

## نگهداری و استفاده از سویه‌های باکتریایی

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  $-70^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد یا پایین تر (در دیپ فریز یا در نیتروژن مایع) می‌باشد.

### ۱- نگهداری در دیپ فریز ( $-50^{\circ}\text{C}$ تا $-70^{\circ}\text{C}$ 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  $\text{CO}_2$  برای هر باکتری انکوبه نمایید. بعد از انکوباسیون، خالص بودن و مورفولوژی کلنی‌ها را بررسی نموده و در صورت نیاز، تست‌های بیوشیمیایی آنرا انجام دهید. سپس از باکتری رشد یافته، سوسپانسیون غلیظی در ۱۰۰-۵۰ 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  $-50^{\circ}\text{C}$  تا  $-70^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد به مدت یکسال نگهداری نمود. در صورت عدم دسترسی به فریزر  $-70^{\circ}\text{C}$  درجه می‌توان سویه‌های با رشد سریع را در فریزر  $-20^{\circ}\text{C}$  درجه نیز نگهداری نمود. در این شرایط توجه به نکات زیر ضروری است.

سویه‌های سخت رشد مانند هموفیلوس انفلوانزا و نیسریا گنوره در این دما قابل نگهداری نمی‌باشند و باید در فریزر  $-70^{\circ}\text{C}$  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 ۱۸-۲۴ 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 بهیچوجه مجددا فریز نگردد.

کشتهای **working control** : عبارتست 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 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 نمایید.
- ۲- باکتری را بصورت کشت عمقی در در این محیط تلقیح نمایید.
- ۳- این محیط را ۲۴ ساعت در 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 تریپتیکیس آگار (CTA) برای نیسریا و استرپتوکوک

:

- ۱- محیط CTA را در لوله تهیه نمایید .
- ۲- باکتری را بطو عمقی در این محیط کشت دهید.
- 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 اتو ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.
- ۳- پس از رشد کامل، لوله را در یخچال نگهداری کنید
- ۴- هر ماه کشت را تجدید نمایید.

### § استرپتوکوکها

- ۱- سوش مورد نظر را در سطح آگار خوندار شیب‌دار (لوله‌ای در پیچ‌دار) 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.

## تهیه کدورت نیم‌مکفارلند

برای استاندارد کردن غلظت تلقیح برای آزمایش تعیین حساسیت، باید از استاندارد سولفات باریم (BaSo4) که برای تهیه آن به روش زیر عمل می‌شود ، استفاده نمود.

۰/۵ میلی‌لیتر از کلرور باریم (BaCl2) 0.048 mol/L ( W/V BaCl<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O 1.175% ) را به ۹۹ /۵

میلی‌لیتر اسید سولفوریک 0.18 mol/L (1% V/V) اضافه کنید و با هم زدن مداوم یک سوسپانسیون تهیه نمایید.

چگالی صحیح استاندارد با تعیین جذب این سوسپانسیون توسط اسپکتروفتومتر در کووت به قطر ۱ سانتی‌متر تعیین می‌شود. جذب در ۶۲۵ نانومتر باید بین ۰/۰۸ تا ۰/۱۳ باشد.

از سوسپانسیون حاصله ۴-۶ میلی لیتر در لوله‌های در پیچدار هم اندازه با لوله‌های سوسپانسیون باکتریایی ریخته می‌شود.

در لوله‌ها محکم بسته شده و در دمای اتاق نگهداری می‌شوند.

قبل از هر بار استفاده ، استاندارد با ورتکس مکانیکی به شدت همزده می‌شوند تا کدورت یکنواختی بدست آید. در صورت مشاهده ذرات بزرگ ، باید استاندارد تازه‌ای جایگزین شود.

استاندارد سولفات باریم ، باید بصورت ماهانه جایگزین گردیده یا جذب آن اندازه‌گیری شود.

## کنترل کیفیت دیسک های آنتی بیوتیک جهت انجام آزمایش تعیین حساسیت میکروبی به روش *disk diffusion agar*

### هدف

هدف از برنامه کنترل کیفی پایش و ارزیابی موارد زیر می باشد :

- صحت و دقت روش انجام آزمایش تعیین حساسیت
  - مواد و وسایل به کار برده شده در این آزمایش
  - عملکرد افرادی که آزمایش را انجام داده و نتایج بدست آمده را قرائت می نمایند.
- به منظور دست یابی بهینه به این اهداف در دسترس داشتن سویه های کنترل کیفی تهیه شده از مراکز معتبر ضروری است .

سویه های کنترل کیفی پیشنهادی توسط CLSI عبارتند از:

*Enterococcus faecalis* ATCC 29212

*Escherichia coli* ATCC 25922

*Escherichia coli* ATCC 35218

*Haemophilus influenzae* ATCC 49247

*Haemophilus influenzae* ATCC 49766

*Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603

*Neisseria gonorrhoeae* ATCC 49226

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923

*Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619

*E.coli* ATCC 35218 فقط به عنوان یک میکروارگانسیم کنترلی برای ترکیبات ممانعت کننده بتالاکتاماز.

مثل ترکیبات حاوی کلوالانیک اسید، سولباکتام یا تازوباکتام پیشنهاد می شود .

*Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (یا *E.faecalis* ATCC 33186) برای ارزیابی محیط مولر

هیتون آگار با دیسک تری متوپریم / سولفامتوکسازول استفاده می شود. در محیط کشت قابل قبول ، هاله عدم رشد واضحی به قطر ۲۰ mm یا بزرگتر ایجاد می شود در حالیکه در محیطهای کشت غیر قابل قبول ، هاله عدم رشد ایجاد نمی شود یا در داخل هاله ، رشد کم مشاهده می شود و یا هاله ای با قطر کمتر از ۲۰ mm ایجاد میگردد. این کار به منظور بررسی مقادیر غیر قابل قبول تیمیدین در محیط کشت مزبور است .

*Enterococcus faecalis* ATCC 29212 همچنین برای کنترل دیسکهای آمینو گلیکوزید با دوز بالا به

کار می رود.

*Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 به عنوان یک سویه کنترلی برای آزمایشات ESBL به کار

برده می شود .

### کنترل کیفیت قطر هاله عدم رشد سویه کنترلی / دیسک آنتی بیوتیکی

سویه های کنترل کیفی را باید به روش استاندارد آزمایش *disk diffusion* و با استفاده از همان مواد و روشی که برای سویه های جدا شده از نمونه های کلینیکی استفاده می شود آزمایش و نتایج را با جداول ۳ و ۳A CLSI (ضمیمه ۳) مقایسه و بررسی نمود . محدوده قطر هاله عدم رشد قابل قبول برای هر سویه کنترلی نسبت به یک دیسک آنتی بیوتیکی در جداول فوق فهرست شده است .

چنانچه تغییر در میانگین قطر هاله عدم رشد ناشی از خطا در روش انجام آزمایش نباشد ، احتمالاً ناشی از تغییر در حساسیت ذاتی باکتری نسبت به آن آنتی بیوتیک می باشد. در این صورت لازم است کشت تازه از سوش کنترل تهیه شود .

### آزمایش کنترل کیفیت را باید در چه فواصل زمانی انجام داد ؟

الف \_ انجام آزمایش روزانه

برای هر سویه کنترلی با یک دیسک آنتی بیوتیکی باید ۲۰ روز متوالی آزمایش تعیین حساسیت انجام و نتایج با مقادیر قابل قبول اشاره شده در جداول فوق مقایسه گردد . بر اساس ضریب اطمینان ۹۵٪ تنها یک مورد از ۲۰ نتیجه قرائت شده می تواند خارج از محدوده کنترل باشد ( به ضمیمه ۲ مراجعه کنید) . چنانچه بیشتر از یک مورد خارج از محدوده کنترل باشد نیاز به اقدامات اصلاحی خواهد بود ، که در ادامه توضیح داده می شود.

ب \_ انجام آزمایش هفتگی

- در صورتیکه تنها یک مورد از ۲۰ نتیجه قطر هاله عدم رشد برای هر سوپه کنترلی / دیسک آنتی بیوتیکی خارج از محدوده قابل قبول مندرج در جداول ۳ و ۳A (ضمیمه ۳) قرار گیرد ، کنترل کیفی روزانه را به هفتگی تغییر دهید (به ضمیمه ۲ مراجعه کنید) .

- آزمایش کنترل کیفی هفتگی را یکبار در هفته و هم چنین زمانیکه یکی از عوامل آزمایش (مانند سری ساخت آگار یا دیسکهای تهیه شده از یک سازنده) تغییر کند، انجام دهید .

اگر هر یک از نتایج کنترل کیفی هفتگی خارج از محدوده قابل قبول باشد ، انجام اقدامات اصلاحی مورد نیاز است .

### اقدامات اصلاحی ( Corrective actions )

الف \_ نتایج خارج از محدوده قابل قبول به دلیل خطاهای مشهود و واضح شامل:

- استفاده از دیسک اشتباه
  - استفاده از سوپه کنترلی اشتباه
  - آلودگی واضح سوپه
  - استفاده غیرعمدی از دما و شرایط اشتباه انکوباسیون
- بوجود آمده است . دراین حال باید دلیل ایجاد خطا مکتوب و پس از اصلاح آزمایش دوباره تکرار شود . اگر نتایج گزارش شده در محدوده مورد نظر قرار گرفت ، عملیات اصلاحی بیشتری مورد نیاز نمی باشد .
- ب \_ عامل ایجاد نتایج خارج از محدوده کنترل نامشخص است. در این حال باید اقدامات اصلاحی فوری بشرح زیر انجام شود.
- آزمایش را جهت یک سوپه کنترلی / دیسک آنتی بیوتیکی برای ۵ روز متوالی تکرار و همه نتایج را ثبت کنید .
  - اگر اندازه هر ۵ قطر هاله مطابق جداول ۳ و ۳A (ضمیمه ۳) و در محدوده قابل قبول باشد ، عملیات اصلاحی بیشتری مورد نیاز نمی باشد .
  - اگر اندازه هر یک از ۵ قطر هاله عدم رشد خارج از محدوده قابل قبول باشد ، به عملیات اصلاحی اضافی نیاز است .
  - آزمایشهای کنترلی روزانه باید ادامه داده شود تا به دلیل نهای مشکلی برده شود .

### عملیات اصلاحی اضافی :

- وقتی عملیات اصلاحی فوری مشکل را حل نکرد ، احتمالاً "خطای مشاهده شده بعلت بروز یک اشکال کلی در سیستم و نه یک خطای تصادفی ایجاد شده است . در این حالت باید موارد بیشتری بررسی شوند.مانند:
- اندازه گیری و ثبت صحیح قطر هاله های عدم رشد
  - رعایت تاریخ انقضا و شرایط نگهداری دیسکها و مواد مورد استفاده ( دور از رطوبت و در دمای مناسب)

- مناسب بودن دما و اتمسفر انکوباتور
- تغییر نیافتن یا آلوده نبودن سویه های کنترل
- مطابقت صحیح سوسپانسیون تلقیح با استاندارد نیم مک فارلند
- استفاده از پلیت کشت تازه برای تلقیح ( پلیت کشت باید تازه بوده و مدت زمان انکوباسیون آن بیشتر از ۲۴ ساعت ، نباشد. )

وقتی مشکل بر طرف شد ، می توان کنترل کیفی هفتگی را برقرار کرد.

### نگهداری دیسکهای آنتی بیوتیکی

- دیسکها باید در یخچال  $8^{\circ}\text{C}$  و پایین تر ، یا در فریزر  $14^{\circ}\text{C}$  - و پایین تر تا زمان مصرف نگهداری شوند.
- تمامی دیسکهای گروه بتالاکتام مانند پنی سیلین ، آمپی سیلین ، کربنی سیلین ، تیکارسیلین ، اگزاسیلین و نسل اول ، دوم و سوم سفالوسپورین ها و ... باید در فریزر نگهداری شوند ، و فقط می توان مقداری از آن را بر اساس کار روزانه آزمایشگاه حداکثر به مدت یک هفته در یخچال نگهداری نمود .
- بعضی آنتی بیوتیکهای حساس مثل ایمپنم ، سفاکلر و ترکیبات کلانولانیک اسید یا سولباکتام اگر تا هنگام مصرف در فریزر نگهداری شوند ، پایداری بیشتری خواهند داشت .
- دیسکها باید در ظروف دارای درپوش محکم و حاوی مواد جاذب رطوبت نگهداری شوند .
- دیسکهای آنتی بیوتیکی باید یک تا دو ساعت قبل از استفاده از یخچال یا فریزر خارج شوند تا به درجه حرارت اتاق برسند .