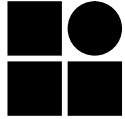


| | | |
|-------------|---|---|
| صفحه 1 از 6 | دستورالعمل |  آزمایشگاه مرجع سلامت |
| | تهیه انواع محیط کشت، معرفیها و رنگهای مورد استفاده در آزمایشگاه میکروب شناسی | |

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:

آگار بی هوازی، بلاد آگار (B.A)، برین هارت آگار و برات (BHB/BHA)، بایل اسکولین آگار، بیسموت سولفیت آگار، بروسلا مدیوم، کوکدمیت برات، کمپیلوباکتر سلکتیو آگار، کری بلر، کازو آگار و برات (TSA/TSB)، CTA مدیوم، DNase تست آگار، EMB آگار، هموفیلوس سلکتیو آگار، هکتون انتریک آگار، کلايگلر آبرون آگار (KIA)، لایزین دکربوکسیلاز سولفیدراز مدیوم (LDS)، لوون اشتاین جنسن مدیوم، لوفلر بلاد سرم، لایزین آبرون آگار، مولر هینتون آگار و برات (MHA/MHB)، MRVP برات، مانیتول سالت آگار، مک کانکی آگار، مالونات برات، نوترینت آگار و برات (N.A/N.B)، نیترات برات، اورنی تین دکربوکسیلاز آرژینین دهیدرولاز تست برات، OF بازال مدیوم، پیتون واتر، فنیل آلانین آگار، فنل رد برات و آگار، پیتون آگار، سیمون سیترات آگار، SIM مدیوم، سالمونلا شیگلا آگار (S.S)، سلنیت برات، تریپل شوگر آبرون آگار (TSI)، TCBS آگار، تایو گلیکولات برات، اوره آگار و برات، 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 = 5 g

3 g = Beef Extract

ژلاتین = 120 g

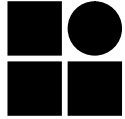
مقادیر فوق را به 1000CC آب مقطر اضافه کرده و در بن ماری جوش قرار دهید تا کاملاً حل شوند (از حرارت دادن این محیط کشت بر روی شعله پرهیز کنید). سپس در اتوکلاو به مدت 15 دقیقه و دمای 121°C در فشار 15 پوند (15 Lb) استریل نمایید. سپس در لوله تقسیم کرده و PH محیط کشت را به 6/8 برسانید

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

پیتون = 10g

کلور سدیم (NaCl) = 10g

آب مقطر = 1000CC

| | | |
|-------------|---|---|
| صفحه 2 از 6 | دستورالعمل |  آزمایشگاه مرجع سلامت |
| | تهیه انواع محیط کشت، معرفیها و رنگهای مورد استفاده در آزمایشگاه میکروب شناسی | |

سپس pH را به ۸/۶-۹ برسانید و در شرایط ۱۵ دقیقه، فشار ۱۵ Lb در اتوکلاو قرار داده و استریل نمایید. دما نیز 121°C است. (برای تنظیم از سود ۱ N استفاده کنید)

روش تهیه محیط کشت حاوی گلیسرین جهت دیپ فریز

از محیط کشت پایه: محیط TSB (Trypticase Soy Broth) یا محیط کشت BHB (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 (۱-۲ 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 NaCl ۶/۵٪ (براث/آگار)

محیط پایه همان محیط برین هارت اینفیوژن براث/آگار است. از آنجا که این محیط کشت حاوی ۰/۵٪ 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 آب مقطر = 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، تراهالوز و آرابینوز شامل فشار ۱۵ Lb، دمای 121°C به مدت ۳ دقیقه و شرایط استریلیزاسیون برای سایر قندها شامل فشار ۱۲-۱۰ Lb، دمای $118-116^{\circ}\text{C}$ 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

آب مقطر: ۱۰۰cc

| | | |
|-------------|--|---|
| صفحه 3 از 6 | دستور العمل |  آزمایشگاه مرجع سلامت |
| | تهیه انواع محیط کشت، معرفها و رنگهای مورد استفاده در آزمایشگاه میکروب شناسی | |

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

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 (بر حسب میزان کار) کنترل کیفی گردد.

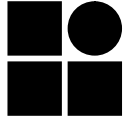
روش تهیه معرف های احیاء نیترات

-تهیه معرف A:

N، N دی متیل آلفا نفتیل آمین: ۶g

اسیداستیک گلاسیال ۵N، (۳۰٪): ۱۰۰۰CC

مقدار فوق از N، N دی 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.

| | | |
|-------------|---|---|
| صفحه 4 از 6 | دستورالعمل |  آزمایشگاه مرجع سلامت |
| | تهیه انواع محیط کشت، معرفیها و رنگهای مورد استفاده در آزمایشگاه میکروب شناسی | |

-تهیه معرف B:

سولفانیلک اسید (P-آمینو بنزن سولفونیک اسید): ۸g

اسیداستیک گلاسیال ۵N، (۳۰٪): ۱۰۰۰ CC

مقدار فوق از سولفانیلک 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 = ۰/۲g

اتانول = ۲۰CC

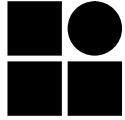
محلول در ظرف تیره و در یخچال نگهداری می شود. درب ظرف باید کاملاً محکم بسته شود. غلظت نهایی محلول ۰/۱ μg/ml برای محیط های مایع و ۱۰ μg/ml برای محیط های آگاردار است. پودر ویتامین K₁ را روی یک قطعه کوچک فویل آلومینیومی استریل وزن کرده و در شرایط آسپتیک به ۲۰ml اتانول در یک بطری استریل اضافه کنید. برای رقیق سازی بیشتر از آب مقطر استریل استفاده کنید. محلول ذخیره ۱۰mg/ml است. ۱ml از محلول ذخیره را به یک لیتر آگار و ۰/۰۱ ml/l برات اضافه کنید. محلول را دور از نور و در یخچال ذخیره کنید.

روش تهیه همین (Haemine)

پودر همین = ۰/۵ g

سود (NaOH) ۱N = ۱۰cc

مقدار فوق از پودر همین را به ۱۰CC سود ۱ نرمال اضافه کرده و حل کنید، سپس با آب مقطر به حجم ۱۰۰CC برسانید. در شرایط ۱۵ دقیقه، ۱۲۱°C، فشار ۱۵ Lb در اتوکلاو استریل نمایید. محلول در ظرف تیره و در یخچال نگهداری می شود. این محلول ذخیره ۵ mg/ml غلظت دارد، ولی هنگام مصرف به عنوان ساپلمنت، باید دارای غلظت نهایی ۵ μg/ml باشد.

| | | |
|-------------|---|---|
| صفحه 5 از 6 | دستورالعمل |  آزمایشگاه مرجع سلامت |
| | تهیه انواع محیط کشت، معرفیها و رنگهای مورد استفاده در آزمایشگاه میکروب شناسی | |

روش تهیه آب اکسیژنه (H₂O₂) ۳٪

محلول آب اکسیژنه ۳۰٪ را به نسبت ۱:۱۰ با آب مقطر رقیق نمایید. (یعنی ۱CC آب اکسیژنه ۳۰٪ را به ۹CC آب مقطر اضافه نمایید). محلول در ظرف تیره و در یخچال نگهداری می شود.

روش تهیه کریستال ویوله ذخیره و اگزالات آمونیوم ذخیره

-تهیه کریستال ویوله

پودر کریستال ویوله = ۲۰g

اتانول = ۱۰۰CC

-تهیه اگزالات آمونیوم

پودر اگزالات آمونیوم = ۱g

آب مقطر = ۱۰۰CC

هنگام مصرف، محلول کریستال ویوله ذخیره را به نسبت ۱:۱۰ با آب مقطر رقیق نمایید. (۱CC از محلول کریستال ویوله و ۹CC آب مقطر) سپس این محلول را با چهار حجم از محلول اگزالات آمونیوم رقیق کنید (۱CC محلول کریستال ویوله رقیق شده و ۴CC اگزالات آمونیوم). محلول ذخیره و مصرفی کریستال ویوله، در ظرف تیره و در دمای اتاق نگهداری می شود.

روش تهیه لوگل

ید = ۱g

یدور پتاسیم = ۲g

آب مقطر = ۲۴۰CC

محلول آبی بیکربنات سدیم ۵٪ = ۶۰CC

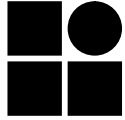
در مقدار کمی از آب مقطر، ید و یدور پتاسیم را کاملاً حل نمایید، بعد حجم را با آب مقطر به ۲۴۰CC برسانید. محلول ۵٪ بیکربنات سدیم (بیکربنات سدیم: ۵g آب مقطر: ۱۰۰C) را نیز به آن اضافه نمایید. محلول در دمای اتاق نگهداری می شود. درب آنرا باید کاملاً محکم ببندید.

روش تهیه محلول الکل-استون

اتانول = ۲۵۰CC

استون = ۲۵۰CC

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

| | | |
|-------------|--|---|
| صفحه 6 از 6 | دستورالعمل |  آزمایشگاه مرجع سلامت |
| | تهیه انواع محیط کشت، معرفها و رنگهای مورد استفاده در آزمایشگاه میکروب شناسی | |

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 می شوند.