**8. انتخاب محیط کشت**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **اسم آزمایشگاه:** | {{LabName}} | |
| **اسم سند:** | **دستورالعمل انتخاب محیط های کشت برای هر نمونه میکروبی** | |
| **کد سند:** | D-004-0008 | |
| **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:**

تشریح نحوه انتخاب محیط های کشت برای هر نمونه میکروبی و دستورالعمل کشت باکتری های سخت رشد و مشکل پسند.

**(2) مسئولیت ها:**

مسئولیت آماده سازی های اولیه نمونه برای لام مستقیم و کشت و ثبت مستندات آنها با پرسنل بخش میکروب شناسی می باشد.

**(3) تعاریف و اصطلاحات:**

**باکتری های سخت رشد یا مشکل پسند:** به ارگانیسم هایی گفته می شود که نیازهای غذایی پیچیده یا خاصی دارند و تنها زمانی رشد می کند که مواد مغذی خاصی در محیط آن گنجانده شود.

**(4) شرح دستورالعمل:**

**کشت باکتری های معمولی:**

* انتخاب محیط برای تلقیح هر نمونه معین معمولاً بر اساس ارگانیسم هایی است که به احتمال زیاد در روند بیماری در محل خاص عفونت دخیل هستند. به عنوان مثال، برای یک نمونه مایع مغزی-نخاعی (CSF)، محتمل‌ترین پاتوژن‌هایی که باعث مننژیت می‌شوند (استرپتوکوک پنومونیه، هموفیلوس آنفولانزا، نایسریا مننژیتیدیس، اشریشیاکلی، استرپتوکوک گروه B) را در نظر می‌گیریم و محیط هایی را انتخاب می‌کنیم که از رشد این باکتری ها حمایت کنند (حداقل بلاد آگار و شکلات آگار).
* به همین ترتیب، اگر نمونه‌ای از منبعی که احتمالاً با میکروبیوتای طبیعی آلوده است، برای مثال، اگر فیستول مقعدی (منفذی در سطح پوست در نزدیکی مقعد که ممکن است با رکتوم ارتباط برقرار کند) جمع‌آوری شود، ممکن است آزمایشگاه بخواهد یک محیط انتخابی، مانند محیط CNA، برای سرکوب باکتری های گرم منفی و امکان بازیابی باکتری های گرم مثبت و مخمر را اضافه کند. بنابراین هر نمونه میکروبی بر اساس محل جداسازی به محیط های کشت خاص خود برای کشت نیاز دارد.
* **توجه**: برای کشت تمامی نمونه ها در بخش باکتری شناسی باید از یک پلیت جداگانه برای هر بیمار استفاده شود. فقط برای کشت ادرار می توان از پليت های دو قسمتی 8 يا 10 سانتی متری حاوی بلادآگار و EMB آگار (يا به جای EMB محیط مک کانکی آگار) برای نمونه يک بيمار استفاده نمود.

در جدول 1 محیط های لازم برای هر نمونه میکروبی ذکر شده است. برای مثال طبق این جدول نمونه مایع زجاجیه به محیط کشت های بلاد آگار، شکلات آگار، مک کانکی یا EMB و محیط مایع تایوگلیکولات برای کشت نیاز دارد و باید رنگ آمیزی گرم بر روی این نمونه به انجام برسد.

جدول 1. محیط های لازم برای هر نمونه میکروبی.

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| نمونه | رنگ آمیزی گرم | آگار خون دار با خون گوسفندی | شکلات آگار | مک کانکی یا ائوزین متیلن بلو | محیط کشت بیهوازی | محیط مایع تایوگلیکولات | تایر مارتین | توضیحات |
| 1) زجاجیه/ مایع | × | × | × | × |  | × |  |  |
| ملتحمه  (Conjunctiva) | × | × | × | × |  | × |  | کشت مستقیم در محیط بلاد آگار و شکلات آگار |
| 1)زخم قرنيه | × | × | × | × |  | × |  | در تخت بیمار تلقيح در BHI 10درصد |
| 1)خون |  |  |  |  |  |  |  | بطری های کشت خون (سنتی یا اتومات) |
| مایعات بدن |  |  |  |  |  |  |  | کشت در بطری های کشت خون اگر حجم مایع کافی باشد. |
| 3-1) آمنیوتیک | × | × | × | × | × | × | × |  |
| 3-2) صفرا | × | × |  | × | × | × |  |  |
| 3-3) مغز استخوان | × | × | × |  |  | × |  |  |
| 3-4) پریکارد | × | × | × | × | × | × |  |  |
| 3-5) پریتوئن | × | × | × | × | × | × |  |  |
| 3-6) پلور | × | × | × | × |  | × |  |  |
| 3-7) سینوویال | × | × | × | × |  | × | × |  |
| 1)کاتتر |  | × |  | × |  |  |  |  |
| 1) مایع مغزی- نخاعی | × | × | × | × |  | × |  | برای رنگ­آمیزی گرم انجام سانتریفیوژ پیشنهاد می شود.   برايCSF جدا شده از شانت محيط Thio اضافه و جمع آوري در كشت خون نيز پیشنهاد |
| 1) قسمت داخلی گوش | × | × | × | × |  | × |  | براي نمونه های تیمپانوسنتز کشت بیهوازی |
| 6-1) قسمت خارجی گوش | × | × | × | × |  |  |  |  |
| 1) چشم | × | × | × | × |  |  |  |  |
| 1) دستگاه گوارش |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 8-1) آسپیره دئودنوم | × | × | × | × |  |  |  | نیازمند محیط کلمبیا-کلیستین-نالیدیکسیک اسید آگار(CNA) |

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| نمونه | رنگ آمیزی  گرم | آگار خوندار با خون گوسفندی | شکلات آگار | مک کانکی یا ائوزین متیلن بلو | محیط کشت  بیهوازی | محیط مایع تایوگلیکولات | تایر مارتین | سایر |
| 8-2) مدفوع |  | × |  | × |  |  |  | هکتون انتریک، (XLD)، محیط آگار خون دار انتخابی کمپیلوباکتر (CAMPY)، سوربیتول مک کانکی آگار (SMAC) |
| 8-3) آسپیره معده | × | × | × | × |  |  |  |  |
| 1)تناسلی |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 9-1) ابزار داخل رحمی(IUD) | × |  | × |  |  | × |  |  |
| 9-2) واژن/ دهانه رحم | × | × | × | × |  |  | × |  |
| 9-3) مجرای ادرار | × | × | × |  |  |  | × |  |
| 1)غربال گری دستگاه تناسلی |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 10-1) نایسریا گنوره |  |  | × |  |  |  | × |  |
| 10-2) استرپتوکوک گروه B |  | × |  |  |  |  |  | Lim broth و محیط Tod |
| 10-3) جراحت، زخم آبسه | × | × | × | × | × | × |  | کلمبیا- کلیستین- نالیدیکسیک اسید آگار ( CNA)، اگر میکس گرم مثبت و منفی وجود دارد، رنگ آمیزی گرم |
| 1. دستگاه تنفس: تحتانی |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 11-1) برونش(brush، شستشو، لاواژ) | × | × | × | × |  |  |  |  |
| 11-2) خلط | × | × | × | × |  |  |  |  |
| 1. دستگاه تنفس: فوقانی |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 12-1) بینی/ نازوفارنکس |  | × | × |  |  |  |  |  |
| 12-2) آسپیره سینوس | × | × | × | × | × | × |  |  |
| 12-3) گلو |  | × |  |  |  |  |  |  |
| 1. بافت | × | × | × | × | × | × |  |  |
| 1. ادرار |  | × |  | × |  |  |  |  |
| 14-1) کاتتر/ قابلیت استفاده مجدد ندارد |  | × |  | × |  |  |  |  |
| 14-2) آسپیره قسمت فوقانی دستگاه ادراری | × | × |  | × | × | × |  |  |

**دستورالعمل کشت باکتری های سخت رشد و مشکل پسند**

اگر درخواست بررسی نمونه از نظر باکتری های سخت رشد و مشکل پسند باشد باید طبق جدول 2 برای کشت نمونه اقدام نمود و به نکات مهم آن و نوع نمونه مورد نیاز توجه نمود:

جدول 2. شرایط اختصاصی باکتری های خاص.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| * نکات | * محیط کشت | * نمونه | * ارگانیسم |
| * انکوباسیون در° C 35- 37، شرایط هوازی ، نمونه 3 روز نگه داری شود. | * آگار خون دار | * خون | * باسیلوس آنتراسیس |
| * علاوه بر تلقیح نمونه. انکوباسیون در دمای ° C 35- 37، شرایط هوازی، نمونه 6-7 روز نگه داری می شود. آنتی بادی فلئورسنت مستقیم (DFA)همراه با کشت انجام می شود. | * رگان لووه، بورده ژانگو آگار | * آسیب پوستی، خلط، سواب نازوفارنکس | * بوردتلا پرتوسیس |
| * پاتوژن کلاس III، آماده سازی نمونه ها باید زیر هود و با تجهیزات محافظت کننده انجام شود. انکوباسیون در° C 35- 37، رشد بر روی اکثر محیط های تجاری در طی 7 روز می باشد. بطری های کشت خون معمولاً باید تا 30 روز نگهداری شود و کشت مجدد از آن ها باید در روز 7، 14 و 30 انجام شود. در کشت اتومات خون معمولاً کمتر از 5 روز رشد میکند. | * محیط های کشت خون تجاری | * خون | * بروسلا |
| * انکوباسیون در°C 35- 37، شرایط هوازی، تست های توکسین زایی باید برای اطمینان از پاتوژنیسته بودن ارگانیسم انجام شود. | * آگار خون دار، محیط تینسدال | * مغز استخوان، حلق | * کورینه باکتریوم دیفتریه |
| * پاتوژن کلاس III، دارای قدرت عفونت زایی قوی به وسیله آئروسل و نفوذ از طریق پوست سالم است. توصیه می شود تا نمونه ها به آزمایشگاه مرجع با تجهیزات کامل ارسال شوند. | * لوفلر آگار(اسلنت)، تینسدال یا اگار خون دار همراه با سیستین- تلوریت، آگار گلوکز- سیستین | * نازوفارنکس، پوست، چشم | * فرانسیسلا تولارنسیس |
| انکوباسیون در°C 33- 35، همراه با 5-3 % CO2 با رطوبت بالا. تا 5 روز نمونه نگهداری شود. | شکلات آگار غنی شده | آسپیره غده لنفاوی، زخم پوستی، خلط، گلو، زخم تناسلی | هموفیلوس دوکره ای |
| انکوباسیون° C 35-37، در شرایط میکروائروفیل بار طوبت بالا. نمونه تا 5 روز نگهداری شود. لام مستقیم که با نقره یا گیمسا رنگ آمیزی شده باشد در تشخیص کمک کننده است. | اسکایرو | آسپیره غده لنفاوی، بیوپسی معده | هلیکوباکتر پیلوری |
| نکوباسیون° C 35-37، در شرایط هوازی، نمونه حداقل تا 7 روز نگهداری شود. آنتی بادی مستقیم در دسترس است. | شکلات آگار، تایر مارتین اصلاح شده، عصاره بافری استخراج شده مخمر و ذغال (BCYE) | خون | لژیونلا |
| انکوباسیون در° C 33- 35، همرا ه با 5-3 % CO2، نمونه به مدت 2-3 هفته نگهداری شود. | محیط انتخابی عصاره بافری استخراج شده مخمر و ذغال ( BCYE) ، آگار خون دار | ریه، مایع پلور، خلط، مغز | نوکاردیا |
| سدیم پلی آنتول سولفونات ممانعت کننده رشد است. سیترات به عنوان آنتی کواگولانت استفاده میشود. انکوباسیون در° C 33- 35، همرا ه با 5-3 % CO2، نمونه حداقل 7 روز نگهداری می شود. | محیط سرم غنی شده، سایاروز دکستروز آگار(SDA)، آگار عصاره قلب و مغز(BHI)، عصاره بافری استخراج شده مخمر و ذغال(BCYE)، تایرمارتین(TM) | خون، خلط، آسپیره زیر جلدی، بافت | استرپتوباسیلوس مونیلی فورمیس |
| برای نمونه مدفوع محیط آگار انتخابی(TCBS) نیاز است. انکوباسیون در° C 33- 35، شرایط هوازی. نمونه ها تا 3 روز نگهداری می شود. | آگار خون دار، مک کانکی آگار، TCBS آگار، آب پپتونه آلکالینه (غنی کننده مدفوع) | غده لنفاوی، مایع مفصلی، خون، مدفوع، زخم، بافت | ویبریو |

**(5) ملاحظات ایمنی:**

کشت برخی از باکتری ها که به عنوان عوامل بیوتروریستی شناخته می شوند (شامل بوردتلا پرتوسیس، باسیلوس آنتراسیس، بروسلا و فرانسیسلا تولارنسیس) نباید در آزمایشگاه معمولی به انجام برسد و باید به آزمایشگاه مرجع با امکانات ایمنی ویژه ارسال شوند.

**(6) محدودیت ها و تداخلات:**

انجام کشت برخی از باکتری ها نیازمند محیط های اختصاصی است که معمولاً گرانقیمت هستند و به همین علت و همچنین درخواست کم، برای اکثر آزمایشگاهها به صرفه نیستند. برای این کشت ها نیز بهتر است نمونه برای آزمایشگاههای مرجع ارسال شوند.

**(7) مستندات و سوابق :**

دستورالعمل های آماده سازی های اولیه تمامی نمونه ها برای انجام لام مستقیم و کشت 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.