GIDA VE KONTROL GENEL MÜDÜRLÜĞÜ

REFERANS KÜLTÜRDEN STOK KÜLTÜR VE ÇALIŞMA KÜLTÜRÜ HAZIRLAMA KILAVUZU

(EK-4)

2022

Referans Kültürden Stok Kültür ve Çalışma Kültürü Hazırlama Kılavuzu

1. AMAÇ ve KAPSAM

Bu talimatın amacı ve kapsamı, mikrobiyolojik analizlerde kullanılmak üzere hazırlanan besiyerlerinde arzu edilen mikroorganizmaların üreme durumu ve selektif besiyerleri için gelişmesi istenmeyen mikroorganizmanın üreme durumunu kontrol etmek, verifikasyon ve eğitim çalışmalarında kullanılmak amacıyla referans kültürden stok kültür ve çalışma kültürü elde edilmesidir.

2. SORUMLULUKLAR

Bu talimatın yürütülmesinden yetkili tüm laboratuvar personeli sorumludur.

3. TANIMLAR ve KISALTMALAR

MKB: Mikrobiyoloji Laboratuvarı

Referans Suş: Bir referans kültür koleksiyonundan doğrudan elde edilen mikroorganizma kültür koleksiyonu, gıda, hayvan yemi, gıda veya yem üretim ortamından veya su kaynaklı, tercihe göre World Federation of Culture Collections (WFCC) veya the European Culture Collections Organisation (ECCO) üyesi olan ve en az cins ve tür düzeyinde kendi özelliklerine göre katologda tanımlanmış mikroorganizma.

Stok Kültür: Referans stoktan yapılan birincil alt kültür.

Çalışma Kültürü: Stok kültür veya referans materyalden elde edilen sertifikalı ya da sertifikasız alt kültürdür.

Referans Materyal (RM): Yeniden canlandırılacak mikroorganizmaları yeterince homojen ve stabil olarak içeren ölçme işleminde kullanılacak mikroorganizma içeren referans malzeme.

Sertifikalı Referans Materyal (CRM): Geçerli bir prosedür ile tekrar canlandırılacak, ölçüm izlenebilirliği ve belirsizliği bulunan, belirtilen miktarda mikroorganizma içeren sertifikalı referans malzeme.

4. UYGULAMA

4.1. Stok Kültürün Hazırlanması

Mikrobiyolojik referans materyalleri kullanıldığında çeşitli problemlerle karşılaşılabilir. Mikroorganizmalar, çoğalabilecek ve ölebilecek, taşıma ve depolama sırasında özellikleri değişebilen canlı organizmalardır. Modern tekniklerle, stabilite ve homojenlik ile ilgili problemlerin çoğu çözülmüştür. Buna rağmen, bir referans materyalindeki doğru /gerçek mikroorganizma miktarı bilinmez. Bu yüzden, analiz birkaç kez tekrarlandığında elde edilen ortalama değer, bir referans materyalindeki mikroorganizma sayısı olduğu kabul edilmiştir.

Referans materyallerdeki suşların bazen stresli veya yaralı olabileceği ve bu nedenle standarda göre 1 ila 2 günlük ek bir inkübasyon süresine ihtiyaç duyulabileceği belirtilmelidir. Bu özellikle, donma toleransı düşük olan mayalar, enterokoklar ve *C. perfringens* için ortaya çıkabilir.

Uluslararası kültür koleksiyonlarından elde edilmiş, tür düzeyinde tanımlamaları yapılmış, kalite kontrolleri ile ilgili sertifikaları mevcut liyofilize haldeki kültürlerden hangi mikroorganizma üretilecekse onun master kültürü kullanılır. Referans kültürün sertifikası ilgili klasörde saklanır.

- Referans kültür, normal mikroorganizma ekim prosedürüne göre ilgili ön zenginleştirme besiyeri kullanılarak üretilir. Daha sonra petriler üzerine kültüre edilir. Mümkün olduğu kadar çok petri

yapılması tavsiye edilir. Dondurma işlemi taze kültürden (bir gece bekletilmiş) kültürden yapılmalıdır.

- Stok kültür hazırlamak ve bu kültürü muhafaza etmek için referans kültürden üretilen koloniler:

a) Boncuklu viallerde saklanabilir.

- Koloniler boncuklu viallere alınır ve çalkalanır. Bu vialler vortekslenmez ve 4 saat inkübe edilir.
- İnkübasyondan sonra boncuk içeren viallerdeki sıvı, mikropipet yardımıyla alınıp otoklavlanıp dekontamine edilmek üzere cam kavanoza boşaltılır.
- Boncuk içeren viallerin üzerine tarih, suşun ismi ve kodu yazılarak (ör: SLM 14.03.19/1) derin dondurucuda **(-18/-24°C) iki yıl** veya daha düşük sıcaklıkta **(-60 °C) uzun yıllar** muhafaza edilebilir.
- Stok kültürden en az boncuklu 5 vial hazırlanmalı ve üzerlerine 1, 2, 3, 4, 5 diye numara yazılmalıdır.
- Kullanırken sırayla önce 1 numaralı stok kültürden başlayarak bitene veya kontamine olana kadar kullanılmalıdır. Daha sonra 2 numaralı stok kültür kullanılmaya başlanmalıdır.

b) %15'lik Gliserollü-BHI Broth'da saklanabilir.

- Öze veya swap yardımıyla petriden toplanan koloniler 10 mL gliserollü –BHI broth içeren tüpe inoküle edilir.
- Bu tüp 10 kez karıştırılır ve kapatılır.
- Süspansiyon önceden belirlenmiş küçük dondurma viallerine bölünür
- Viallerin üzerine tarih, suşun ismi ve kodu yazılarak (ör: SLM 14.03.19/1) derin dondurucuda (-18/-24°C) iki yıl veya daha düşük sıcaklıkta (-60°C) uzun yıllar muhafaza edilebilir.
- Stok kültürden en az 5 vial hazırlanmalı ve üzerlerine 1, 2, 3, 4, 5 diye numara yazılmalıdır.
- Kullanırken sırayla önce 1 numaralı stok kültürden başlayarak bitene veya kontamine olana kadar kullanılmalıdır. Daha sonra 2 numaralı stok kültür kullanılmaya başlanmalıdır.

%15'lik Gliserollü-BHI Broth Hazırlanması:

1. Üretici talimatına göre 850 mL BHI Broth hazırlanır.
2. Üzerine 150 mL gliserol eklenir ve iyice karıştırılır.
3. 121±2°C'de 15 dk otoklavlanır.
4. pH'ı kontrol edilir: pH 7,4±0,2 olmalıdır.
5. Her bir vialde 0,5 mL olacak şekilde doldurulur.

Hazırlan %15'lik Gliserollü-BHI Broth buzdolabında en fazla 3 ay saklanabilir.

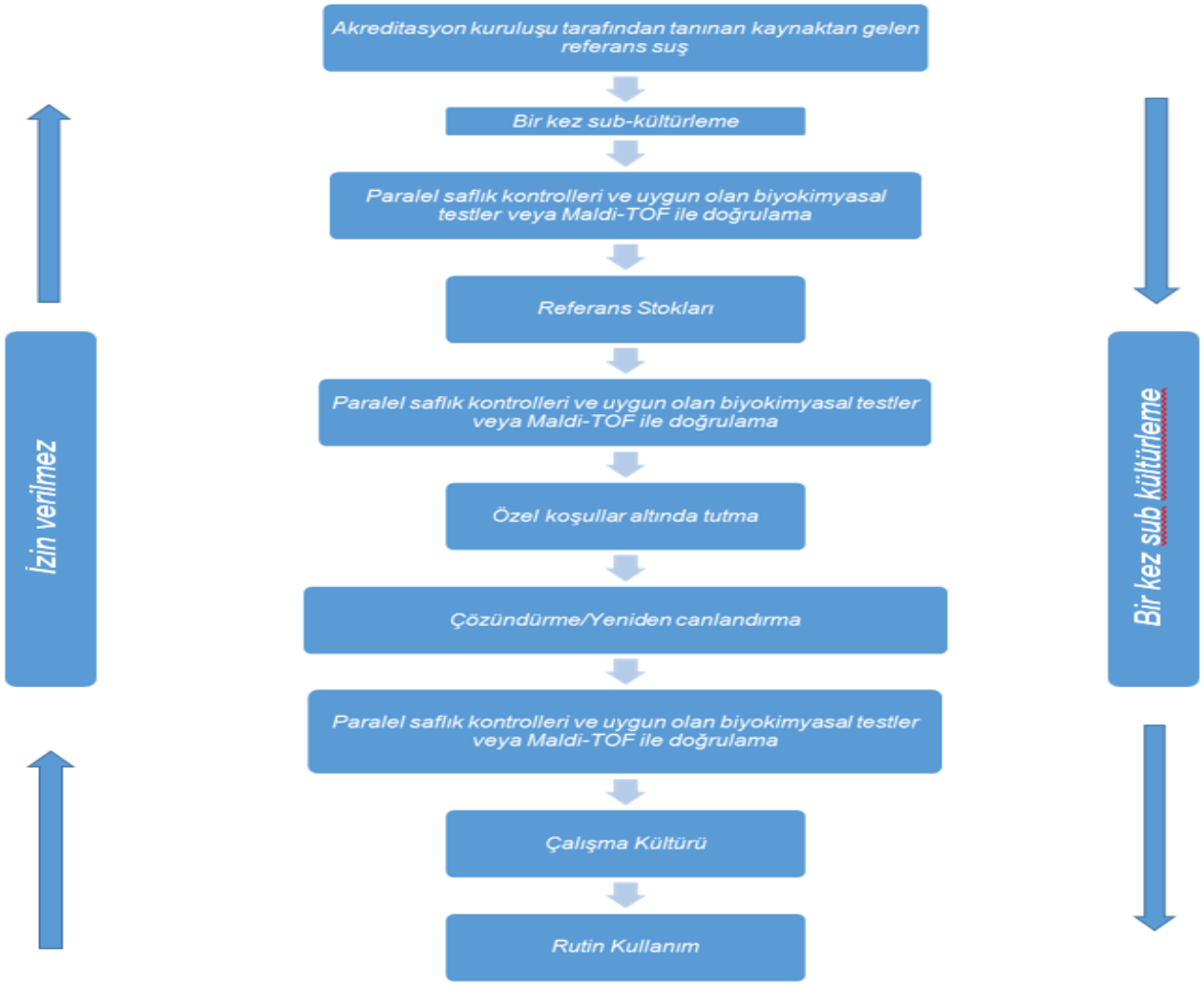
- Hazırlanan stok kültüre ait bilgiler kayıt altına alınmalıdır.

Stok kültürler biyokimyasal doğrulama testleri ile ya da MALDI Biotyper cihazına verilerek kontrol edilir. Doğrulanamayan ve kontamine olduğu tespit edilen stok kültürler tıbbi atığa gönderilerek imha edilir.

4.2. Çalışma Kültürünün Hazırlanması.

- Çalışma kültürü hazırlanmasında, derin dondurucuda bulunan stok kültür viallerinden en küçük numaradan başlamak üzere çıkartılır.
- Eğer boncuklu vial kullanılacaksa, vialin dışından parmakla küçük bir darbe vurularak boncukların serbest kalması sağlanır.
- İğne öze yardımıyla bir boncuk ortasındaki delikten tutularak alınıp katı bir genel besiyerine (örn; Tryptone Soya Agar (TSA) veya Kanlı Agara) ekim yapılır. 37°C'de 18–24 saat uygun atmosferik koşullarda inkübe edilir. Özel koşullar gerektiren mikroorganizmaların (*C. perfringens*; anaerobik koşullar) hazırlanmasında gerekli şartların sağlanmasına dikkat edilir.
- İnkübasyon sonucunda petri kutusunda üreme görülür. Üreme görülen petri kutularındaki koloniler doğrulanır. Böylece, çalışma kültürü hazırlanmış olur.
- İnkübasyon sonrası petrilerin kenarları parafilm ile sarılarak, 5±3°C'de buzdolabında muhafaza edilir.
- Çalışma kültürleri uygun biyokimyasal testler ile ya da MALDI Biotyper cihazına verilerek kontrol edilir. Doğrulanamayan ve kontamine olduğu tespit edilen çalışma kültürleri tıbbi atığa gönderilerek imha edilir.
- Üreme görülmeyen viallerin yine de tıbbi atık olarak atılır.
- Bir referans suşu beş kereden fazla sub-kültürü yapılması tavsiye edilmez.
- Oluşturulan çalışma kültürüne ait bilgiler kayıt altına alınmalıdır.

4.3. EK-3: Referans Kültürlerin Genel Kullanımı (EA-04/10)



5. KAYNAKLAR (REFERANSLAR)

- TS EN ISO 11133/A2, Gıda, Yem ve Su Mikrobiyolojisi - Kültür Ortamının Hazırlama, Üretim, Muhafaza ve Performans Deneyi, 2020.
- Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Ed: A. K. Halkman. Başak Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara, 2005.
- NMKL Procedure No: 18. The use of reference materials, reference strains and control charts in a food microbiological laboratory, 2006.