



تهیه و کنترل کیفی محیط های کشت مورد استفاده در شناسایی ویبریو کلرا

مهناز صارمی

کارشناس میکروبیولوژی

آزمایشگاه مرجع سلامت



Cary-Blair Transport Medium

Alkaline Peptone Water

TCBS Agar

KIA / TSI

LIA / LDS

Ornithine Decarboxylase Arginine Dihydrolase Test Broth Base

SIM Medium

MR-VP Broth

0% Nacl and 6% Nacl

Gelatin Medium

Simmons Citrate Agar

Urea Agar

Nitrate Broth

Cary-Blair Transport Medium



■ کری بلر به دلیل pH بالایی که دارد (۸/۴)، محیط انتقال و نگهداری مناسبی برای ویبریو کلرا است.

■ مطابق دستور سازنده تهیه می شود. بعضی از انواع کری بلر نیاز به افزودن کلرید کلسیم دارند و برخی این گونه نیستند.

■ برای تقسیم کری بلر از لوله های درپیچ دار یا بیژوباتل استفاده کنید. مقداری که داخل هر ظرف ریخته می شود باید به اندازه ای باشد که حداقل ۴ سانتی متر محیط روی پنبه سواب را بپوشاند.

■ در حالی که درپیچ ها شل هستند، با بخار 100°C به مدت ۱۵ دقیقه استرون کنید (در اتوکلاو قرار ندهید). سپس درپیچ ها را محکم کنید.

■ کری بلر تا یک سال در یخچال قابل نگهداری است، به شرطی که از حجمش کاسته نشود، آلوده نگردد، تغییر رنگ ندهد و در ظروف در بسته نگهداری شود.

Alkaline Peptone Water (APW)



* توجه: چندین فرمول متفاوت برای این محیط ذکر شده است.

• پپتون: ۱۰ g

• کلرید سدیم: ۱۰ g

• آب مقطر: ۱۰۰۰ ml

■ pH محیط کشت را با استفاده از سود ۱ نرمال به ۹-۸/۵ برسانید، سپس در لوله های درپیچ دار تقسیم کرده و در اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 121°C استریل نمایید.

■ APW تا ۶ ماه قابل نگهداری است به شرطی که درپیچ لوله ها محکم باشد و لوله ها در یخچال نگهداری شوند.

Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar (TCBS Agar)



- مطابق دستور سازنده تهیه می شود. آگار باید به طور کامل حل شود.
- این محیط کشت اتوکلاو نمی شود.
- پس از این که دمای آگار به $45-50^{\circ}\text{C}$ رسید، آن را در پلیت استریل تقسیم کنید.
- اگر پلیت ها را در کیسه های پلاستیکی و در یخچال قرار دهید، تا یک هفته قابل نگهداری هستند.

Kligler Iron Agar (KIA)

Triple Sugar Iron Agar (TSI)



- این محیط های کشت مطابق دستور سازنده تهیه می شوند.
- پس از تقسیم در لوله های درپیچ دار به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 121°C استریل نمایید (درپیچ لوله ها را شل ببندید).
- پس از اتوکلاو کردن، لوله ها را به صورت شیب دار قرار دهید تا شیب و نیز عمق محیط کشت در ته لوله ۳ سانتی متر باشد.
- اگر درپیچ لوله ها را محکم ببندید و در یخچال نگهداری کنید، تا ۶ ماه قابل نگهداری هستند.

Lysine Iron Agar (LIA)



- مطابق دستور سازنده تهیه می شود.
- پس از تقسیم در لوله های درپیچ دار به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 121°C استریل نمایید (درپیچ لوله ها را شل ببندید).
- پس از اتوکلاو کردن، لوله ها را به صورت شیبدار قرار دهید تا شیب و نیز عمق محیط کشت در ته لوله ۳ سانتی متر باشد.
- اگر درپیچ لوله ها را محکم ببندید و در یخچال قرار دهید، تا ۶ ماه قابل نگهداری هستند.

Lysine-decarboxylase Sulfhydrase (LDS)



- مطابق دستور سازنده تهیه می شود.
- پس از تقسیم در لوله های درپیچ دار، بر روی هر کدام به اندازه یک سانتی متر پارافین مایع بریزید و در اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 121°C استریل نمایید.
- لوله ها را به صورت ایستاده در جا لوله ای قرار دهید تا آگار سفت شود.
- لوله ها تا ۶ ماه در یخچال قابل نگهداری هستند.

Ornithine Decarboxylase Arginine Dihydrolase Test Broth Base



- محیط پایه را مطابق دستور سازنده تهیه نمایید. پس از حل شدن پودر محیط کشت، آن را به سه قسمت تقسیم نموده، طبق دستور سازنده به یک قسمت آن پودر اورنی تین و به قسمت دوم پودر آرژینین اضافه نمایید. به قسمت سوم اسید آمینه اضافه نمی گردد و از آن به عنوان لوله کنترل استفاده می شود.
- پس از تقسیم در لوله های درپیچ دار در حجم های کم، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 121°C استریل نمایید.
- در هنگام استفاده و پس از کشت باکتری، بر روی لوله کنترل و لوله های حاوی اسید آمینه به اندازه یک سانتی متر پارافین مایع بریزید و انکوبه نمایید.
- لوله ها تا ۶ ماه در یخچال قابل نگهداری هستند.

SIM Medium



- مطابق دستور سازنده تهیه می شود.
- پس از تقسیم در لوله های درپیچ دار، در اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 121°C استریل نمایید.
- لوله ها را به صورت ایستاده در جا لوله ای قرار دهید تا آگار سفت شود.
- لوله ها تا یک ماه در یخچال قابل نگهداری هستند.

MR-VP Broth



- مطابق دستور سازنده تهیه می شود.
- پس از تقسیم در لوله های درپیچ دار در مقادیر ۲/۵ میلی لیتری، در اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 121°C استریل نمایید.
- لوله ها تا ۶ ماه در یخچال قابل نگهداری هستند.



0% NaCl and 6% NaCl

- محیط پایه، نوترینت برات است.
- برای تهیه 0% NaCl نیازی به افزودن نمک به محیط پایه نیست.
- برای تهیه 6% NaCl، به میزان ۶ گرم کلرید سدیم به ۱۰۰ ml محیط پایه اضافه نمایید.
- پس از تقسیم در لوله های درپیچ دار، در اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 121°C استریل نمایید.
- لوله ها تا ۶ ماه در یخچال قابل نگهداری هستند.

Gelatin Medium



- پپتون: ۵ g
- Beef Extract: ۳ g
- پودر ژلاتین: ۱۲۰ g
- آب مقطر: ۱۰۰۰ ml
- مواد فوق را به آب مقطر اضافه کرده، در بن ماری 100°C قرار دهید تا کاملاً حل شوند (از حرارت مستقیم بر روی شعله پرهیزید). pH محیط کشت را به ۶/۸ برسانید، سپس در لوله های در پیچ دار تقسیم کرده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 121°C استریل نمایید.
- لوله ها تا ۶ ماه در یخچال قابل نگهداری هستند.

Simmons Citrate Agar



- مطابق دستور سازنده تهیه می شود.
- پس از تقسیم در لوله های درپیچ دار به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 121°C استریل نمایید.
- پس از اتوکلاو کردن، لوله ها را به صورت شیبدار قرار دهید تا آگار سفت شود.
- اگر درپیچ لوله ها را محکم ببندید و در یخچال قرار دهید، تا ۳ ماه قابل نگهداری هستند.

Urea Agar



- اوره آگار بیس را مطابق دستور سازنده تهیه کنید. ارلن حاوی محیط کشت را به همراه لوله های درپیچ دار و نیز ۱۰۰ ml آب مقطر به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 121°C استریل نمایید.
- از آنجا که اوره به دمای بالا حساس است، برای تهیه محلول اوره ۴۰٪، در شرایط آسپتیک ۴۰ گرم پودر اوره را به ۱۰۰ ml آب مقطر استریل خنک شده اضافه نمایید.
- پس از آن که دمای محیط کشت به $45-50^{\circ}\text{C}$ رسید، در شرایط آسپتیک مطابق دستور سازنده حجم مورد نظر از محلول اوره ۴۰٪ را به ارلن حاوی اوره آگار بیس اضافه نمایید و در لوله های استریل تقسیم نموده و به صورت شیبدار قرار دهید.
- لوله ها تا ۶ ماه در یخچال قابل نگهداری هستند.

Nitrate Broth



- مطابق دستور سازنده تهیه می شود.
- پس از تقسیم محیط کشت در لوله های درپیچ دار، برای مشاهده ایجاد گاز، لوله های دورهام را به صورت واژگون در لوله ها بیندازید. دقت کنید که لوله های دورهام پر از مایع و فاقد حباب باشند.
- سپس در اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 121°C استریل نمایید.
- لوله ها تا ۶ ماه در یخچال قابل نگهداری هستند.

کنترل کیفی



برای کنترل کیفی محیط کشت آن را از جنبه های ذیل بررسی
نمایید:

- سترون بودن
- توانایی رشد دادن ارگانیسم (های) مورد نظر بر روی خود
- توانایی ایجاد واکنش های مناسب شیمیایی

کنترل کیفی



۱) ۳-۵٪ لوله ها یا پلیت های محیط کشت تهیه شده را به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای °C ۳۵ تا °C ۳۷ انکوبه نمایید و از نظر آلودگی و ایجاد رشد باکتریایی بر روی آنها بررسی نمایید.

۲) برای بررسی محیط های کشت مغذی یا انتخابی، کشت ۲۴ ساعته ای از ارگانسیم کنترل بر روی پلیت تهیه نمایید. از کلونی های ایزوله، سوسپانسیونی مطابق با کدورت 0.5 MF در سرم فیزیولوژی تهیه نمایید.

(از این کدورت باید به تعداد $10^8 \times 1-2$ CFU/ml کلونی بدست آید):

الف) برای بررسی محیط های کشت مایع، هر لوله را با ۰/۰۱ ml از سوسپانسیون اولیه مطابق با 0.5 MF تلقیح نمایید. پس از ۲۴-۱۸ ساعت انکوباسیون، از نظر وجود رشد و ایجاد کدورت و نیز ایجاد واکنش مناسب شیمیایی بررسی نمایید.

...ادامه



ب) برای بررسی ظرفیت مغذی بودن (Nutritional Activity) یک محیط کشت مغذی پلیتی، سوسپانسیون اولیه را به نسبت ۱:۱۰۰ در سرم فیزیولوژی رقیق نموده، سپس ۰/۰۱ ml از سوسپانسیون رقیق شده را بر روی پلیت به روش کشت ادرار تلقیح نمایید. پس از ۱۸-۲۴ ساعت انکوباسیون، آن را از نظر ایجاد واکنش مناسب شیمیایی و تعداد کلونی بررسی نمایید. تعداد کلونی مورد انتظار $1-2 \times 10^4$ CFU/plate می باشد.

ج) برای بررسی ظرفیت مهار کنندگی (Inhibitory Activity) یک محیط کشت انتخابی پلیتی، سوسپانسیون اولیه را به نسبت ۱:۱۰ در سرم فیزیولوژی رقیق نموده، سپس ۰/۰۱ ml از سوسپانسیون رقیق شده را بر روی پلیت به روش کشت ادرار تلقیح نمایید. پس از ۱۸-۲۴ ساعت انکوباسیون، آن را از نظر ایجاد واکنش مناسب شیمیایی و تعداد کلونی بررسی نمایید. تعداد کلونی مورد انتظار $1-2 \times 10^5$ CFU/plate می باشد.

...ادامه



۳) برای بررسی محیط های کشت افتراقی و واکنش بیوشیمیایی حاصل از آنها، نیازی به تهیه سوسپانسیون میکروبی مطابق 0.5 MF و تهیه رقت نیست. مستقیماً از کلونی ایزوله ارگانیزم های شناخته شده ای که واکنش مثبت می دهند (کنترل مثبت) و ارگانیزم هایی که واکنش منفی می دهند (کنترل منفی) استفاده کنید و محیط کشت را تلقیح نمایید، سپس به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در دمای 35°C تا 37°C انکوبه نمایید و نتایج را بررسی نمایید.

Cary-Blair Transport Medium



■ *Shigella flexneri* ATCC 9199: وقتی روی یک محیط مغذی ساب کالچر شود، بعد از ۱۸ ساعت رشد می کند.

■ *Neisseria gonorrhoeae* ATCC 19424: وقتی روی یک محیط مغذی ساب کالچر شود، بعد از ۱۸ ساعت رشد می کند.

Alkaline Peptone Water (APW)



- کدورتی مطابق ۰/۵ مک فارلند از *Vibrio cholerae* و *Escherichia coli* تهیه نمایید، سپس $10 \mu\text{l}$ از این سوسپانسیون ها را به طور جداگانه درون لوله های محیط کشت APW بریزید و به مدت ۸-۶ ساعت در دمای $35-37^{\circ}\text{C}$ انکوبه نمایید. پس از آن، ساب کالچری از آنها بر روی پلت های TCBS تهیه نموده و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت انکوبه نمایید. پس از این زمان ویبریو کلرا بر روی TCBS رشد می کند.

Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar (TCBS Agar)



- *Vibrio cholerae* ATCC 9459 : رشد متوسط تا زیاد، کلونی ها زرد هستند.
- *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 : رشد متوسط تا زیاد، کلونی ها آبی هستند.
- *Escherichia coli* ATCC 25922 : رشد به طور جزئی یا کامل مهار می شود. اگر رشد کند کلونی ها کوچک و شفاف هستند.
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 : رشد به طور جزئی یا کامل مهار می شود. اگر رشد کند کلونی ها آبی هستند.
- *Streptococcus faecalis* ATCC 29212 : رشد به طور جزئی یا کامل مهار می شود. اگر رشد کند کلونی ها کوچک و زرد هستند.

Kligler Iron Agar (KIA) Triple Sugar Iron Agar (TSI)



Microorganisms	Slant	Butt	SH ₂
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	A	A-G	-
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	Alk	A-G	+
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	Alk	A	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Alk	Alk	-

Lysine Iron Agar (LIA)



Microorganisms	Slant	Butt	SH ₂
<i>Salmonella arizonae</i> ATCC 13314	Alk (purple)	Alk (purple)	+
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8454	Alk (purple)	A (Yellow)	-
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 9484	Red	A (Yellow)	-

Lysine-decarboxylase Sulfhydrase (LDS)



ظاهر کلونی ها	میکروارگانیزم ها
سیاه که ممکن است با هاله بنفش رنگ احاطه شود.	LDS مثبت و SH_2 مثبت: سالمونلا آریزونا، ادواردسیلا و ...
بنفش	LDS مثبت و SH_2 منفی: اشیشیا، کلبسیلا، هافنیا، سراسیا و ...
زرد (بدون تغییر رنگ)، رشد تأخیری	LDS منفی: شیگلا، سیتروباکتر، انتروباکتر، پروتئوس، پروویدنسیا و ...

Ornithine Decarboxylase Arginine Dihydrolase Test Broth Base



Microorganisms	Arginine	Ornithine
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	+	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	-	-

SIM Medium



Microorganisms	SH ₂	Indole	Motility
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	+	+
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	+	-	+
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 9199	-	-	-

MR-VP Broth



Microorganisms	MR Reaction	VP Reaction
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	+	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	-	+

Simmons Citrate Agar



■ *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048: رشد

می کند و سطح شیب دار آبی می شود.

■ *Escherichia coli* ATCC 25922: فاقد رشد تا رشد

کم، بدون تغییر رنگ محیط کشت.

Urea Agar



■ *Proteus vulgaris* ATCC 8427: واکنش اوره آز مثبت
(رنگ قرمز - صورتی تند تا قرمز ارغوانی)

■ *Salmonella typhimurium* ATCC 13311: واکنش
اوره آز منفی (بدون تغییر رنگ)

Nitrate Broth



■ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145
نیتریت مثبت، گاز تولید می کند.

■ *Acinetobacter Iwoffii* ATCC 15309
نیتریت منفی،
گاز تولید نمی کند.

