

In The Name Of God

Shaheed Beheshti University of
Medical sciences and Health Services

Collaborating Center for Tuberculosis
East Mediterranean Region

Mycobacteriology Research Center
مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی
MRC

National Research Institute
Tuberculosis and Lung Disease

Collaborating Center for Tuberculosis
Laboratory IUATLD

جداسازی و کشت مایکوباکتریم

Culture Examination

Mycobacteriology Research Center (MRC)

Dr. P. Farnia	**دکتر پریسا فرنیا**
Dr. M. Varahram	**دکتر محمد ورهرام**
Dr. F. Mohammadi	**دکتر فروزان محمدی**
F. Ghadiri Fard	**فرهاد قدیری فرد**
Dr. M. Doraghi	**دکتر معصومه دورقی**
Dr. S. J. Tabatabaee	**دکتر سید جواد طباطبایی**
Dr. A. Zia Zarifi	**دکتر ابوالحسن ضیاء ظریفی**
Dr. M. Bahadori	**دکتر مسلم بهادری**
Dr. M. R. Masjedi	**دکتر محمدرضا مسجدی**
Dr. A. A. Velayati	**دکتر علی اکبر ولایتی**

Contence

فهرست

Introduction	7	۷	مقدمه
Isolation & culture of mycobacterium from clinical specimens	9	۹	مراحل انجام کشت و جداسازی مایکوباکتریوم از نمونه های بالینی
Specimen's collection	13	۱۱	جمع آوری نمونه ها
Specimens transport	15	۱۵	انتقال نمونه ها
Digestion & decontamination	17	۱۷	هضم و آلوده زدایی
1) Cetylpyridinium Chloride-Sodium Chloride	17	۱۷	۱) نمونه های خلط در ترانزیت
2) Petroff Method	21	۲۱	۲) روش پتروف
3) Oxalic – acid Method	27	۲۷	۳) روش اگزالیک اسید
Lowenstein-Jensen Culture Media preparation	31	۳۱	تهیه محیط لونشتاین جانسن
Inoculation & incubation	43	۴۳	تلقیح و انکوباسیون نمونه
Culture reading	45	۴۵	خواندن کشت
Culture recording & reporting	47	۴۷	گزارش و ثبت نتایج کشت
Sensitivity	49	۴۹	حساسیت

مقدمه

آزمایشگاه رفرانس سل کشوری در روز بین ۸۰ تا ۱۲۰ عدد نمونه ریوی و خارج ریوی دریافت می نماید. این نمونه ها توسط روش پتروف هضم وآلوده زدایی می گردد. سدیمان به دست آمده برای تهیه اسمیر و همچنین تلقیح به لوله های محیط لوین اشتاین مورد استفاده قرار می گردد. در ایـن کتابچه روش انجام کار به طور کامل نوشته شده است.

Introduction

The Iranian Reference TB Laboratory receives between 80 to 120 pulmonary and Extra-Pulmonary specimens per day. The specimens were digested and decontaminated by petroff's (using 4% NAOH) method.

مراحل انجام کشت و جداسازی مایکوباکتریوم از نمونه های بالینی
Isolation &Culture of Mycobacterium from clinical specimens

جمع آوری و انتقال نمونه ها
Specimen's collection & Transports

هضم و آلودگی زدایی
Digestion & decontamination

تهیه محیط کشت
Culture media preparation

تلقیح و انکوباسیون نمونه
Inoculation & incubation

خواندن کشت
Culture reading

گزارش و ثبت نتایج کشت
Culture recording & reporting

حساسیت
Sensitivity

ساخت سایر محیط های کشت
Liquid & Agar culture media

جمع آوری نمونه ها

نوع نمونه	دفعات نمونه گیری	شرایط نگهداری	زمان نگهداری داخل حرارت ۴ C	محل نمونه برداری	مقدار لازم CC/	اسمیر مستقیم/ اسمیرهموژنه
خلط	صبحگاهی ۳ نوبت	بدون ماده نگهدارنده	۵ – ۳ روز	همیشه ریه	۵ –۱۰ CC	اسمیر مستقیم/ اسمیرهموژنه
ادرار	صبحگاهی ۳ نوبت	بدون ماده نگهدارنده	حداکثر ۲۴ ساعت	کلیه و مجاری ادراری	۴۰ – ۵۰ CC	اسمیرهموژنه
توباژ شیره معده	ناشتا و صبحگاهی ۳ نوبت	بیکربنات سدیم یا بافر فسفات (100mg/10ml)	۴ – ۳ ساعت	محتویات معده	۵ – ۱۰ CC	اسمیرهموژنه
بیوپسی لنف نود	معمولا یک نوبت	بدون ماده نگهدارنده	حداکثر ۲۴ ساعت	لنف نود	-	اسمیرهموژنه
برونش	معمولا یک نوبت	بدون ماده نگهدارنده	۱۲ – ۸ ساعت	ریه راست و چپ	۱۰ – ۱۵ CC	اسمیرهموژنه
مایع نخاع	معمولا یک نوبت	بدون ماده نگهدارنده	حداکثر ۲۴ ساعت	ستون فقرات بین مهره کمری ۴ و ۵	۲ – ۵ CC	اسمیرهموژنه
مایع پلور	معمولا یک نوبت	هپارین ۱٪	حداکثر ۲۴ ساعت	بین دنده ۴ و ۵ (محل کاهش صدا)	۲ – ۵ CC	اسمیرهموژنه
مایع آسیت	معمولا یک نوبت	هپارین ۱٪	حداکثر ۲۴ ساعت	پریتوئن	۳ – ۵ CC	اسمیرهموژنه
مایع پریکارد	معمولا یک نوبت	هپارین ۱٪	حداکثر ۱۲ ساعت	مایع دور قلب	۲ – ۵ CC	اسمیرهموژنه
مایع مفصل	معمولا یک نوبت	هپارین ۱٪	حداکثر ۲۴ ساعت	محل اتصال مفاصل خصوصاً زانو	۲ – ۵ CC	اسمیرهموژنه
مایع مغز استخوان	معمولا یک نوبت	هپارین ۱٪	حداکثر ۲۴ ساعت	مغز استخوان	۱ – ۳ CC	اسمیرهموژنه

Specimen's collection

Specimens	Collection instruction (time & Preservatives)	Volume/ml	Specimens storage in 4^0C	Unacceptable Specimens
Abscess contents, aspirate fluid	Clean the skin with alcohol before aspirating .Swab can placed in small amount of 7H9 medium for transport	-	8-12 hours	Dry swab
Blood	SPS (sodium polyanethol sulfonate) or Heparin as anticoagulant	5-10 ml	8-12 hours	-
Body fluids (pleural, pericardial ,peritoneal, etc)	Bloody specimens collected in 1% Heparin	10-15 ml	Maximum 24 hours	EDTA inhibits mycobacterial growth even in trace amounts
Bone marrow	Bloody specimens collected in 1% Heparin	1-2 ml	Maximum 24 hours	EDTA inhibits mycobacterial growth even in trace amounts
Bronchoalveolar lavage or bronchial washings	Collect without preservative	5-10 m	8-12 hours	EDTA inhibits mycobacterial growth even in trace amounts
CSF	Collect without preservative	2-5 ml	8-12 hours	
Gastric lavage fluid	Collect fasting early-morning specimens on 3 consecutive days. Adjust the PH with (100 mg/10 ml specimens) of sodium carbonate immediately after collecting.	5-10 ml	2-4 hours	
Lymph node	Collect without preservative.	-	Maximum 24 hours	don't immerse in saline or other fluid
Sputum (expectorated)	Rinse the mount and collect 3 consecutive morning sputum	5-10 ml	3-5 days	
Sputum (induced)	Use sterile hypertonic saline	-	8-12 hours	
Stool	Collect directly into container	-	Maximum 24 hours	
Tissue biopsy sample/wound material	Collect without preservative	1g	Maximum 24 hours	don't immerse in saline or other fluid
Urine	Collect first morning specimen on 3 consecutive days	minimum 40 ml		24-h pooled specimens; urine from catheter bag

انتقال نمونه

Specimens transport

برای جلوگیری از رشد سایر میکروارگانیسم ها در نمونه ها ی خلط، این نمونه ها باید بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شوند. در صورتی که نمونه های خلط قابل انتقال نباشد می توان آنها را در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت حداکثر ۵ روز نگهداری کرد. برای انتقال نمونه می توان از محلول نگهدارنده cetylpyridinium chloride-sodium chloride (CPC) استفاده کرد. نمونه های حاوی CPC احتیاجی به عمل هضم مجدد ندارد.

Specimens should be transported to the laboratory to avoid overgrowth by other microorganisms. This is particularly true for specimens from non-sterile-sites such as sputum. When the transport or the processing is delayed, specimens should be stored not more than 5 days at 4^0C. The cetylpyridinium chloride (CPC) method is widely used for the transport of sputum specimens .CPC eliminates the associated flora in sputum specimens and treated specimens should not be submitted to further decontamination prior to cultivation. Specimens treated with CPC preferentially inoculated in egg-based culture media.

هضم و آلوده زدایی نمونه های خلط در ترانزیت ، (روش Cetylpyridinium Chloride-Sodium Chloride)

روش CPC برای هضم و آلوده زدایی نمونه های خلط در ترانزیت انجام می گیرد. بعد از دریافت نمونه های خلط در آزمایشگاه مرجع این نمونه ها سانتریفوژ شده و سدیمان بدست آمده مستقیم روی محیط کشت لوین–اشتاین تلقیح می گردد.

مواد مورد نیاز

ستیل پریدینیوم–کلرید ۱٪ (Cetylpyridinium – Chloride) ، کلرید سدیم ۲٪ , آب مقطر یا نرمال سالین

طرز تهیه

۱۰ گرم ستیل پریدینیوم–کلرید و ۲۰ گرم سدیم کلرید را در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کنید. محلول تهیه شده را باید دور از نور و گرما نگهداری شود.

روش

به هم حجم نمونه خلط، محلول CPC-NaCL افزوده و پس از مخلوط کردن آن به آزمایشگاه مرجع ارسال می گردد. بعد از تحویل به آزمایشگاه مرجع ، نمونه با استفاده از آب مقطر استریل یا نرمال سالین رقیق شده (به طوری که حجم نمونه به ۵۰ میلی لیتر برسد) و به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۳۰۰۰ سانتریفوژ می گردد. سدیمان بدست آمده به محیط لوین–اشتاین جانسون تلقیح می شود.

Digestant-decontaminant sputa in transit, Cetylpyridinium Chloride –Sodium Chloride (CPC) method

Cetylpyridinium Chloride (CPC) a quaternary ammonium compound is used to decontaminate the specimens while sodium chloride effects liquefaction.

Materials

1% cetylpyridinium chloride, 2% sodium chloride, D.W or sterile saline.

Preparation

Dissolve 10 g of cetylpyridinium chloride and 20 g of Nacl in 1000 ml D.W .Solution should be protected from light, heat and evaporation.

Procedures:

To 10 ml-of sputum specimens, add equal volume of CPC-Nacl solution .Shake by hand. Package specimens in mailing container and send to the laboratory for processing.

Once received in the laboratory, dilute the specimens with D.W. to 50ml- mark. Centrifuges at 3000 x g for 15 minutes Decant supernatant fluid and suspend sediment in 1 to 2 ml of D.W, saline or 0.2% bovine albumin fraction. The re suspended medium inoculated onto egg –medium and incubated at 35^0 to 37^0C.

هضم و آلوده زدایی
Digestion & decontamination

اکثر نمونه های بالینی حاوی مایکوباکتریومها، دارای باکتریهای دیگر نیز می باشند. این میکروارگانیسمها باید قبل از کشت طبق دستورات حذف شوند تا از آلودگی محیط کشت جلوگیری شود.

The rapidly growing normal flora contaminate majority of clinical specimens that submitted to the tuberculosis culture laboratory. They would rapidly overgrow the entire surface of the medium and digest it before the tubercle bacilli start to grow. Therefore most specimens must be subjected to a harsh digestion and decontamination procedures that liquefies the organic debris and eliminates the unwanted flora.

هنگام کشت باسیل سل، ۲ جنبه مهم را مدنظر نگاه دارید: نمونه ها باید خوب هموژن شود تا باسیل را از موکوس، سلولها و بافتهایی که به آن چسبیده آزاد کند. هموژن کردن و آلوده زدایی نباید حیات مایکوباکتریوم را از بین ببرند.

When culturing tubercle bacilli, two important aspects should be borne in mind.
Specimens homogenized to free the bacilli from mucus, cells or tissue in which they embedded.
Neither homogenization nor decontamination should unnecessarily diminish the viability of tubercle bacilli.

هضم و آلوده زدایی به روش پتروف (Modified Petroff)

مواد :

محلول سود ۴٪ ، محلول ۲ نرمال هیدروکلریدریک اسید– اندیکاتور فنل رد

طرز تهیه:

سود ۴٪: ۴ گرم سود را در ۱۰۰میلی لیتر آب مقطر حل کرده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد آن را اتوکلاو نمایید.

اسید هیدروکلریدریک – ۲ نرمال: ۳۳ میلی لیتراسید هیدروکلریدریک به ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه کرده و سپس آنرا آتوکلاو نمایید.

اندیکاتور فنل–رد: ۸۰ میلی گرم پودر فنل رد را در ۲۰ میلی لیتر سود ۴٪ حل کرده و حجم نهایی ان را با آب مقطر به ۱۰۰۰ میلی لیتری می رسانیم.

اسید هیدروکاریدریک –اندیکاتور فنل رد: ۲۰ میلی لیتر محلول فنل – رد (۸۰ میلی گرم پود فنل رد در ۲۰ میلی لیتر سود ۴٪) را به ۸۵ میلی لیتر اسید هیدروکلریدریک غلیظ افزوده و حجم نهایی محلول را با آب مقطر به ۱۰۰۰ میلی لیتر می رسانیم.

Materials for sodium hydroxide (Modified Petroff) method

4% NaOH solution, 2 NHCl solutions –phenol red indicators

Preparation

NaOH: Dissolve 4 g NaOH in 100ml distilled water and sterilize by autoclaving at 121^0C for 15 minutes (4% NaOH)

HCL: Prepare the 2.0 N HCL by carefully adding 33ml concentrated HCL to 200 ml distilled water and sterilize by autoclaving

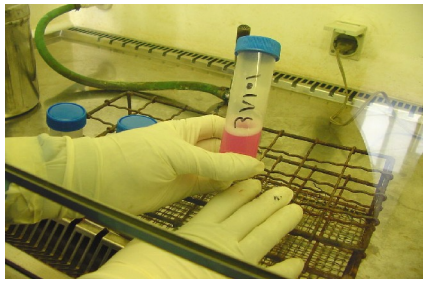
Phenol-red indicator: 80 mg phenol red powder in 20 ml 4% NaOH and add sufficient distilled water to make 1000 ml

HCL- Phenol red indicator: combine 20 ml of phenol red solution (80 mg phenol red powder in 20 ml 4% NaOH) and 85 ml of concentrated HCL, with distilled water to make 1000ml

روش
Procedure

به هم حجم نمونه ها سود ۴٪ بیفزایید.

To equal volume of sputum specimen add equal amount of 4% NaOH.



پس از بستن در لوله، نمونه را با استفاده از شیکر مخلوط نمایید.

Tighten the container cap and shake to digest.

نمونه را بمدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگهدارید.

Let stand for 15 minutes at room temperature.

نمونه را به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۳۰۰۰ سانتریفوژ نمایید.

Centrifuge at 3000 x g for 15 minutes.

Pour off supernatant. محلول رویی را دور بریزید .

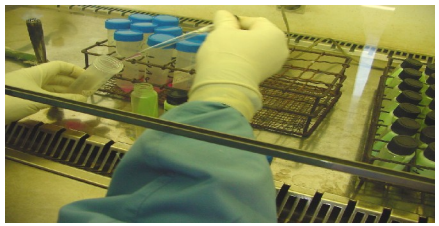
به منظور خنثی نمودن، چند قطره اسید به ته نشین بیفزایید، تا تغییر رنگ مشاهده گردد.

Neutralize sediment* with HCl until indicator changes from red to yellow. Re-suspend the sediment with 1 to 2 ml of sterile water.



رسوب را کمی مخلوط نمایید و به ۳ محیط (برای نمونه خارج ریـوی) یـا ۲ محـیط (بـرای نمونـه خلط) لونشتاین– جانسن تلقیح نمایید.

Mix sediment and inoculate it to L.J culture medium, (For extra-pulmonary specimen three L.J media and for sputum two L.J media are used)



*. Adjusting the PH of the sediment is not necessary because of the well –buffered media. But do not over-inoculate because this interferes with the buffer action and results in poor growth.

روش اگزالیک- اسید
Oxalic – acid Method

اسید اگزالیک محیط را اسیدی کرده و بعضی از باسیلهای گرم منفی نظیر Pseduomonas و Proteous را از بین می برد.
This method is often helpful for specimens consistently contaminated with Pseudomonas species.

روش اگزالیک- اسید

مواد

اسید اگزالیک : ۵ گرم در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر

سدیم هیدروکسید : ۴ گرم در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر

بافر فسفات : ۰/۸۵ گرم در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر

معرف فنل رد : ۸۰ میلی گرم فنل رد + ۲۰ میلی لیتر سود ۴٪ + ۹۸۰ میلی لیتر آب مقطر

روش

در داخل یک لوله سانتریفوژ، حجم مساوی از محلول اسید اگزالیک ۵٪ را به نمونه خلط اضافه کنید.

لوله ها را به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس نمایید. بگذارید لوله به مدت ۳۰ دقیقه بماند.

بافر فسفات اضافه کرده (طوری که حجم کل نمونه به۵۰ میلی لیتر برسد) و در دور ۳۰۰۰ X g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ نمایید.

محلول رویی را خالی کنید و ۱-۲ قطره معرف فنل رد به سدیمان اضافه کنید. برای خنثی کردن سدیمان از سود ۴٪ استفاده کنید. رسوب را کمی مخلوط نمایید و به محیط کشت لونشتاین – جانسن تلقیح نمایید.

Materials

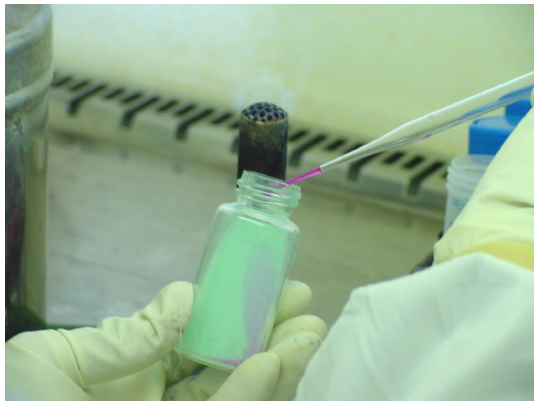
5% Oxalic –acid
4% Sodium hydroxide
Physiological saline
Indicator solution, phenol red

Preparation

1) Oxalic acid ($C_2H_2O_4.2H_2O$): mix 5 g per 100 ml D.W and autoclave.
2) Sodium hydroxide: Mix 4 g per 100 ml distilled water and autoclave.
3) Physiological saline: Mix 0.85 g per 100 ml distilled water and autoclave.
4) Phenol red indicator: Dissolve 80 mg phenol red powder in 20 ml 4% NaOH, bring volume up to 1,000 ml with D.W.

Procedure

1) Add an equal volume of 5% oxalic acid to each specimen.
2) Mix on test –tube mixer. Let stand for 30 minutes with occasional shaking.
3) Add sterile saline to the 50-ml mark on the centrifuge tube.
4) Centrifuge the specimen at 2,000 to 3,000 X g for 15 minutes.
5) Decant the supernatant fluid into splash-proof container.
6) Add a few drops of the phenol-red indicator to the sediment and neutralize with the 4% NaOH until the first persistent pale pink color forms.
7) Inoculate media and incubate at 35^0C to 37^0C.



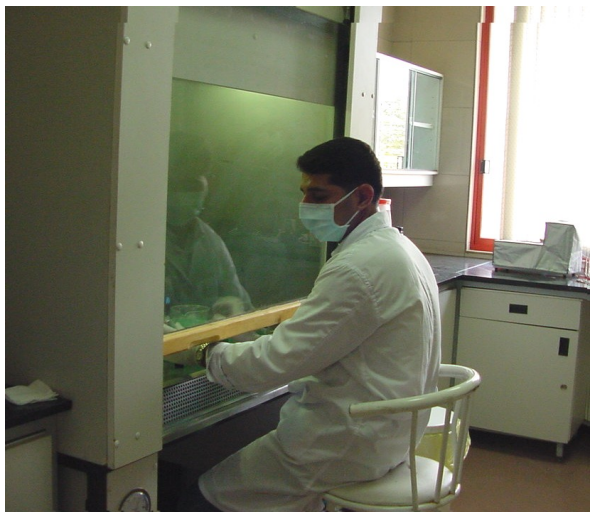
محیط لونشتاین جانسن
Lowenstein-Jensen Culture Media

محیط لونشتاین جانسن

محتویات: محلول نمکی، محلول مالاشیت گرین ۲٪ ، مخلوط یکنواخت تخم مرغ

ساخت محیط

منعقد نمودن محیط، بررسی از نظر آلودگی و نگهداری محیط های ساخته شده



LÖWENSTEIN-JENSEN MEDIUM

1) Ingredients: Mineral salt solution, Malachite green solution 2%, homogenised whole eggs.

2) Preparation of complete medium

Coagulation of medium, Sterility check, Storage

Mineral salt solution

Potassium dihydrogen phosphate anhydrous	2.4g
Magnesium sulphate	0.24g
Magnesium citrate	0.6g
Asparagine	3.6g
Glycerol	12 ml
Distilled water	600 ml

Dissolve the ingredients in order in the distilled water by heating. Autoclave at 121 ºC for 30 minutes to sterilize.

محلول نمکی

پتاسیم دی هیدروژن فسفات	۲/۴ گرم
منیزیم سولفات	۰/۲۴ گرم
منیزیم سیترات	۰/۶ گرم
آسپاراژین	۳/۶ گرم
گلیسرول	۱۲ میلی لیتر
آب مقطر	۶۰۰ میلی لیتر

مواد فوق را به ترتیب در آب مقطر حل نموده و حرارت دهید، سپس در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه در اتوکلاو استریل نمایید.

Malachite green solution 2%:

Malachite green dye	2 g
Sterile distilled water	100 ml

Dissolve the dye in sterile distilled water by placing the solution on stirrer. Distribute the solutions in special tubes, then autoclave it. Always keep the malachite solution in dark.

محلول مالاشیت گرین سبز ۲٪

رنگ مالاشیت سبز	۲ گرم
آب مقطر استریل	۱۰۰ میلی لیتر

ابتدا رنگ را در آب مقطر استریل حل نمایید و سپس مدت یک ساعت روی دستگاه قرار دهید تا به خوبی حل گردد .رنگ را در ظرفهای درب دار مخصوص تقسیم و اتوکلاو نمایید. باید توجه داشت که مالاشیت در معرض نور قرار نگیرد .

Homogenised whole eggs

Clean fresh eggs by scrubbing thoroughly with a hand brush in warm and a plain alkaline soap. Rinse eggs in running water and soak them in 70% ethanol for 15 minutes. Before handling the clean dry eggs scrub the hands and wash them. Crack the eggs with a sterile knife into a sterile flask and beat them with a sterile egg whisk or in a sterile blender.

مخلوط یکنواخت تخم مرغ

تخم مرغ تازه را با یک برس کاملاً تمیز نمایید و به مدت ۵-۱ دقیقه در محلول ۵٪ صابون قرار دهید. پس از آن، ابتدا ظرف تخم مرغ را زیر آب جاری و سرد قرار دهید و بعد تخم مرغها را به مدت ۱۵ دقیقه در الکل ۷۰٪ قرار دهید. دستهای خود را با آب و صابون بشویید و تخم مرغ ها را در ظرف استریل بشکنید و با دست یا با دستگاه تکان دهنده آنرا کاملاً مخلوط نمایید و از ۴ لایه پارچه نازک بگذارنید.

Preparation of complete medium

The following ingredients are aseptically pooled in a large, sterile flask and mixed well:

Mineral salt solution:	600 ml
Malachite green solution:	20 ml
Homogenised eggs:	1000 ml

Complete egg medium is distributed in 6-8 volumes in sterile McCartney bottles and the tops are tightened.

ساخت محیط :

محتویات زیر را در یک فلاسک دو لیتری (با رعایت شرایط استریل) بریزید و مخلوط نمایید:

محلول نمکی	۶۰۰ میلی لیتر
محلول مالاشیت سبز	۲۰ میلی لیتر
محلول یکنواخت تخم مرغ	۱۰۰۰ میلی لیتر

پس ازمخلوط کردن، به مقدار ۶ تا ۸ میلی لیتر در لوله های در پیچ دار مک کارتنی (۱۵۰x۲۰) بریزید و درب هر لوله را محکم ببندید.





Coagulation of medium

Before loading, heat the inspissator to 80 ºC to quicken the build-up of the temperature. Place the bottles in a slanted position in the inspissator and coagulate the medium for 45 minutes at 80º-85º C (Since the medium has been prepared with sterile precautions this heating is to solidify the medium, not to sterilise it). Heating for a second or third time has a detrimental effect on the quality of the medium.

منعقد نمودن محیط

قبل از قرار دادن محیطها ابتدا دمای دستگاه منعقدکننده را به ۸۰ درجه سانتیگراد برسانید. محیطها را به صورت مورب در دستگاه قراردهید و محیطها را به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۸۰ تا ۸۵ درجه سانتیگراد منعقد سازید. از آنجا که محیط در شرایط استریل تهیه می شود این دمای فقط برای منعقد کردن محیط استفاده می شود نه برای استریل سازی. حرارت بیش از حد (دو یا سه بار) اثر نامطلوبی بر کیفیت محیط دارد.

محیط Middle brook 7 H-10 Agar

این محیط با استفاده از پودر **Middle brook 7 H-10** و محیط غنی شده OADC تهیه می شود .

تهیه ۲۰۰ میلی لیتر از محیط کامل

۳/۶ گرم از **Middle brook 7 H-10** را در ۱۸۰ میلی لیتر آب مقطر حل کرده و ۱/۵ میلی لیتر glycerol را به آن اضافه می نماییم و در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد اتوکلاو می نماییم.

وقتی دمای محیط به ۵۶–۵۰ درجه رسید، ۲۰ میلی لیتر OADC به آن افزوده و بلافاصله (تا حداکثر یک ساعت) آن را تقسیم می نماییم.

Middle brook 7 H-10 Agar Medium

Middle brook 7H-10 agar medium may be prepared by using commercially available 7H-10 agar – powdered base and Middle brook OADC enrichment.

To prepare 200 ml of complete medium

Suspend 3.6 g of Middlebrook 7H-10 basal medium in 180 ml of sD.W snd add 1.0 ml of glycerol (reagent grade).

Autoclave for 10 minutes at 121^0C. As soon as cooled to 50 to 56^oC, add 20 ml of OADC. Dispense within 1 hour after autoclaving. Allow to solidify at room temperature without exposure to daylight.

محیط Middle brook7 H-9

این محیط با استفاده از پودر **Middle brook 7 H-9** و محیط غنی شده OADC تهیه می شود.

تهیه ۱۰۰۰ میلی لیتر از محیط کامل

۴/۷ گرم از **Middle brook 7 H-9** را در ۹۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کرده و ۲ میلی لیتر glycerol را به آن اضافه مـی نمـاییم و در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد برای ۱۵ دقیقه اتوکلاو می نماییم.
وقتی دمای محیط به ۴۵ درجه سانتیگراد رسید، ۱۰۰ میلی لیتر OADC به آن افزوده و در لولـه هـای ۲۰ تـا ۱۵ میلـی لیتـری تقـسیم می نماییم.

Middlebrook 7 H-9 Liquid Medium

Middle brook 7H-10 agar medium may be prepared by using commercially available 7H-10 agar – powdered base and Middle brook OADC enrichment.

To prepare 1000 ml of complete medium
Suspend 4.7 g of dehydrated medium in 900 ml of sD.W containing 2 ml of glycerol.
Autoclave for 15 minutes at 121^0 C. As soon as cooled to 45^0 C, add 100 ml of OADC. Dispense 5-ml amounts into 20X 150 mm screw cap tubes.

تلقیح و انکوباسیون نمونه
Inoculation & incubation

تلقیح

می توان از پیپت پاستور شیشه ای یا پلاستیکی استفاده نمود. به هر محیط کشت باید ۰/۲ تا ۰/۴ میلی لیتر از رسوب نمونه (۲ تا ۴ قطره) به سطح محیط افزوده شود.

Inoculation

Glass or plastic Pasture pipettes used. Each slope inoculated with 0.2-0.4 ml (2-4 drops) of the centrifuged sediment.

انکوباسیون

محیطها را پس از تلقیح به صورت مورب حداقل به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ تا ۳۷ درجه سانتیگراد نگهدارید تا از پوشیده شدن سطح محیط با نمونه اطمینان حاصل گردد. محیطها برای مدت ۲ ماه در انکوباتور نگهداری شده و در صورت منفی بودن، پس از استریل شدن دور انداخته شود.

Incubation

All cultures incubated at 35º-37º C until growth observed or discarded as negative after eight weeks. Inoculated media preferably incubated in a slanted position for at least 24 hours to ensure the complete distribution of inoculum.

خواندن کشت
Culture reading

جدول زمانی بررسی کشت

تمام کشت ها بایستی پس از ۷۲ ساعت از نظر جذب نمونه تلقیح شده و تبخیر آن کنترل شوند و سپس درب لوله ها باید محکم بسته شوند تا از خشک شدن محیط و آلوده شدن آن جلوگیری شود، پس از آن کشت ها هر هفته بررسی می شوند که به هنگام بررسی باید به موارد زیر توجه داشت:

- پس از یک هفته به منظور بررسی مایکوباکتریوم های سریع الرشد
- به مدت ۸ هفته کشتها به منظور بررسی رشد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

خواندن کشت

کلنی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس خشن، مومی، فاقد رنگدانه (کرم رنگ) و کند رشد است، که ۸-۴ هفته پس از تلقیح ظاهر می شوند. در موارد مشکوک (اسمیر منفی/ کشت مثبت) باید گسترش تهیه گردد و به روش زیل نلسون رنگ آمیزی گردد.

Examination schedule

Examine all cultures 72 hours after inoculation to check that liquid has completely evaporated.Thereafter, the caps

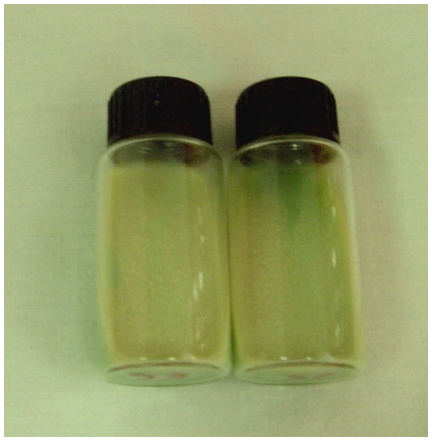
Tighten in order to prevent drying out of media and to detect contaminants.

- After one week to detect rapidly growing mycobacteria
- Weekly through eight weeks to detect positive cultures of M.tuberculosis

Reading of cultures

Typical colonies of *M.tuberculosis* are rough, crumbly, waxy, non-pigmented (Cream colored) and slow-growers, i.e. only appearing three weeks after inoculation. With doubtful cases, the acid-fastness should be confirmed by Ziehl-Neelsen staining.

گزارش و ثبت نتایج کشت
Culture recording & reporting



Reading Reporting

No growth	Negative
<50 colonies	Number of colonies
50-100 colonies	Positive (+1)
100-200 colonies	Positive (+2)
200-500 colonies	Positive (+3)
> 500 colonies	Positive (+4)
Contamination	Contamination

خواندن گزارش

عدم رشد	منفی
۵۰ >کلنی	تعداد کلنی
۵۰–۱۰۰ کلنی	مثبت (+۱)
۱۰۰–۲۰۰ کلنی	مثبت (+۲)
۲۰۰–۵۰۰ کلنی	مثبت (+۳)
۵۰۰ <	مثبت (+۴)
آلوده	آلوده

حساسیت
Sensitivity

تشخیص قطعی بیماریهای مایکوباکتریایی با جداسازی مایکوباکتریوم امکانپـذیر اسـت. بـا اسـتفاده از روش کشت امکان بررسی و ردیابی ۱۰ تا ۱۰۰۰ مایکوباکتریوم زنده در هر میلی لیتر نمونه وجود دارد.

The definitive diagnosis of mycobacterial disease demands that the causative agent recovered on culture medium.
Culture techniques have been estimated to detect as many as 10 to 1000 viable mycobacteria per ml. of specimens. A positive culture for *M.tuberculosis* confirms the diagnosis of active disease.

Address: Mycobacteriology Research Centre, Iranian National Reference TB Laboratory, National Research Institute of Tuberculosis & Lung Disease (NRITLD), Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Shaheed Bahonar Ave, Darabad, 19556, P.O 19575/154, Tehran, Iran.
Tel: (0098-21) 20105555 or 20109505
Fax: (0098-21) 20109484 or 20109505
E-mail: mrc @ nritld.ac.ir, pfarnia @ hotmail.com, pfarnia @ nritld.ac.ir, Website: www.mrc.ac.ir

This document was created with Win2PDF available at http://www.daneprairie.com.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.