


کد: W-LM47/00 صفحه 1 از 9	<h2 style="margin: 0;">دستور العمل</h2> <h3 style="margin: 0;">تهیه انواع محیط کشت، معرفیها و رنگهای مورد استفاده در آزمایشگاه میکروب شناسی</h3>	 <p>آزمایشگاه مرجع سلامت</p>
----------------------------------	--	---

۱- هدف:

تهیه محیط های کشت استریل جهت رشد و جداسازی سویه های میکروبی از نمونه های مربوط به بیمار

۲- تعاریف و اصطلاحات:

شرایط آسپتیک: ایجاد شرایط سترون با کار کردن در کنار شعله و رعایت نکات لازم جهت جلوگیری از آلودگی نمونه

۳- شرح اقدامات:

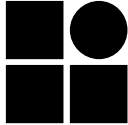
۱-۲) آب:

آب مورد استفاده باید دارای کیفیت مناسب باشد، یعنی عاری از موادی باشد که می توانند از رشد میکروارگانیسم ها جلوگیری کنند (یونهای فلزی سمی مثل مس) یا در شرایط آزمایش بر رشد آنها تاثیر بگذارند. آب خوب و تازه باید از راه تقطیر یا دیونیزاسیون تهیه شود. برای نگهداری آب مقطر باید از ظروفی استفاده شود که از مواد خنثی تهیه شده اند (شیشه خنثی، پلی اتیلن و غیره). ضریب هدایت آب باید کمتر از $15 \mu\text{s}$ باشد. pH آب معمولاً کنترل نمی شود مگر آنکه مشکلی در pH محیط های کشت تهیه شده بوجود آید. ممکن است آب دارای مقادیر زیادی میکروارگانیسم باشد، بنابراین توصیه می شود از آبی استفاده شود که تعداد میکروارگانیسم آن کم است.

۲-۳) توزین محیط کشت و افزودن آب:

طبق دستورالعمل تهیه محیط کشت که بر روی قوطی نصب گردیده است، مقدار مناسبی از پودر محیط کشت را با دقت وزن نمایید. ظرف محیط کشت را دور از کوران 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 توده ای از غبار وزن کنید. هرچه زودتر درب 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 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.

۳-۳) حل کردن محیط کشت:

کد: W-LM47/00	<h2>دستور العمل</h2>	 <p>آزمایشگاه مرجع سلامت</p>
صفحه 2 از 9	<h3>تهیه انواع محیط کشت، معرفیها و رنگهای مورد استفاده در آزمایشگاه میکروب شناسی</h3>	

محیط های کشت بدون آگار، معمولا 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 دیگر آماده خواهند بود. اکثر محیط های کشت به استریلیزاسیون نهایی (در دمای C ۱۲۱ به مدت ۱۵ دقیقه) نیاز خواهند داشت.

۳-۴) استریلیزاسیون:


بعضی از محیط های کشت به استریلیزاسیون با اتوکلاو احتیاجی نداشته و با جوشاندن استریل می شوند که دستور ساخت آنها بر روی برچسب قوطی محیط کشت قید گردیده است. استریلیزاسیون سایر محیط های کشت توسط حرارت مرطوب یا صافی غشایی انجام می گردد که این موارد نیز بر روی برچسب قوطی محیط کشت قید گردیده است.

الف) استریلیزاسیون با حرارت مرطوب:

استریلیزاسیون محیط کشت تا حجم یک لیتر، در اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای C ۱۲۱ (فشار ۱/۲ کیلوگرم بر سانتی متر مربع) انجام می گیرد. برای حجم های بیشتر از یک لیتر باید چرخه استریلیزاسیون را بطور مناسب تغییر داد. اما چون اکثر مشکلات در استریلیزاسیون محیط های کشت وقتی رخ میدهد که مقادیر بیشتر از دو لیتر محیط کشت باید استریل شود، لذا توصیه می شود که مقادیر زیاد محیط کشت را در حجم های کوچکتر تقسیم نمایید.

ب) استریلیزاسیون با صافی غشایی:

از صافی غشایی برای استریل کردن محیط های کشت و ترکیبات حساس به حرارت استفاده می شود. استریلیزاسیون بوسیله صافی غشایی تحت شرایط خلاء یا افزایش فشار انجام می پذیرد. از غشاء ها و صافیهای با قطر منفذ ۰/۲۲ یا ۰/۴۵ میکرومتر استفاده نمایید. این فیلترها باید قبل از استفاده، در اتوکلاو استریل شوند. در مورد غشاء ها و صافیهای که در بسته بندیهای استریل به فروش می رسند، به دستورالعمل سازنده مراجعه نمایید. قسمت های مختلف دستگاه صافی را با صافی یا بدون صافی در اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه در دمای C ۱۲۱ استریل نمایید.

کد: W-LM47/00 صفحه 3 از 9	<h2>دستور العمل</h2> <h3>تهیه انواع محیط کشت، معرفیها و رنگهای مورد استفاده در آزمایشگاه میکروب شناسی</h3>	 <p>آزمایشگاه مرجع سلامت</p>
----------------------------------	--	---

۳-۵) آماده سازی جهت مصرف:

بعد از استریلیزاسیون، زمانیکه دمای محیط کشت به حدود 50°C رسید، 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 50°C رسید، به آن اضافه شوند. دمای مکمل (سابلمنت) قبل از این که به محیط کشت اضافه شود، به دمای اتاق برسد. سپس مکمل را با رعایت شرایط آسپتیک به محیط کشت اضافه نموده، خوب مخلوط کنید.

۳-۶) توزیع:

سپس در ظروف نهایی که از قبل استریل شده اند، تقسیم نمایید.

۳-۷) اندازه گیری و تنظیم pH:


محیط های کشت دهیدراته اگر بطور مناسب تهیه شوند نیازی به تنظیم pH ندارند. pH نهایی محصول استریل شده را می توان روی پلیت یا بطری اندازه گیری کرد، اما باید آنها را بعد از سنجش pH دور ریخت. بنابراین بعد از استریل شدن و خنک شدن محیط کشت تا دمای 25°C ، مقدار pH را در حد مورد نظر (± 0.2) تنظیم نمایید. تنظیم pH معمولا با استفاده از هیدروکسید سدیم ۴۰ گرم در لیتر (تقریبا "یک مولار) و یا با استفاده از اسید کلریدریک ۳۶/۵ گرم در لیتر (تقریبا "یک مولار) انجام می شود.

دستورالعمل تهیه انواع محیط های کشت، معرفیها و رنگ های مصرفی در آزمایشگاه میکروب شناسی، به شرح ذیل می باشد:

روش تهیه انواع محیط های کشت دهیدراته و استریلیزاسیون آنها

روش کار بر اساس دستورالعمل موجود بر روی قوطی های حاوی انواع محیط های کشت می باشد. روش استریلیزاسیون نیز بر روی برچسب دستورالعمل تهیه محیط کشت درج گردیده است. این دستورالعمل ها بر حسب نوع محیط کشت و کارخانه تولیدکننده، متفاوت است.

محیط های کشت دهیدراته شامل:

کد: W-LM47/00 صفحه 4 از 9	<h2 style="margin: 0;">دستور العمل</h2> <h3 style="margin: 0;">تهیه انواع محیط کشت، معرفیها و رنگهای مورد استفاده در آزمایشگاه میکروب شناسی</h3>	 <p>آزمایشگاه مرجع سلامت</p>
----------------------------------	--	---

آگار بی هوازی، بلاد آگار (B.A)، برین هارت آگار و براث (BHB/BHA)، بایل اسکولین آگار، بیسموت سولفیت آگار، بروسلا مدیوم، کوکدمیت براث، کمپیلوباکتر سلکتیو آگار، کری بلر، کازو آگار و براث (TSA/TSB)، CTA مدیوم، DNase تست آگار، EMB آگار، هموفیلوس سلکتیو آگار، هکتون انتریک آگار، کلایگر آیرون آگار (KIA)، لایزین دکربوکسیلاز سولفیدراز مدیوم (LDS)، لوون اشتاین جنسن مدیوم، لوفلر بلاد سرم، لایزین آیرون آگار، مولر هینتون آگار و براث (MHA/MHB)، MRVP براث، مانیتول سالت آگار، مک کانکی آگار، مالونات براث، نوترینت آگار و براث (N.A/N.B)، نیترات براث، اورنی تین دکربوکسیلاز آرژینین دهیدرولاز تست براث، OF بازال مدیوم، پپتون واتر، فنیل آلانین آگار، فنل رد براث و آگار، پپتون آگار، سیمون سیترات آگار، SIM مدیوم، سالمونلا شیگلا آگار (S.S)، سلنیت براث، تریپل شوگر آیرون آگار (TSI)، TCBS آگار، تایو گلیکولات براث، اوره آگار و براث، XLD آگار و سایر محیط های کشت دهیدراته که در دفتر راهنمای محیط های کشت ثبت شده اند می باشد.

روش تهیه محیط کشت ژلاتین (ترکیبی)

پیتون = ۵ g

۳ g = Beef Extract

ژلاتین = ۱۲۰ g

مقادیر فوق را به ۱۰۰۰cc آب مقطر اضافه کرده و در بن ماری جوش قرار دهید تا کاملاً حل شوند (از حرارت دادن این محیط کشت بر روی شعله پرهیز کنید). سپس در اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه و دمای ۱۲۱°C در فشار ۱۵ پوند (۱۵ Lb) استریل نمایید. سپس در لوله تقسیم کرده و PH محیط کشت را به ۶/۸ برسانید


روش تهیه محیط کشت آب پپتونه قلیایی یا APW (ترکیبی)

پیتون = ۱۰g

۱۰g = (NaCl) کلرور سدیم

آبمقطر = ۱۰۰۰cc

سپس pH را به ۹-۸/۶ برسانید و در شرایط ۱۵ دقیقه، فشار ۱۵ Lb در اتوکلاو قرار داده و استریل نمایید. دما

کد: W-LM47/00 صفحه 5 از 9	<h2 style="margin: 0;">دستور العمل</h2> <h3 style="margin: 0;">تهیه انواع محیط کشت، معرفیها و رنگهای مورد استفاده در آزمایشگاه میکروب شناسی</h3>	 <p>آزمایشگاه مرجع سلامت</p>
----------------------------------	--	---

نیز 121°C است. (برای تنظیم از سود N ۱ استفاده کنید)

روش تهیه محیط کشت حاوی گلیسرین جهت دیپ فریز
 از محیط کشت پایه: محیط TSB (Trypticase Soy Broth) یا محیط BHB کشت (Brain Heart Infusion Broth) استفاده کنید. به میزان ۱۵٪ گلیسرین به محیط پایه اضافه نمایید. به خوبی تکان دهید تا محلول یکنواختی حاصل شود. سپس در مقادیر کم (۲-۱ ml) در لوله های درپیچ دار تقسیم نموده و در شرایط 121°C ، ۱۵ دقیقه و فشار ۱۵ Lb اتوکلاو نمایید.

روش تهیه محیط کشت مصرفی در لیوفیلیزاسیون (ترکیبی)


ژلاتین = ۱۰۰g
 اینوزیتول = ۵۰g
 نوترینت براث = ۲۵g
 مقادیر فوق را به ۱۰۰۰cc آبمقطر اضافه کرده و در بن ماری جوش حرارت دهید تا کاملاً حل شوند (از قرار دادن در حرارت مستقیم شعله خودداری شود). در لوله تقسیم کرده و در شرایط فشار ۱۵ Lb، دمای 121°C و مدت زمان ۱۵ دقیقه استریل نمایید.

روش تهیه محیط کشت NaCl ۶/۵٪ (براث / آگار)

محیط پایه همان محیط برین هارت اینفیوژن براث/آگار است. از آنجا که این محیط کشت حاوی ۵/۰٪ نمک می باشد، بنابراین ۶٪ نمک به این محیط پایه اضافه نمایید تا مقدار ۶/۵٪ نمک حاصل شود. شرایط استریلیزاسیون همان دمای 121°C ، فشار ۱۵ Lb و زمان ۱۵ دقیقه می باشد.

روش تهیه انواع قندها:

محلول ۱۰٪ از انواع قندها تهیه نمایید (قند = ۱۰g و آبمقطر = ۱۰۰cc)
 روش استریلیزاسیون قندها استفاده از فیلتراسیون می باشد. در غیر اینصورت می توان همه انواع قندها را در فشار ۵ Lb به مدت ۵ دقیقه استریل نمود.
 اگر بخواهید قندها را از هم تفکیک نمایید، شرایط استریلیزاسیون برای انواع لاکتوز، مالتوز، گزیلوز، سالیسین، سوکروز، ترهالوز و آرابینوز شامل فشار ۱۵ Lb، دمای 121°C به مدت ۳ دقیقه و شرایط استریلیزاسیون

کد: W-LM47/00 صفحه 6 از 9	<h2>دستور العمل</h2> <h3>تهیه انواع محیط کشت، معرفیها و رنگهای مورد استفاده در آزمایشگاه میکروب شناسی</h3>	 <p>آزمایشگاه مرجع سلامت</p>
----------------------------------	--	---

برای سایر قندها شامل فشار ۱۰-۱۲ Lb، دمای ۱۱۶-۱۱۸ °C و زمان ۱۵ دقیقه می باشد.

روش تهیه انواع معرف ها و رنگ ها

روش تهیه معرف های VP

- تهیه آلفا نفتول (معرف A):
 پودر آلفا نفتول: ۵ g
 اتانول: ۱۰۰cc

-تهیه KOH (پتاس) (معرف B):
 KOH: ۴۰g

کراتین (cr): ۰/۳ g
 آبمقطر: ۱۰۰cc

معرف ها در ظروف تیره و در یخچال نگهداری می شوند. چون دارای پایداری متغیر هستند لازم است به طور هفتگی (بر حسب میزان کار) کنترل کیفی گردند.

روش تهیه معرف متیل رد (MR)

پودر متیل رد = ۰/۱ g
 اتانول = ۳۰۰cc

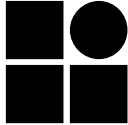
پودر متیل رد را در اتانول حل کرده سپس با آب مقطر حجم آنرا به ۵۰۰cc برسانید. معرف در ظرف تیره و در یخچال نگهداری می شود. چون دارای پایداری متغیر است، لازم است بطور هفتگی (بر حسب میزان کار) کنترل کیفی گردد.

روش تهیه معرف کواکس

P-دی متیل آمینو بنز آلدئید = ۱۰g
 آمیل الکل: ۱۵۰cc
 اسید کلریدریک غلیظ و تازه: ۵۰cc

دی متیل آمینو بنز آلدئید را به آمیل الکل اضافه نموده و به آرامی اسید کلریدریک را به آنها اضافه نمایید. برای تهیه این معرف از هود استفاده نمایید. معرف در ظروف تیره و در یخچال نگهداری می شود. چون دارای پایداری متغیر است، لازم است بطور هفتگی (بر حسب میزان کار) کنترل کیفی گردد.

روش تهیه معرف کلرور فریک

کد: W-LM47/00	<h2>دستور العمل</h2>	 <p>آزمایشگاه مرجع سلامت</p>
صفحه 7 از 9	<h3>تهیه انواع محیط کشت، معرفها و رنگهای مورد استفاده در آزمایشگاه میکروب شناسی</h3>	

کلرور فریک = ۱۰g
 آب مقطر = ۱۰۰cc (روش غیر اسیدی)
 (روش دیگر تهیه این معرف شامل کلرور فریک: ۱۲g، اسید کلریدریک غلیظ: ۲/۵cc و آب مقطر ۱۰۰cc می باشد، که این روش، روش اسیدی است). معرف در ظروف تیره و در یخچال نگهداری می شود. چون دارای پایداری متغیر است، لازم است بطور هفتگی (برحسب میزان کار) کنترل کیفی گردد.

روش تهیه معرف های احیاء نیترات

-تهیه معرف A:

N، N دي متیل آلفا نفتیل آمین: ۶g
 اسیداستیک گلاسیال ۵N، (۳۰٪): ۱۰۰۰cc
 مقدار فوق از N، N دي متیل آلفا نفتیل آمین را در کمتر از ۱۰۰۰cc اسید استیک گلاسیال ۵N حل کرده و کمی حرارت ملایم دهید تا حل شود. حجم را به یک لیتر رسانیده، محلول را از صافی رد کنید.

-تهیه معرف B:

سولفانلیک اسید (P- آمینو بنزن سولفونیک اسید): ۸g
 اسیداستیک گلاسیال ۵N، (۳۰٪): ۱۰۰۰ cc
 مقدار فوق از سولفانلیک اسید را در کمتر از ۱۰۰۰ cc اسیداستیک حل کرده و سپس حجم را به یک لیتر برسانید. معرف ها در ظروف تیره و در یخچال نگهداری می شوند. آلفا نفتیل آمین سرطان زا است.

روش تهیه معرف نین هیدرین

پودر نین هیدرین = ۳/۵ g

استن = ۵۰ cc


بوتانول = ۵۰ cc

استن و بوتانول را مخلوط کرده و سپس پودر نین هیدرین را اضافه نمایید. معرف در ظرف تیره و در دمای اتاق نگهداری می شود. درب آن باید کاملاً محکم بسته شود.

روش تهیه ویتامین K₁

پودر ویتامین k₁ = ۰/۲ g

اتانول = ۲۰cc

کد: W-LM47/00	دستور العمل	 آزمایشگاه مرجع سلامت
صفحه 8 از 9	تهیه انواع محیط کشت، معرفیها و رنگهای مورد استفاده در آزمایشگاه میکروب شناسی	

محلول در ظرف تیره و در یخچال نگهداری می‌شود. درب ظرف باید کاملاً محکم بسته شود. غلظت نهایی محلول $0/1 \mu\text{g/ml}$ برای محیط های مایع و $10 \mu\text{g/ml}$ برای محیط های آگار دار است. $0/2 \text{g}$ پودر ویتامین K_1 را روی یک قطعه کوچک فویل آلومینیومی استریل وزن کرده و در شرایط آسپتیک به 20ml اتانول در یک بطری استریل اضافه کنید. برای رقیق سازی بیشتر از آب مقطر استریل استفاده کنید. محلول ذخیره 10mg/ml است. 1ml از محلول ذخیره را به یک لیتر آگار و $0/01 \text{ ml/l}$ برات اضافه کنید. محلول را دور از نور و در یخچال ذخیره کنید.

روش تهیه همین (Haemine)

پودر همین = $0/5 \text{ g}$

سود $10 \text{ cc} = 1 \text{N (NaOH)}$

مقدار فوق از پودر همین را به 10 cc سود 1 N نرمال اضافه کرده و حل کنید، سپس با آب مقطر به حجم 100 cc برسانید. در شرایط 15 دقیقه، 121°C ، فشار 15 Lb در اتوکلاو استریل نمایید.

محلول در ظرف تیره و در یخچال نگهداری می‌شود. این محلول ذخیره 5 mg/ml غلظت دارد، وی هنگام مصرف به عنوان ساپلمنت، باید دارای غلظت نهایی $5 \mu\text{g/ml}$ باشد.

روش تهیه آب اکسیژنه (H_2O_2) ۳٪

محلول آب اکسیژنه ۳۰٪ را به نسبت ۱:۱۰ با آب مقطر رقیق نمایید. (یعنی 1 cc آب اکسیژنه ۳۰٪ را به 9 cc آب مقطر اضافه نمایید). محلول در ظرف تیره و در یخچال نگهداری می‌شود.

روش تهیه کریستال ویوله ذخیره و اگزالات آمونیوم ذخیره

-تهیه کریستال ویوله

پودر کریستال ویوله = 20 g


اتانول = 100 cc

-تهیه اگزالات آمونیوم

پودر اگزالات آمونیوم = 1 g

آب مقطر = 100 cc

هنگام مصرف، محلول کریستال ویوله ذخیره را به نسبت ۱:۱۰ با آب مقطر رقیق نمایید. (1 cc از محلول کریستال ویوله و 9 cc آب مقطر) سپس این

کد: W-LM47/00 صفحه 9 از 9	<h2>دستور العمل</h2> <h3>تهیه انواع محیط کشت، معرفیها و رنگهای مورد استفاده در آزمایشگاه میکروب شناسی</h3>	 <p>آزمایشگاه مرجع سلامت</p>
----------------------------------	--	---

محلول را با چهار حجم از محلول اگزالات آمونیم رقیق کنید (۱CC محلول کریستال ویوله رقیق شده و ۴CC اگزالات آمونیم). محلول ذخیره و مصرفی کریستال ویوله، در ظرف تیره و در دمای اتاق نگهداری می‌شود.

روش تهیه لوگل

۱g = ید

۲g = یدور پتاسیم

آب مقطر = ۲۴۰CC

محلول آبی بیکربنات سدیم ۵% = ۶۰CC

در مقدار کمی از آب مقطر، ید و یدور پتاسیم را کاملاً حل نمایید، بعد حجم را با آب مقطر به ۲۴۰CC برسانید. محلول ۵% بیکربنات سدیم (بیکربنات سدیم: ۵g آب مقطر: ۱۰۰C) را نیز به آن اضافه نمایید. محلول در دمای اتاق نگهداری می‌شود. درب آنرا باید کاملاً محکم ببندید.

روش تهیه محلول الکل-استون

اتانول = ۲۵۰CC

استون = ۲۵۰CC

حجم مساوی از الکل اتیلیک (اتانول) را با استون مخلوط نمایید.

روش تهیه فوشین/ یا سافرانین ذخیره

پودر فوشین = ۲g

اتانول = ۱۰۰CC

و یا

پودر سافرانین = ۲/۵g

اتانول = ۱۰۰CC

به هنگام مصرف، محلول ذخیره فوشین یا محلول ذخیره سافرانین را به نسبت ۱:۱۰ با آب مقطر رقیق نمایید. محلولها در ظروف تیره، تهیه و در دمای اتاق ذخیره می‌شوند.