**3. شکلات آگار**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **اسم آزمایشگاه:** | {{LabName}} | |
| **اسم سند:** | **دستورالعمل ساخت و کنترل کیفی محیط کشت شکلات آگار** | |
| **کد سند:** | D-003-0005 | |
| **دسته بندی سند:** | دستورالعمل و کنترل کیفی مواد و تست های تشخیصی | |
| **شماره ویرایش:** | {{EditeNumber}} | |
| **تاریخ ویرایش:** | {{EditeNumber}} | |
| **تاریخ بازنگری سند:** | {{ReviewDate}} | |
| **تهیه کننده:** | **تایید کننده:** | **امضاء :** |
| شرکت دارا ویرا آزما  دکتر داریوش شکری | {{ConfirmerOneName}} | {{ConfirmerTwoName}} |

**(1) هدف:**

محیط شکلات آگار جهت جداسازی باکتری های سخت رشد مانند نایسریا و هموفیلوس از نمونه های میکروبی کاربرد دارد.هدف از این دستورالعمل تشریح روش ساخت و کنترل کیفی این محیط می باشد.

## **(2) ترکیبات محیط (بر حسب گرم در لیتر):**

پپتون (5/4)، عصاره گوشت (5/7)، سدیم کلراید (5)، نشاسته ذرت (1)، آگار (12)، پتاسیم دهیدروژن فسفات (1)، 5 درصد خون گوسفندی، آب مقطر 1000 میلی لیتر. pH حدود 4/7.

**(3) اساس محیط**:

از شکلات آگار برای رشد باکتری های سخت رشد و دیررشد استفاده می شود. همچنین، برخی از این باکتری ها، مانند هموفیلوس آنفلوانزا، به فاکتورهای رشدی مانند نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید یا فاکتور V و هِمین یا فاکتورX که در داخل گلبول های قرمز خون هستند، نیاز دارند. بنابراین نیاز رشد این باکتری ها وجود گلبول های قرمز لیز شده است که با گرما دادن محیط بعد از اضافه شدن خون گوسفندی تا 80 درجه این اتفاق می افتد. همچنین این گرما باعث می شود آنزیم های مهاری تخریب کننده NAD (به نام NAD آز) نیز غیرفعال شوند.

**(4) مراحل ساخت محیط:**

1. میزان نوشته شده بر روی قوطی محیط کشت (معمولاً 40 گرم) از پودر پایه محیط را با 1 لیتر آب مقطر ترکیب کنید.
2. این مخلوط را در حین هم زدن حرارت دهید تا همه اجزا کاملاً حل شوند.
3. مخلوط حل شده را به مدت 15 دقیقه در دمای 121 درجه سانتیگراد در اتوکلاو قرار دهید.
4. پس از اتوکلاو، اجازه دهید خنک شود و هنگامی که دمای محیط به 80 درجه رسید خون گوسفندی را به نسبت 5 درصد اضافه کنید.
5. سپس ارلن حاوی محیط را در بن ماری 80 درجه گذاشته به مدت 15 دقیقه صبر می کنیم تا لیز RBCها صورت گیرد (چندباری به آرامی محیط را هم می زنیم).
6. بعد از 15 دقیقه محیط را خارج نموده و اجازه می دهیم تا دمای 50-45 درجه سانتی گراد سرد شود.
7. در حالی که مخلوط هنوز به صورت مایع است، آن را در پلیت های استریل بریزید.
8. از ایجاد حباب‌های هوا اجتناب کنید و در صورت تشکیل با گرفتن حرارت روی حباب ها آنها را از بین ببرید.

**(5) کنترل کیفی محیط:**

**ظاهر محیط:** کرم تا زرد بدون چسبندگی پودر.

**حالت محیط بعد از ژله شدن**: سفت، قابل مقایسه با ژل آگار 2/1 درصد.

**رنگ و شفافیت محیط آماده شده:**

محیط پایه: ژل کهربایی روشن تا کمی مادی رنگ. پس از افزودن هموگلوبین: ژل مات قهوه ای شکلاتی.

**الگوی رشد ارگانیسم های کنترل کیفی** (**رقت باکتری:**µL 10 از غلظت 01/0 نیم مک فارلند، **انکوباسیون**: CO2‌ (جار شمع دار یا انکوباتور CO2) به مدت 18-24 ساعت در 35 درجه)**:**

نایسریا گونوره آ ATCC43069: رشد خوب

استرپتوکوکوس پنومونیه ATCC49619/6305: رشد خوب و سبز شدن در منطقه رشد

استافیلوکوکوس اورئوس ATCC25923: رشد خوب

هموفیلوس آنفولانزاATCC10211 : رشد مناسب

**(6) منابع:**

1. کتاب آزمایشگاه باکتری شناسی پزشکی. جلد اول: تشخیص. دکتر داریوش شکری و همکاران. انتشارات تیمورزاده نوین و کیا. 1402.
2. محیط هاي کشت آزمایشگاهی (موارد مصرف وکنترل کیفی) به انضمام اطلس رنگی محیط هاي کشت؛ گردآوري و ترجمه مهناز صارمی و محمد علی صارمی؛ آزمایشگاه مرجع سلامت، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی؛ 1387.
3. Quality Assurance for commercially prepared Microbiological Culture Media- Second Edition; CLSI, 2022.