**1. اصول شناسایی**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **اسم آزمایشگاه:** | {{LabName}} | |
| **اسم سند:** | **اصول شناسایی باکتری ها: 1) میکروسکوپی؛ 2) کشت** | |
| **کد سند:** | D-005-0001 | |
| **دسته بندی سند:** | دستورالعمل های شناسایی باکتری ها: نمودارها و جداول تشخیصی | |
| **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:**

شناسایی باکتری ها توسط دو قسمت اصلی 1) بررسی میکروسکوپی و 2) کشت به انجام می رسد. در این دستورالعمل اصول کلی شناسایی باکتری ها با بررسی میکروسکوپی و نحوه گزارش های آن و همچنین اصول شناسایی باکتری ها با کشت، نحوه تشخیص اولیه کلنی ها و تست های لازم برای تشخیص احتمالی اولیه باکتری ها شرح داده شده است.

**(2) تعاریف و اصطلاحات:**

**شناسایی باکتری ها:** در آزمایشگاهای بالینی به کمک دو قسمت اصلی شناسایی میکروسکوپی و شناسایی به کمک کشت به انجام می رسد.

**تشخیص میکروسکوپی:** منظور استفاده از لام مستقیم برای تشخیص اولیه باکتری ها می باشد و مهمترین قسمت آن تشخیص بر اساس رنگ آميزي گرم می باشد.

**تشخیص با کشت:** بعد از کشت نمونه و رشد کلنی ها، تشخیص نهایی می تواند توسط سه روش سنتي، تست API و همچنين دستگاههای خودکار به انجام برسد.

**روش های سنتی**: همان روش هایی است که اغلب آزمایشگاهها هنوز از آن استفاده می کنند و به کمک تست های کلاسیک و بیوشیمیایی لوله ای و پلیتی شناسایی به انجام می رسد.

**تست API**: شاخص پروفایل تحلیلی (The analytical profile index) یا API طبقه بندی باکتری ها بر اساس آزمایش های بیوشیمیایی است که امکان شناسایی سریع باکتری های بالینی را فراهم کرده است. تست API یک نسخه استاندارد شده و کوچک شده از تست های بیوشیمیایی موجود است.

**دستگاههای تمام خودکار:** این دستگاه ها (مانند دستگاه Phoenix 100 شرکت BD آمریکا و دستگاه Vitec2 ساخت بیومریوکس فرانسه) بدون دخالت نیروی انسانی به صورت کاملاً اتومات از مکانیسم های مختلفی برای شناسایی باکتری ها و قارچ ها استفاده می کند که شامل حدود 40 تست مختلف می باشد و به همین دلیل احتمال خطا در تشخیص را به کمترین میزان ممکن می رساند (تقریباً برابر با روش های ملکولی تشخیص) و توانایی بسیار بالایی در تشخیص انواع میکروارگانیسم هاي بیماریزا را دارند. از طرف دیگر انجام تست حساسیت آنتی بیوتیکی برای باکتریها در این دستگاه ها به روش تعیین کمتری غلظت مهاری (MIC) برای آنتی بیوتیک های مختلف در زمان کوتاهی (معمولاً زیر 12 ساعت) به انجام می رسد.

**(3) شرح دستورالعمل**:

در دستورالعمل های مجزا برای قسمت میکروسکوپی، اصول تشخیص کشت و نمودارها و جداول تشخیصی باکتری ها شرح داده شده اند.

**(4) ملاحظات ایمنی:**

* استفاده از وسايل حفاظت فردی مخصوصاً دستکش مقاوم و غير قابل نفوذ برای انجام لام میکروسکوپی، کشت و تست های تشخیصی الزامی می باشد.
* تمامی فرایندهای لام، کشت نمونه های میکروبی و تشخیص باید در زیر هود بیولوژیک به انجام برسد.

**(5) محدودیت ها و تداخلات:**

استفاده از دستگاههای تمام خودکار به علت گرانقیمت بودن برای بسیاری از آزمایشگاهها در دسترس نیست به همین دلیل باید از آزمایش های سنتی بیشتری برای تشخیص استفاده نمود تا تشخیص دقیق تری به انجام برسد.

**(6) مستندات و سوابق :**

* مستندات مربوط به شناسایی ارگانیسم ها توسط لام مستقیم و کشت باید در بخش موجود باشد.
* در موارد تشخیص میکروسکوپی و تشخیص باکتری های خاص که جزو موارد بحرانی می باشد، مستندات کامل تشخیصی و گزارش باید موجود باشد.

**(7) منابع**:

1. کتاب آزمایشگاه باکتری شناسی پزشکی. جلد اول: تشخیص. دکتر داریوش شکری و همکاران. انتشارات تیمورزاده نوین و کیا. 1402.
2. Isenberg D. Henry: *Clinical Microbiology Procedures Handbook*، American Society for Microbiology. 2007.
3. Koneman، Elmer W، et al. Color Atlas and Text book of Diagnostic Microbiology. *Philedelphia: Lippincott-Raven Publishers. Seventh edition.* 2021.
4. Mahon CR, Lehman DC. Textbook of Diagnostic Microbiology-E-Book: Textbook of Diagnostic Microbiology. Elsevier Health Sciences; 2022 Nov 2.
5. Tille، Patricia. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology-e-book*. Elsevier Health Sciences، fifteenth edition. 2021.

**شرح دستورالعمل: 1) اصول شناسایی میکروسکوپی باکتری ها**

**مروري کلي بر باکتری های بيماري­زاي مهم بر اساس رنگ آميزي گرم:**

**1. باکتری هایي که به آساني رنگ­پذيرند:** همانطور اشاره شد در دو دسته گرم مثبت و گرم منفی قابل دسته­بندي هستند:

**گرم مثبت ها** که خود بر اساس مورفولوژی به دو دسته تقسیم می شوند:

الف- کوکسي­هاي گرم مثبت ← استافيلوکوک، استرپتوکوک، انتروکوک و غیره.

ب- باسيل­هاي گرم مثبت ← نوکارديا، اکتينوميسس، کلستريديوم، باسيلوس، ليستريا، کورينه باکتريوم و غیره.

**گرم منفی ها:** که خود بر اساس مورفولوژی به سه دسته تقسیم می شوند:

الف- کوکسي­ها ← نايسريا و موراکسلا

ب- اسپيروکت­ها ← بورليا

ج- باسيل­ها که بر اساس سیستم تنفسی آنها در چهار گروه تقسیم بندی می شوند:

1- هوازي ← بوردتلا، بروسلا، فرانسيسلا، سودوموناس و غیره.

2- ميکروآئروفيل ← کمپيلوباکتر، هليکوباکتر

3- بي­هوازي اختياري ← انتروباکتريال ها، پاستورلا، هموفيلوس، ويبريو و غیره.

4- بي­هوازي مطلق ← باکتروئيدس، پرووتلا، فوزوباکتريوم و غیره.

باسيل­هاي گرم منفي بر اساس محل عفونت هم به 3 گروه قابل تقسيم هستند:

- باکتری های مرتبط با دستگاه گوارش: ويبريو، کمپيلوباکتر، هليکوباکتر، انتروباکترياسه، سودوموناس و باکتروئيدها

- باکتری های مرتبط با دستگاه تنفس: هموفيلوس، بوردتلا و لژيونلا

- باکتری های مرتبط با منابع حيواني (بیماری های مشترک حیوان و انسان یا زئونوز): يرسينيا، پاستورلا، بروسلا و فرانسيسلا

**2. باکتری هایي که به روش گرم به راحتی یا اصلاً رنگ نمی شوند:**

- گرم منفي ضعيف ← لژيونلا

- گونه­هاي مايکوباکتريوم (باسيل اسيد-فست و رنگ گرم در آن نفوذ نمی کند).

- گونه­هاي مايکوپلاسما (فاقد ديواره سلولي و بنابراین قابليت رنگ­آميزي به روش گرم ندارند).

- گونه­هاي ترپونما و لپتوسپيرا (به علت نازکي با رنگ­آميزي گرم رنگ نمي­شوند).

- گونه­هاي کلاميديا، کوکسيلا، ارليشيا، بارتونلا و ريکتزيا جزو انگل هاي اجباري داخل سلولي هستند و بنابراین رنگ نمی شوند.

جدول 1. رایج ترین مورفولوژی گرم ارگانیسم های بیماریزا.

|  |  |
| --- | --- |
| **رایج ترین ارگانیسم** | **مورفولوژی** |
| آئروکوکوس، ، لوکونوستوک، پدیوکوکوس، پلانوکوکوس،  **جفت**: استافیلوکوکوس، انتروکوکوس، استرپتوکوکوس، فینگولدیا  **تتراد**: میکروکوکوس، استافیلوکوکوس، پپتواسترپتوکوکوس  **گروهی**: استافیلوکوکوس، پپتواسترپتوکوکوس، استوماتوکوکوس، فینگولدیا  **زنجیره** **ای**: استرپتوکوکوس، پپتواسترپتوکوکوس  **داخل** **سلولی**: استرپتوکوکوس میکروآئروفیلیک، استرپتوکوک ویریدنس، استافیلوکوکوس  **داخل کپسولی**: استرپتوکوکوس پنومونیه، استرپتوکوکوس پایوژنز (به ندرت)، استوماتوکوکوس موسیلاژینوس  **دیپلوکوکسی گرم مثبت (لانست شکل)**: استرپتوکوکوس پنومونیه | **کوکسی گرم مثبت** |
| نایسریا گنوره آ و نایسریا مننژیتیدیس، موراکسلا کاتارالیس | **دیپلوکوکسی گرم منفی** |
| **کوچک:** لیستریا مونوسایتوژنز، گونه های کورینه باکتریوم  **متوسط:** لاکتوباسیلوس، باسیل بی هوازی  **بزرگ:** لاکتوباسیلوس، کلستریدیوم، باسیلوس  **دیفتروئید شکل:** کورینه باکتریوم، پروپیونی باکتریوم، روتیا  **پلئومورفیک، گرم متغیر:** گاردنرلا واژینالیس  **مهره ای (تسبیحی):** مایکوباکتریوم، لاکتوباسیل متاثر از آنتی بیوتیک، کورینه باکتریوم  **فیلامنتوس:** بی هوازی، سلول های متاثر از آنتی بیوتیک  **فیلامنتوس، مهره ای:** اکتینومیست، نوکاردیا، استرپتومایسس، روتیا.  **V فرم یا بیفیدیا:** گونه بیفیدوباکتریوم، بِرِوی باکتریوم | **باسیل گرم مثبت** |
| **ریز و کم رنگ**: بوردتلا، **پلئومورفیک**: هموفیلوس، **توده ای:** ویونلا، **زنجیره ای:** پریوتلا، ویونلا | **کوکوباسیل گرم منفی** |
| **کوچک:** هموفیلوس، لژیونلا (نازک با رشته)، اکتینوباسیلوس، بوردتلا، بروسلا، فرانسیسلا، پاستورلا، کاپنوسیتوفاگا، پریوتلا، ایکنلا.  **دو قطبی:** کلبسیلا پنومونیه، پاستورلا، باکتریوئیدس.  **متوسط:** انتریک ها، پسودوموناس ها.  **چاق:** کلبسیلا پنومونیه  **خمیده:** گونه های ویبریو، کمپیلوباکتر.  **مارپیچ:** گونه های کمپیلوباکتر، هلیکوباکتر، گاستروباسیلوم، بورلیا، لپتوسپیرا، تریپونما.  **فوزی فرم:** فوزوباکتریوم نوکلئاتوم.  **فیلامنتی**: فوزوباکتریوم نکروفورم (پلئومورفیک) | **باسیل گرم منفی** |

* مورفولوژی های ذکر شده روی لام مستقیم گرم معمولاً باید در کشت بازیابی شوند.
* بعضی اوقات میکروارگانیسم ها را در اسمیر مستقیم مشاهده می کنیم اما در کشت رشد نمی کنند. توضیحات احتمالی برای این اتفاق شامل موارد زیر است:

1) ممکن است ارگانیسم ها به خصوص آنهایی که روی سطح گلبول های سفید ظاهر می شوند ارگانیسم های بلعیده شده باشند که دیگر زنده یا قادر به رشد نیستند یا در حال مرگ هستند و بنابراین در کشت رشد نمی کنند.

2) اثرات باقیمانده عوامل ضد میکروبی (مثل آنتی بیوتیک ها) در کشت از رشد ارگانیسم جلوگیری می کند.

3) اسلایدها یا معرف های رنگ آمیزی گرم آلوده به میکروب هستند.

4) ارگانیسم مشاهده شده برای رشد به شرایط انکوباسیون خاصی نیاز دارد (اتمسفر بیهوازی و بنابراین حضور باکتری های بیهوازی، محیط های مخصوص، انکوباسیون طولانی مدت و غیره).

در این حالت یعنی عدم رشد میکروارگانیسم ها با وجود مشاهده در اسمیر می توان در جواب نهایی بیمار توصیه زیر را اضافه کرد و بهتر است درخواست تکرار نمونه شود:

**Comment:** Possible explanations for observing of microorganism in direct smear without growth in culture can be as follow:

1) Organisms that are dead or dying are visualized on the smear but are not viable and therefore do not grow in culture.

2) Residual effects of antimicrobial agents in the culture prevent growth of the organism.

3) The organism observed may requires special incubation conditions to grow (anaerobic atmosphere and so presence of anaerobic bacteria, special media, prolonged incubation, etc.).

Reapet of sample is recommended.

* در حالت برعکس اگر یک یا چند ارگانیسم در کشت وجود دارد که در رنگ آمیزی گرم قابل مشاهده نیستند، این می تواند نشان دهنده آلودگی احتمالی محیط های کشت باشد یا ممکن است ارگانیسم ها با سلول ها و ترشحات پوشیده شوند و دیده نشوند. در این حالت تکرار نمونه گیری باید درخواست شود.

**بررسی لام مستقیم کجا نیاز نیست و موارد استثناء:**

* رنگ آمیزی گرم برای بررسی بیماری سوزاک (باکتری نایسریا گنوره آ) روی نمونه‌هایی از واژن، دهانه رحم و حفره‌های ایجاد شده نزدیک مقعد توصیه نمی‌شود زیرا این محل‌ها حاوی باکتری‌های دیگری هستند که می‌توانند مورفولوژی یکسانی داشته باشند. برعکس اسمیر مستقیم رنگ آمیزی گرم برای تشخیص واژینوز باکتریایی توصیه می‌شود (تشخیص کلوسل در عفونت با باکتری گاردنرلا واژینالیس).
* بررسی لام مستقیم معمولاً بر روی نمونه‌های گلو (یا اوروفارنکس)، نازوفارنکس و مدفوع به دلیل وجود میکروبیوتای طبیعی فراوان انجام نمی‌شود.
* دو استثناء نمونه لام مستقیم مدفوع برای بررسی باکتری کمپیلوباکتر است که به صورت مارپیچی در نمونه مشخص است و بررسی لام مستقیم گلو برای بررسی بیماری آنژین وینسنت (vincent's angina) است که باکتری فوزوباکتریوم نکروفوروم در این سندروم نقش دارد و رنگ آمیزی گرم نمونه گلو تعداد زیادی باسیل گرم منفی دوکی شکل و اسپیروکتی را نشان می دهد.

**دستورالعمل مشاهده و گزارش لام مستقیم**

**مشاهده لام مستقیم:**

* اسمیرهایی که بیش از حد غلیظ هستند ممکن است به درستی رنگ نگیرند یا غلیظ رنگ شوند و بنابراین تفسیر آنها مشکل باشد، پس منطقه مناسب را پیدا کنید. اسمیرهای ضخیم تقریباً همیشه حاوی نواحی نازکتر هستند که می توان از این قسمت ها برای دیدن استفاده کرد.
* هنگام بررسی اسمیر باید دقت زیادی کرد زیرا ممکن است تعداد برخی ارگانیسم ها کم باشد.
* پس از آماده سازی و رنگ آمیزی، 20-40 میدان دید با استفاده از عدسی شیئی کم توان یا X40 (بزرگنمایی 400 برابر) بررسی می شود. با عدسی 40 میکروب شناس باید به دنبال گلبول های سفید (WBC)، سلول های اپیتلیال (SEC) و گلبول های قرمز (RBC) (یعنی سلول های میزبان) و ارگانیسم های بزرگ مانند قارچ ها یا انگل ها باشد.
* در مرحله بعد، اسمیر با استفاده از عدسی شیئی روغنی یا لنز X 100 (1000برابر) از نظر وجود سلول های باکتریایی و همچنین واکنش های گرم، مورفولوژی مانند کوکسی یا باسیل، میله ای خمیده (curved rods)، دیفتروئید فرم (diphtheroids) و آرایش (به عنوان مثال، زنجیره ای یاchain برای استرپتوکوکوس، جفتی یا diplococci برای پنوموکوکوس، خوشه ای یا cluster برای استافیلوکوکوس) ارزیابی می شود.
* هنگام استفاده از عدسی 100، فقط مناطقی را بررسی کنید که هم حاوی سلول های التهابی هستند و هم به طور مناسب رنگ آمیزی گرم دارند (لام را مقابل نور نگاه کنید تا لکه رنگ ببینید و آنجا را بررسی کنید).
* گزارش عدم وجود باکتری و سلول میزبان می تواند به اندازه گزارش شواهد عفونت مهم باشد. این اطلاعات اغلب یک تشخیص اولیه در مورد عوامل عفونی ارائه می دهد و اغلب برای هدایت درمان های اولیه برای بیمار استفاده می شود.
* در بررسی اسمیر رنگ شده کلنی های کشت و محیط آبگوشت، از عدسی روغنی استفاده می شود تا واکنش گِرم و مورفولوژی باکتری ها گزارش شود.
* شایع ترین آرایشها و واکنش رنگ گرم باکتری ها و نحوه گزارش آنها در زیر آورده شده اند:

A : کوکسی های گرم مثبت در زنجیره: Gram-positive cocci in chains were seen

B: کوکسی های گرم مثبت به صورت جفت: Gram-positive cocci in pairs were seen

C: کوکسی های گرم مثبت خوشه ای: Gram-positive cocci in clusters were seen

D: کوکوباسیل های گرم منفی: Gram-negative coccobacilli were seen

E: باسیل های گرم منفی: Gram-negative bacilli were seen

F: دیپلوکوک های گرم منفی: Gram-negative diplococci were seen

G: مخلوط گرم مثبت و گرم منفی: Mixed Gram-positive and Gram-negative morphologies were seen

**گزارش اسپور:**

* اسپورها با معرف های رنگ آمیزی گرم رنگ آمیزی نمی شوند اما به صورت نواحی شفاف در داخل سلول ها ظاهر می شوند.
* اگر هاگ (اسپور) باکتری وجود دارد، محل سلولی، مانند انتهایی (terminal) یا زیر ترمینال (subterminal)، و شکل آن مانند بیضی (oval) یا گرد (round) و شکل های خاص (مثل دسته طبل در کلستردیوم تتانی) را گزارش دهید.

برای مثال گزارش لام کلستریدیوم تتانی با شکل دسته طبل اسپور آن به صورت زیر است:

**Report**: Gram-positive bacilli with terminal, round spores with drum stick appearance were seen.

* **گزارش آنژین وینسنت**:

**Report**: Fusospirochetal gram negative bacteria resembling to fusobacterium/borrelia were seen. Possible Diagnosis: Vincent ́s angina.

**گزارش نیمی کمی ارگانیسم ها:**

* علاوه بر لزوم گزارش مورفولوژی و آرایش باکتری ها، گزارش تعداد آنها در لام مستقیم هم می تواند مهم باشد چون توجه به مقادیر نسبی مشاهده شده در اسمیر مستقیم اطلاعات مفیدی برای ارتباط نتایج اسمیر با میزان رشد مشاهده شده کشت ها و همچنین شدت عفونت ارائه می دهد.
* برای دیدن سلول های باکتریایی با میکروسکوپ نوری در نمونه مستقیم، حداقل غلظت 105 سلول در هر 1 میلی لیتر از نمونه مورد نیاز است که تعداد بسیار زیادی باکتری برای هر نمونه مایع استریل بدن است و توصیف تعداد بر اساس مشاهدات میکروسکوپی به صورت نادر یا کم ممکن است اهمیت آنها را در یک نمونه بالینی کم کند.
* پس گزارش تعداد زیاد (Many) می تواند سودمند باشد اما گزارش تعدد کم (few) شاید مفید نباشد. بنابراین گزارش مقادیر نسبی سلول های باکتریایی (به عنوان مثال، نادر، کم، متوسط، زیاد) در اسمیر مستقیم اجباری نیست. اینجا تجربه میکروب شناس می تواند کمک کننده باشد.

ارگانیسم ها را طبق جدول 2 به صورت نیمه کمی گزارش کنید (میانگین 20 تا 40 نما):

جدول 2. نحوه گزارش نیمه کمی ارگانیسم ها در لام مستقیم.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Many (Heavy) | +4 | تعداد 10 عدد و بیشتر در عدسی روغنی |
| Moderate | +3 | تعداد 6-10 عدد در عدسی روغنی |
| Few | +2 | تعداد 3-5 عدد در عدسی روغنی |
| Rare | +1 | کمتر از 10 عدد در کل لام مستقیم |
| None |  | ارگانیسم منفی |

* به طور خلاصه در لام مستقیم باید تعداد به صورت نیمه کمی، واکنش گرم، مورفولوژی و آرایش باکتری ها و وجود اشکال خاص مانند اسپور گزارش شوند.
* چند مثال برای نحوه گزارش ارگانیسم ها در 20 میدان عدسی روغنی در زیر آمده است:

**مثال 1:** تعداد میانگین 5 باکتری کوکسی گرم مثبت خوشه ای یا زنجیره ای:

Few gram-positive cocci in chain/ in cluster were seen.

**مثال 2:** تعداد میانگین 9 باکتری کوکسی گرم مثبت دیپلوکوکی:

Moderate gram-positive diplococci were seen.

**مثال 3:** تعداد میانگین بیش از 10 باکتری باسیل گرم منفی:

Many gram-negative rods were seen.

**گزارش نیمه کمی سلول های میزبان (WBC،RBC و SEC):**

* حضور سلول های میزبان در نمونه های میکروب شناسی باید گزارش شود.
* گلبول های سفید (WBC) می تواند نشانه حضور عفونت یا التهاب باشد. این مورد گاهی همراه با تخریب بافتی با حضور گلبول های قرمز در نمونه خود را نشان می دهد. همیشه وجود یا عدم وجودWBC ها را گزارش دهید.
* گلبول های سفید ممکن است به سلول های پلی مورفونکلئر (PMNs) و سلول های تک هسته ای تمایز داده شوند و گزارش شوند اما با استفاده از رنگ آمیزی گرم نباید تمایز بیشتر گلبول های سفید را انجام داد.
* همچنین حضور سلول های اپیتلیال می تواند در برخی نمونه ها مانند نمونه های بافتی نشانه تخریب و ریزش این سلول ها و در برخی نمونه های دیگر مانند نمونه ادرار نشانه احتمال آلودگی باشد.
* گزارش نیمه کمیگلبول های سفید، گلبول های قرمز و سلول های اپیتلیال برای ارزیابی شدت احتمالی عفونت مفید بوده و طبق جدول 3 از یک تا چهار مثبت گزارش می شوند:

جدول 3. نحوه گزارش نیمه کمی سلول های میزبان در لام مستقیم.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Many (Heavy) | +4 | تعداد 25 عدد یا بیشتر در عدسی کم قدرت (LPF) |
| Moderate | +3 | تعداد 10-25 عدد در عدسی کم قدرت (LPF) |
| Few | +2 | تعداد 2-10 عدد در عدسی کم قدرت (LPF) |
| Rare | +1 | کمتر از 2 عدد در عدسی کم قدرت (LPF) |
| None |  | سلول منفی |

**مثال 1:** تعداد 5 سلول اپیتیلیال در LPF دیده شده است: Few SEC’s were seen

**مثال 2:** تعداد 20 سلول خونی در LPF دیده شده است: Moderate RBC’s were seen

**مثال 3:** تعداد صفر سلول گلبول سفید در LPF دیده شده است: No WBC’s were seen

**مثال 4:** تعداد 30 سلول گلبول سفید در LPF دیده شده است: Many WBC’s were seen

**در نمونه لام مستقیم ادرار:**

* تعداد متوسط ​​ارگانیسم ها در هر میدان عدسی 100 را تعیین کنید.
* هر سلول باکتری که دیده می شود معادل 100000 ارگانیسم در میلی لیتر ادرار است.
* وجود تعداد بالای SECها و یا چندین مورفوتیپ باکتریایی نشان دهنده آلودگی است.
* وجود تعداد کم SECها، تعداد بالای WBC و یک مورفوتیپ خالص باکتریایی نشان دهنده عفونت واضح است.

**مواد پروتئینی پس زمینه (**Proteinaceous**)**

* نمونه های دارای مواد پروتئینی زمینه ای، با زمینه صورتی (گرم منفی) رنگ می شوند و اطلاعات مفیدی ارائه می‌دهد.
* وجود چنین موادی نشان می دهد که مواد نمونه به اندازه کافی به لام چسبانده شده است و لام کیفیت دارد و در این حالت عدم وجود باکتری یا سلول های التهابی روی اسمیر یک نتیجه منفی واقعی است و احتمال از دست دادن نمونه در طول رنگ آمیزی بسیار کم می شود.
* مهم است که به این پس‌زمینه با دقت نگاه کنید زیرا ممکن است باکتری های گرم منفی نادیده گرفته شوند.

**نکته:** ارگانیسم های مولد سم مانند کلستریدیوم، استافیلوکوکوس و استرپتوکوکوس ممکن است با داشتن توکسین های تخریب کننده، گلبول های سفید خون را در یک نمونه چرکی از بین ببرند (یک دلیل لام مستقیم مثبت ولی بدون حضور WBC).

* بعد از آماده شدن جواب نهایی نتیجه لام مستقیم یک گزارش مقدماتی کتبی با نتایج رنگ آمیزی گرم را گزارش کنید. بخش را از طریق تلفن در مورد هر گونه یافته مستقیم اسمیر قابل توجه (مثلاً هر ارگانیسمی در نمونه گرم CSF) مطلع کنید. تاریخ، زمان و نام فردی که نتایج را به وی گزارش کرده اید، مستند کنید.

**شرح دستورالعمل: 2) اصول شناسایی باکتری ها با کشت**

**دستورالعمل تشخیص کلنی و تست های اولیه**

* قدم اصلی تشخیص، در روز بعد از کشت به کمک محیط کشت های تلقیح شده به انجام می رسد که در صورت رشد باکتری ها بتوان از روی خصوصیات کلنی های رشد کرده و همچنین استفاده از تست هایی که به صورت سریع در همان روز قابل انجام است، یک تشخیص اولیه را به انجام رساند.
* در اینجا جداسازی تک کلنی ها در کشت برای بررسی مورفولوژی و خصوصیات مهم مورد نیاز برای شناسایی و برای انجام رنگ آمیزی غیرمستقیم گرم ضروری است.
* هنگام خواندن پلیت (پلیت خوانی)، گرفتن لام از کلنی خالص (رنگ آمیزی غیرمستقیم) و مورفولوژی کلنی نقش مهمی در شناسایی احتمالی اولیه دارد. گاهی رنگ آمیزی ممکن است ضروری نباشد زیرا رشد روی یک آگار انتخابی مخصوص باکتری های خاص می باشد. مثلاً باسیل های گرم منفی اساساً تنها باکتری هایی هستند که به خوبی و با رشد زیاد روی مک کانکی یا EMB رشد می کنند.
* علاوه بر لام گرم از کلنی و شکل کلنی، باید تست های اولیه ای به انجام برسد که سریعاً قابل انجام و نتایج آن قابل مشاهده باشد تا به یک تشخیص اولیه احتمالی رسید. این تشخیص اولیه احتمالی در روز اول دو کاربرد اساسی دارد:

1. تشخیص احتمالی فلور طبیعی بدن از بیماریزاها: در این حالت اگر تشخیص اولیه فلور طبیعی باشد معمولاً نیازی به انجام تست های اضافی و انجام تست حساسیت به آنتی بیوتیک ها (آنتی بیوگرام) نیست.

2. انتخاب الگوی صحیح پانل آنتی بیوتیکی: چون هر گروه از باکتری ها دارای الگوی آنتی بیوگرامی مشخصی هستند و باید طبق این الگو آنتی بیوگرام برای آنها گذاشته شود بنابراین تشخیص اولیه در همان روز اول منجر به انجام آنتی بیوگرام در همان روز و بنابراین آماده شدن سریعتر جواب بیمار خواهد شد.

**نکات مهم و تست های اولیه برای تشخیص احتمالی اولیه**

**1. میزان شناسایی ارگانیسم**

* شناسایی کامل ایزوله کشت خون، مانند کلستریدیوم سپتیکوم در مقایسه با شناسایی فقط جنس کلستریدیوم، پزشک را از احتمال بدخیمی یا سایر بیماری ها آگاه می کند.
* در عین حال، شناسایی احتمالی (و نه دقیق) اشریشیاکلی از عفونت ادراری ساده در صورتی که یک باکتری میله ای گرم منفی و اندول مثبت با مورفولوژی کلنی تیپیک در آگار مک کانکی (کلنی صاف و تخمیر کننده لاکتوز که نمک های صفراوی را رسوب می دهد) بازیابی شود مجاز است (گزارش نهایی: احتمالاً باکتری اشریشیاکلی: presumptive *Escherichia coli*).
* در تجزیه و تحلیل نهایی، نتایج کشت همیشه باید با تشخیص احتمالی مقایسه شود.

**2. محل جداسازی باکتری**

* محل جداسازی یک باکتری در تشخیص احتمالی می تواند بسیار با اهمیت باشد. با وجودی که برخی باکتری ها مثل اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس آرئوس می توانند در قسمت های مختلف بدن باعث ایجاد عفونت شوند اما در برخی از نقاط بدن می توان انتظار داشت باکتری های خاصی عامل عفونت باشند.
* باکتری استرپتوکوکوس پایوژنز عامل اصلی گلودرد چرکی (فارنژیت) است بنابراین در کشت گلو می توان انتظار جداسازی آن را داشت.
* در عفونت مایع مغزی-نخاعی باکتری های اصلی عامل مننژیت شامل هموفیلوس آنفولانزا، استرپتوکوکوس پنومونیه و نایسریا مننژیتیدیس هستند.
* عفونت های ادراری غالباً با باکتری های انتروباکتریال و از جمله اشریشیاکلی همراه است.
* در عفونت مایع مفصلی باکتری استافیلوکوکوس آرئوس باعث اغلب عفونت ها بوده است.
* در عفونت ذات الریه اکتسابی از جامعه معمولاً باکتری استرپتوکوکوس پنومونیه درگیر می باشد.
* اغلب عفونت های اندوکاردیت با استرپتوکوک های گروه ویریدانس همراه بوده است.
* اعضای مصنوعی کار گذاشته شده در بدن توسط استافیلوکوکوس های کواگولاز منفی از جمله استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به طور عمده عفونی می شوند.

**3. الگوی رشد بر روی محیط های معمول کشت**

* بسیاری از نمونه های میکروب شناسی، روی محیط کشت های مختلف مثل CHOC، BA و MAC یا EMB‌ قرار می گیرند.
* به طور کلی، میکروب شناس ها الگوی رشد و مورفولوژی کلنی های ارگانیسم های جدا شده در کشت اولیه را پس از 18 تا 24 ساعت انکوباسیون مشاهده می کنند.
* تفسیر کشت های اولیه که معمولاً به عنوان **پلیت خوانی** شناخته می شود، در واقع یک بررسی مقایسه ای مورفولوژی کلنی میکروارگانیسم های در حال رشد در محیط کشت های مختلف است. به این معنا که هر نوع پلیت در ارتباط با بقیه پلیت ها، به صورت مقایسه ای مورد بررسی قرار می گیرد که باید ارتباط منطقی بین آنها وجود داشته باشد.
* توانایی تعیین اینکه کدام ارگانیسم ها در محیط های انتخابی و غیرانتخابی رشد می کنند، کمک می کند تا تمایز اولیه بین ایزوله های گرم مثبت و گرم منفی را ایجاد کند. برای مثال باکتری گرم مثبت رشد کرده باید هم روی شکلات آگار هم بر روی بلادآگار رشد کرده باشد.

**قوانین کلی الگوی رشد بر محیطها:**

1) بلادآگار (BA) و شکلات آگار (CHOC) از رشد ارگانیسم های سختگیر (سخت رشد، نیازمند به فاکتورهای اضافی رشد) و غیرسختگیر (اغلب باکتری های گرم مثبت و گرم منفی) حمایت می کنند.

* به طور کلی، ارگانیسم هایی که در BA رشد می کنند در CHOC هم رشد می کنند اما لزوماً همه ی ارگانیسم های با رشد در CHOC در BA رشد نمی کنند.
* اگرچه BA از ارگانیسم های سخت گیر حمایت می کند اما گونه های بسیار سخت گیر مثل گونه های هموفیلوس و نایسریا گنوره آ روی آن رشد نمی کنند و محیط شکلات آگار است که نیازهای رشد تغذیه ای را برای حمایت از این ارگانیسم های سخت گیر را فراهم می کند. بنابراین، یک باسیل گرم منفی که روی CHOC رشد می کند اما روی BA و MAC رشد نمی کند، می تواند مشکوک به گونه های هموفیلوس باشد در حالیکه، دیپلوکوک های گرم منفی با همین الگوی رشد (عدم رشد روی BA و MAC و دارای رشد در CHOC) مشکوک به نایسریا گنوره آ هستند.
* برخی از باکتری های گرم منفی بسیار سخت رشد ممکن است روی شکلات آگار نیز رشد نداشته باشند و نیازمند محیط کشت های کاملاً اختصاصی برای رشد باشند مثل باکتری های هموفیلوس دوکره ای و بوردتلا پرتوزیس.
* باسیل های گرم منفی معمولاً روی BA و CHOC کلنی های بزرگی تولید می کنند و خاکستری و گاهی موکوئیدی به نظر می رسند.

2) MAC و EMB از رشد اکثر باسیل های گرم منفی به ویژه انتروباکتریاسه ها حمایت و از رشد باکتری های گرم مثبت و باکتری های گرم منفی سخت گیر مثل گونه های هموفیلوس و نایسریا جلوگیری می کنند.

* باسیل های گرم منفی در این دو محیط بهتر خود را نشان می دهند زیرا این ارگانیسم ها کلنی های به ظاهر مشابه در محیط های BA و CHOC تولید می کنند. بنابراین رشد واضح بر روی EMB و مک کانکی نشانه حضور یک باکتری گرم منفی است و عدم رشد واضح بر روی این محیط ها نشان دهنده حضور ایزوله گرم مثبت یا باسیل یا کوکوس گرم منفی سخت گیر است.
* دقت شود بعضی از باکتری های گرم مثبت مانند برخی سویه های استافیلوکوکوس و انتروکوکوس بر روی برخی برندهای محیط های گرم منفی رشد ضعیف دارند که در اینجا انجام رنگ آمیزی گرم برای پی بردن به گرم مثبت بودن باکتری بسیار مهم است.

3) کلنی رنگی بر روی EMB و مک کانکی نشانه حضور یک گرم منفی تخمیری لاکتوز مانند اکثر اعضای انتروباکتریاسه (اشریشیاکلی، کلبسیلا، انتروباکتر و غیره) است و کلنی بی رنگ نشانه حضور یک گرم منفی غیرتخمیری لاکتوز مانند سودوموناس آئروژینوزا، بورخولدریا، استنوتروفوموناس مالتوفیلیا، آسینتوباکتر، آکرموباکتر و غیره است.

* تخمیر کننده های لاکتوز با تغییر pH در اثر تخمیر لاکتوز، کلنی های صورتی، صورتی تیره یا قرمز تولید می کنند و کلنی های غیر تخمیری (مانند شیگلا) شفاف و بی رنگ باقی می مانند. این تمایز به ویژه در غربال گری پاتوژن های روده ای از کشت مدفوع مهم است زیرا بیشتر پاتوژن های روده ای قند لاکتوز را تخمیر نمی کنند.

4) در محیط MAC برخی از پاتوژن های روده ای مثل ارگانیسم های اشریشیاکلی و سیتروباکتر، کلنی های خشک و صورتی با یک هاله صورتی رنگ در اطراف نمک های صفراوی رسوب شده تولید می کنند و برخی از آنها مانند اشریشیاکلی و سیتروباکتر بر روی محیط EMB دارای جلای فلزی هستند. در حالی که ارگانیسم هایی مثل کلبسیلا و انتروباکتر کلنی های موکوئیدی بزرگی تولید می کنند که دارای کلنی های صورتی و گاهی دارای مراکز کرم رنگ هستند و این ویژگی ها در شناسایی احتمالی مفیدند.

* تمایز بیشتر بین باسیل های گرم منفی با تست های اولیه در روز اول دشوار است. برای تشخیص نهایی باید تست های تکمیلی به انجام برسد.

**4. همولیز بر روی محیط آگار خوندار**

* همولیز با بررسی کلنی های رشد یافته در شرایط بیهوازی یا با بررسی کلنی های سطحی در پورپلیت، یا در روش خطی مشاهده می شود.
* برای تشخیص نوع همولیز کلنی ها باید از یک منبع نور استفاده کرد. تکنیک مناسب نیاز به عبور نور روشن از پایین پلیت برای تعیین همولیتیک بودن ارگانیسم دارد.
* گاهی که همولیز واضح نیست، یک یا چند کلنی باید با لوپ یا سواب برداشته شود و بعد جای آنها روی آگار را به روش گفته شده نگاه کرد تا الگوی همولیتیک مشخص شود. این روش همچنین برای تشخیص رنگ در غیر تخمیرکننده های لاکتوز برای مک کانکی هم می تواند استفاده شود.
* مشاهده و تفسیر صحیح خواص همولیتیک باکتری ها بسیار مهم است زیرا تشخیص های بعدی در برخی جنس ها مثل استرپتوکوکوس ها بر اساس همین ارزیابی اولیه است.
* سه نوع همولیز اصلی شامل آلفا، بتا و گاما وجود دارد که در جدول زیر آمده است. گاهی همولیز مابین آلفا و بتا به عنوان همولیز چهارم به نام آلفا پریم شناخته می شود.

|  |  |
| --- | --- |
| توضیحات | همولیز |
| قسمتی از گلبول قرمز در اطراف کلنی لیز شده که باعث ایجاد رنگی متمایل به سبز در اطراف کلنی ایجاد می شود. مانند استرپتوکوک پنومونیه و بعضی از استرپتوکوک های ویریدانس | آلفا |
| گلبول قرمز به طور کامل لیز شده و در اطراف کلنی ناحیه ای شفاف ایجاد می شود. | بتا |
| گلبول قرمز لیز نمی شود و تغییر رنگی در آگار ایجاد نمی کند. | گاما (بدون همولیز) |
| ناحیه کوچکی از گلبول قرمز سالم چسبیده به اطراف کلنی قرار دارند که به وسیله ناحبه وسیعی از همولیز کامل احاطه شده است (بین بتا و آلفا). | آلفا پریم یا منطقه وسیع آلفا |

* همولیز پنجمی به نام همولیز هدف هم معرفی شده است که در باکتری کلستریدیوم پرفرنجنس دیده می شود و به آسانی در آزمایشگاه با همولیز «منطقه دوگانه» مشخصه آن شناسایی می شود.
* استرپتوکوکوس پایوژنز و استرپتوکوکوس آگالاکتیه دارای همولیز بتا هستند، استرپتوکوکوس پنومونیه دارای همولیز آلفا و استرپتوکوکوس های گروه ویریدانس و انتروکوکوس ها معمولاً دارای همولیز گاما هستند.
* علاوه بر استرپتوکوکوس ها، همولیز در افتراق استافیلوکوکوس آرئوس (همولیز بتای منتشر) از استافیلوکوکوس های فلور طبیعی و همچنین کمک به تشخیص پاتوژن های روده ای آئروموناس و پلزیوموناس (دارای همولیز بتا) کاربرد دارد.
* باکتری سودوموناس آئروجینوزا نیز دارای همولیز بتا می باشد.
* آرکانوباکتریوم همولیتیکوم که یکی از عوامل فارنژیت است نیز دارای همولیز بتا می باشد که گاهی باعث اشتباه در تشخیص با باکتری استرپتوکوک پایوژنز می شود.
* محیط CHOCهمولیز واقعی را نشان نمی دهد زیرا گلبول های قرمز موجود در محیط قبلاً لیز شده اند اما ارگانیسم هایی که در BA آلفا همولیتیک یا بتا همولیتیک هستند، معمولاً رنگ سبزی در اطراف کلنی روی CHOC نشان می دهند. با این حال، این رنگ نباید با یک ویژگی همولیتیک اشتباه گرفته شود.
* بعضی از ارگانیسم ها مانند استرپتوکوکوس های بتا-همولیتیک گروه A یا استرپتوکوکوس پایوژنز یک منطقه وسیع، عمیق و واضح بتا-همولیز و بزرگتر از کلنی تولید می کنند، در حالی که برخی دیگر از باکتری های دارای همولیز بتا مثل استرپتوکوکوس آگالاکتیه و لیستریا مونوسایتوژنز یک منطقه باریک بتا-همولیز دقیقاً در اطراف کلنی ایجاد می کند.

**5. خصوصیات کلنی**

معیارهای مورد نظر مهم برای یک کلنی شامل موارد زیر است: اندازه ی کلنی، شکل یا حاشیه ی کلنی، برآمدگی کلنی، تراکم کلنی، رنگ کلنی، قوام کلنی، تولید پیگمان، بوی کلنی و همچنین تغییرات در محیط کشت ناشی از رشد باکتری مثل الگوی همولیتیک روی بلاد آگار، تغییر در رنگ نشانگر pH، سوراخ شدن سطح آگار و گاهی مخلوطی از این خصوصیات.

**- اندازه کلنی:** کلنی های باکتری ها می توانند به صورت بزرگ، متوسط، کوچک و یا سرسوزنی (نقطه ای) بر روی محیط های کشت رشد کنند. اندازه کلنی معمولاً در مقیاس میلی متر اندازه گیری می شود و یا به صورت نسبی توصیف می شود مثلاً کمتر از 1 میلی متر: نقطه ای؛ 1 تا 2 میلی متر: کوچک؛ 2 تا 3 میلی متر: متوسط؛ بیشتر از 3 میلی متر: بزرگ.

* باکتری های گرم مثبت به طور کلی کلنی های کوچکتر از باکتری های گرم منفی تولید می کنند. گونه های استافیلوکوکوس معمولاً کلنی بزرگتر از گونه های استرپتوکوکوس دارند. البته این یک قانون همیشگی نیست زیرا برخی سویه های استافیلوکوکوس ممکن است کوچکتر از برخی سویه های استرپتوکوکوس باشند و همچنین کلنی برخی از باکتری های گرم منفی ممکن است کوچکتر از کلنی های باکتری های گرم مثبت باشند به خصوص باکتری های گرم منفی سخت رشد.

**- شکل یا حاشیه کلنی:** لبه و حاشیه کلنی­ها می تواند صاف، رشته ای، خشن یا ریزویید یا نامنظم توصیف می شود.

* کلنی های باسیلوس ها به صورت بی نظم هستند و معمولاً به شکل شیشه خورد شده یا پلاستیک جمع شده در اثر حرارت ظاهر می شوند. کلنی های باسیلوس آنتراسیس به دلیل ظاهر بی نظم و رشته ای به عنوان "سر مدوزا" توصیف می شود.
* بعضی از جنس ها مانند پروتئوس ممکن است در آگار غیر انتخابی مانند بلاد آگار یا شکلات آگار دارای حرکت خزنده (یا سوارمینگ) باشند.
* کلنی های با لبه های خشن در دیفتروئیدها دیده می شود که دارای کلنی های سفید گچی هستند.
* برخی از مخمرها از جمله کاندیدا آلبیکنس تولید کلنی­های می کنند که به عنوان ستاره ها یا کلنی­های با پایه ها یا پدیکول ها توصیف می شوند.

**- برآمدگی کلنی:** برآمدگی کلنی باید با چرخش صفحه پلیت به سمت کنار کلونی تعیین شود. برآمدگی ممکن است بالا رونده، محدب، تخت، شبیه ناف (مرکز تورفته)، یا مرکز برجسته باشد.

* باکتری استرپتوکوکوس پنومونیه به طور معمول کلنی های شبیه ناف (مرکز تورفته) تولید می کند، مگر اینکه کلنی ها به علت وجود کپسول پلی ساکاریدی موکوئیدی باشند.
* استرپتوکوکوس­های بتاهمولیتیک معمولاً کلنی­های تخت را تولید می کنند.
* باکتری استافیلوکوکوس آرئوس دارای کلنی محدبی شکل است و گاهی با نوک برجسته.

**- تراکم کلنی:** تراکم کلنی می تواند شفاف، نیمه شفاف و یا مات باشد. برای دیدن تفاوت های موجود در تراکم کلنی ها، بهتر است نور عبوری از کلنی استفاده شود. کلنی های شفاف اجازه می دهد تا مقداری از نور از کلنی عبور کند اما کلنی مات اجازه عبور نور از کلنی را نمی دهد.

* استرپتوکوکهای بتاهمولیتیک به جز استرپتوکوکوس آگالاکتیه به عنوان کلنی های نیمه شفاف توصیف می شوند.
* استرپتوکوکوس آگالاکتیه تولید کلنی هایی نیمه کدر می کنند، که ارگانیسم ها در مرکز کلنی متمرکز شده اند و به این ترتیب گاهی اوقات به عنوان کلونی چشم گاو توصیف می شود.
* استافیلوکوکوس ها و دیگر باکتری های گرم مثبت معمولاً کدر هستند.
* اغلب باسیل های گرم منفی نیز مات یا کدر هستند.

**- قوام کلنی:** قوام کلنی با لمس کلنی با یک لوپ استریل تعیین می­شود. قوام کلنی ممکن است شکننده، خامه ای (کِرمی)، خشک یا واکسی (مومی) یا چسبنده باشد که کل کلنی به حلقه میچسبد.

* کلنی استافیلوکوکوس آرئوس خامه ای (کِرمی) است.
* کلنی های گونه­های نایسریا چسبنده هستند.
* کلنی­های نوکاردیا تولید کلنی با ظاهر شکننده، کدر و چروکیده و شبیه خرده نان بر روی پلیت می کنند که بسیار محکم به آگار می چسبند.
* کلنی دیفتروئید معمولاً خشک و مومی است.
* بیشتر استرپتوکوکوس های بتاهمولیتیک خشک هستند (به جز انواع موکوئید) و وقتی که توسط یک حلقه تحت فشار قرار می گیرند کل کلنی باقی می ماند.
* کلنی باکتری کلبسیلا پنومونیه معمولاً کش می آید و توسط لوپ به سختی برداشته می شوند.

**- رنگ کلنی:** در مقایسه با رنگدانه، رنگ کلنی برای توصیف یک جنس خاص باکتری به طور کلی استفاده می شود. کلنی ها ممکن است سفید، خاکستری، زرد یا قهوه ای (بژ) باشند.

* استافیلوکوکوس های کواگولاز منفی سفید هستند در حالی که گونه های انتروکوکوس ممکن است خاکستری ظاهر شود.
* بیشتر باسیل های گرم منفی بر روی آگار خون دار خاکستری هستند.
* معمولاً گونه های میکروکوکوس و نایسریای غیربیماریزا و استافیلوکوکوس آرئوس زرد هستند.

**- تولید پیگمان (رنگدانه):** تولید رنگدانه یک ویژگی ذاتی از یک ارگانیسم خاص است که عموماً به کلنی محدود می شود و در محیط کشت پخش نمی­شود. البته همیشه و همه کلنی های آنها ممکن است تولید رنگدانه نکنند. علاوه بر این رنگدانه ممکن است به وضوح در محیط کشت قابل مشاهده نباشد.

* برای تجسم واضح رنگدانه، ممکن است از یک سوآب سفید استریل استفاده شود بدین طریق که مقدار کمی از کلنی را با سوآب برداشته تا رنگدانه مشخص شود. این به میکروب شناس اجازه می دهد تا رنگدانه واقعی کلنی را مشاهده کند نه انعکاس رنگ از پایه محیط آگار.
* نمونه هایی از ارگانیسم هایی که رنگدانه تولید می کنند عبارتند از:سراشیا مارسه سنس تولید رنگدانه قرمز آجری می کند.
* باکتری سودوموناس آئروجینوزا دارای جلای فلزی براق و رنگدانه­های سبز است.
* باکتری کلیورا تولید رنگدانه آبی-بنفش می­کند.
* باکتری کروموباکتریوم ویولاسوم تولید رنگدانه بنفش می­کند.
* باکتری پرووتلا ملانینوژنتیکا که یک باکتری بیهوازی است دارای رنگدانه قهوه­ای-سیاه است.
* بررسی تولید پیگمان هیچوقت بر روی محیط های حاوی معرف ها به انجام نمی رسد. مثال بسیار مهم آن محیط های مک کانکی یا EMB است چون کلنی های رنگی تولید شده بر روی آنها در باکتری های تخمیرکننده لاکتوز در اثر تولید اسید از لاکتوز و واکنش با معرف است و نه تولید پیگمان.

**- بوی کلنی:** بوی کلنی با برداشتن درب پلیت مشخص می شود و به دلیل خطرات زیستی نباید مستقیماً کلنی ها را بو کرد.

* همه باکتریها دارای بوی مشخصی نیستند اما باکتری های زیر معمولاً دارای یک بوی مشخص منحصر به خود هستند:پروتئوس بوی تعفن فاضلاب دارد، باکتری استافیلوکوک آرئوس وقتی چند روز در محیط مانیتول سالت آگار بماند بوی جوراب چند روز پوشیده شده می­دهد، سودوموناس آئروجینوزا بوی میوه­ای یا بوی انگور مانند و گاهی هم بوی گل اقاقیا دارد، هموفیلوس بوی زیرزمین کثیف یا لانه موش دارد، نوکاردیا و برخی دیگر از اکتینومیست ها بوی زمین تازه کشت داده شده (یا بوی خاک آب خورده) دارند.

**- کلنی­های با چند ویژگی:** علاوه بر انواع کلنی­های که شرح داده شد کلنی­های برخی از باکتری ها دارای چند ويژگی به طور همزمان هستند.

* باکتری باسیلوس سرئوس دارای کلنی­های بزرگ، سبزرنگ، خشن و همولیتیک بر روی محیط آگار خوندار می­باشد.
* باکتری ایکنلا کرودنس کلنی کوچک با لبه مضرسی و مرکز فرو رفته بر روی شکلات آگار و آگار خون دار دارد. این باکتری تمایل به سوراخ کردن آگار دارد.

**6. الگوی رشد میکروارگانیسم ها در محیط مایع**

علاوه بر استفاده از محیط های جامد برای شناسایی اولیه میکروارگانیسم ها، همچنین می توان نکات مهمی برای شناسایی یک ارگانیسم را با مشاهده الگوی رشد آن در محیط های مایع مانند آبگوشت تیوگلیکولات به دست آورد. در این محیط اولین نکته تشخیصی مهم پی بردن به متابولسیم باکتری است.

* باسیل‌های گرم منفی بیهوازی اختیاری (یعنی آن‌هایی که در حضور یا عدم حضور اکسیژن رشد می‌کنند) در سراسر آبگوشت رشد می‌کنند. کوکسی های گرم مثبت هم که بیهوازی اختیاری هستند این الگو را دارند اما حالت فلوکاسیون یا لخته را نشان می دهند.
* موجودات کاملاً هوازی (یعنی آنهایی که برای رشد به اکسیژن نیاز دارند)، مانند سودوموناس آئروژینوزا، به سمت بالای آبگوشت رشد می کنند.
* موجودات کاملاً بیهوازی (یعنی آنهایی که در حضور اکسیژن رشد نمی کنند) در ته آبگوشت رشد می کنند و ارگانیسم های میکروآئروفیل و مخمرها در منطقه نزدیک سطح رشد می کنند.
* علاوه بر پی بردن به متابولیسم باکتری، نحوه رشد در این محیط نیز برای شناسایی اولیه باکتری ها مهم است. جریان کشیده رشد به سمت پایین لوله (حالت Streamers) یا نمای شبیه درخت انگور و حالت شکل دانه های انگور یا توپ های کوچک پف کرده یا پاف بال توسط گونه های خاصی از استرپتوکوکوس ها ایجاد می شوند.
* کدورت در سرتاسر لوله که به ابری بودن محیط ناشی از رشد (و معمولاً گاز در صورت وجود گلوکز) اشاره می کند، توسط بسیاری از گونه های انتروباکتریاسه تولید می شود که این رشد در نقاط هوازی و بی هوازی (ته لوله) خصوصیت باکتری های بیهوازی اختیاری است.
* گونه های مخمر و سودوموناس در سطح لوله تولید رشد کف مانند می کنند (گاهی رشد مخمرها در منطقه میکروآئروفیلی).

**7. رنگ آمیزی گرم از کشت مثبت:**

رنگ آمیزی گرم برای تأیید نتایج تست ها و خصوصیات کلنی و پی بردن به مورفولوژی باکتری ها مورد استفاده است. مورفولوژی و آرایش باکتریها در رنگ آمیزی گرم در گرم مثبت ها مهمتر است و می تواند به نوع احتمالی باکتری به کمک آن پی برد.

**1. کوکسی گرم مثبت:**

تک و دوتایی و زنجیره ای: استرپتوکوکوس

کوکسی تک و دوتایی: انتروکوکوس

کوکسی تک و دوتایی و خوشه ای: استافیلوکوکوس

کوکسی تک و دوتایی و تتراد: میکروکوکوس

**2. باسیل گرم مثبت:**

الف) باسیل گرم مثبت اسپوردار: باسیلوس و جنس های مشابه

ب) باسیل گرم مثبت بدون اسپور:

- شاخه دار: اکتینومیست های هوازی: نوکاردیا، گوردونیا، تسوکامورلا، رودوکوکوس، استرپتومایسس.

- بدون شاخه و ساده: کورینه باکتریوم، لیستریا، لاکتوباسیلوس، آرکانوباکتریوم، اریزیپلوتریکس، گاردنرلا واژینالیس

* رنگ آمیزی گرم در باسیل های گرم منفی خیلی اطلاعات کمک کننده ای نمی دهد اما در افتراق آسینتوباکتر که کوکسی گرم منفی رشدکننده روی محیط گرم منفی است از باسیل های گرم منفی غیرتخمیری مثل سودوموناس کمک کننده است.

**8. تست کاتالاز**

تست کاتالاز در گرم مثبتها مهمتر است و می تواند با کمک واکنش رنگ آمیزی گرم باعث افتراق کلی این باکتریها به صورت زیر شوند:

* کوکسی گرم مثبت کاتالاز مثبت: استافیلوکوکوس، میکروکوکوس و بقیه
* کوکسی گرم مثبت کاتالاز منفی: استرپتوکوکوس و انتروکوکوس و بقیه (لوکونستوک، جملا و غیره)
* باسیل گرم مثبت کاتالاز مثبت: کورینه باکتریوم، لیستریا
* باسیل گرم مثبت کاتالاز منفی: لاکتوباسیلوس، آرکانوباکتریوم، اریزیپلوتریکس، گاردنرلا واژینالیس

**9. تست اکسیداز**

* در گرم منفی ها این تست باعث تشخیص اولیه انتروباکتریال اکسیداز منفی (به استثنا‌ء پلزیوموناس شیگلوئیدز که اکسیداز مثبت است) از سودوموناس و ویبریوناسه اکسیداز مثبت می شود.
* در بین غیرتخمیریها این تست باعث افتراق آسینتوباکتر (منفی) از سودوموناس (مثبت) می شود.
* همچنین در جداسازی کوکسی های گرم منفی (آسینتوباکتر اکسیداز منفی از نایسریا و موراکسلای اکسیداز مثبت) کاربرد دارد.
* در گرم مثبتها جنس میکروکوک دارای تست اکسیداز تغییریافته (میکروداز) مثبت است.

**10. تست بایل اسکولین**

این تست باعث شناسایی انتروکوکوس و استرپتوکوکوس های گروه D (مثبت بعد از چند ساعت از بالای لوله) از استرپتوکوکوس ها (منفی) می شود.

**11. کواگولاز لامی**

برای افتراق استافیلوکوکوس های کواگولاز مثبت پاتوژن مثل استافیلوکوکوس آرئوس از استافیلوکوکوس های کواگولاز منفی (معمولاً نرمال فلور) اهمیت دارد.

**12. آزمایش PYR**

گونه‌هاي استرپتوكوكوس پایوژنز و انتروكوكوس، برخي از استافيلوكوكوس ‌ها و ندرتاً استرپتوكوكوس های گروه ويريدانس دارای تست PYR مثبت هستند. این باکتری ها موجب تغيير رنگ قرمز روشن در طي 5 دقيقه مي‌شوند.

**13. تست هیپورات**

چندين گونه باكتري شامل استرپتوكوكوس هاي بتاهموليتيك گروهB ، گاردنرلا واژيناليس و گونه‌هاي ليستريا، دارای تست هیپورات مثبت در چند ساعت هستند. در اثر هیدرولیز هیپورات رنگ بنفش تا قهوه ای تیره در لوله مشاهده می‌شود.

**14. تست حرکت**

* با روش قطره معلق از روی کلنی های رشد کرده در روز اول می توان به تحرک یا عدم تحرک باکتری پی برد.
* این تست برای افتراق آسینتوباکتر غیرمتحرک از بقیه غیرتخمیریها که اکثراً متحرک هستند مثل سودوموناس و همچنین افتراق باکتری های شیگلا و کلبسیلای بدون حرکت از بقیه انتروباکترال های غالباً متحرک مانند اشریشیاکلی کاربرد دارد.
* در باسیل های گرم مثبت برای جداسازی کورینه باکتریوم غیرمتحرک از لیستریای متحرک اهمیت دارد.

با توجه به مطالب گفته شده در فوق به طور کلی می توان باکتری ها را بر اساس خصوصیات کشت و کلنی و همچنین تست های اولیه گفته شده به صورت زیر تقسیم بندی نمود که دستورالعمل شناسایی هر کدام جداگانه آمده است:

* **کوکسی های گرم مثبت کاتالاز مثبت**
* **کوکسی های گرم مثبت کاتالاز منفی**
* **باسیل های گرم مثبت**

الگوی رشد بر روی محیط های روتین: اکثراً عدم رشد بر روی مک کانکی و EMB آگار ولی رشد بر روی بلادآگار و شکلات آگار

* **باسیل های گرم منفی تخمیری اکسیداز منفی شامل انتروباکترال** **ها**
* **باسیل های گرم منفی اکسیداز مثبت شامل ویبریو، پلزیوموناس شیگلوئیدز و آئروموناس**
* **گرم منفی های غیرتخمیری**

الگوی رشد بر روی محیط های روتین: اکثراً رشد بر روی مک کانکی، EMB آگار، بلادآگار و شکلات آگار

* **باکتری های گرم منفی خمیده شامل هلیکوباکتر، کمپیلوباکتر و آرکوباکتر**

الگوی رشد: نیازمند محیط های اختصاصی برای رشد.

* **باكتري هاي سخت رشد، کند رشد و بدون رشد:**

الگوی رشد بر روی محیط های روتین:

- اکثراً عدم رشد بر روی مک کانکی و EMB آگار

- **رشد روی شکلات آگار و بلاد آگار:** گروه هاسک، پاستورلا، بروسلا، کاپنوسیتوفاگا و نایسریا مننژیتیدیس.

- **رشد فقط روی شکلات آگار**: هموفیلوس آنفولانزا، فرانسیسلا تولارنزیس، لژیونلا و نایسریا گنوره آ.

- **عدم رشد بر روی مک کانکی و EMB آگار، بلاد آگار و حتی شکلات آگار (نیازمند محیط اختصاصی):** هموفیلوس دوکره ای و بوردتلا پرتوزیس.

- **بدون رشد (غیر قابل کشت) بر روی محیط های روتین آزمایشگاهی**: اسپیروکت ها (لپتوسپیرا، بورلیا، ترپونما)، مایکوپلاسما و اوره آپلاسما، ریکتزیا و ارگانیسم های مشابه شامل ارلیشیا، آناپلاسما و کوکسیلا و مایکوباکتریوم ها.

در شکل زیر خلاصه اولیه تشخیصی باکتریهای شایع آمده است. بعد از این تشخیص اولیه بر اساس تست های لازم برای هر دسته از باکتریها تشخیص نهایی طبق دستورالعمل های آمده در جلوتر به انجام خواهد رسید.

