

کد : W- LM16/00 صفحه 1 از 3	<h1 style="text-align: center;">راهنمای انجام آزمایش</h1> <h2 style="text-align: center;">محیط</h2> <h3 style="text-align: center;">Triple Sugar Iron Agar (TSI Agar)</h3>	 <p style="text-align: center;">آزمایشگاه مرجع سلامت</p>
---------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

۱- هدف:

تفکیک باسیل های روده ای گرم منفی (بر اساس تخمیر کربوهیدرات و تولید سولفید هیدروژن)

۲- اساس آزمایش:

در این محیط کشت، ساکاروز به دو قندی (دکستروز و لاکتوز) که در محیط کلایگر آیرون آگار (KIA) وجود دارد، اضافه می شود. افزودن ساکاروز، با تسهیل در جداسازی باسیل های تخمیر کننده ساکاروز و نیز تخمیر کننده های لاکتوز و یا دکستروز، حساسیت محیط را افزایش می دهد. تخمیر کربوهیدرات، با تغییر رنگ قابل مشاهده معرف pH یعنی فنل رد (از قرمز به زرد) نشان داده می شود. تولید سولفید هیدروژن با ایجاد رسوبی که محیط را در عمق لوله سیاه می کند و نتیجه افزودن سولفات فروس به محیط است، نشان داده می شود. برای تسهیل در جداسازی ارگانیسم هایی که فقط دکستروز را تخمیر می کنند، غلظت دکستروز یک دهم (0/1) غلظت لاکتوز یا ساکاروز است. مقدار کم اسید تولید شده در سطح شیب دار لوله در طی تخمیر دکستروز، به سرعت اکسید می شود و باعث می شود محیط به pH قلیایی (قرمز) برگردد. در مقابل، بدلیل فشار پایین تر اکسیژن در عمق، واکنش اسیدی (زرد) حفظ می شود.

توجه: به هنگام تهیه محیط کشت باید دقت نمود که طول سطح شیب دار و عمق محیط کشت در لوله، حدوداً 3 سانتی متر باشد.

۳- نمونه اولیه :

- کشت ارگانیسم بر روی یک پلیت محیط مورد استفاده برای کشت انتروباکتریاسه

۴- مواد و تجهیزات مورد نیاز:

- لوله محیط کشت TSI بصورت شیب دار

۵- روش انجام کار:

با استفاده از آنس سوزنی استریل خنک، رشد را از مرکز یک کلونی که به تازگی روی پلیت محیط مورد استفاده برای کشت انتروباکتریاسه رشد کرده است، به سطح شیب دار TSI Agar انتقال دهید و آن را با حرکت آنس در امتداد سطح شیب دار، کشت دهید و سپس عمق را با سوراخ کردن محیط، تلقیح نمایید. لوله ها را با در پوش های شل شده به مدت 18-24 ساعت در دمای $35 \pm 2^\circ \text{C}$ در اتمسفر هوازی انکوبه نمایید. واکنش های تولید شده توسط ایزوله مجهول را با ارگانیسم های کنترل، مقایسه نمایید. تخمیر کربوهیدرات با رنگ زرد محیط نشان داده می شود.

کد : W- LM16/00 صفحه 2 از 3	راهنمای انجام آزمایش	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	محیط Triple Sugar Iron Agar (TSI Agar)	

اگر محیط در عمق لوله زرد شود (اسیدی) اما در سطح شیب دار قرمز شود (قلیایی)، ارگانیسم تحت بررسی فقط دکستروز (گلوکز) را تخمیر می کند.

رنگ زرد (اسیدی) در سطح شیب دار و عمق نشان می دهد که ارگانیسم تحت بررسی، دکستروز، لاکتوز و یا ساکاروز را تخمیر می کند.

رنگ قرمز (قلیایی) در سطح شیب دار و عمق، نشان می دهد که ارگانیسم تحت بررسی، یک غیر تخمیر کننده (Nonfermenter) است.

تولید سولفید هیدروژن سبب تولید رسوب سیاه در عمق لوله می شود.

تولید گاز با شکاف و ترک خوردگی محیط نشان داده می شود.

6- برنامه کنترل کیفی (QC):

ارگانیسم	سطح شیب دار	عمق	گاز	H ₂ S
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	A	A	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	K	K	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	K	A	+	+
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	K	A	-	-

A: اسیدی (زرد) K: قلیایی (قرمز)

7- تداخلات:

- برای حفظ شرایط قلیایی سطح شیب دار باید با بستن در پیچ لوله بصورت شل، اجازه داد که تبادل آزاد هوا صورت گیرد. اگر لوله محکم بسته شود، واکنش اسیدی (ایجاد شده فقط با تخمیر دکستروز) سطح شیب دار را درگیر خواهد کرد.
- بعضی از ارگانیسم ها ممکن است تولید سولفید هیدروژن را روی KIA نشان دهند، اما روی TSI نشان ندهند، چون استفاده از ساکاروز در TSI Agar، مکانیسم آنزیمی را که در تولید H₂S اثر می گذارد مهار می کند. بویژه سالمونلای تولید کننده H₂S و بعضی از اعضاء انتروباکتریاسه نمی توانند روی TSI Agar، H₂S تولید کنند.
- سولفات فروس موجود در این محیط (به عنوان معرف H₂S) گاهی دارای حساسیت کمتری نسبت به سایر نمک های فریک می باشد. بنابراین ممکن است در ایجاد H₂S در TSI و KIA با سایر محیط های کشت مثل SIM مغایرت هایی دیده شود.

کد : W- LM16/00	راهنمای انجام آزمایش	 آزمایشگاه مرجع سلامت
صفحه 3 از 3	محیط Triple Sugar Iron Agar (TSI Agar)	

- چون عمق لوله های KIA و TSI، با تخمیر گلوکز اسیدی می شود، سیاه شدن اغلب در ته لوله وجود دارد یا به همان جا محدود می شود (بویژه با باکتریهای غیر تخمیر کننده لاکتوز) بنابراین اگر عمق سیاه است باید آن را اسیدی در نظر گرفت.