


<p>کد: W-LM39/00</p> <p>صفحه 1 از 4</p>	<p style="text-align: center;"><b>دستورالعمل</b></p> <p style="text-align: center;"><b>نگهداری و استفاده از سو ش های میکربی ذخیره به روش طولانی مدت و کوتاه مدت</b></p>	 <p style="text-align: center;">آزمایشگاه مرجع سلامت</p>
---	---	---

#### ۱- هدف :

- نگهداری و استفاده از کشت های ذخیره به روش طولانی مدت و کوتاه مدت به شیوه ای همگون در بخش میکروب شناسی آزمایشگاه
- نگهداری کشت های ذخیره که برای اهداف کنترل کیفی استفاده می شوند، باید به روشی استاندارد شود که احتمال آلوده شدن یا تغییرات خصوصیات کشت به حداقل برسد.

#### ۴- مواد و ابزار لازم :

نیاز به موارد زیر با توجه به نوع سویه مورد نظر جهت ذخیره سازی تعیین میگردد .

- گلیسرول استریل
- کشت خالص میکروب روی محیط جامد مناسب
- لوله های شیشه ای یا پلاستیکی کوچک دریچ دار استریل
- محیط کشت هارت اینفیوژن آگار خون دار لوله ای دریچ دار
- روغن معدنی (یا پارافین) استریل
- محیط کشت Cooked Meat لوله ای دریچ دار
- محیط کشت شکلات آگار لوله ای (Slant) دریچ دار
- یخچال
- دیپ فریزر  $70^{\circ}\text{C}$  یا فریزر  $20^{\circ}\text{C}$
- پلیت TSA خون دار
- یک محیط محافظت کننده از سرما مانند TSB یا Skim milk حاوی ۱۵ - ۱۰٪ گلیسرول
- استاندارد نیم ویک مک فارلند

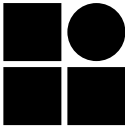
#### ۵- روش انجام آزمایش:

##### A) نگهداری طولانی مدت :

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، لیوفیلیزاسیون و نگهداری در  $50^{\circ}\text{C}$  تا  $70^{\circ}\text{C}$  یا پایین تر در دیپ فریزر یا در نیتروژن مایع می باشد. با این حال در صورت عدم دسترسی به فریزر با برودت فوق میتوان از فریزرهای خانگی با برودت  $20^{\circ}\text{C}$  استفاده نمود. فقط بایستی توجه داشت در سرمای  $20^{\circ}\text{C}$  احتمال از بین رفتن باکتری ها بیشتر است .

##### الف - استفاده از گلیسرول در فریزر $20^{\circ}\text{C}$ یا دیپ فریزر ( $70^{\circ}\text{C}$ یا پایین تر)


برای تهیه سوسپانسیون از باکتری مورد نظر اولیه که ممکن است به صورت لیوفیلیزه از یک منبع تجاری مانند ATCC تهیه شود، باید مطابق دستورات سازنده عمل شود.

<p>کد: W-LM39/00</p> <p>صفحه 2 از 4</p>	<p style="text-align: center;"><b>دستورالعمل</b></p> <p style="text-align: center;"><b>نگهداری و استفاده از سو ش های میکربی ذخیره</b></p> <p style="text-align: center;"><b>به روش طولانی مدت و کوتاه مدت</b></p>	 <p style="text-align: center;">آزمایشگاه مرجع سلامت</p>
---	---	---

- با استفاده از یک لوپ استریل، دو یا سه پلیت TSA با ۵٪ خون گوسفند را با این سوسپانسیون تلقیح کنید. این پلیت ها را به مدت ۲۴ - ۱۸ ساعت در محیط و دمای توصیه شده مناسب برای هر باکتری انکوبه نمایید.
  - بعد از انکوباسیون، خالص بودن کلنی ها باید چک شده و مورفولوژی کلنی ها بررسی شود و در صورت نیاز، آزمایش های شیمیایی انجام گیرد. از نواحی از پلیت که رشد زیادی دارد، تعدادی کلنی برداشته و در ۵۰ - ۱۰۰ ml از یک محیط محافظت کننده از سرما (Cryoprotective) سوسپانسیون نمایید. محیط محافظت کننده ممکن است خون گوسفند یا خرگوش دفیبرینه، Skim milk یا TSB حاوی گلیسرول در غلظت نهایی ۱۵ - ۱۰٪ باشد.
  - حجم کمی (۱ - ۰/۵ ml) از سوسپانسیون باکتریایی را در ویال های شیشه ای یا پلاستیکی کوچک توزیع کنید. تعداد کافی ویال ذخیره کشت به مدت یک سال آماده نمایید. قبل از این که ویال ها برای آزمایش کنترل کیفیت به کار برده شوند، خالص بودن آنها باید کنترل شود.
  - ویال ها را می توان در دمای کمتر از  $70^{\circ}\text{C}$  به مدت زیادی نگهداری نمود. نگهداری در دمای  $50^{\circ}\text{C}$  تا  $70^{\circ}\text{C}$  برای یک سال و نگهداری سویه ها در دمای  $20^{\circ}\text{C}$  به مدت کوتاهی امکان پذیر خواهد بود.
  - هنگام نیاز، یک ویال از فریزر یا تانک نیتروژن مایع در آورده و سریع محتویات آن را زیر آب جاری ولرم ذوب نمایید. محتویات ویال یا برای شروع انجام آزمایش و یا برای تهیه کنترل کاری (Working Control) به کار می رود. سوسپانسیون استفاده شده باید دور انداخته شود، هرگز برای استفاده بعدی آنها را دوباره فریز نکنید.
- کشت های کنترل کاری (Working Control):** عبارتست از کشت مجدد از کشت ذخیره فریز شده که برای کنترل کیفیت محیط های کشت استفاده می شود.
- تا ۳ کشت مجدد پشت سرهم از کشت ذخیره فریز شده می توان انجام داد. بعد از انجام حداکثر ۳ کشت مجدد پشت سرهم، آن را با یک کشت ذخیره فریز شده دیگر جایگزین کنید. کشتهای مجدد پشت سرهم به تعداد بیشتر، ریسک تغییرات فنوتیپی باکتری را افزایش می دهد.
  - برای تهیه کشت کنترل کاری (Working Control)، یک آگار شیب دار یا پلیت را با کشت ذخیره فریز شده تلقیح کنید و آن را به مدت یک شبانه روز یا تا زمانی که رشد مناسبی به دست آید، انکوبه نمایید. این کشت های پلیت یا آگار شیب دار کنترل کاری (Working Control) را می توان در  $8^{\circ}\text{C}$  -  $2^{\circ}\text{C}$  یا در حرارت اتاق تا مدت ۴ هفته نگهداری نمود. بعد از هر ساب کالچر، خالص بودن و مورفولوژی کلنی ها باید کنترل شود.

**( ب ) استفاده از روغن معدنی در حرارت اتاق :**

- محیط کشت برین هارت اینفیوژن آگار را با شیب کم در لوله تهیه نمایید. برای باکتری های مشکل پسند، به محیط، خون تازه یا خون حرارت داده شده، اضافه نمایید.

<p>کد: W-LM39/00</p> <p>صفحه 3 از 4</p>	<p style="text-align: center;"><b>دستورالعمل</b></p> <p style="text-align: center;"><b>نگهداری و استفاده از سوش های میکربی ذخیره</b></p> <p style="text-align: center;"><b>به روش طولانی مدت و کوتاه مدت</b></p>	 <p style="text-align: center;">آزمایشگاه مرجع سلامت</p>
---	--	---

- سپس روغن معدنی (یا پارافین مایع) را در حرارت خشک (۱۷۰ درجه به مدت یک ساعت) استریل نمایید.
- از میکروب مورد نظر روی سطح محیط، کشت دهید.
- بعد از بدست آوردن رشد کافی روغن استریل را به مقدار ۱<sup>cc</sup> روی سطح محیط بریزید.
- در صورت انجام کشت مجدد، نمونه از قسمت زیرین روغن برداشته می شود.
- بعد از ۱۲ - ۶ ماه کشت مجدد تهیه نمایید.

### ج) کشت عمقی و نگهداری در حرارت اتاق :

این روش فقط برای باکتری هایی که مشکل پسند نیستند، مانند استافیلوکوک و انترباکتریاسه ها به کار می رود.


- محیط کشت آگار بدون کربوهیدرات مانند محیط TSA را با عمق زیاد در لوله، تهیه کنید.
- باکتری را به صورت عمیق (کشت عمقی) در این محیط تلقیح کنید.
- این محیط را ۲۴ ساعت در اتوو ۳۵°C نگهداری نمایید.
- در لوله را با درپیچ یا چوب پنبه ببندید.
- سپس لوله درپیچ دار را در پارافین مذاب فرو ببرید، طوری که کاملاً در لوله را بپوشاند.
- کشت ها را در حرارت اتاق نگهداری کنید.
- هر ساله سوش مورد نظر را مجدداً کشت دهید.

### د) کشت عمقی روی محیط سیستین تریپتیکس آگار (CTA) برای نیسریا و استرپتوکوک :

- محیط پایه ای CTA را در لوله تهیه نمایید.
- باکتری را به طور عمقی در این محیط کشت دهید.
- محیط را به مدت ۲۴ ساعت در اتوو ۳۵°C نگهداری کنید.
- در لوله را با چوب پنبه یا درپیچ ببندید.
- سپس لوله درپیچ دار را در پارافین مذاب فرو ببرید، طوری که کاملاً در لوله را بپوشاند.
- برای نیسریاها لوله را در ۳۵°C نگهداری کنید و هر دو هفته یکبار مجدداً کشت دهید. برای استرپتوکوک ها لوله را در حرارت اتاق نگهداری کرده و هر ماه مجدداً کشت دهید.

### ه) محیط کشت Cooked Meat برای باکتری های بیهوازی :

- باکتری را در لوله های حاوی محیط Cooked Meat کشت دهید.
- لوله را به مدت ۲۴ ساعت در اتوو ۳۵°C قرار دهید.
- در لوله ها را با درپیچ یا چوب پنبه ببندید.
- لوله ها را در حرارت اتاق نگهداری کنید.
- هر ۲ ماه یک بار مجدداً کشت دهید.

<p>کد: W-LM39/00</p> <p>صفحه 4 از 4</p>	<p style="text-align: center;"><b>دستورالعمل</b></p> <p style="text-align: center;"><b>نگهداری و استفاده از سوش های میکربی ذخیره به روش طولانی مدت و کوتاه مدت</b></p>	 <p style="text-align: center;">آزمایشگاه مرجع سلامت</p>
---	--	---

### **(B) نگهداری کوتاه مدت :**

کشت هایی که برای کارهای روتین روزانه استفاده می شوند به روش های زیر نگهداری می شوند :

#### **الف - برای باکتری های با رشد سریع :**

- سوش مورد نظر را در سطح محیط TSA لوله ای در پیچ دار کشت دهید.
- لوله را به مدت ۲۴ ساعت در اتوو  $35^{\circ}\text{C}$  انکوبه کنید.
- پس از رشد کامل، لوله را در یخچال نگهداری نمایید.
- هر ۲ هفته یک بار مجددا کشت دهید.

#### **ب - استرپتوکوک ها :**

- سوش مورد نظر را در سطح محیط بلاد آگار لوله ای در پیچ دار کشت دهید.
- لوله را به مدت ۲۴ ساعت در  $35^{\circ}\text{C}$  انکوبه کنید.
- پس از رشد لوله را در یخچال نگهداری کنید.
- هر ۲ هفته یک بار مجددا کشت دهید.

#### **ج - مننگوکک، هموفیلوس :**

- سوش مورد نظر را در سطح محیط شکلات آگار لوله ای یا پلیتی کشت دهید.
- لوله یا پلیت را به مدت ۲۴ ساعت در  $35^{\circ}\text{C}$  انکوبه کنید و بعد از رشد در حرارت اتاق نگهداری کنید.
- هر ۲ هفته یک بار مجددا کشت دهید.

#### **د - گنوکک :**

- سوش مورد نظر را روی شکلات آگار کشت دهید.
- به مدت ۲۴ ساعت در  $35^{\circ}\text{C}$  انکوبه کنید.
- نمونه کشت داده شده را پس از این مدت نیز ، در این درجه حرارت ( $35^{\circ}\text{C}$ ) نگهداری نمایید.
- هر ۲ روز یک بار تجدید کشت کنید.