

به نام خدا

آماده سازی، تهیه و کنترل کیفیت محیط های کشت میکروبی

رقیه صبوریان

مرداد ماه ۱۴۰۰

نکات عمومی در مورد تهیه محیط های کشت

- ▶ آب مصرفی
- ▶ توزین پودر محیط کشت و افزودن آب
- ▶ حل کردن محیط کشت
- ▶ توزیع
- ▶ استریلیزاسیون
- ▶ آماده سازی جهت مصرف
- ▶ اندازه گیری و تنظیم pH
- ▶ نگهداری محیط های کشت تهیه شده
- ▶ خطاها، مشکلات و علل ممکن در تهیه محیط های کشت

آب مصرفی

- ▶ کیفیت محیط های کشت به طور مستقیم به کیفیت مواد خام مورد استفاده در تهیه آنها بستگی دارد.
- ▶ آب یکی از مهمترین موادي است که در تهیه محیط های کشت به کار می رود.
- ▶ معیار های مهم برای آب مورد استفاده در تهیه محیط های کشت شامل
 - ▶ بررسی قدرت هدایت الکتریکی
 - ▶ مقاومت الکتریکی
 - ▶ آلودگی میکروبی
 - ▶ pH
- ▶ در شرایط ایده آل یون های مس به دلیل خاصیت مهارکنندگی برای اغلب میکروارگانیسم ها، نباید در آب مورد استفاده برای تهیه محیط های کشت وجود داشته باشد.
- ▶ در بخش میکروب شناسی تاثیر نوع آب در عملکرد فرایندها بطور کافی مستند نشده است، بنابراین برای جلوگیری از مشکلات ناشناخته توصیه می شود در صورت امکان از آب نوع ۱ استفاده شود.
- ▶ اما بطور واقع گرایانه اکثر آزمایشگاه های میکروب شناسی از آب دیونیزه ای که معیارهای آب نوع ۲ را داشته باشد، استفاده می کنند.

آب آزمایشگاهی

► نوع ۱: مورد استفاده در آنزیم ایمونواسی، رادیوایمونواسی، ایمونوفلورسنس اسی، آماده سازی بافرها یا معرف هایی که حاوی مواد نگهدارنده نیستند، معرف های الکتروفورز، ویروس شناسی و مواد کشت سلولی

► نوع ۲: مورد استفاده در محیط های کشت و رنگ ها، و معرف هایی که یا استریل می شوند یا به آنها مواد نگهدارنده اضافه می شود.

► نوع ۳ و ۴: برای شستشو و آب کشی اولیه ظروف شیشه ای

► خصوصیات و دفعات انجام آزمایش QC آب آزمایشگاهی

Table 14.4–3 Specifications and frequency of QC testing of laboratory water^a

Test	Frequency	Tolerance limit ^b		
		Type I	Type II	Type III
Bacterial content (CFU/ml)	Weekly	≤10	≤1,000	NS
pH	With use	NS	NS	5.0–8.0
Resistivity (MΩ-cm at 25°C)	Type I, daily (in-line)	10	1.0	0.1
	Type II, daily (in- or off-line)			
	Type III, with use (off-line)			
Silicate (mg/liter)	Initially and annually thereafter	0.05	0.1	1.0

^a Adapted from references 1 and 4 with permission. See Table 14.4–2, footnote a.

^b NS, not specified.

آب مصرفی

► خصوصیات انواع آب به طور خلاصه در جدول زیر آمده است.

ویژگی	درجه I	درجه II	درجه III
pH	در نظر گرفته نمیشود.	در نظر گرفته نمیشود.	۵-۸
آلودگی میکروبی بر اساس CFU/ml	≤ 10	$\leq 10^3$	در نظر گرفته نمیشود.
مقاومت الکتریکی بر حسب میلیاهم بر سانتیمتر (Mohm/cm)	۱۰ حداقل	۲ حداقل	۰/۱ حداقل
هدایت الکتریکی بر حسب میکروزیمنس بر سانتیمتر (Microsiemens/cm)	۰/۱ حداکثر	۰/۵ حداکثر	۱۰ حداکثر
مواد آلی	آب از کربن فعال عبور داده شود.	در نظر گرفته نمیشود.	در نظر گرفته نمیشود.
تعداد ذرات ریز معلق که از فیلتر با سوراخ ۰/۲۲ میکرون عبور داده میشود.	$< 500/Lit$	در نظر گرفته نمیشود.	در نظر گرفته نمیشود.

توزین پودر محیط کشت و افزودن آب

- ▶ طبق دستورالعمل تهیه محیط کشت که بر روی قوطی آن نصب گردیده است، مقدار مناسبی از پودر محیط کشت را با دقت وزن نمایید.
- ▶ قوطی محیط کشت را دور از جریان هوا و رطوبت باز کنید. از استنشاق پودرها به خصوص آنهایی که دارای مواد سمی هستند و تماس طولانی مدت آنها با پوست اجتناب کنید. پودر را به سرعت، به دقت و بدون ایجاد غبار وزن کنید. هرچه زودتر در ظرف را ببندید.
- ▶ نصف حجم آب مورد نیاز را داخل ظرف بریزید. سپس مقدار وزن شده محیط کشت را به آن اضافه نمایید. برای چند دقیقه به تندی تکان دهید.
- ▶ باقیمانده آب را به دیواره داخلی ظرف بریزید تا ذرات محیط کشت چسبیده به دیواره نیز وارد محلول شوند. این مرحله بسیار مهم است، چون پودر خشک محیط کشت در بالای سطح آب، ممکن است در اتوکلاو استریل نشود و منبع آلودگی گردد.

حل کردن محیط کشت و توزیع آن

- ▶ محیط های کشت بدون آگار، معمولاً با تکان دادن آهسته و ملایم حل خواهند شد. اما محیط های کشت حاوی آگار باید قبل از حرارت دادن به مدت چند دقیقه با آب مخلوط شوند. سپس حرارت داده شوند تا آگار قبل از اتوکلاو کردن، حل شود.
- ▶ محیط های کشت را بجوشانید بدون آنکه بسوزند.
- ▶ محیط های کشتی که نباید اتوکلاو شوند، بعد از این مقدار حرارت دادن، برای تقسیم داخل پلیت ها یا ظروف استریل دیگر آماده خواهند بود.
- ▶ توصیه می شود محیط کشت را در ظرفی مناسب با حجم 2 تا 3 برابر حجم محیط کشت بریزید تا بتوانید آن را به خوبی تکان دهید و مخلوط کنید.

استریلیزاسیون

- ▶ استریلیزاسیون محیط کشت تا حجم یک لیتر، در اتوکلاو به مدت 15 دقیقه و در دمای 121°C فشار 1 / 2 کیلوگرم بر سانتی متر مربع) انجام می گیرد.
- ▶ برای حجم های بیشتر از یک لیتر باید چرخه استریلیزاسیون را به طور مناسب تغییر داد.
- ▶ اما چون اکثر مشکلات در استریلیزاسیون محیط های کشت هنگامی رخ می دهد که مقادیر بیشتر از دو لیتر محیط کشت باید استریل شوند، لذا توصیه می شود که مقادیر زیاد محیط کشت را در حجم های کوچکتر تقسیم نمایید.
- ▶ توصیه می شود استریلیزاسیون تا حجم های 1 لیتری محیط کشت در دمای 121°C ، به مدت 15 دقیقه انجام شود.

آماده سازی جهت مصرف

- ▶ بعد از استریلیزاسیون، اجازه دهید دمای محیط کشت به حدود 50°C برسد، سپس با رعایت شرایط آسپتیک در ظروف نهایی تقسیم نمایید. هیچ وقت محیط کشت را در دمای بالاتر از 50°C تقسیم نکنید.
- ▶ مکمل های حساس به گرما و حرارت باید بعد از این که دمای محیط کشت به حدود 45°C - 50°C رسید، به آن اضافه شوند.
- ▶ دمای مکمل (سابلمنت) استریل قبل از این که به محیط کشت اضافه شود، باید به دمای اتاق برسد. سپس مکمل را با رعایت شرایط آسپتیک به محیط کشت اضافه نموده، خوب مخلوط کنید و در ظروف نهایی که از قبل استریل شده اند، تقسیم نمایید.

اندازه گیری و تنظیم pH

- ▶ مقدار pH محیط کشت یکی از خصوصیات فیزیکی مهمی است که بررسی می شود.
- ▶ pH نهایی محصول استریل شده و خنک شده تا دمای 25°C را باید روی پلیت یا ارلن با استفاده از pH متر استاندارد اندازه گیری نموده، و آنها را بعد از سنجش pH دور ریخت.
- ▶ بر اساس توصیه CLSI، اندازه گیری pH برای هر بار تهیه و ساخت محیط مولر هینتون آگار الزامی است (۷.۲ تا ۷.۴).
- ▶ در صورتی که pH محیط مولر هینتون ساخته شده با عدد مورد انتظار (درج شده بر روی قوطی محیط کشت) همخوانی نداشته باشد، در صورت عدم خطای کاری، نباید از آن محیط استفاده شود.
- ▶ در هنگام تهیه محیط های کشت تلفیقی که از افزودن چند ماده مجزا تهیه می شوند (مانند آب پیتونه قلیایی)، pH اندازه گیری و سپس تنظیم می شود ($\text{pH} \pm 0.2$ مورد نظر).
- ▶ این نوع محیط های کشت بعد از اتوکلاو کردن و خنک شدن آن تا دمای 25°C ، با استفاده از دستگاه pH متر استاندارد، اندازه گیری و سپس تنظیم می شود. استفاده از کاغذ pH نادرست می باشد.
- ▶ تنظیم pH معمولاً با استفاده از هیدروکسید سدیم 40 گرم در لیتر (تقریباً یک مولار) و یا با استفاده از اسید کلریدریک 36.5 گرم در لیتر (تقریباً یک مولار) انجام می شود.

روش های اندازه گیری pH

- ▶ pH را به یکی از روش های زیر اندازه گیری نمایید:
- ▶ روش اول: آگار یک پلیت را در ظرفی کوچک کاملاً له کرده و اجازه دهید به مدت 30 - 15 دقیقه در این حالت باقی بماند، سپس نوک الکترو د pH متر را در آن قرار دهید و pH را اندازه گیری نمایید.
- ▶ روش دوم: نوک الکترو د 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 الکترودهای سطحی استفاده نمایید.

نگهداری محیط های کشت تهیه شده

- ▶ عوامل مورد ارزیابی در این شرایط، دما، نور و رطوبت است.
- ▶ طول عمر محیط های کشت تهیه شده، به نوع اجزاء تشکیل دهنده، نحوه نگهداری و ذخیره سازی آنها بستگی دارد.
- ▶ تمامی محیط های کشت باید دور از نور نگهداری شوند. تابش نور به محیط های کشت موجب تشکیل مواد باکتریواستاتیک و باکتریوساید مانند پراکسیداز می گردد.
- ▶ طول عمر اغلب محیط های کشت پلیتی در دمای 4 درجه سانتی گراد یک هفته می باشد، ولی اگر به گونه ای مناسب بسته بندی شوند که هوا داخل آنها نفوذ نکند، تا 4 - 3 هفته قابل مصرف هستند.
- ▶ طول عمر محیط های کشت حاوی آنتی بیوتیک به پایداری آنتی بیوتیک موجود در آنها بستگی دارد. توصیه می شود محیط های حاوی آنتی بیوتیک در مدت یک هفته استفاده شوند. از سویی دیگر با گذشت زمان این گونه محیط های کشت رطوبت خود را از دست داده، به دلیل افزایش غلظت آنتی بیوتیک، قدرت انتخابی آنها افزایش می یابد.
- ▶ پلیت ها را باید قبل از مصرف به دمای اتاق رساند. اگر پلیت محیط کشت بیش از 8 ساعت در دمای اتاق باقی بماند برای مصرف مناسب نمی باشد.

نگهداری محیط های کشت تهیه شده

- ▶ **محیط های کشت لوله ای** در مقایسه با محیط های کشت پلیتی عمر طولانی تري دارند. اغلب این محیط های کشت اگر در دمای 4 درجه سانتی گراد نگهداری شوند، 6 - 3 ماه قابل مصرف می باشند.
- ▶ **موارد استثناء:**
 - ▶ تایوگلیکولات براث، اندول نیترا ت براث و SIM به مدت یک ماه قابل نگهداری می باشند.
 - ▶ محیط های CTA Medium و OF Medium حاوی کربوهیدرات و مولر هینتون براث به مدت 6 هفته قابل نگهداری می باشند.
- ▶ **محیط مولر هینتون آگار:**
 - ▶ پلیت ها را می توان همان روز استفاده کرد یا در یخچال (۲ تا ۸ درجه سانتیگراد) نگهداری نمود. پلیت ها به مدت ۷ روز پایدار می باشد.
 - ▶ در صورت رعایت احتیاط ها برای جلوگیری از خشک شدن و همچنین در صورتی که در زمان انجام آزمایش نتایج کنترل کیفیت با این محیط ها در محدوده قابل قبول باشند، می توانند نیمه عمر طولانی تر داشته باشند.

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 استرایلیزاسیون - 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 های سیاه: نیم‌سوز شدن آگار - رگه های 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 استرایلیزاسیون - 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 (Percipitation/Turbidity)	- حرارت بیش از اندازه در طی استرایلیزاسیون - 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
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 با مایه تلقیح یا مکمل‌های محیط کشت - ذخیره‌سازی طولانی مدت در دمای ۵۰°C

ارزیابی کیفیت محیط های کشت میکروبی

► هر آزمایشگاه باید از کیفیت محیط های آماده مصرف تجاری و یا محیطهای کشت دهیدراته، قبل از استفاده اطمینان حاصل نماید.

► محیط های آماده مصرف تجاری: هر سری ساخت و خرید قبل از استفاده

► محیط های کشت دهیدراته: هر سری ساخت و خرید قبل از استفاده و سپس هر ۶ ماه

► الزامات عمومی کنترل کیفیت محیط های کشت عبارتند از:

➤ (1 ثبت اطلاعات محیط های کشت

➤ (2 بررسی ظاهری

➤ (3 بررسی آلودگی

➤ (4 انجام آزمایش کنترل کیفیت

1) ثبت اطلاعات محیط های کشت

1. ► محیط های آماده مصرف تجاری:

- منبع تهیه آن (شرکت سازنده)، سری ساخت، تاریخ انقضاء، تاریخ دریافت، تاریخ شروع به استفاده
- نگهداری هر محیط مطابق دستورالعمل سازنده (معمولا در ۲-۸C)

2. ► محیط های ساخته شده از پودر دهیدراته در آزمایشگاه:

- مقدار محیط ساخته شده، منبع تهیه آن (شرکت سازنده)، سری ساخت، روش استریل نمودن آن، تاریخ ساخت، pH (در صورت لزوم)، تاریخ شروع به استفاده از آن، تاریخ انقضاء و نام فرد سازنده آن

100

فرم ثبت آماده سازی محیط کشت

[illegible]

(2) بررسی ظاهری

- ▶ شکستگی یا آسیب دیدگی پلیت ها و لوله ها
- ▶ جدا شدن آگار از جداره پلیت ها و لوله ها
- ▶ یخ زدگی یا ذوب شدن آگار
- ▶ پر شدن ناصاف پلیت ها
- ▶ مقدار ناکافی آگار در پلیت ها (برای MHA عمق کمتر از 4mm) و لوله ها (عمق و سطح ناکافی: کمتر از 3cm عمق و سطح برای LIA و TSI)
- ▶ وجود همولیز در محیط های حاوی خون
- ▶ تغییر در رنگ مورد انتظار برای هر محیط (احتمال وجود مشکل در pH محیط)
- ▶ وجود حباب یا ناهمواری در سطح محیط
- ▶ رطوبت اضافی یا از دست رفتن آب محیط
- ▶ آلودگی قابل مشاهده
- ▶ وجود رسوب

3) بررسی آلودگی

تعداد

- ▶ برای batch های ۱۰۰ تایی یا کمتر، به تعداد ۳ تا ۵ درصد نمونه
- ▶ برای batch های بیشتر از ۱۰۰ تا، ۱۰ نمونه
- ▶ انتخاب تصادفی

انکوباسیون

- ▶ به مدت ۴۸ ساعت در دمایی که استفاده خواهند شد (معمولا $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$)
- ▶ و سپس به مدت ۴۸ ساعت دیگر در دمای اتاق
- ▶ نباید شواهدی از رشد میکروبی بعد از انکوباسیون مشاهده گردد.
- ▶ بعد از کامل شدن بررسی، باید تمام نمونه های بررسی شده دور ریخته شوند.

4) انجام آزمایش کنترل کیفیت

► بررسی هر محیط کشت از نظر میزان رشد قابل قبول و/یا خصوصیت مهارکنندگی، با میکروارگانیسم های کنترل مناسب مطابق جداول

► A. محیط های کشت غیر انتخابی

► B. محیط های کشت انتخابی

► C. محیط های لوله ای

► D. محیط های بیوشیمیایی

► E. محیط های انتقالی

منابع تهیه میکروارگانیزم های کنترل

ATCC (American Type Culture Collection) یا ▶

PTCC (Persian Type Culture Collection)

▶ سویه های شناسنامه دار که طی برنامه ارزیابی خارجی کیفیت دریافت می شوند

▶ سویه های شناخته شده بیماران که دارای ثبات فنوتیپی می باشند

A. محیط های کشت غیر انتخابی

مانند بلاد آگار، نوترینت آگار، تریپتیک سوی آگار و...

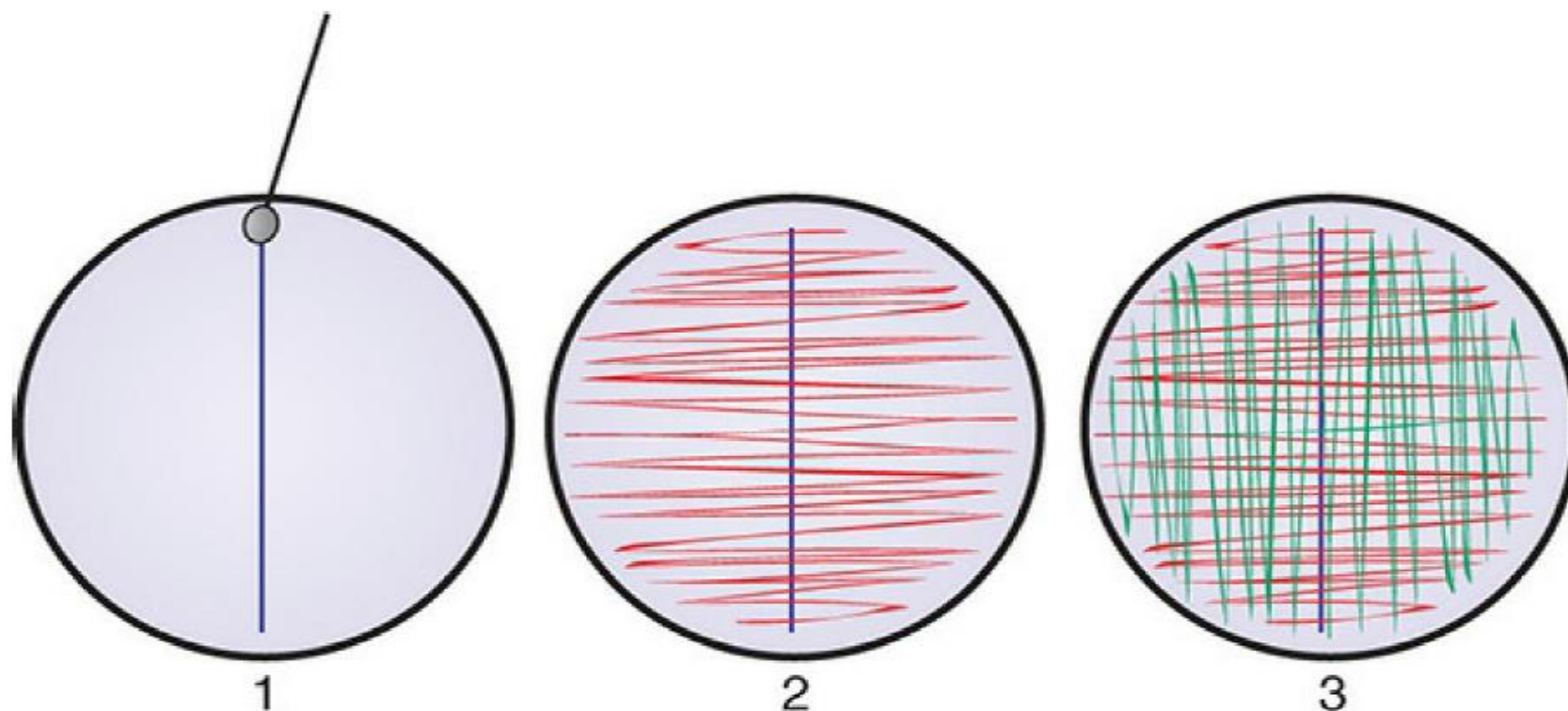
▶ روش انجام آزمایش:

- ▶ تهیه سوسپانسیون از کشت تازه (۱۸ تا ۲۴ ساعته) و خالص هر سویه کنترل در سرم فیزیولوژی استریل مطابق کدورت استاندارد نیم مک فارلند ($1 \times 10^7 - 10^8$ cfu/ml)
- ▶ رقیق سازی این سوسپانسیون در سرم فیزیولوژی استریل به نسبت 1:100
- ▶ تلقیح (0.01ml) $10 \mu\text{l}$ از رقت بدست آمده روی هر پلیت مورد آزمون، و کشت به گونه ای که کلنی های ایزوله بدست آید (مطابق شکل ۱).
- ▶ اگر با تلقیح رقت 1:100 روی پلیت کلنی های متراکم رشد کند، برای ایجاد کلنی های ایزوله از رقت 1:1000 استفاده کنید.
- ▶ انکوباسیون پلیتها مطابق شرایط ذکر شده در جدول ۱

▶ تفسیر:

- ▶ کیفیت یک محیط غیر انتخابی زمانی قابل قبول است که سویه های کنترل روی آن محیط رشد کافی داشته (10^2 تا 10^4 CFU/plate) و اندازه و مورفولوژی کلنی ها متناسب با نتایج مورد انتظار باشد.

شكل ١



1
Primary inoculation

2
Streak at right angles

3
Then, turn the
inoculating loop
90 degrees once again
to produce a matt
of growth.

B. محیط های کشت انتخابی

مانند مکانکی آگار، EMB آگار، XLD آگار و ...

▶ روش انجام آزمایش:

- ▶ تهیه سوسپانسیون از کشت تازه (۱۸ تا ۲۴ ساعته) و خالص هر سویه کنترل در سرم فیزیولوژی استریل مطابق کدورت استاندارد نیم مک فارلند ($1 \times 10^7 - 10^8$ cfu/ml)
- ▶ رقیق سازی این سوسپانسیون در سرم فیزیولوژی استریل به نسبت 1:10
- ▶ تلقیح ($10 \mu\text{l}$ (0.01ml) از رقت بدست آمده روی هر پلیت مورد آزمون، و کشت به گونه ای که کلنی های ایزوله بدست آید (مطابق شکل ۱).
- ▶ اگر با تلقیح رقت 1:10 روی پلیت کلنی های متراکم رشد کند، برای ایجاد کلنی های ایزوله از رقت 1:100 استفاده کنید.
- ▶ انکوباسیون پلیتها مطابق شرایط ذکر شده در جدول ۱

▶ تفسیر:

- ▶ کیفیت یک محیط انتخابی زمانی قابل قبول است که سویه های کنترل روی آن محیط رشد کافی داشته (10^4 تا 10^5 CFU/plate)، اندازه و مورفولوژی کلنی ها متناسب با نتایج مورد انتظار باشد، ضمن اینکه رشد بعضی از سویه ها را مهار کند.

C و D. محیط های لوله ای و بیوشیمیایی

مانند نوترینت براث، MRVP، SIM، مالدونات و ...

▶ روش انجام آزمایش:

- ▶ تهیه سوسپانسیون از کشت تازه و خالص هر سویه کنترل در سرم فیزیولوژی استریل مطابق کدورت استاندارد نیم مک فارلند (10^7 - 10^8 cfu/mL)
- ▶ تلقیح (0.01ml) $10\mu\text{l}$ سوسپانسیون در محیط لوله ای (بدون رقیق نمودن)
- ▶ انکوباسیون لوله ها مطابق شرایط ذکر شده در جدول ۱

▶ تفسیر:

- ▶ پس از انکوبا سیون، لوله ها را از نظر وجود رشد و/یا ایجاد کدورت و نیز ایجاد واکنش مناسب بیوشیمیایی بررسی نمایید.
- ▶ کیفیت محیط های بیوشیمیایی زمانی قابل قبول است که سویه های کنترل روی آن رشد کافی داشته باشند و با سویه های کنترل مثبت و کنترل منفی واکنشهای بیوشیمیایی مورد انتظار ایجاد گردد.

TSI

Urea Agar

Positive - intense pink colour on the slant
Negative - no colour change



A

B

C

A: Uninoculated Urea Agar
B: Positive (*Proteus mirabilis*)
C: Negative (*E. coli*)



A

B

C

D

E

F

A: Uninoculated TSI

B: *Salmonella* serovar Typhi K/A^{TR} (Alkaline slant / Acid Butt / Trace H₂S / No Gas)

C: *Salmonella* serovar Newport K/A_g⁺⁺⁺ (Alkaline slant / Copious H₂S / Gas)

D: *Shigella flexneri* K/A (Alkaline slant / Acid Butt / No H₂S / No Gas)

E: *E. coli* A/A (Acid slant / Acid Butt / No H₂S / Copious Gas)

F: *Pseudomonas aeruginosa* (Non-fermenter / No H₂S / No Gas)

LIA



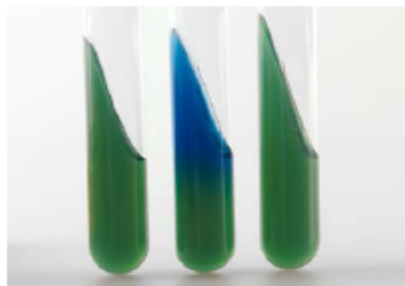
A B C D E

- A: Uninoculated LIA
 B: LDC negative / lysine deaminase negative / H₂S negative (*Citrobacter freundii*)
 C: LDC positive / lysine deaminase negative / H₂S negative (*Salmonella* ser. Typhi)
 D: LDC negative / lysine deaminase positive / H₂S negative (*Proteus mirabilis*)
 E: LDC positive / lysine deaminase negative / H₂S positive (*Salmonella* ser. Newport)

Simmons Citrate Agar

Positive - intense blue color (initially the color change may only occur on the agar slant)

Negative - agar remains green



A B C

- A: Uninoculated agar
 B: Citrate Positive (*Salmonella* serovar Newport)
 C: Citrate Negative (*E. coli*)

SIM



موارد استثناء

► برای بررسی محیط های لوله ای

SIM ►

TSI ►

KIA ►

LIA ►

CTA ►

OF ►

► فنل رد آگار

► به جاي تهیه سوسپانسیون، از روش تلقیح مستقیم هم می توان استفاده کرد.

E. محیط های انتقالی

مانند Cary blair

▶ روش انجام آزمایش:

▶ تهیه سوسپانسیون از کشت تازه و خالص هر سویه کنترل در سرم فیزیولوژی استریل مطابق کدورت استاندارد نیم مک فارلند ($1 \times 10^7 - 10^8$ cfu/ml)

▶ فرو بردن یک سواب استریل در این سوسپانسیون، با فشردن به دیواره لوله آب اضافی آن را خارج کنید. سواب را در محیط انتقالی غوطه ور نمایید.

▶ انکوباسیون محیط در دمای اتاق

▶ سپس کشت سواب روی محیط پلیتی مناسب

▶ تفسیر:

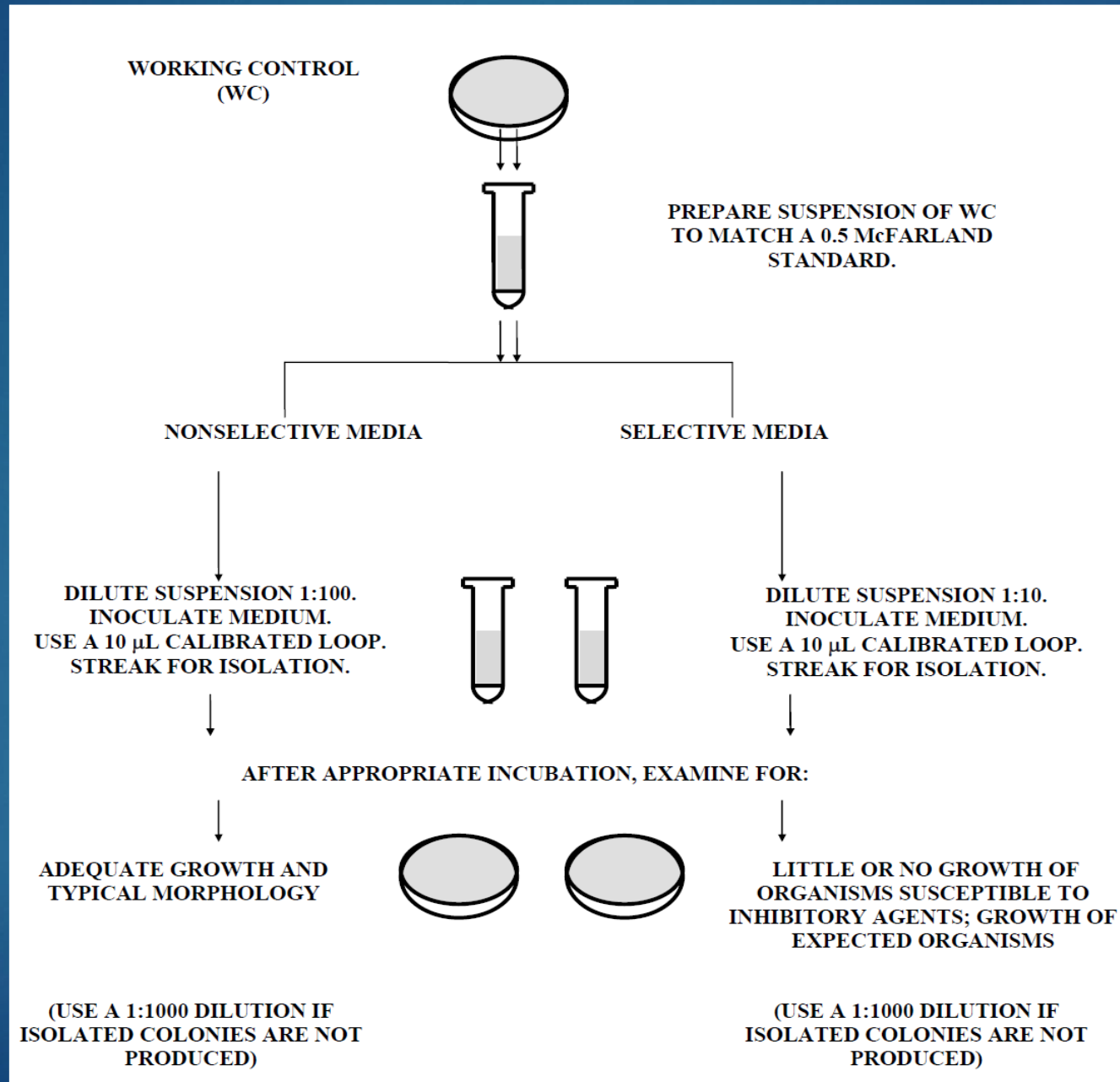
▶ وجود رشد کافی

جدول ۱ - شرایط انکوباسیون

Quality Control Organisms	Incubation Temperature	Incubation Atmosphere	Length of Incubation
Rapidly growing bacteria	35-37 °C	Ambient Air* or CO ₂ Enriched	18-24 hours
Bacteria with special growth requirements	35-37 °C	CO ₂ Enriched	24-72 hours
Anaerobes	35-37 °C	Anaerobic Gas	24-72 hours
<i>Campylobacter</i>	42 °C	Campy Gas	24-48 hours
Mycobacteria	35-37 °C	CO ₂ Enriched	7-21 days
Yeast	35-37 °C	Ambient Air	≤72 hours
Moulds	25-30 °C	Ambient Air	≤72 hours

* Atmosphere depends on medium type. Check manufacturer's recommendations.

شکل ۱ - آماده سازی سوسپانسیون برای کنترل کیفیت محیط های کشت



محیط کشت	اتمسفِر، مدت زمان و دمای انکوباسیون	ارگانیسم های کنترلی (شماره ATCC)	نتایج قابل انتظار
Alkaline peptone water (APW)	هوازی، ۱۲-۶ ساعت، ۳۵°C	<i>V. cholerae</i> non O1 <i>E. coli</i> (25922)	رشد بر روی ساب کالچر (بلاد آگار) مهار جزئی تا کامل بر روی ساب کالچر (بلاد آگار)
Anaerobic sheep blood and laked blood agar	بی هوازی، ۴۸-۲۴ ساعت، ۳۵°C	<i>C. perfringens</i> (13124)	رشد می کند، همولیز بتا
		<i>B. fragilis</i> (25285) or <i>F. nucleatum</i> (25586) or <i>P. anaerobius</i> (27337) or <i>P. melaninogenica</i> (25845)	رشد می کند رشد می کند رشد می کند رشد می کند
Anaerobic broths— thioglycolate medium را ملاحظه نمایید)			
Bile esculin agar	هوازی، ۴۸-۲۴ ساعت، ۳۵°C	<i>E. faecalis</i> (29212) <i>S. pyogenes</i> (19615)	رشد می کند، اطراف کلنی ها سیاه می شود (نصف یا بیشتر محیط سیاه می شود) مهار (جزئی تا کامل)؛ اطراف کلنی ها سیاه نمی شود
Bismuth sulfite agar	هوازی، ۴۸-۲۴ ساعت، ۳۵°C	<i>S. typhi</i> (19430) <i>S. typhimurium</i> (14028) <i>E. coli</i> (25922) <i>E. faecalis</i> (29212)	رشد، کلنی های سیاه با درخشندگی رشد، کلنی های سیاه یا خاکستری مایل به سبز، ممکن است درخشندگی داشته باشند مهار جزئی؛ کلنی های قهوه ای تا سبز مهار کامل رشد
Blood agar (BA)—nonselective sheep blood agar media	هوازی یا CO ₂ ، ۲۴-۱۸ ساعت، ۳۵°C	<i>S. pyogenes</i> (19615) <i>S. pneumoniae</i> (6305)	رشد می کند، همولیز بتا رشد می کند، همولیز آلفا
		<i>S. aureus</i> (25923) or <i>E. coli</i> (25922)	رشد می کند رشد می کند
Blood agar-CAMP test (trypticase soy agar [TSA] with sheep blood only)	هوازی، ۲۴-۱۸ ساعت، ۳۵°C	<i>S. aureus</i> (33862) or (25923) <i>S. agalactiae</i> (12386) <i>S. pyogenes</i> (19615)	رشد می کند واکنش مثبت (تشکیل نوک پیکان شفاف) واکنش منفی (عدم تشکیل نوک پیکان)
Blood agar—Selective sheep blood agar media (Columbia [CNA] agar, phenylethyl alcohol [PEA] agar)	CO ₂ ، CNA، ۴۸-۲۴ ساعت، ۳۵°C	<i>S. pyogenes</i> (19615) <i>S. pneumoniae</i> (6305) <i>S. aureus</i> (25923) <i>P. mirabilis</i> (12453)	رشد می کند، همولیز بتا رشد می کند، همولیز آلفا رشد می کند مهار می شود (به طور جزئی)
		<i>S. pyogenes</i> (19615) or <i>S. aureus</i> (25923)	رشد می کند رشد می کند
	CO ₂ ، PEA، ۴۸-۲۴ ساعت، ۳۵°C	<i>P. mirabilis</i> (12453)	مهار می شود (به طور جزئی)
Blood culture media	بی هوازی، CO ₂ ، ۵ روز، ۳۵°C	<i>B. fragilis</i> (25285)	رشد می کند
	هوازی، CO ₂ ، ۵ روز، ۳۵°C	<i>S. pneumoniae</i> (6305)	رشد می کند
Brain heart infusion agar	هوازی، ۴۸-۲۴ ساعت، ۳۵°C	<i>C. albicans</i> (10231) or <i>S. flexneri</i> (12022) or <i>S. pneumoniae</i> (6305)	رشد متوسط تا زیاد رشد متوسط تا زیاد رشد متوسط تا زیاد
<i>Campylobacter</i> agar	O ₂ کاهش یافته، غنی شده با CO ₂ ، ۴۸ ساعت، ۴۲°C	<i>C. jejuni</i> (33291) <i>E. coli</i> (25922)	رشد می کند مهار می شود (به طور جزئی)
Cary-Blair transport medium	هوازی، ۲۴-۱۸ ساعت، ۲۵°C	<i>S. typhimurium</i> (14028) <i>V. cholerae</i> non O1 <i>S. flexneri</i> (12022)	روی ساب کالچر (بلاد آگار) رشد می کند روی ساب کالچر (بلاد آگار) رشد می کند روی ساب کالچر (بلاد آگار) رشد می کند

محیط کشت	اتمسفِر، مدت زمان و دمای انکوباسیون	ارگانیسم های کنترلی (شماره ATCC)	نتایج قابل انتظار
Chocolate agar	CO ₂ ، ۴۸-۲۴ ساعت، ۳۵°C	<i>H. influenzae</i> (10211)	رشد می کند
DNase test agar	هوازی، ۲۴-۱۸ ساعت، ۳۵°C	<i>S. aureus</i> (25922) or <i>S. marcescens</i> (8100) or <i>S. pyogenes</i> (19615)	رشد خوب، ایجاد هاله رشد خوب، ایجاد هاله رشد خوب، ایجاد هاله
		<i>S. epidermidis</i> (12228) <i>K. pneumonia</i> (33495)	رشد خوب، عدم ایجاد هاله رشد متوسط تا زیاد، عدم ایجاد هاله
Enrichment broths for enterics (gram-negative [GN] broth, selenite broths)	هوازی، ۲۴-۱۸ ساعت، ۳۵°C	<i>S. typhimurium</i> (14028) or <i>S. sonnei</i> (9290)	روی ساب کالچر (مکانکی آگار) رشد می کند روی ساب کالچر (مکانکی آگار) رشد می کند (ممکن است روی محیط های دارای سلفیت مهار شود)
		<i>E. coli</i> (25922)	مهار (جزئی تا کامل) بر روی ساب کالچر (مکانکی آگار)، اما از GN broth بر روی ساب کالچر رشد می کند
Eosin methylene blue media (Levine EMB agar; EMB agar, modified)	هوازی، ۲۴-۱۸ ساعت، ۳۵°C	<i>S. typhimurium</i> (14028) <i>E. coli</i> (25922) <i>E. faecalis</i> (29212)	رشد می کند، کلنی های بی رنگ تا کهربایی رشد می کند، کلنی های آبی- سیاه با جلای سبز فلزی مهار می شود (به طور جزئی)
Gelatin medium	هوازی، ۴۸-۱۸ ساعت یا تا ۲ هفته، ۳۵°C	<i>S. marcescens</i> (8100) <i>E. coli</i> (25922)	رشد می کند، ژلاتیناز مثبت رشد می کند، ژلاتیناز منفی
Hektoen enteric (HEK) agar	هوازی، ۲۴-۱۸ ساعت، ۳۵°C	<i>S. typhimurium</i> (14028) <i>S. flexneri</i> (12022) <i>E. faecalis</i> (29212) <i>E. coli</i> (25922)	رشد می کند، کلنی های آبی تا سبز- آبی با مراکز سیاه رشد می کند، کلنی های سبز تا سبز- آبی مهار می شود (به طور جزئی)؛ کلنی های زرد مهار (جزئی تا کامل)؛ کلنی های زرد تا زرد-قرمز
Kligler iron agar (KIA)	هوازی، 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، بدون SH ₂ Alk/A، با یا بدون گاز، ایجاد SH ₂ Alk/A، بدون گاز، بدون SH ₂ Alk/Alk، بدون گاز، بدون SH ₂
Loeffler medium	هوازی، ۹۶-۲۴ ساعت، ۳۵°C	<i>C. diphtheria</i> (51696) <i>P. aeruginosa</i> (10145)	رشد متوسط تا خوب. در بررسی میکروسکوپی، دانه های متاکروماتیک و باسیل های زنجیره ای بدون اسپور، شکل چماقی متورم و برجسته دارد. رشد کلنی های قهوه ای- سبز با پروتئولیز
Lysine iron agar (LIA)	هوازی، ۲۴-۱۸ ساعت، ۳۵°C	<i>S. typhimurium</i> (14028) <i>S. flexneri</i> (12022) <i>P. mirabilis</i> (43071)	Alk/Alk، ایجاد SH ₂ ، بدون گاز Alk/A، بدون SH ₂ ، بدون گاز Red/A، بدون گاز، بدون SH ₂
MacConkey agar	هوازی، ۲۴-۱۸ ساعت، ۳۵°C	<i>E. coli</i> (25922) <i>P. mirabilis</i> (12453) <i>S. typhimurium</i> (14028) <i>E. faecalis</i> (29212)	رشد می کند، کلنی های صورتی رشد می کند، کلنی های بی رنگ، مهار جزئی سوارمینگ رشد می کند، کلنی های بی رنگ مهار می شود (به طور جزئی)
Malonate broth	هوازی، ۴۸-۲۴ ساعت، ۳۵°C	<i>E. aerogenes</i> (13048) <i>E. coli</i> (25922)	قلبیایی (آبی) بدون تغییر رنگ (سبز) یا زرد (تخمیر دکستروز)

محیط کشت	اتمِسفر، مدت زمان و دمای انکوباسیون	ارگانیسم های کنترلی (شماره ATCC)	نتایج قابل انتظار
Mannitol salt agar	هوازی، ۴۸-۲۴ ساعت، ۳۵°C	<i>S. aureus</i> (25923) or <i>S. epidermidis</i> (12228)	رشد، کلنی ها پس از ۴۸ ساعت هاله زرد دارند
		<i>P. mirabilis</i> (12453)	رشد، کلنی ها پس از ۴۸ ساعت هاله قرمز دارند
Moeller decaboxylase broth with amino acids (Arginine, Ornithine and Lysin)	بی‌هوازی، ۹۶-۲۴ ساعت، ۳۵°C	<i>K. pneumoniae</i> (13883)	مهار جزئی در ۲۴ h، مهار سوارمینگ در ۴۸ h
		<i>E. aerogenes</i> (13048)	دهیدرولاز آرژنین و دکربوکسیلاز اورنیتین، منفی (A) و دکربوکسیلاز لایزین، مثبت (Alk)
		<i>S. typhimurium</i> (14028)	دهیدرولاز آرژنین، منفی و دکربوکسیلاز اورنیتین و دکربوکسیلاز لایزین، مثبت
		<i>S. flexneri</i> (12022)	دهیدرولاز آرژنین، دکربوکسیلاز اورنیتین و دکربوکسیلاز لایزین، مثبت
MR-VP broth	هوازی، ۴۸-۲۴ ساعت، ۳۵°C	<i>E. coli</i> (25922) <i>E. aerogenes</i> (13048)	MR مثبت (قرمز) و VP منفی (بدون تغییر) MR منفی (زرد) و VP مثبت (قرمز)
Mycobacteria media (Lowenstein-Jensen agar and Middlebrook)	CO ₂ ، > ۲۱ روز، ۳۵°C	<i>M. tuberculosis H37Ra</i> (25177) or <i>M. fortuitum</i> Group IV (6841) or <i>M. kansasii</i> Group I (12478)	رشد می کند رشد می کند رشد می کند
		<i>M. scrofulaceum</i> Group II (19981) or	رشد می کند - ممکن است روی محیط های انتخالی مهار شود
		<i>M. intracellulare</i> Group III (13950)	رشد می کند - ممکن است روی محیط های انتخالی مهار شود
		<i>E. coli</i> (25922)	مهار (جزئی تا کامل روی محیط های انتخالی)
Nitrate broth	هوازی، ۴۸ ساعت، ۳۵°C	<i>E. coli</i> (25922) <i>A. baumannii</i> (19606) <i>P. aeruginosa</i> (27853)	احیاء نیترات مثبت، تولید گاز منفی احیاء نیترات منفی احیاء نیترات مثبت، تولید گاز مثبت
Nonselective mycology media	هوازی، ≥ ۷۲ ساعت، ۲۵-۳۵°C	<i>C. albicans</i> (60193 or 10231) or <i>T. mentagrophytes</i> (9533)	رشد می کند رشد می کند
Nutrient agar (NA)	هوازی، ۴۸-۲۴ ساعت، ۳۵°C	<i>P. aeruginosa</i> (10145) <i>S. flexneri</i> (12022) <i>S. aureus</i> (25923)	رشد متوسط تا زیاد، ایجاد پیگمان سبز رشد متوسط تا زیاد رشد متوسط تا زیاد، کلنی های کرم تا طلایی
Nutrient broth (NB)	هوازی، ۲۴-۱۸ ساعت، ۳۵°C	<i>E. coli</i> (25922) or <i>S. aureus</i> (25923)	رشد خوب رشد خوب
OF medium with Dextrose	هوازی، ۴۸-۲۴ ساعت، ۳۵°C	<i>A. calcoaceticus</i> (19606) or	لوله بدون روغن، A (زرد) و لوله دارای روغن Alk (سبز)
		<i>P. aeruginosa</i> (27853)	لوله بدون روغن، A و لوله دارای روغن Alk
		<i>E. aerogenes</i> (13048)	لوله بدون روغن، A (زرد) و گاز، و لوله دارای روغن A (زرد) و گاز
Phenol red agar/ broth with carbohydrates	هوازی، ۴۸-۲۴ ساعت، ۳۵°C	<i>S. flexneri</i> (12022)	لوله بدون روغن و لوله دارای روغن A (زرد)
		<i>E. coli</i> (25922)	دکستروز، لاکتوز و مانیتول AG (اسید و گاز)
		<i>E. faecalis</i> (33186)	دکستروز، لاکتوز و ساکاروز A (اسید)
		<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)	دکستروز A، مانیتول Alk (قلی) و ساکاروز AG دکستروز Alk لاکتوز و ساکاروز Alk دکستروز و مانیتول A، لاکتوز و ساکاروز Alk مانیتول AG

محیط کشت	اتم‌سفر، مدت زمان و دمای انکوباسیون	ارگانیسم های کنترلی (شماره ATCC)	نتایج قابل انتظار
Phenylalanine agar	هوازی، ۲۴-۱۸ ساعت، ۳۵°C	<i>P. mirabilis</i> (43071) <i>E. coli</i> (25922)	مثبت (ایجاد رنگ سبز) منفی (بدون تغییر رنگ)
<i>Salmonella-Shigella</i> (SS) agar	هوازی، 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، کلنی های بی رنگ با یا بدون مراکز سیاه رشد می کند، کلنی های بی رنگ مهار می شود (به طور کامل) مهار می شود (جزئی تا کامل؛ کلنی های صورتی تا قرمز با رسوب)
Selective mycology media	هوازی، ≥ ۷ روز، ۲۵°C	<i>A. niger</i> (16404) <i>E. coli</i> (25922)	مهار (جزئی تا کامل) روی محیط های حاوی سیکوهگزیماید مهار (جزئی تا کامل) روی محیط های حاوی کلرامفتیکل
		<i>C. albicans</i> (10231) or <i>T. mentagrophytes</i> (9533)	رشد می کند رشد می کند
Selective media for pathogenic <i>Neisseria</i> spp.	CO ₂ ، ۲۴-۴۸ 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 متوپریم استفاده شود مهار می شود (به طور جزئی)
Selective media for enterococci, with azide	هوازی، ۲۴-۴۸ ساعت، ۳۵°C	<i>E. faecalis</i> (29212) <i>S. pyogenes</i> (19615) <i>E. coli</i> (25922)	رشد می کند، سیاه شدن اطراف کلنی ها مهار می شود (به طور جزئی تا کامل) مهار (جزئی)- کلنی های بی رنگ روی بایل اسکولین آگار
Selective media for enterococci, without azide	هوازی، ۲۴-۴۸ ساعت، ۳۵°C	<i>E. faecalis</i> (29212) <i>S. pyogenes</i> (19615)	رشد می کند، سیاه شدن اطراف کلنی ها مهار می شود (به طور جزئی تا کامل)
SIM medium	هوازی، ۲۴-۴۸ ساعت، ۳۵°C	<i>E. coli</i> (25922) <i>S. typhimurium</i> (13311) <i>S. sonnei</i> (9290)	تولید SH ₂ منفی، اندول مثبت و حرکت مثبت تولید SH ₂ مثبت، اندول منفی و حرکت مثبت تولید SH ₂ منفی، اندول منفی و حرکت منفی
Simmons citrate agar	هوازی، ۴۸-۹۶ ساعت، ۳۵°C	<i>E. aerogenes</i> (13048) <i>E. coli</i> (25922)	رشد می کند، سطح شیب دار آبی می شود فاقد رشد تا رشد کم، بدون تغییر رنگ
Thioglycollate broth, with or without indicator	هوازی، ۴۸ ساعت (درپیچ های محکم)، ۳۵°C	<i>B. fragilis</i> (25285) or <i>S. aureus</i> (25923)	رشد می کند رشد می کند
Thioglycollate broth, enriched with vitamin K and hemin	هوازی، ۴۸ ساعت (درپیچ های محکم)، ۳۵°C	<i>P. anaerobius</i> (27337) or <i>B. vulgatus</i> (8482) or <i>C. perfringens</i> (13124)	رشد می کند رشد می کند رشد می کند
Thiosulfate citrate bile salts sucrose (TCBS) agar	هوازی، ۲۴-۱۸ ساعت، ۳۵°C	<i>V. cholerae</i> (9459) <i>V. parahaemolyticus</i> (17802) <i>E. coli</i> (25922) <i>P. aeruginosa</i> (10145) <i>E. faecalis</i> (29212)	رشد متوسط تا زیاد، کلنی های زرد رشد متوسط تا زیاد، کلنی های سبز آبی مهار جزئی یا کامل، کلنی های کوچک و شفاف مهار جزئی یا کامل، کلنی های سبز آبی مهار جزئی یا کامل، کلنی های کوچک و زرد

محیط کشت	اتمسفر، مدت زمان و دمای انکوباسیون	ارگانیسم های کنترلی (شماره ATCC)	نتایج قابل انتظار
Triple sugar iron (TSI) agar	هوازی، ۱۸-۲۴ 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، بدون SH ₂ Alk/A، با یا بدون گاز، ایجاد SH ₂ Alk/A، بدون SH ₂ ، بدون گاز Alk/Alk، بدون SH ₂ ، بدون گاز
Trypticase soy agar (TSA)	هوازی، ۲۴-۴۸ ساعت، ۳۵°C	<i>S. flexneri</i> (12022) <i>S. aureus</i> (25923) <i>E. coli</i> (25922)	رشد می کند، کلنی های متوسط تا بزرگ، سفید مایل به خاکستری و کمی محدب موکونیدی. رشد می کند، کلنی های متوسط تا بزرگ، مات، مدور، کامل با پیگمان کرم-زرد تا طلایی. رشد می کند
Tubed media (brain heart infusion and tryptic soy broth)	هوازی، ۱۸-۲۴ ساعت، ۳۵°C	<i>E. coli</i> (25922) or <i>S. aureus</i> (25923)	رشد می کند رشد می کند
Urea agar/ broth	هوازی، ۸-۴۸ ساعت، ۳۵°C	<i>P. mirabilis</i> (43071) <i>S. typhimurium</i> (13311)	اوره آز مثبت، رنگ قرمز صورتی اوره آز منفی، بدون تغییر رنگ
Xylose lysine desoxycholate (XLD) agar	هوازی، 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 می کند، کلنی های قرمز با مراکز سیاه رشد می کند، کلنی های قرمز مهار جزئی مهار می شود (جزئی تا کامل؛ کلنی های زرد تا زرد-قرمز) (قرمز)

INCUBATION		ORGANISMS (ATCC)	
TRYPTICASE SOY AGAR	O ₂ , 24 h	<i>Streptococcus pyogenes</i> (19615)	Growth, β-hemolysis
WITH 5% SHEEP BLOOD		<i>Streptococcus pneumoniae</i> (6305)	Growth, α-hemolysis
	CO ₂ , 24 h	<i>Staphylococcus aureus</i> (25923)	Growth
		<i>Escherichia coli</i> (25922)	Growth

ثبت نتایج کنترل کیفیت

Place label from one bag
of representative
media received here

Cracked plate _____

Cracked agar _____

Unequal filling _____

Hemolysis _____

Freezing _____

Bubbles/pits _____

Contamination _____

Date received Initials

Comment

Year _____

Performance

Acceptable =

References:

Acceptable =

[illegible]

^aA, acceptable; NA, not acceptable.

ثبت نتائج كنترول کیفیت

نام محیط کشت:

pH (در صورت نیاز):

شرکت سازنده	سری ساخت پودر محیط	مشخصات فیزیکی	استریل بودن	سویه کنترل کیفی	مورفولوژی کلنی	میزان رشد/واکنش	نتیجه نهایی	اقدام اصلاحی	نام فرد انجام دهنده آزمایش	تاریخ انجام آزمایش

فرم ثبت نتایج
کنترل کیفیت
محیط کشت

مراجع

1. Clinical Microbiology Procedures Handbook, fourth edition, Leber A.I., 2016
2. Clinical and Laboratory Standard Institute. Quality Control for Commercially Prepared Microbiological Culture Media- Approved Standard, Third Edition; M22–A3, Vol. 24, No. 19, June 2004
3. Biochemical tests for identification of medical bacteria, MacFaddin Jean F, 2000