

کد M-08/00 صفحه 1 از 5	نگهداری و استفاده از سویه‌های باکتری	 آزمایشگاه مرجع سلامت
--------------------------------------	---	---

برای نگهداری سویه‌های باکتریایی می‌توان از روشهای طولانی مدت و کوتاه مدت استفاده نمود.

نگهداری طولانی مدت

نگهداری طولانی مدت باکتریها این امکان را می‌دهد که کلیه سویه‌های میکروبی اعم از هوازی (بارشد سریع و یا سخت رشد) و نیز بیهوازی، ماهها و حتی سالها به صورت زنده نگهداری شوند. بهترین روشهای نگهداری طولانی مدت شامل لیوفیلیزاسیون (Freeze drying) و نگهداری در دمای -70°C درجه سانتی‌گراد یا پایین تر (در دیپ فریز یا در نیتروژن مایع) می‌باشد.

۱- نگهداری در دیپ فریز (-50°C تا -70°C درجه سانتی‌گراد یا پایین‌تر) و یا نیتروژن مایع:

باکتری مورد نظر را روی محیط مغذی مانند پلیت TSA (Trypticase Soy Agar) حاوی ۵٪ خون گوسفند و در مورد میکروارگانیسمهای سخت رشد روی محیط آگار شکلاته کشت دهید. پلیتها را به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ درجه سانتی‌گراد و در صورت نیاز تحت شرایط CO_2 برای هر باکتری انکوبه نمایید. بعد از انکوباسیون، خالص بودن و مورفولوژی کلنی‌ها را بررسی نموده و در صورت نیاز، تستهای بیوشیمیایی آنها انجام دهید. سپس از باکتری رشد یافته، سوسپانسیون غلیظی در ۵۰-۱۰۰ میلی‌لیتر از یک محیط محافظت‌کننده از سرما (Cryoprotective) تهیه نمایید. این محیط برای جلوگیری از تخریب سلولهای باکتری در شرایط انجماد مورد استفاده قرار می‌گیرد. محیط محافظت‌کننده از سرما می‌تواند Skim milk، خون گوسفند یا خرگوش دفیبرینه استریل یا Tryptic Soy Broth (TSB) حاوی گلیسرول با غلظت نهایی ۱۵-۱۰٪ باشد. سپس از سوسپانسیون باکتریایی فوق به مقدار ۱-۰/۵ ml در ویالهای شیشه‌ای یا پلاستیکی کوچک استریل توزیع کنید. تعداد ویال ذخیره خود را برای مصرف یکسال آماده نمایید. ویالهای حاوی سویه‌ها را می‌توان در برودت -50°C تا -70°C درجه سانتی‌گراد به مدت یکسال نگهداری نمود. در صورت عدم دسترسی به فریزر -70°C درجه می‌توان سویه‌های با رشد سریع را در فریزر -20°C درجه نیز نگهداری نمود. در این شرایط توجه به نکات زیر ضروری است.

کد M-08/00 صفحه 2 از 5	نگهداری و استفاده از سویه‌های باکتری	 آزمایشگاه مرجع سلامت
-------------------------------	---	---

سویه‌های سخت رشد مانند هموفیلوس آنفلوانزا و نیسریا گنوره در این دما قابل نگهداری نمی‌باشند و باید در فریزر ۷۰- درجه نگهداری شوند.

سویه‌های بارشد سریع در این دما عمر کمی دارند و تعداد زیادتری از آنها از بین می‌روند. بنابراین توصیه می‌شود برای اطمینان از حیات سویه‌ها هر چند ماه، طبق روش زیر کشت داده شوند.

یک ویال از فریزر بیرون آورده و و سریعا زیر آب جاری ولرم محتویات آنرا ذوب نمائید. نمونه را روی محیط آگار خوندار یا شکلاته (در مورد باکتریهای سخت رشد) تلقیح کرده و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای 25 ± 2 درجه و در صورت نیاز در شرایط CO_2 انکوبه نمائید. این باکتری می‌تواند برای آزمایشهای کنترل داخلی کیفیت در آزمایشگاه یا برای تهیه **working control** بکار رود. قبل از هر اقدام باید از خالص بودن نمونه، اطمینان حاصل کرد. ویال مورد استفاده بعد از ذوب شدن باید دور انداخته شده و بهیچوجه مجددا فریز نگردد.

کشتهای **working control** عبارتست از کشت مجدد از کشت ذخیره فریز شده که برای کنترل کیفیت محیط کشت و استفاده می‌شود.

از کشت ذخیره تا ۳ پاساژ پشت سر هم می‌توان انجام داد. پس از آن، نمونه باید دور انداخته شده و از یک کشت ذخیره فریز شده دیگر برای تهیه کشتهای **working control** استفاده شود. پاساژهای مکرر (بیش از ۳ پاساژ)، احتمال تغییر فنوتیپی سویه‌ها را افزایش می‌دهد.

برای تهیه **working control**، از کشت ذخیره فریز شده، روی پلیت یا آگار شیبدار تلقیح و آنرا به مدت یک شبانه‌روز تا زمانی که رشد مناسبی بدست آید، انکوبه نمائید. در مورد ارگانیسیمهای با رشد سریع این پلیت یا آگار شیبدار را می‌توان در ۸-۲ درجه سانتیگراد یا در دمای اتاق تا مدت ۴ هفته نگهداری نمود. بعد از هر پاساژ، خالص بودن و مورفولوژی کلنی‌ها را بررسی نمائید.

۲- استفاده از روغن معدنی در دمای اتاق :

۱- محیط کشت Brain Heart Infusion Agar (BHIA) را با شیب کم در لوله تهیه نمائید. برای باکتریهای مشکل‌پسند مانند گونوکک، مننگوکک، استرپتوکک پنومونیه و هموفیلوس آنفلوانزا، لازم است محیط

کد M-08/00 صفحه 3 از 5	نگهداری و استفاده از سویه‌های باکتری	 آزمایشگاه مرجع سلامت
--------------------------------------	---	---

شکلات آگار را با افزودن ۵٪ خون گوسفند به محیط فوق پس از خروج از اتوکلاو و رسیدن به دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و قرار دادن در بن‌ماری ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه تهیه نمود.

۲- روغن معدنی (یا پارافین مایع) را در حرارت خشک (۱۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یکساعت) استریل نمائید.

- ۳- میکروب مورد نظر را روی محیط کشت دهید.
- ۴- بعد از بدست آوردن کشت کافی، روغن استریل را به مقدار ۱ CC روی سطح محیط بریزید.
- ۵- در صورت نیاز به کشت مجدد، نمونه از سطح آگار (زیر روغن) برداشته می‌شود.
- ۶- بعد از ۱۲-۶ ماه تجدید کشت نمائید.

۱- کشت عمقی و نگهداری در دمای اتاق :

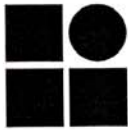
این روش فقط برای باکتری‌هایی که مشکل‌پسند نیستند مانند استافیلوکوک و خانواده انتروباکتریاسه بکار می‌رود.

- ۱- یک محیط کشت آگار بدون کربوهیدرات مانند TSA را با عمق زیاد در لوله تهیه نمائید.
- ۲- باکتری را بصورت کشت عمقی در در این محیط تلقیح نمائید.
- ۳- این محیط را ۲۴ ساعت در اتو ۳۵ درجه انکوبه نمائید.
- ۴- در لوله را با درپیچ یا چوب پنبه ببندید.
- ۵- لوله در پیچ‌دار را در پارافین مایع فرو ببرید به گونه‌ای که کاملاً در لوله را بپوشاند.
- ۶- کشت‌ها را در حرارت اتاق نگهداری نمائید.
- ۷- هر ساله سوش موردنظر را تجدید نمائید.

۲- کشت عمقی در محیط سیستمین تریپتیکس آگار (CTA) برای نیسریا و استرپتوکوک

:

- ۱- محیط CTA را در لوله تهیه نمائید.
- ۲- باکتری را بطو عمقی در این محیط کشت دهید.

کد M-08/00 صفحه 4 از 5	نگهداری و استفاده از سویه‌های باکتری	 آزمایشگاه مرجع سلامت
--------------------------------------	---	---

- ۳- محیط را بمدت ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.
- ۴- در لوله را با چوب‌پنبه یا در پیچ ببندید.
- ۵- لوله در پیچ‌دار را در پارافین مایع فرو ببرید به گونه‌ای که کاملاً در لوله را بپوشاند.
- ۶- برای نیسریا لوله را در ۳۵ درجه نگهداری و هر دو هفته کشت را تجدید نمائید. برای استرپتوکوک لوله را در حرارت اتاق نگهداری کرده و هر ماه تجدید کشت کنید.

۳- محیط کشت **Cooked meat** برای باکتریهای بیهوازی :

- ۱- باکتری را در لوله‌های حاوی محیط **Cooked meat** کشت دهید.
- ۲- محیط را بمدت ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.
- ۳- در لوله را با چوب‌پنبه یا در پیچ ببندید.
- ۴- کشتها را در حرارت اتاق نگهداری نمائید.
- ۵- هر دو ماه کشت را تجدید نمائید.

نگهداری کوتاه مدت

کشت‌های **working control** که برای کارهای روتین روزانه استفاده می‌شوند، به روشهای زیر تهیه می‌شوند.

▪ باکتریهای با رشد سریع

- ۱- سوش مورد نظر را در سطح محیط **TSA** لوله‌ای در پیچ‌دار کشت دهید.
- ۲- محیط را بمدت ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.
- ۳- پس از رشد کامل، لوله را در یخچال نگهداری کنید.
- ۴- هر ماه کشت را تجدید نمائید.

▪ استرپتوکوکها

کد M-08/00 صفحه 5 از 5	نگهداری و استفاده از سویه‌های باکتری	 آزمایشگاه مرجع سلامت
--------------------------------------	---	---

- ۱- سوش مورد نظر را در سطح آگار خوندار شیب‌دار (لوله‌ای درپیچ‌دار) کشت دهید.
 - ۲- محیط را بمدت ۲۴ ساعت در اتو ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.
 - ۳- پس از رشد کامل، لوله را در یخچال نگهداری کنید. (جهت استرپتوکوک پنومونیه ، محیط را در دمای اتاق نگهداری کنید).
 - ۴- هر ماه کشت را تجدید نمایید.
- مننگوکک و هموفیلوس
- ۱- سوش مورد نظر را در سطح محیط آگار شکلاته لوله‌ای یا پلیت کشت دهید.
 - ۲- محیط را بمدت ۲۴ ساعت در اتو ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.
 - ۳- پس از رشد کامل، لوله را در حرارت اتاق نگهداری کنید.
 - ۴- هر ۲ هفته کشت را تجدید نمایید.
- گونوکک
- ۱- سوش مورد نظر را در سطح محیط آگار شکلاته کشت دهید.
 - ۲- محیط را بمدت ۲۴ ساعت در اتو ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.
 - ۳- نمونه را در دمای ۳۵ درجه نگهداری نمایید.
 - ۴- هر ۲ روز یکبار کشت را تجدید نمایید.