9. **انجام و گزارش کشت**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **اسم آزمایشگاه:** | {{LabName}} | |
| **اسم سند:** | **دستورالعمل نحوه انجام و گزارش کشت کمی و نیمه کمی برای هر نمونه میکروبی** | |
| **کد سند:** | D-004-0009 | |
| **دسته بندی سند:** | دستورالعمل های مدیریت و پردازش نمونه های میکروبی | |
| **شماره ویرایش:** | {{EditeNumber}} | |
| **تاریخ ویرایش:** | {{EditeNumber}} | |
| **تاریخ بازنگری سند:** | {{ReviewDate}} | |
| **تهیه کننده:** | **تایید کننده:** | **تصدیق و امضاء :** |
| شرکت دارا ویرا آزما  دکتر داریوش شکری | {{ConfirmerOneName}} | {{ConfirmerTwoName}} |

**(1) هدف:**

در این دستورالعمل نحوه انجام کشت برای نمونه های مختلف میکروبی شامل نحوه انجام و گزارش کشت کمی و نیمه کمی و همچنین دستورالعمل کشت نمونه های غیرمعمول آمده است.

**(2) مسئولیت ها:**

مسئولیت انجام و گزارش کشت کمی و نیمه کمی برای هر نمونه میکروبی با پرسنل بخش میکروب شناسی می باشد.

**(3) تعاریف و اصطلاحات:**

* **کلنی کانت** (colony count): میکروارگانیسم ها در محیط کشت به همان نسبت یا غلظتی که در نمونه بالینی حضور دارند رشد می کنند، بنابراین بعد از کشت و رشد باکتریها، گزارش تعداد رشد کرده آنها که به عنوان کلنی کانت (colony count) نامیده می شود، در محیط کشت در صورت عدم غنی سازی آنها می تواند معیار مستقیمی از تعداد موجود در نمونه بالینی باشد.
* تعداد باکتری رشد کرده باید در گزارشات باکتری به صورت کمی یا نیمه کمی (بسته به نوع کشت) آورده شود و در تفسیر کشت های مختلف دارای اهمیت ویژه ای است.
* **روش کشت خطی (استریک:** Streak Plate Method**):** نمونه ها را می توان به صورت دستی با روش کشت خطی (استریک) برای تخمین تعداد باکتری ها به پلیت های آگار تلقیح کرد. این نیمه کمی‌سازی، کشت خطی برای جداسازی نامیده می‌شود، زیرا میکروارگانیسم‌های موجود در نمونه به ‌طور متوالی در یک چهارم پلیت رقیق می‌شوند، تا در نهایت هر مورفوتیپ به عنوان یک کلنی منفرد به دست بیاید.
* کشت خطی به صورت عمومی برای اکثر نمونه ها مفید است و تعداد نسبی ارگانیسم ها را می توان بر اساس میزان رشد فراتر از ناحیه اصلی تلقیح تخمین زد.
* همچنین انواع تلقیح کننده های خودکار نیز موجود است.

**(4) شرح دستورالعمل:**

* نمونه ها را می توان 1) به صورت کمی (روش رقیق سازی یا با استفاده از یک لوپ کالیبره) یا 2) به صورت نیمه کمی با استفاده از یک لوپ معمولی روی محیط جامد کشت داد (تلقیح کرد).

**1) نحوه انجام و گزارش کشت نیمه کمی**

* انجام کشت نیمه کمی برای نمونه های نقاط آناتومیک حاوی نرمال فلور مثل گلو، بینی، واژن، مجرا، گوش، چشم و زخم برای جداسازی کلنی های بیماریزا از کلنی های این فلور طبیعی بسیار مفید است.

**نحوه انجام کشت خطی:** نمونه با غلتاندن سواب یا قرار دادن یک قطره نمونه مایع روی ناحیه کوچکی در لبه پلیت به اندازه یک چهارم کشت می شود. سپس کشت خطی در چهار ناحیه پلیت انجام می شود. بعد از هر یک ربع کشت باید لوپ استریل شود (4 بار). این کار از تلقیح بیش از حد محیط جلوگیری می کند و تضمین می کند که تک کلنی به دست می آید. اگر بیشتر از 4 بار کشت خطی در پلیت انجام می دهید دیگر نیازی به استریل کردن نیست.

تعداد ارگانیسم های موجود را می توان به صورت زیر گزارش نیمه کمی داد:

* 3+ تا 4+ (یا رشد سنگین یا زیاد: Many یا Heavy): اگر رشد باکتری ها تا ربع سوم و چهارم گسترش یافته باشد.
* 2+ (یا رشد متوسط:Moderate): اگر رشد باکتری ها تا ربع دوم گسترش یافته باشد.
* 1+ (یا رشد کم:Light یا Few): اگر رشد باکتری ها فقط در ربع اول گسترش یافته باشد.

جدول 1 روش دیگر درجه بندی نیمه کمی و گزارش برای جدایه های باکتریایی در محیط رشد را نشان می دهد. این یک دستورالعمل کلی است. آزمایشگاه ها ممکن است در روش های مورد استفاده برای کمیت متفاوت باشند.

جدول 1. روش دیگر درجه بندی نیمه کمی و گزارش برای جدایه های باکتریایی در محیط رشد.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **تعداد کلنی های قابل مشاهده در هر ربع** | | | | |
| درجه | | (ربع اول کشت) 1 | ( ربع دوم کشت) 2 | (ربع سوم کشت) 3 | ( ربع چهارم کشت) 4 |
| Rare | 1+ | کمتر از 10 کلنی |  |  |  |
| Few | 2+ | کمتر از 10 کلنی | کمتر از 10 کلنی |  |  |
| Moderate | 3+ | بیشتر از 10 کلنی | بیشتر از 10 کلنی | کمتر از 10 کلنی |  |
| Many | 4+ | بیشتر از 10 کلنی | بیشتر از 10 کلنی | بیشتر از 10 کلنی | بیشتر از 5 کلنی |

**2) نحوه انجام و گزارش کشت کمی**

* کشت های ادرار، بافت سوختگی (و کلاً بافت) و نمونه های تنفسی برونشیال و بال با شمارش دقیق کلنی های رشد کرده و گزارش برحسب میزان عفونت در هر میلی لیتر به صورت CFU/mL (در مورد زخم و سوختگی به صورت CFU در هر گرم بافت) گزارش می شوند.
* پلیت ها برای کمی سازی معمولاً با یک لوپ کالیبره 1:100 یا 1:1000 کشت می شوند.
* برای کشت ادرار و نمونه تنفسی یک لوپ پر از نمونه برداشت شده و در وسط پلیت قرار داده و سپس به صورت یک خط صاف سرتاسر طول پلیت را تلقیح اولیه انجام می دهیم و با همان لوپ بدون استریل کردن به صورت زیگزاگی عمود بر خط اولیه سرتاسر پلیت را کشت می دهیم.
* برای گزارش کلنی کانت، تعداد کلني هاي محيط کشت را شمارش کرده و در ضريب حجم لوپ (عکس ضريب رقت) ضرب مي کنیم. نتيجه به صورت واحد کلنی تشکیل شده در ميلي ليتر نمونه بيان مي شود (CFU/mL).
* هنگامي که تعداد کلني ها غيرقابل شمارش است باید تعداد را به صورت بيشتر از 105 در CFU/mL گزارش کرد.
* در مواردي که تعداد کلني ها کمتر از 105 عدد است و از طرفي تعداد کلني ها به اندازه اي زياد است که شمارش آنها سخت است، مي توان از يک کاغذ مشبک که پشت آن را مي توان ديد استفاده کرد و به صورت ناحيه اي کلني ها را شمارش کرد. بعد از به دست آوردن تعداد نواحی و میانگین کلنی موجود در هر ناحیه، با ضرب این دو عدد به راحتی می توان تعداد تقریبی کلنی ها را به دست آورد. بعد از مسلط شدن به این روش نواحی را می توان به صورت ذهنی ترسیم کرد.

**کشت مجدد یا ساب کالچر (**sub-culture**)**

پس از آشکار شدن رشد باکتری ها در محیط های اولیه، تمام روش های بعدی برای شناسایی قطعی نیاز به استفاده از کشت های خالص (یعنی کشت های حاوی یک سویه از یک گونه) دارد. بنابراین اگر کلنی ها خالص نیستند یا مقدار باکتری خالص برای انجام تست های تکمیلی کافی نیست، باید کشت مجدد یا ساب کالچر از کشت اولیه به روش کشت خطی که در بالا توضیح داده شد به انجام برسد.

**دستورالعمل کشت نمونه های غیرمعمول**

نمونه‌های غیرمعمول ممکن است شامل نمونه پیوند ورید، کاتترهای چند لومنی (multiple-lumen catheters)، دریچه‌های قلب، محلول‌های خیساندن ایمپلنت، مواد عرقی، نمونه‌های آب و تجهیزات باشند. آزمایشگاه میکروب شناسی باید پروتکل و روش های مناسب برای پردازش این نمونه ها را ایجاد کند. نحوه پردازش برخی از این موارد در ادامه می آید.

**محلول های خیساندن ایمپلنت:** حجم زیادی از این محلول و سپس تغلیظ آن مورد نیاز است زیرا حتی یک موجود زنده ممکن است مهم باشد. به کمک یک محیط آبگوشت با تلقیح سنگین، اسمیر سیتوسانتریفیوژ و حجم زیادی از نمونه فیلتر شده که روی محیط شکلات آگار قرار می گیرد، باید امکان تشخیص تعداد کم موجودات فراهم شود.

**نمونه‌های استریل آب:** آب از منابعی مانند آب دستگاه تقطیر یا آب معرف ها نیز نیاز به تغلیظ دارد. نمونه گیر یا سمپلر میلی پور (Millipore) برای این منظور طراحی شده است که آب را با فیلتر تغلیظ می کند. سانتریفیوژ نمونه هم قابل قبول است.

**نوک (تیپ) کاتتر عروقی**: نوک کاتتر عروقی برای کمک به تشخیص عفونت مرتبط با کاتتر برای کشت ارسال می شود. تکنیک رول (چرخش) یا روش ماکی (Maki) در بسیاری از آزمایشگاه ها استفاده می شود. با استفاده از پنس استریل، یک بخش 5 تا 7 سانتی متری از کاتتر چهار بار بر روی سطح پلیت آگار خوندار غلت داده می شود. در شک به باکتری های سخت رشد، شکلات آگار هم اضافه شود. پس از انکوباسیون، آزمایشگاه تست های شناسایی و حساسیت را بر روی هر ارگانیسمی که 15 کلنی یا بیشتر تولید می کند انجام می دهد.

**کاتترهای چند لومنی:** از قسمت حاوی بیوفیلم باکتری (تجمع عفونت) با قیچی استریل برش داده و به روش ماکی کشت داده می شود.

**دریچه‌های قلب**: قسمت آلوده آنها را با قیچی استریل برش داده و در قسمت اول پلیت قرار داده و با یک سوآب استریل کاملاً آن را بر روی محیط مالش می دهیم. سپس کشت خطی را به انجام می رسانیم.

**وسیله داخل رحمی (**IUD**):** این وسیله معمولاً برای تشخیص گونه های اکتینومیست کشت می شوند. رنگ آمیزی گرم از نمونه باید وجود این باکتری را مشخص کند و وسیله را می توان در یک لوله تایوگلیکولات تلقیح کرد. بعد از انکوباسیون در صورت ایجاد کدورت از نمونه بر روی محیط های شکلات آگار و بلادآگار کشت داده می شود.

**دستورالعمل انکوباسیون محیط های کشت**

* محیط های بلادآگار، مک کانکی، EMB، CLED، PEA و CNA در شرایط هوازی در انکوباتور 35 درجه به مدت اولیه 24 ساعت باید نگهداری شوند.
* محیط شکلات آگار را در داخل جار شمع دار در انکوباتور 35 درجه و در صورت داشتن انکوباتور CO2دار در دمای 35 درجه به مدت 24 ساعت اولیه نگه داری می کنیم.
* بعد از 24 ساعت ، قرائت ابتدایی پلیت ها صورت می گیرد. در صورت عدم رشد، پلیت ها باید حتماً تا 48 ساعت نگه داری شوند.
* در صورت درخواست یا شک به حضور باکتری های سخت رشد مثل نایسریا گنوره آ، گاردنرلا واژینالیس و موارد مشابه پلیت های بلاد آگار و شکلات آگار باید به مدت حداقل 4 روز تا یک هفته نگهداری و هر روز مورد بررسی قرار گیرند.
* محیط مخصوص قارچ ها مانند SDA به مدت 14 روز در دمای اتاق و محیط مخصوص مایکوباکتریوم ها مانندLJ به مدت 60 روز در انکوباتور 35 درجه با حفظ رطوبت باید نگهداری و روزانه مشاهده شوند.

**(5) ملاحظات ایمنی:**

* استفاده از وسايل حفاظت فردی مخصوصاً دستکش مقاوم و غير قابل نفوذ در زمان کشت الزامی می باشد.
* تمامی فرایندهای کشت نمونه های میکروبی باید در زیر هود بیولوژیک به انجام برسد.

**(6) محدودیت ها و تداخلات:**

شمارش کلنی ها ممکن است برای برخی از پرسنل چالش برانگیز باشد. بهتر است از شمارشگرهای کلنی که اخیراً وارد بازار شده اند و تعداد را به طور دقیق گزارش می کنند استفاده شود.

**(7) مستندات و سوابق :**

دستورالعمل های نحوه انجام کشت و گزارش کلنی کانت برای تمامی نمونه ها باید در بخش موجود باشد.

**(8) منابع**:

1. کتاب آزمایشگاه باکتری شناسی پزشکی. جلد اول: تشخیص. دکتر داریوش شکری و همکاران. انتشارات تیمورزاده نوین و کیا. 1402.
2. کتاب آزمایشگاه باکتری شناسی پزشکی. جلد دوم: تفسیر کشت. دکتر داریوش شکری و همکاران. انتشارات تیمورزاده نوین و کیا. 1402.
3. دستورالعمل مدیریت نمونه در آزمایشگاه های پزشکی. آزمایشگاه مرجع سلامت وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی. تابستان 1396.
4. Isenberg D. Henry: *Clinical Microbiology Procedures Handbook*، American Society for Microbiology. 2007.
5. Koneman، Elmer W، et al. Color Atlas and Text book of Diagnostic Microbiology. *Philedelphia: Lippincott-Raven Publishers. Seventh edition.* 2021.
6. Mahon CR, Lehman DC. Textbook of Diagnostic Microbiology-E-Book: Textbook of Diagnostic Microbiology. Elsevier Health Sciences; 2022 Nov 2.
7. Tille، Patricia. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology-e-book*. Elsevier Health Sciences، fifteenth edition. 2021.
8. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th Edition, HHS Publication No. (CDC) 21-1112, Revised December 2009.
9. Baron EJ، Thomson RB Jr: Specimen collection، transport، and processing: bacteriology. In Versalovic J، et al، editors: Manual of clinical microbiology، Ed 10، Washington، DC، 2011، ASM Press، p. 228.