1- هدف:

جداسازي انتخابي ويبريوهاي كلرا و ويبريو پاراهموليتيكوس

2- اساس آزمايش:

TCBS آگار Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar محيطی انتخابی براي جداسازي ويبريوكلرا و ويبريوپاراهموليتيكوس و نيز ديگر ويبريوها است.

- مهار باكتري هاي گرم مثبت با افزودن Oxgall (صفراي گاوي، محتوي مخلوطي از نمك هاي صفراوي و Sodium Cholate) انجام مي شود.
- تيوسولفات سديم به عنوان منبع سولفور عمل مي كند و در تركيب با سيترات فريك، توليد سولفيد هيدروژن مي كند.
- ساكاروز بعنوان كربوهيدرات قابل تخمير براي متابوليسم ويبريوها موجود است.
- pH قليائي محيط، جداسازي ويبريوكلرا را افزايش مي دهد. تيمول بلو و برم تيمول بلو به عنوان معرف هاي تغيير pH موجودند.

3- نمونه اوليه :

- سواب هاي محتوي ماده نمونه در محيط كشت انتقالي كري ـ بلر (Cary & Blair)

4- مواد و ابزار لازم :

- آب پپتونه قليايي
- محيط كشت TCBS

5- روش انجام كار:

حتي الامكان به محض دريافت نمونه، آن را كشت دهيد. نمونه هايي مثل سوابهاي مقعد، مدفوع، ماده استفراغ شده، ماهي يا غذاهاي ديگر را مي توان با سواب به طور مستقيم روي محيط تهيه شده در پليت برد. تلقيح زياد، مخصوصاً اگر نمونه ها تازه نيستند، توصيه مي شود. اگر تأخيري در رسيدن نمونه به آزمايشگاه پيش بيني مي شود، سواب هاي محتوي ماده نمونه را بايد در محيط انتقالي كري ـ بلر به آزمايشگاه منتقل نمود.

براي جداسازي ويبريوكلرا و ديگر گونه هاي ويبريو از مدفوع، آب پيتونه قليايي و TCBS به كار مي رود. يعني نمونه را ابتدا داخل آب پپتونه قليايي حاوي 1% NaCl (pH = 8/5) برده و به مدت 8-5 ساعت در دماي C ° 35 انكوبه نماييد و سپس روی محيط TCBS كشت دهيد.
اما در مواقع اورژانس و كمبود وقت توصيه می شود قبل از قرار دادن سواب در آب پپتونه قليايي, سواب را بر روی يک پليت TCBS بكشيد, پليت را كشت داده و انكوبه نماييد و سپس سواب را در آب پپتونه قليايي برده و به مدت 8-5 ساعت در دماي C ° 35 انكوبه نماييد و پس از آن ساب كالچر مجددی بر روی پليت TCBS تهيه نماييد.
پليت ها را دور از نور نگهداشته و به مدت 24-18 ساعت در دماي C °2 ±35 انكوبه نماييد. اگر بعد از 24 ساعت منفي بود براي 24 ساعت ديگر انكوبه نماييد.

- *توجه : از زمان تهيه محيط TCBS نبايد بيش از يک هفته گذشته باشد. همچنين محيطهای TCBS بايد در كيسه های فريزر در بسته در يخچال نگهداری شوند.*

نكته: براي كشت ويبريوها نبايد نمونه ها را فريز كرد.

6- برنامه كنترل كيفي (QC):

Vibrio Cholerae ATCC 9459: رشد متوسط تا زياد، كلوني های زرد
Vibrio parahaemolyticus ATCC 17802: رشد متوسط تا زياد، كلوني های آبي
Escherichia coli ATCC 25922: اگر رشد كند،كلوني ها كوچك و شفاف هستند.
Pseudomonas aeruginosa ATCC 10145: رشد به طور جزئي يا كامل مهار مي شود. اگر رشد كند، كلوني ها آبي هستند.
Streptococcus faecalis ATCC 29212: رشد به طور جزئي يا كامل مهار مي شود. اگر رشد كند، كلوني ها كوچك و زرد هستند.