymixin B ۳۰۰U دیسک
- SXT دیسک



- معرف های تهیه شده در آزمایشگاه باید دارای برچسب مناسب بر روی ظروف حاوی معرف و حاوی اطلاعات لازم مانند مشخصات معرف ها(شامل نام ، غلظت، تاریخ ساخت، تاریخ انقضا...) باشد.
- معرف ها باید در هر سری ساخت یا خرید و سپس سه ماه یکبار و در موارد خاص شامل معرف های کاتالاز ، اکسیداز و کواگولاز در هر روز کاری برای واکنش های مثبت و منفی کنترل کیفی شود.
- آنتی سرم ها باید در هر سری ساخت یا خرید و سپس شش ماه یکبار برای واکنش منفی و شدت واکنش های مثبت کنترل کیفی شود.



- دیسک های تشخیصی باید در هر سری ساخت یا خرید و سپس ماهی یکبار برای واکنش های مثبت و منفی کنترل کیفی شود.
- تمامی معرف ها ، آنتی سرم ها و دیسک های تشخیصی باید طبق دستورالعمل شرکت سازنده نگهداری شوند.
- معرف ها ، آنتی سرم ها، محیط های کشت ، دیسک های تشخیصی و دیسک های آنتی بیوتیکی باید بعد از تاریخ انقضا دور ریخته شوند. مگر مواردی از معرف ها ، آنتی سرم ها و محیط های کشت تاریخ گذشته (بجز محیط مولر هینتون آگار). که به طور مستمر کنترل کیفی شوند و نتایج قابل قبولی داشته باشند.
- توجه: محیط مولر هینتون آگار، دیسک های آنتی بیوتیکی و دیسک های تشخیصی تاریخ گذشته به هیچ عنوان قابل استفاده نیستند.



بیسک تشخیصی / معرف	ارگانیسم کنترل	شماره ATCC	نتیجه مورد انتظار	نقاط انجام آزمایش QC
Bacitracin, 0.04u	Step. pyogenes	19615	هاله عدم رشد بزرگتر از 10 میلی متر	هر سری ساخت و
	Strep. agalactiae	12386	عدم هاله یا هاله کمتر از 10 میلی متر	خرید، سپس هر یک ماه
Catalase (3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Staph. aureus	25923	مثبت ( ایجاد سریع حباب )	هر سری ساخت و
	Step. pyogenes	19615	منفی ( بدون حباب )	خرید، سپس هر روزگاری
Coagulase test	Staph. aureus	25923	مثبت ( ایجاد لخته )	هر سری ساخت و
	Staph. epidermidis	12228	منفی ( عدم ایجاد لخته )	خرید پانسمای خرگوش، سپس هر روزگاری
Deoxycholate (10%) (Bile solubility test)	Strep. pneumoniae	6305	مثبت ( حل شدن )	هر سری ساخت و
	Ent. faecalis	29212	منفی ( حل شدن )	خرید، سپس هر 3 ماه
Ferric chloride (10%)	Proteus miabilis	43071	مثبت ( سبزرنگ )	هر سری ساخت و
	E. coli	25922	منفی ( بدون تغییر رنگ )	خرید، سپس هر 3 ماه

Indol (Kovacs)	E. coli	25922	مثبت ( ارغوانی رنگ )	هر سری ساخت و
	Klebsiella Pneumoniae	13883	منفی ( بدون تغییر رنگ )	خرید، سپس هر 3 ماه
Methyl Red	E. coli	25922	مثبت ( قرمز رنگ )	هر سری ساخت و
	Klebsiella Pneumoniae	13883	منفی ( بدون تغییر رنگ )	خرید، سپس هر 3 ماه
Ninhydrin (Hippurate hydrolysis test)	Strep. agalactiae	12386	مثبت ( آبی پر رنگ )	هر سری ساخت و
	Step. pyogenes	19615	منفی ( بنفش کم رنگ یا بدون تغییر رنگ )	خرید، سپس هر 3 ماه
Novobiocin, 5µg, on BAP or MH agar	Staph. aureus	25923	هاله عدم رشد بیشتر مساوی 22 میلی متر	هر سری ساخت و
	Staph. saprophyticus	15305	هاله عدم رشد کمتر مساوی 15 میلی متر	خرید، سپس هر 1 ماه
ONPG	E. coli	25922	مثبت ( زرد رنگ )	هر سری ساخت و
	Proteus miabilis	29245	منفی ( بدون تغییر رنگ )	خرید، سپس هر 3 ماه
Optochin, 5µg (in 5 to 10% CO <sub>2</sub> )	Strep. pneumoniae	6305	برای بیسک 10 میلی متری قطر هاله عدم رشد بیشتر مساوی 16 و برای بیسک 6 میلی متری هاله عدم رشد بیشتر مساوی 14 حسان می باشد.	هر سری ساخت و
	Step. pyogenes	19615	مقاوم ( بدون هاله عدم رشد )	خرید، سپس هر 1 ماه



Oxidase	P. aeruginosa  E. coli	27853  25922	مثبت (بنفش)  منفی (بنون تغییر رنگ)	هر سری ساخت و  خرید، سپس هر  روزکاری
PYR test	Ent. faecalis  E. coli	29212  25922	مثبت (صورتی پر رنگ تا  قرمز)  منفی (صورتی کم رنگ یا بنون  تغییر رنگ)	هر سری ساخت و  خرید، سپس هر 3 ماه
Voges-Proskauer	Enterobacter cloacae  E. coli	13047  25922	مثبت (قرمز)  منفی (بنون تغییر رنگ)	هر سری ساخت و  خرید، سپس هر 3 ماه
Antisera	مطابق دستور العمل کنترل  کیفیت هر آنتی سرم			هر سری ساخت و  خرید، سپس هر 6 ماه



## روش تعیین حجم لوپ

- برای شمارش کلنی های بدست آمده از کشت نمونه های بالینی بویژه ادرار به منظور تشخیص عفونت الزم است از لوپ های استاندارد با حجم معین استفاده شود.
- آزمایشگاه باید همواره از لوپ های کالیبره جهت کشت نمونه های ادراری، استفاده و تعداد کلنی های موجود در هر میلی لیتر ادرار (ml/CFU) را گزارش نماید.
- برای بررسی حجم لوپ از روش هایی مانند رنگ سنجی و توزین استفاده میشود.
- ساده ترین روش برای بررسی حجم لوپ استفاده از روش رنگ سنجی از طریق اسپکتروفتومتر یا فتومتر به کمک مواد رنگی مانند متیلن بلو، کریستال ویوله و اوانس بلو میباشد.



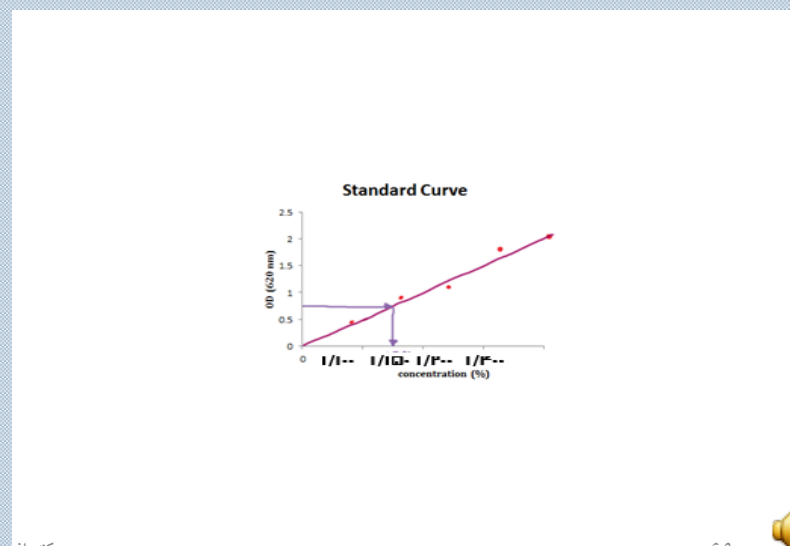
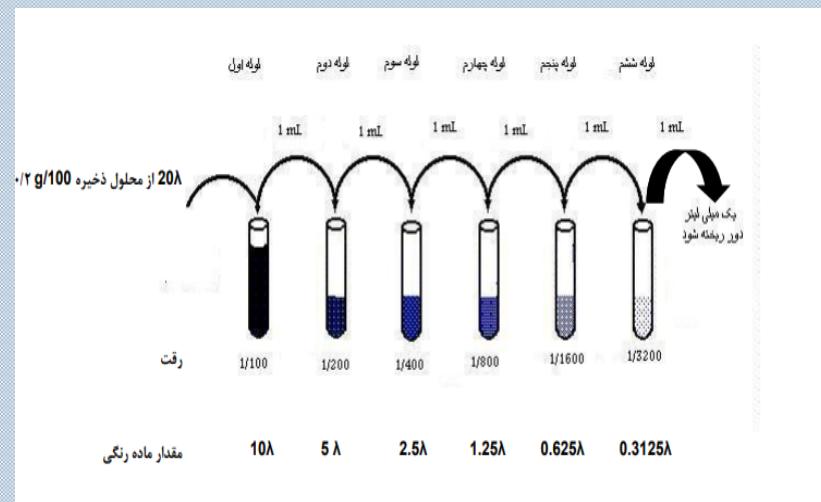
ابزار و مواد مورد نیاز تعیین حجم لوپ با استفاده از ماده رنگی اوانس بلو

- پودر اوانس بلو **Evans blue** این ماده به صورت پودر تجاری قابل دسترس بوده و به آسانی در آب حل میشود. در صورت استفاده از سایر مواد رنگی، باید طول موج و جذب نوری ویژه همان ماده به کار برده شود.
- آب مقطر
- لوله آزمایش
- پیپت یا سمپلر
- اسپکتروفتومتر یا فتومتر کالیبره
- کاغذ میلی متری



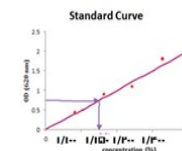
# روش انجام

- ۲۰ mg از پودر رنگی اوانس بلو را در ۱۰ میلی لیتر آب حل نمایید.  
(غلظت دودهم گرم درصد میلی لیتر)
- شش لوله آزمایش انتخاب کرده، در لوله اول ۲ ml و در هر یک از لوله های باقیمانده ۱ ml آب مقطر بریزید.
- ۲۰ میکرولیتر از محلول ذخیره اولیه (با غلظت ۰/۲ گرم درصد میلی لیتر) برداشته و در لوله اول ریخته و کاملاً مخلوط نمایید.
- سپس ۱ ml از لوله اول برداشته و در لوله دوم بریزید، از لوله دوم، در لوله سوم و این عمل را تا آخر ادامه دهید.
- در انتها یک میلی لیتر از لوله ششم را برداشته و دور بریزید.
- میزان جذب نوری (OD) هر یک از ۶ محلول حاصله را به کمک اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۰ nm بدست آورید.





- جهت تعیین حجم لوپ مورد بررسی، ۱۰ لوله آزمایش برداشته و در هر یک ۱ میلیلیتر آب مقطر بریزید.
- لوپ تحت کنترل را به طور کامل عمودی وارد محلول ذخیره اولیه نموده، از محلول رنگی برداشته و در لوله های آزمایش فرو برید. این کار را ۱۰ بار تکرار و در فواصل لوپ را روی کاغذ خشک کن قرار دهید تا کامل خشک شود. از سوزاندن لوپ خودداری نمایید.
- بعد از مخلوط کردن، جذب هریک از لوله ها را در طول موج ۶۲۰nm قرائت نمایید.
- بر روی کاغذ میلیمتری، نموداری ترسیم نمایید که در آن، محور افقی نشانگر رقت های تهیه شده و محور عمودی نمایانگر جذب نوری هر رقت باشد.
- با قرار دادن میانگین جذب بدست آمده از لوپ کنترلی، روی محور عمودی میتوان ضریب رقت لوپ کنترلی را از روی محور افقی بدست آورد.



# نگهداری و استفاده از سویه های باکتریایی

- روش نگهداری طولانی مدت (یکسال یا بیشتر)
- روش نگهداری کوتاه مدت



### (A) نگهداری طولانی مدت (یک سال یا بیشتر):

نگهداری طولانی مدت باکتری ها این امکان را می دهد که نمونه میکروبی، ماه ها و حتی سال ها به صورت زنده باقی بماند. بهترین روش های نگهداری طولانی مدت شامل لیوفیلیزاسیون (Freez Drying)، نگهداری در فریزر Ultra Low  $-70^{\circ}\text{C}$  (Freezer) یا پایین تر و نگهداری در نیتروژن مایع ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) می باشد.



## نگهداری طولانی مدت (یکسال یا بیشتر)

- باکتری مورد نظر را روی محیط مغذی مانند پلیت آگار حاوی ۵٪ خون گوسفند و در مورد میکروارگانیزم های سخت رشد (پرنیاز) روی محیط شکلات آگار کشت دهید.
- پلیت ها را به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در دمای  $1 \pm 36$  درجه سانتی گراد و در صورت نیاز برای هر باکتری تحت شرایط  $CO_2$  انکوبه نمایید.
- بعد از انکوباسیون، خالص بودن و مرفولوژی کلنی ها را بررسی نموده و در صورت نیاز، تست های بیوشیمیایی انجام دهید.
- سپس از باکتری رشد یافته، سوسپانسیون غلیظی در ۵۰-۱۰۰ ml از یک محیط محافظت کننده از سرما (Cryoprotective) تهیه نمایید. این محیط برای جلوگیری از تخریب سلول های باکتری در شرایط انجماد مورد استفاده قرار میگیرد.
- محیط های محافظت کننده از سرما عبارتند از: Skim milk
- خون دفیبرینه استریل گوسفند یا خرگوش ۵۰٪
- fetal calf serum in broth
- **Tryptic Soy Broth (TSB) نهایی غلظت با گلیسرول حاوی ۱۵-۱۰٪**



- از سوسپانسیون باکتریایی فوق به مقدار نیم تا یک میلی لیتر در ویال های شیشه ای یا پلاستیکی کوچک استریل توزیع کنید. تعداد کافی ویال ذخیره را برای مصرف یک سال آماده نمایید.
- بر روی ویال ها برچسب حاوی نام یا کد سویه و تاریخ تهیه سوسپانسیون را بچسبانید. ویال ها را در فریزر منفی ۵۰ تا منفی ۷۰ درجه سانتی گراد قرار داده و تا زمان مورد نیاز در آن ذخیره نمایید.
- سویه ها را می توان در برودت کمتر از منفی ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت طولانی نگهداری کرد.
- در صورت عدم دسترسی به فریزر منهای ۷۰ درجه سانتی گراد می توان سویه ها را در فریزر منهای ۲۰ درجه سانتی گراد نیز نگهداری نمود.
- در این شرایط توجه به این نکته ضروری است:



- توجه ۱: ویال ذخیره مورد استفاده، بعد از ذوب شدن باید دور انداخته شود و نباید مجدداً فریز گردد.
- • توجه ۲: قبل از استفاده از سویه رشد یافته روی هر پلیت باید از خالص بودن سویه، اطمینان حاصل نمود.
- • توجه ۳: از کشت ذخیره فریز شده حداکثر تا ۳ پاساژ پشت سر هم میتوان انجام داد. پس از آن، پلیت باید دور انداخته شود و از یک کشت ذخیره فریز شده دیگر استفاده گردد. پاساژهای پشت سر هم مکرر، بیش از ۳ پاساژ احتمال تغییر فنوتیپی سویه ها را افزایش میدهد.



# نگهداری طولانی مدت در هوای اتاق برای باکتری های سخت رشد

- نگهداری در دمای اتاق با کشت در محیط : BHIA
- محیط کشت (Brain heart infusion agar) BHIA را با شیب کم در لوله شیشه ای در پیچ دار تهیه نمایید.
- برای باکتری های سخت رشد، خون تازه یا خون حرارت داده شده، به محیط اضافه نمایید.
- روغن معدنی (یا پارافین مایع) را در اون استریل نمایید.
- میکروارگانسیم مورد نظر را روی سطح محیط کشت دهید و در شرایط مناسب برای هر میکروارگانسیم انکوبه نمایید.
- بعد از اطمینان از وجود رشد کافی، روغن استریل را به مقدار ۱ ml روی سطح محیط بریزید، به گونه ای که سطح شیبدار محیط را بپوشاند.
- لوله ها را با رعایت شرایط ایمنی در دمای اتاق نگهداری کنید. در صورت نیاز به کشت مجدد سویه، با لوپ استریل از قسمت زیرین روغن برداشته و روی محیط آگار خوندار یا چاکلیت آگار کشت دهید.
- از لوله ذخیره بعد از ۱۲-۶ ماه تجدید کشت نمایید



# نگهداری طولانی مدت در دمای اتاق برای باکتری های غیر سخت رشد

- نگهداری در دمای اتاق با کشت در محیط TSA (tryptic soy agar)
- این روش فقط برای باکتری هایی که سخت رشد نیستند، مانند استافیلوکوک و انتروباکتریاسه به کار می رود.
- محیط کشت TSA بدون کربوهیدرات را با عمق زیاد در لوله شیشه ای در پیچ دار تهیه کنید.
- باکتری را به صورت کشت عمقی در این محیط تلقیح کنید.
- محیط را به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۶ درجه سانتی گراد انکوبه نمایید. سپس لوله در پیچ دار را در پارافین مذاب فرو ببرید، که کاملاً در لوله را بپوشاند.
- لوله ها را با رعایت شرایط ایمنی در دمای اتاق نگهداری کنید. از لوله ذخیره بعد از ۱۲-۶ ماه تجدید کشت نمایید.



# نگهداری کوتاه مدت (کمتر از یکسال)

- کشت در محیط CTA برای نیسریا و استرپتوکوک:
- محیط کشت (cystine tryptic agar) CTA به اضافه ۱ mL سرم استریل اسب را با عمق زیاد در لوله شیشه ای در پیچ دار تهیه کنید.
- سویه نیسریا یا استرپتوکوک را به طور عمقی در این محیط کشت دهید.
- محیط را به مدت ۲۴-۷۲ ساعت در دمای ۳۶ درجه سانتی گراد و ۵ درصد CO<sub>2</sub> انکوبه نمایید.
- سپس لوله در پیچ دار را در پارافین مذاب فرو ببرید، که کاملا در لوله را بپوشاند.
- برای نیسریاها لوله را در ۳۵ درجه سانتی گراد نگهداری کنید و هر دو هفته یکبار تجدید کشت نمایید. برای استرپتوکوک ها لوله را با رعایت شرایط ایمنی در دمای اتاق نگهداری کرده و هر ماه تجدید کشت کنید.



## کشت در محیط Cooked meat برای باکتری های بی هوازی

- محیط Meat Cooked را در لوله های شیشه ای در پیچ دار تهیه کنید. باکتری را در این محیط تلقیح کنید. محیط را به مدت ۷۲-۲۴ ساعت در دمای ۳۶ درجه سانتی گراد انکوبه نمایید. لوله ها را با رعایت شرایط ایمنی در دمای اتاق نگهداری کنید. هر دو ماه یکبار تجدید کشت نمایید.



## کشت در محیط تریپتیکاز سوی برات برای باکتری های با رشد سریع

- باکتری مورد نظر را در سطح محیط TSA لوله ای در پیچ دار کشت دهید. محیط را به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۶ درجه سانتی گراد انکوبه نمایید. پس از رشد کامل، لوله را در یخچال نگهداری کنید. هر ۲-۴ هفته یکبار تجدید کشت نمایید.



# محیط بلاد آگار گوسفندی برای استرپتوکوکوس

- سویه مورد نظر را در سطح محیط آگار خوندار لوله ای در پیچ دار کشت دهید. محیط را به مدت ۲۴-۷۲ ساعت در دمای ۳۶ درجه سانتی گراد انکوبه نمایید. پس از رشد کامل، لوله را در یخچال نگهداری کنید. هر دو هفته یکبار تجدید کشت نمایید.



# شکلات آگار برای سویه های منگوکک و هموفیلوس

- سویه مورد نظر را در سطح محیط شکالت آگار لوله ای یا پلیتی کشت دهید. لوله یا پلیت را به مدت ۲۴-۷۲ ساعت در ۳۶ درجه سانتی گراد انکوبه کنید. لوله یا پلیت را بعد از رشد در حرارت اتاق نگهداری کنید. هر دو هفته یکبار تجدید کشت نمایید.



# کشت در محیط شکلات آگار برای گنوکک

- سویه مورد نظر را در سطح محیط شکلات آگار پلیتی یا شیبدار لوله ای کشت دهید. لوله یا پلیت را به مدت ۷۲-۲۴ ساعت در ۳۶ درجه سانتی گراد انکوبه کنید. پس از این مدت، لوله یا پلیت را مجدداً در این درجه حرارت ۳۶ درجه سانتی گراد نگهداری نمایید. هر دو روز یکبار تجدید کشت کنید.



# باتشکر از همکاران عزیز

