

دستورالعمل نگهداری و استفاده از سویه های باکتریایی به روش بلند مدت و کوتاه مدت

آزمایشگاه مرجع سلامت

وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی

تابستان ۱۳۹۶

محل مهر تضمین کیفیت	
تاریخ :	تاریخ :

صفحه 1 از 6	آزمایشگاه رفرانس بخش میکروب شناسی	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	نگهداری و استفاده از سویه های باکتریایی به روش طولانی مدت و کوتاه مدت	

۱- هدف:

هدف از تهیه این دستورالعمل تدوین روش های صحیح و مناسب ذخیره سازی و نگهداری باکتری ها به روش طولانی و کوتاه مدت، و چگونگی استفاده از آنها برای مقاصد مختلف مانند برنامه تضمین کیفیت (ارزیابی کیفی محیط های کشت، معرف ها، دیسک های آنتی بیوتیک و ...) انجام آزمایش های تأییدی یا تکمیلی (بررسی الگوی مقاومتی سویه ها با آزمایش تعیین حساسیت ضد میکروبی، بررسی های اپیدمیولوژی و ...) در بخش میکروب شناسی آزمایشگاه می باشد. روش مناسب، روشی است که باکتری بتواند در آن شرایط زنده مانده، ضمن این که ویژگی هایش حفظ شده و پایدار بماند.

۲- نمونه:

کشت تازه و خالص میکروارگانیسم روی محیط جامد مناسب

۳- مواد، لوازم و تجهیزات:

- ✓ محیط محافظت کننده از سرما مانند 50% fetal calf serum، یا 10% or 15% glycerol در Tryptic Soy Broth (TSB)، یا Skim Milk، یا خون دفیبرینه گوسفند
- ✓ محیط کشت آگار خوندار پلیتی
- ✓ محیط کشت شکلات آگار پلیتی
- ✓ محیط کشت آگار خوندار شیبدار لوله ای در پیچ دار
- ✓ محیط کشت شکلات آگار شیبدار لوله ای در پیچ دار
- ✓ محیط کشت Tryptic Soy Broth (TSB) لوله ای در پیچ دار
- ✓ محیط کشت Cystine Tryptic Agar (CTA) لوله ای در پیچ دار
- ✓ محیط کشت Brain Heart Infusion Agar (BHIA) شیبدار لوله ای در پیچ دار
- ✓ محیط کشت Cooked Meat لوله ای در پیچ دار
- ✓ روغن معدنی یا پارافین مایع استریل
- ✓ ویال های شیشه ای یا پلاستیکی کوچک در پیچ دار استریل
- ✓ یخچال
- ✓ فریزر -70°C

۴- روش انجام آزمایش:

A) نگهداری طولانی مدت (یک سال یا بیشتر):

نگهداری طولانی مدت باکتری ها این امکان را می دهد که نمونه میکروبی، ماه ها و حتی سال ها به صورت زنده باقی بماند. بهترین روش های نگهداری طولانی مدت شامل لیوفیلیزاسیون (Freez Drying)، نگهداری در فریزر -70°C (Ultra Low Freezer) یا پایین تر و نگهداری در نیتروژن مایع (-196°C) می باشد.

صفحه 2 از 6	آزمایشگاه رفرانس بخش میکروب شناسی	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	نگهداری و استفاده از سویه های باکتریایی به روش طولانی مدت و کوتاه مدت	

روش های انتخابی و در دسترس عبارتند از:

الف) نگهداری در فریزر -70°C (Ultra Low Freezer):

- باکتری مورد نظر را روی محیط مغذی مانند پلیت آگار حاوی ۵٪ خون گوسفند و در مورد میکروارگانیسم های سخت رشد (پرنیاز) روی محیط شکلات آگار کشت دهید.
- پلیت ها را به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در دمای $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ و در صورت نیاز برای هر باکتری تحت شرایط CO_2 انکوبه نمایید.
- بعد از انکوباسیون، خالص بودن و مرفولوژی کلنی ها را بررسی نموده و در صورت نیاز، تست های بیوشیمیایی انجام دهید.
- سپس از باکتری رشد یافته، سوسپانسیون غلیظی در ۵۰-۱۰۰ ml از یک محیط محافظت کننده از سرما (Cryoprotective) تهیه نمایید. این محیط برای جلوگیری از تخریب سلول های باکتری در شرایط انجماد مورد استفاده قرار می گیرد. محیط های محافظت کننده از سرما عبارتند از:
 - ✓ Skim milk
 - ✓ خون دفیبرینه استریل گوسفند یا خرگوش
 - ✓ 50% fetal calf serum in broth
 - ✓ Tryptic Soy Broth (TSB) حاوی گلیسرول با غلظت نهایی ۱۵-۱۰٪
- از سوسپانسیون باکتریایی فوق به مقدار ۱-۰/۵ ml در ویال های شیشه ای یا پلاستیکی کوچک استریل توزیع کنید. تعداد کافی ویال ذخیره را برای مصرف یک سال آماده نمایید.
- بر روی ویال ها برچسب حاوی نام (یا کد) سویه و تاریخ تهیه سوسپانسیون را بچسبانید. ویال ها را در فریزر 50°C - تا 70°C - قرار داده و تا زمان مورد نیاز در آن ذخیره نمایید. سویه ها را می توان در برودت کمتر از 50°C - به مدت طولانی نگهداری کرد.
- در صورت عدم دسترسی به فریزر 70°C - می توان سویه ها را در فریزر 20°C - نیز نگهداری نمود. در این شرایط توجه به این نکته ضروری است:
 - ✓ سویه های باکتریایی در این برودت عمر کمتری (حداکثر یک سال) دارند و ممکن است تعداد زیادی از سلول ها از بین بروند. بنابراین توصیه می شود برای اطمینان از زنده بودن سویه ها در فواصل چند ماهه، از کشت ذخیره فریز شده، کشت مجدد بر روی محیط مناسب تهیه شود.
- در صورت نیاز، یک ویال از کشت ذخیره فریز شده را بیرون آورده و محتویات آن را سریعاً زیر آب جاری ولرم ذوب نمایید.
- سوسپانسیون را روی محیط آگار خوندار یا شکلاته (در مورد باکتری های سخت رشد) تلقیح نمایید، به گونه ای که کلنی های ایزوله رشد کنند. پلیت را به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در دمای $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ و در صورت نیاز در شرایط CO_2 انکوبه نمایید (ساب کالچر اولیه). قبل از استفاده برای آزمایش، از کشت ذخیره فریز شده، دو بار ساب کالچر انجام دهید. ساب کالچر دوم همان کشت کاری (working culture) می باشد.
- پلیت ها را در دمای 8°C - تا 2°C - (در مورد ارگانیسم های غیر سخت رشد) یا شرایط مناسب برای هر نوع میکروارگانیسم نگهداری نمایید.

- **توجه ۱:** ویال ذخیره مورد استفاده، بعد از ذوب شدن باید دور انداخته شود و نباید مجدداً فریز گردد.
- **توجه ۲:** قبل از استفاده از سویه رشد یافته روی هر پلیت باید از خالص بودن سویه، اطمینان حاصل نمود.
- **توجه ۳:** از کشت ذخیره فریز شده حداکثر تا ۳ پاساژ پشت سر هم می توان انجام داد. پس از آن، پلیت باید دور انداخته شود و از یک کشت ذخیره فریز شده دیگر استفاده گردد. پاساژهای پشت سر هم مکرر (بیش از ۳ پاساژ)، احتمال تغییر فنوتیپی سویه ها را افزایش می دهد.

صفحه 3 از 6	آزمایشگاه رفرانس بخش میکروب شناسی	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	نگهداری و استفاده از سویه های باکتریایی به روش طولانی مدت و کوتاه مدت	

Quality Control Organisms	Storage Conditions	Type of Stock Culture	Length of Storage
All	Per manufacturer	Lyophilized	Until expiration date
Rapidly growing bacteria and yeast	2-8 °C	Working QC Cultures	4 weeks
	2-8 °C	Stock QC Cultures	≤12 months
	≤-20 °C	Suspension in Cryopreservative	≤12 months
	≤-50 °C	Suspension in Cryopreservative	Indefinitely
Anaerobes, mycobacteria, bacteria w/special growth requirements	≤-20 °C	Suspension in Cryopreservative	≤12 months
	≤-50 °C	Suspension in Cryopreservative	Indefinitely
Moulds	25-30 °C	Oil Overlay or Water Cultures	Indefinitely
	≤-20 °C	Spore Suspension	Indefinitely

ب) نگهداری در دمای اتاق با کشت در محیط BHIA:

- محیط کشت (BHIA) Brain Heart Infusion Agar را با شیب کم در لوله شیشه ای درپیچ دار تهیه نمایید. برای باکتری های سخت رشد، خون تازه یا خون حرارت داده شده، به محیط اضافه نمایید.
- روغن معدنی (یا پارافین مایع) را در اون استریل نمایید.
- میکروارگانیسم مورد نظر را روی سطح محیط کشت دهید و در شرایط مناسب برای هر میکروارگانیسم انکوبه نمایید.
- بعد از اطمینان از وجود رشد کافی، روغن استریل را به مقدار ۱ ml روی سطح محیط بریزید، به گونه ای که سطح شیبدار محیط را بپوشاند.
- لوله ها را با رعایت شرایط ایمنی در دمای اتاق نگهداری کنید.
- در صورت نیاز به کشت مجدد سویه، با لوپ استریل از قسمت زیرین روغن برداشته و روی محیط آگار خوندار یا شکلاته کشت دهید.
- از لوله ذخیره بعد از ۶-۱۲ ماه تجدید کشت نمایید.

ج) نگهداری در دمای اتاق با کشت در محیط TSA:

- این روش فقط برای باکتری هایی که سخت رشد نیستند، مانند استافیلوکوک و انتروباکتریاسه به کار می رود.
- محیط کشت آگار بدون کربوهیدرات را با عمق زیاد در لوله شیشه ای درپیچ دار تهیه کنید. محیط Tryptic Soy Agar (TSA) پیشنهاد می شود.
- باکتری را به صورت کشت عمقی در این محیط تلقیح کنید.
- محیط را به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در دمای $36 \pm 1^{\circ} \text{C}$ انکوبه نمایید.
- سپس لوله درپیچ دار را در پارافین مذاب فرو ببرید، که کاملاً در لوله را بپوشاند.
- لوله ها را با رعایت شرایط ایمنی در دمای اتاق نگهداری کنید.
- از لوله ذخیره بعد از ۶-۱۲ ماه تجدید کشت نمایید.

صفحه 4 از 6	آزمایشگاه رفرانس بخش میکروب شناسی	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	نگهداری و استفاده از سویه های باکتریایی به روش طولانی مدت و کوتاه مدت	

(B) نگهداری کوتاه مدت (کمتر از یک سال):

الف) کشت در محیط CTA برای نیسریا و استرپتوکوک:

- محیط کشت Cystine Tryptic Agar (CTA) به اضافه ۱ mL سرم استریل اسب را با عمق زیاد در لوله شیشه ای در پیچ دار تهیه کنید.
- سویه نیسریا یا استرپتوکوک را به طور عمقی در این محیط کشت دهید.
- محیط را به مدت ۲۴-۷۲ ساعت در دمای $36 \pm 1^{\circ} \text{C}$ و $5\% \text{CO}_2$ انکوبه نمایید.
- سپس لوله در پیچ دار را در پارافین مذاب فرو ببرید، که کاملاً در لوله را بپوشاند.
- برای نیسریاها لوله را در 35°C نگهداری کنید و هر دو هفته یکبار تجدید کشت نمایید. برای استرپتوکوک ها لوله را با رعایت شرایط ایمنی در دمای اتاق نگهداری کرده و هر ماه تجدید کشت کنید.

ب) کشت در محیط Cooked Meat برای باکتری های بی هوازی:

- محیط Cooked Meat را در لوله های شیشه ای در پیچ دار تهیه کنید.
- باکتری را در این محیط تلقیح کنید.
- محیط را به مدت ۲۴-۷۲ ساعت در دمای $36 \pm 1^{\circ} \text{C}$ انکوبه نمایید.
- لوله ها را با رعایت شرایط ایمنی در دمای اتاق نگهداری کنید.
- هر دو ماه یکبار تجدید کشت نمایید.

ج) کشت در TSA (Tryptic Soy Agar) برای باکتری های با رشد سریع:

- باکتری مورد نظر را در سطح محیط TSA لوله ای در پیچ دار کشت دهید.
- محیط را به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در دمای $36 \pm 1^{\circ} \text{C}$ انکوبه نمایید.
- پس از رشد کامل، لوله را در یخچال نگهداری کنید.
- هر ۲-۴ هفته یکبار تجدید کشت نمایید.

د) کشت در Sheep Blood Agar (آگار خوندار) برای استرپتوکوک ها:

- سویه مورد نظر را در سطح محیط آگار خوندار لوله ای در پیچ دار کشت دهید.
- محیط را به مدت ۲۴-۷۲ ساعت در دمای $36 \pm 1^{\circ} \text{C}$ انکوبه نمایید.
- پس از رشد کامل، لوله را در یخچال نگهداری کنید.
- هر دو هفته یکبار تجدید کشت نمایید.

ه) کشت در Chocolate Agar (شکلات آگار) برای مننگوکک و هموفیلوس:

- سویه مورد نظر را در سطح محیط شکلات آگار لوله ای یا پلیتی کشت دهید.
- لوله یا پلیت را به مدت ۲۴-۷۲ ساعت در $36 \pm 1^{\circ} \text{C}$ انکوبه کنید.
- لوله یا پلیت را بعد از رشد در حرارت اتاق نگهداری کنید.
- هر دو هفته یکبار تجدید کشت نمایید.

صفحه 5 از 6	آزمایشگاه رفرانس بخش میکروب شناسی	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	نگهداری و استفاده از سویه های باکتریایی به روش طولانی مدت و کوتاه مدت	

(و) کشت در Chocolate Agar برای گونوکک:

- سویه مورد نظر را در سطح محیط شکلات آگار پلیتی یا شیبدار لوله ای کشت دهید.
- لوله یا پلیت را به مدت ۲۴-۷۲ ساعت در $36 \pm 1^{\circ} \text{C}$ انکوبه کنید.
- پس از این مدت، لوله یا پلیت را مجدداً در این درجه حرارت ($36 \pm 1^{\circ} \text{C}$) نگهداری نمایید.
- هر دو روز یکبار تجدید کشت کنید.

۵- منابع:

1. Quality Control for Commerically Prepared Microbiological Culture Media- Approved Standard, Third Edition; M22-A3, Vol. 24 No. 19, June 2004
2. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests- Approved Standard, Eleventh Edition; M02-A11, Vol. 32 No. 1, January 2012
3. Clinical Microbiology Procedures Handbook, second edition update, Garcia, Lynne S. & Isenberg, Henry D., 2007
4. Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology World Health Organization Geneva, 1991