


1 از 6 صفحه	دستورالعمل فني	 مرجع سلامت
	نگهداري و استفاده از سويه هاي باكتريايي	

## نگهداري و استفاده از

### سويه هاي باكتريايي

براي نگهداري سويه هاي باكتريايي مي توان از روشهاي طولاني مدت و کوتاه مدت استفاده نمود.


#### الف) نگهداري طولاني مدت

نگهداري طولاني مدت باكتريها اين امکان را مي دهد كه كليه سويه هاي ميكروبي اعم از هوازي (با رشد سريع و يا سخت رشد) و نيز بيهوازي، ماهها و حتي سالها به صورت زنده نگهداري شوند. بهترين روشهاي نگهداري طولاني شامل ليوفيليزاسيون (Freeze drying) و نگهداري در دماي  $-70$  درجه سانتیگراد يا پايين تر (در ديپ فریز يا در نيتروژن مایع) مي باشد.

#### 1- نگهداری در ديپ فریز ( $-50$ تا $-70$ درجه سانتیگراد يا پايين تر) و يا نيتروژن مایع:

باكتري مورد نظر را روي محيط مغذي مانند پليت TSA (Trypticase Soy Agar) حاوي 5% خون گوسفند و در مورد ميكروارگانيسمهاي سخت رشد روي محيط آگار شكلاته كشت دهيد. پليتها را به مدت 18-24 ساعت در دماي  $35 \pm 2$  درجه سانتیگراد و در صورت نياز تحت شرايط  $CO_2$  براي هر باكتري انكوبه نماييد.

بعد از انكوباسيون، خالص بودن و مورفولوژي كلنيها را بررسي نموده و در صورت نياز، تستهاي بيوشيميايي آنها انجام دهيد. سپس از باكتري رشد يافته، سوسپانسيون غليظي در 100-50 ميلي ليتر از يك محيط محافظت كننده از سرما (Cryoprotective) تهيه نماييد. اين محيط براي جلوگيري از تخریب سلولهاي باكتري در شرايط انجماد مورد استفاده قرار مي گيرد. محيط محافظت كننده از سرما مي تواند Skim milk، خون گوسفند يا خرگوش دفيبرينه استريل يا Tryptic Soy Broth (TSB) حاوي گليسرول با غلظت نهايي 10-15% باشد.

2 از 6 صفحه	<b>دستور العمل فني</b>	
	<b>نگهداري و استفاده از سويه هاي باكتريايي</b>	

سپس از سوسپانسیون باکتریایی فوق به مقدار 1 ml - 0/5 در ویالهای شیشه‌ای یا پلاستیکی کوچک استریل توزیع کنید. تعداد ویال ذخیره خود را برای مصرف یکسال آماده نمائید. ویالهای حاوی سویه‌ها را می‌توان در برودت 50- تا 70- درجه سانتی‌گراد به مدت یکسال نگهداری نمود. در صورت عدم دسترسی به فریزر 70- درجه می‌توان سویه‌های با رشد سریع را در فریزر 20- درجه نیز نگهداری نمود. در این شرایط توجه به نکات زیر ضروری است:

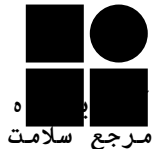
سویه‌های سخت رشد مانند هموفیلوس انفلوانزا و نیسریا گونوره در این دما قابل نگهداری نمی‌باشند و باید در فریزر 70- درجه نگهداری شوند.

سویه‌های با رشد 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 سریعاً 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 18-24 ساعت در دمای  $35 \pm 2$  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 به هیچ وجه مجدداً 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 3 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.

3 از 6 صفحه	<b>دستور العمل فني</b>	 مرجع سلامت
	<b>نگهداري و استفاده از سويه هاي باكتريايي</b>	

پاساژهاي مكرر (بیش از 3 پاساژ)، احتمال تغییر فنوتیپی سويه ها را افزایش مي دهد.


براي تهیه **working control**، از کشت ذخیره فریز شده، روی پلیت یا آگار شیب دار تلقیح و آنرا به مدت یک شبانه روز تا زمانی که رشد مناسبی بدست آید، انکوبه نمائید. در مورد ارگانيسمهاي با رشد سریع این پلیت یا آگار شیبدار را می توان در 2-8 درجه سانتیگراد یا در دمای اتاق تا مدت 4 هفته نگهداری نمود. بعد از هر پاساژ، خالص بودن و مورفولوژی کلنیها را بررسی نمائید.

## 2- استفاده از روغن معدنی در دمای اتاق:

- 1- محیط کشت **Brain Heart Infusion Agar (BHIA)** را با شیب کم در لوله تهیه نمائید. برای باکتریهای مشکلپسند مانند گونوکوک، مننگوکوک، استرپتوکوک پنومونیه و هموفیلوس آنفلوانزا، لازم است محیط شکلات آگار را با افزودن 5% خون گوسفند به محیط فوق پس از خروج از اتوکلاو و رسیدن به دمای 50 درجه سانتیگراد و قرار دادن در بن ماری 80 درجه سانتیگراد به مدت 15 دقیقه تهیه نمود.
- 2- روغن معدنی (یا پارافین مایع) را در حرارت خشک (170 درجه سانتیگراد به مدت یکساعت) استریل نمائید.
- 3- میکروب مورد نظر را روی محیط کشت دهید.
- 4- بعد از بدست آوردن کشت کافی، روغن استریل را به مقدار 1 cc روی سطح محیط بریزید.
- 5- در صورت نیاز به کشت مجدد، نمونه از سطح آگار (زیر روغن) برداشته میشود.
- 6- بعد از 6-12 ماه تجدید کشت نمائید.

## 3- کشت عمقی و نگهداری در دمای اتاق:

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

4 از 6 صفحه	<b>دستور العمل فني</b>	 مرجع سلامت
	<b>نگهداري و استفاده از سويه هاي باكتريايي</b>	


- 1- یک محیط کشت آگار بدون کربوهیدرات مانند TSA را با عمق زیاد در لوله تهیه نمایید.
- 2- باکتری را بصورت کشت عمقی در این محیط تلقیح نمایید.
- 3- این محیط را 24 ساعت در انکوباتور 35 درجه انکوبه نمایید.
- 4- در لوله را با درپیچ یا چوب پنبه ببندید.
- 5- لوله در پیچدار را در پارافین مایع فرو ببرید به گونه ای که کاملاً در لوله را بپوشاند.
- 6- کشتها را در حرارت اتاق نگهداری نمایید.
- 7- هر ساله سوش موردنظر را تجدید نمایید.

#### **4- کشت عمقی در محیط سیستین تریبتیکس آگار (CTA) برای نیسریا و استرپتوکوک:**

- 1- محیط CTA را در لوله تهیه نمایید .
- 2- باکتری را بطور عمقی در این محیط کشت دهید.
- 3- محیط را بمدت 24 ساعت در انکوباتور 35 درجه سانتیگراد انکوبه نمایید.
- 4- در لوله را با چوبپنبه یا در پیچ ببندید.
- 5- لوله در پیچدار را در پارافین مایع فرو ببرید به گونه ای که کاملاً در لوله را بپوشاند.
- 6- برای نیسریا لوله را در 35 درجه نگهداری و هر دو هفته کشت را تجدید نمایید. برای استرپتوکوک لوله را در حرارت اتاق نگهداری کرده و هر ماه تجدید کشت کنید.

#### **5- محیط کشت Cooked meat برای باکتریهای بهوازی:**

- 1- باکتری را در لوله های حاوی محیط Cooked meat کشت دهید.

5 از 6 صفحه	<b>دستور العمل فني</b>	 مرجع سلامت
	<b>نگهداري و استفاده از سويه هاي باكتريايي</b>	

- 2- محیط را بمدت 24 ساعت در انکوباتور 35 درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.
- 3- در لوله را با چوب‌پنبه یا در پیچ ببندید.
- 4- کشتها را در حرارت اتاق نگهداري نمائید.
- 5- هر دو ماه کشت را تجدید نمائید.

### (ب) نگهداري کوتاه مدت

کشتهاي **working control** که براي کارهاي روتين روزانه استفاده مي‌شوند، به روشهاي زیر تهیه مي‌شوند:

#### ▪ باكتريهاي با رشد سريع

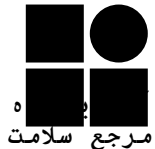
- 1- سوش مورد نظر را در سطح محیط TSA لوله اي در پیچ دار کشت دهید.
- 2- محیط را بمدت 24 ساعت در انکوباتور 35 درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.
- 3- پس از رشد کامل، لوله را در یخچال نگهداري کنید
- 4- هر ماه کشت را تجدید نمائید.

#### ▪ استرپتوکوکها

- 1- سوش مورد نظر را در سطح آگار خوندار شیب دار (لوله اي در پیچ دار) کشت دهید.
- 2- محیط را بمدت 24 ساعت در انکوباتور 35 درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.
- 3- پس از رشد کامل، لوله را در یخچال نگهداري کنید. ( جهت استرپتوکوک پنومونیه، محیط را در دمای اتاق نگهداري کنید.)
- 4- هر ماه کشت را تجدید نمائید.

#### ▪ مننگوکوک و هموفیلوس

- 1- سوش مورد نظر را در سطح محیط آگار شکلاته لوله اي یا پلیت کشت دهید.
- 2- محیط را بمدت 24 ساعت در انکوباتور 35 درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.

6 از 6 صفحه	دستور العمل فني	
	نگهداري و استفاده از سويه هاي باكتريايي	

3- پس از رشد کامل، لوله را در حرارت اتاق نگهداري کنید

4- هر 2 هفته کشت را تجديد نماييد.

▪ گونوکوک

1- سوش مورد نظر را در سطح محيط آگار شکلاته کشت دهيد.

2- محيط را ب مدت 24 ساعت در انکوباتور 35 درجه سانتیگراد انکوبه نماييد.

3- نمونه را در دماي 35 درجه نگهداري نماييد.

4- هر 2 روز یکبار کشت را تجديد نماييد.