

کنترل کیفی محیط های کشت میکروپ شناسی

بر اساس چک لیست ارزیابی بخش باکتری شناسی (ویرایش سوم)

ارائه دهنده:

دکتر سودابه رستمی

عضو هیات علمی مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری

دکترای تخصصی باکتری شناسی پزشکی

انتخاب انواع محیط کشت و شرکت های تولید کننده

- انتخاب نوع محیط های کشت مورد نیاز بر اساس ستینگ آزمایشگاه
- محیط های پایه، مغذی، انتخابی و محیط های کشت برای شرایط اپیدمی
- خرید محیط کشت های آماده مصرف
- ساخت محیط کشت توسط آزمایشگاه
- مشخصات محیط کشت

نام محصول، نام شرکت تولید کننده پودر محیط کشت و یا محیط کشت آماده، سری ساخت، تاریخ انقضاء در هر سری ساخت

تاریخ شروع استفاده و یا ساخت محیط کشت در آزمایشگاه

INGREDIENTS

Final pH at 25°C: 7,1±0,2

Formula in grams per liter of distilled water

Bacteriological agar: 13.5 Bile salts: 1.5 Crystal violet: 0.001 Gelatin pancreatic digest: 17 Neutral red: 0.03 Peptone mixture: 3 Sodium chloride: 5 Lactose monohydrate: 10

PREPARATION

Suspend 50 grams of the medium in one liter of distilled water. Mix well and dissolve by heating with frequent agitation. Boil for one minute until complete dissolution. Sterilize in autoclave at 121 °C for 15 minutes. Cool to 47 °C, mix well and dispense into plates. Allow the plates to solidify and place them upside down to avoid excessive moisture on the surface of the medium.

Substances that contributed to the classification: Bile, extract (8008-63-7)

Sustancias que contribuyen a la clasificación: Bilis, extracto (8008-63-7)



2 °C

25 °C



HAZARD AND PRECAUTIONARY STATEMENTS

H317: May cause an allergic skin reaction.

P101: If medical advice is needed, have product container or label at hand P102: Keep out of reach of children P261: Avoid breathing dust/fume/gas/mist/vapours/spray P280: Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection P302+P352: IF ON SKIN: Wash with plenty of water P501: Dispose of the contents/containers in accordance with the current legislation on waste treatment

Indicaciones de peligro y consejos de prudencia

H317: Puede provocar una reacción alérgica en la piel

P101: Si se necesita consejo médico, tener a mano el envase o la etiqueta P102: Mantener fuera del alcance de los niños P261: Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección P302+P352: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante agua P501: Eliminar el contenido/el recipiente conforme a la legislación vigente de tratamiento de residuos



Condalab

Laboratorios Conda S.A.
C/ Forja, 9. Torrejón de Ardoz 28850 Madrid, Spain
T. +34 91 761 02 00

MacConkey Agar EP/USP/ISO

For the isolation and identification of Enterobacteriaceae from feces, urine wastewater and foods.



BATCH NUMBER: 102111

CAT. 1052.00

NEXT RETEST: 2024/02

500 g

Inspired by knowledge | www.condalab.com

خرید، ذخیره سازی، و مدیریت انبار

- تاییدیه کتبی از وزارت بهداشت

سازمان غذا و داروی وزارت بهداشت، اداره کل تجهیزات پزشکی imed.ir

- **ذخایر محیط کشت** را بر اساس یک سیستم منطقی و به ترتیب تاریخ خرید یا ورود به آزمایشگاه مرتب کنید. همچنین قوطی های باز شده را از بقیه محصولات باز نشده جدا کنید.

- تاریخ باز کردن بسته را حتما روی قوطی بنویسید و بیشتر از ۶ ماه محصولات باز شده را نگهداری نکنید.

- محصولات را زمانی که تاریخ مصرف آنها منقضی شده است، یا هنگامی که پودر جمع شده، تغییر رنگ داده، یا در صورت مشکلات کیفیت، دور بریزید. جزئیات محصول و دلایل دور ریختن را ثبت کنید.

آماده سازی محیط های کشت



محاسبه و توزین



- ترازو
- وسایل حفاظت شخصی
- محاسبه: جدول اوزان و حجم تعریف شده برای تعداد ثابت پلیت و یا لوله
- نام محصول، مقدار محیط ساخته شده، نام شرکت سازنده، شماره ساخت، روش استریل نمودن، تاریخ ساخت در آزمایشگاه، تاریخ شروع به استفاده، تاریخ انقضاء و نام فرد سازنده

مخلوط کردن با آب و حرارت دادن



کیفیت آب مصرفی

• خلوص آب:

آب تصفیه شده (آب مقطر، غیر معدنی، دیونیزه یا تولید شده توسط اسمز معکوس، یا با کیفیت معادل، عاری از موادی که احتمالاً رشد میکروارگانیسم ها را تحت شرایط آزمایش مهار کرده یا بر آن تأثیر می گذارد مانند: **کلر، آمونیاک و یون های فلزی همچون مس**)

• ذخیره و نگهداری:

ظروف درب دار از جنس مواد خنثی (شیشه، پلی اتیلن و غیره) که عاری از هرگونه مواد بازدارنده باشد، (بهتر است که آب به محض تولید استفاده شود).

• آلودگی میکروبی:

نباید بیشتر از **1000 CFU/ml** باشد و ترجیحاً کمتر از 100CFU/ml

• pH: ۵-۸

• هدایت الکتریکی:

رسانایی نباید بیشتر از $25 \mu\text{S/cm}$ (معادل مقاومت $\geq 0.04 \text{ M}\Omega \text{ cm}$)، ترجیحاً زیر ۵ $\mu\text{S/cm}$ در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد باشد. رسانایی باید قبل از استفاده بررسی شود.

حل کردن پودر در آب

- آب گرم ۵۰ تا ۶۰ درجه
- استفاده از مگنت و استیرر
- اضافه کردن نیمی از آب و سپس پودر
- باقی ماندن پودر به دیواره منجر به آلودگی می گردد



استریلیزاسیون

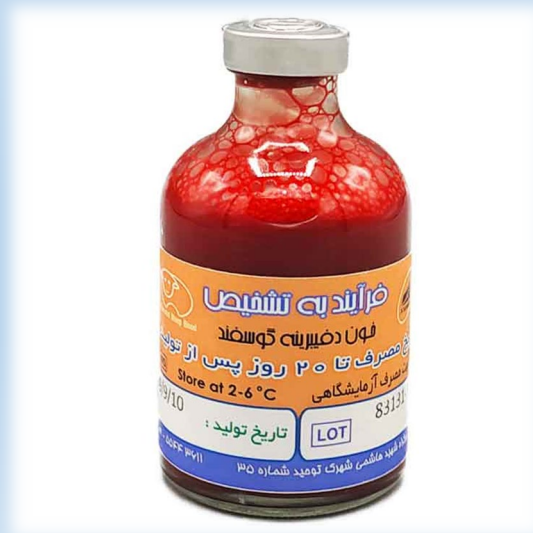
- برخی محیط های کشت نیاز به استریل کردن ندارند مانند SS agar و Cary Blair agar
- استریلیزاسیون مرطوب
- استریلیزاسیون با صافی غشائی (فیلتراسیون)
- کنترل کیفی اتوکلاو
- کلاس ۵ یا ۶ اندیکاتور شیمیایی TST (هر ران کاری)
- اندیکاتور بیولوژیکی (هفتگی)



- ۱۲۱ درجه سانتیگراد فشار ۱/۲ کلیوگرم بر سانتی متر مربع
- مدت زمان: به مقدار مایع بستگی دارد:
 - برای لوله ها و بطری های کوچک حاوی حدود ۱۰ میلی لیتر محیط: ۱۵ دقیقه
 - ارلن های حاوی ۵۰۰ میلی لیتر: ۲۰ دقیقه
 - ارلن های حاوی ۱۰۰۰ میلی لیتر ۲۵ دقیقه
 - ارلن های حاوی ۲۰۰۰ میلی لیتر ۳۰ دقیقه

اضافه کردن مکمل

- خون، ویتامین ها، مواد مغذی، آنتی بیوتیکها و فاکتورهای رشد هم دمای محیط
دمای مناسب محیط کشت برای اضافه کردن مکمل: ۴۵-۵۰ درجه سانتیگراد
اضافه کردن در شرایط آسپتیک
- **خون گوسفندی** (غلظت، همگنی، ویسکوزیته، رنگ و بررسی از نظر آلودگی میکروبی)



تنظیم pH محیط

- pH محیط کشت: بعد از استریل شدن و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد
- محیط کشت های ترکیبی: قبل و بعد از استریل کردن تنظیم لازم دارند
- تنظیم pH با استفاده از : هیدروکسید سدیم (NaOH) یک مولار و اسید کلریدریک (HCl) یک مولار



توزیع، بسته بندی و نگهداری محیط های کشت

- دمای مناسب برای توزیع محیط کشت در پلیت ۴۵ تا ۵۰ درجه سانتیگراد است.
- توزیع محیط کشت در اتاقی که جریان هوا ندارد باید صورت گیرد.
- قطر محیط کشت برای بررسی حساسیت آنتی بیوتیکی: 4 ± 0.5 mm
- نباید در درب پلیت بخار آب جمع شود (احتمال آلودگی)
- ۱۰ عدد پلیت در هر بسته
- نگهداری محیط ها در دمای مناسب و دور از نور (نور: امکان ایجاد پراکسیداز)
 - بلاد آگار: ۲-۵ روز
 - محیط های کشت لوله ای: ۳-۶ ماه
 - محیط های انتخابی: ۵-۷ روز
 - نوترین آگار بدون خون: ۲-۴ هفته
 - محیط حاوی آنتی بیوتیک: ۷ روز
 - استثناء: تایوگلیکولات، اندول نیترات، SIM، OF & CTA
 - حاوی کربوهیدرات (۴ و ۶ هفته)

مشکلات

مشکلات	علل ممکن
رنگ غیر طبیعی / تیرگی	آب ناخالص، ظروف شیشه ای کثیف، افت کیفیت محیط دهیدراته حرارت زیاد یا نادرست در طی استریلیزاسیون، pH اشتباه حل نشدن کامل محیط کشت، ماندن طولانی مدت محیط در ۵۰ درجه
وجود لخته در محیط کشت و یا منعقد شدن آن	حرارت زیاد محیط کشت هنگام اضافه کردن ساپلمنت
رگه رگه شدن محیط کشت	رگه های سیاه: نیم سوز شدن آگار رگه های روشن: سرد شدن تقریبی آگار در هنگام افزودن ساپلمنت
pH نادرست	آب ناخالص یا بی کیفیت یا ظروف شیشه ای کثیف، حرارت زیاد در طی استریلیزاسیون ذوب مجدد یا ماندن طولانی مدت در دمای ۵۰ درجه، آلودگی شیمیائی، کالیبراسیون نادرست pH، اندازه گیری pH در دمای بالای ۲۵ درجه، افت کیفیت محیط کشت دهیدراته

ادامه مشکلات

مشکلات	علل ممکن
سمیت	حرارت بیش از اندازه در طی استریلیزاسیون، افت کیفیت محیط کشت دهیدراته، قرارگیری در معرض نور مستقیم خورشید، حجم اشتباه مکمل اضافه شده
ایجاد رسوب یا کدورت	حرارت بیش از اندازه در طی استریلیزاسیون، ماندن در دمای ۵۰ درجه، pH اشتباه، حل نشدن کامل محیط کشت، آب ناخالص یا ظروف شیشه ای کثیف، داغ بودن محیط هنگام اضافه کردن مکمل، کیفیت پایین آب یا ظروف
شل بودن آگار	حرارت بیش از اندازه، هیدرولیز اسید در محیط کشت با pH پائین، توزین یا مخلوط کردن اشتباه، حل نشدن کامل آگار، حجم نادرست آب، رقیق سازی زیاد با مکمل، ماندن در دمای ۵۰ درجه
رشد ضعیف باکتری یا اثر روی خواص انتخابی/افتراقی	توزین یا مخلوط کردن نادرست، مواد مهار کننده در آب یا ظروف، نگهداری نادرست محیط کشت و سایر عوامل ذکر شده در سایر مشکلات

ارزیابی کیفیت محیط های کشت



- ثبت اطلاعات محیط های کشت

- بررسی ظاهری محیط های کشت

- بررسی وجود آلودگی

- مقادیر ۱۰۰ لوله یا پلیت یا کمتر : ۳-۵ درصد

- مقادیر بیشتر از ۱۰۰ لوله یا پلیت: ۱۰ درصد

به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۷-۳۵ درجه و به مدت ۴۸ ساعت در دمای محیط

انجام کنترل کیفیت

از نظر میزان رشد قابل قبول و یا خاصیت مهار کنندگی

- منابع تهیه میکروارگانیسم ها:
- سویه های دارای ATCC یا PTCC
- سویه های شناسنامه دار که طی برنامه ارزیابی خارجی دریافت می شوند.
- سویه های شناخته شده بیماران که دارای ثبات فنوتیپی باشند.
- تهیه سوسپانسیون میکروبی از سویه استاندارد: معادل نیم مک فارلند

بررسی عملکرد محیط کشت

رقیق سازی

بررسی ویژگی های رشد محیط های کشت غیر انتخابی پلیتی (بلاد آگار، نوترینت آگار و...)

رقت ۱:۱۰۰ در سرم فیزیولوژی از سوسپانسیون نیم مک فارلند (گاهی ۱:۱۰۰۰)

۱۰ میکرولیتر به محیط کشت تلقیح شود.

1000-10000 CFU/Plate

رشد کافی، سائز و مورفولوژی مورد انتظار کلنی

رقیق سازی

بررسی ویژگی های رشد و مهار کنندگی محیط های کشت انتخابی پلیتی (مکانکی آگار، EMB آگار و...)

رقت ۱:۱۰ در سرم فیزیولوژی از سوسپانسیون نیم مک فارلند (گاهی ۱:۱۰۰)

۱۰ میکرولیتر به محیط کشت تلقیح شود.

10000-100000 CFU/Plate

رشد کافی، سایز و مورفولوژی مورد انتظار کلنی و مهار رشد ارگانیزم های خاص

ایجاد واکنش های خاص یا همولیز

رقیق سازی

بررسی محیط های کشت لوله ای

رقت سازی ندارد (سوسپانسون نیم مک فارلند به صورت مستقیم)

استثنا: SIM, TSI, KIA, LIA, CTA, OF, Phenol Red

۱۰ میکرولیتر به محیط کشت تلقیح شود.

وجود رشد و یا ایجاد کدورت و یا ایجاد واکنش مناسب بیوشیمیائی

زمان انکوباسیون

مدت انکوباسیون	اتمسفر انکوباسیون	دمای انکوباسیون	سویه های کنترل کیفی
۱۸-۲۴ ساعت	عادی یا غنی شده با CO2	35-37°C	باکتری های دارای رشد سریع
۲۴-۷۲ ساعت	غنی شده با CO2	35-37°C	باکتری های دارای نیازهای خاص برای رشد
۲۴-۷۲ ساعت	شرایط بی هوازی	35-37°C	بی هوازی
۲۴-۴۸ ساعت	گازپک Campy	42°C	کمپیلوباکتر
۷-۲۱ روز	غنی شده با CO2	35-37°C	مایکوباکتریوم ها
۷۲≥ ساعت	عادی	35-37°C	مخمرها
۷۲≥ ساعت	عادی	25-30°C	کپک ها

لطفا جدول شماره ۳

دستورالعمل آماده سازی، تهیه و کنترل کیفیت محیط های
کشت

را مطالعه فرمائید



با تشکر از حسن توجه شما