**10.بسیار کندرشد و بدون رشد**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **اسم آزمایشگاه:** | {{LabName}} | |
| **اسم سند:** | **نمودارها و جداول تشخیصی باکتری های بسیار کندرشد و بدون رشد** | |
| **کد سند:** | D-005-0010 | |
| **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}} |

باکتري هاي بسیار کند رشد و بدون رشد (غیرقابل کشت) معمولاً بر روی محیط کشت های معمول، رشد بسیار کند داشته یا برخی از آنها به طور کلی قابل کشت در این محیط ها نیستند و بنابراین لازم است از روش های بجز کشت برای شناسایی آنها استفاده شود. لیست این باکتريها شامل موارد زیر است:

* اسپیروکت ها: لپتوسپیرا، بورلیا، ترپونما
* کلامیدیا، ریکتزیا و ارگانیسم های مشابه شامل ارلیشیا، آناپلاسما و کوکسیلا
* مایکوپلاسما و اوره آپلاسما
* مایکوباکتریوم

**اسپیروکت ها: لپتوسپیرا، بورلیا، ترپونما**

**تشخیص آزمایشگاهی لپتوسپیرا**

**جمع آوری نمونه:**

* در طول فاز حاد بیماری (هفته اول) خون یا مایع مغزی-نخاعی باید جمع آوری شود.
* بعد از یک هفته ادرار دارای میزان بالاتری از نمونه است و هفته ها هم می تواند باکتری در آن دفع شود.

**آزمایش مستقیم:**

* اثبات مستقیم بیماری در هفته اول در نمونه بالینی با میکروسکوپ زمینه تاریک یا فاز کنتراست امکان پذیر است اما پیشنهاد نمی شود چون اثبات وجود ارگانیسم در تعداد اندکی از نمونه ها قابل انجام است و نتیجه مثبت کاذب ممکن است به دلیل حضور مواد آرتیفکت به ویژه در ادرار گزارش شود.
* سایر تکنیک ها مانند رنگ آمیزی آنتی بادی فلئورسنت، تکنیک های هیبریدازیسیون و استفاده از پروب DNA اختصاصی، لپتوسپیرا را در نمونه های بالینی تشخیص می دهد. از Real Time PCR و PCR برای نمونه های بالینی و محیطی لپتوسپیرا استفاده می شود.

**کشت**:

* جداسازی باکتری به کمک تلقیح مستقیم 1-2 قطره از خون تازه یا CSF در محیط آزمایشگاه شامل فلچر، استوارت یا EMJH و نگهداری در محیط تاریک در دمای اتاق برای بیشتر از 6-8 هفته انکوباسیون به انجام می رسد.
* ادرار پس از هفته اول بیماری می تواند کشت شود. برای کاهش تأثیر مواد ممانعت کننده چندین رقت باید استفاده و کشت شود (غلظت های 1، 1:10 و 1:100) و یا فیلتر شود (با فیلتر 45/0 میکرومتر). لوله ها هفتگی از نظر شواهد رشد همچون کدورت، غلظت یا حلقه رشد بررسی می شوند.
* از نظر فیزیولوژیک ساپروفیت ها از پاتوژن ها به وسیله توانایی رشد در 10 درجه سانتیگراد و پایین تر افتراق داده می شود.
* یک قطره از چند میلی متری زیر سطح محیط براث گرفته می شود و به وسیله میکروسکوپ زمینه تاریک برای بررسی باکتری مارپیچی و حرکت سریع اسپیروکت ها با انتهای قلاب مانند استفاده می شود.
* بر اساس تعداد پیچیدگی ها و قلاب انتهایی عصامانند، لپتوسپیرا از سایر اسپیروکت ها افتراق داده می شود.

**تشخیص آزمایشگاهی بورلیا**

**آزمایش میکروسکوپی:**

* بورلیا ارگانیسم های انعطاف پذیر با ضخامت متفاوت از 2/0 تا 5/0 میکرومتر و طول 20-3 میکرومتر هستند.
* برخلاف لپتوسپیرا و ترپونما، بورلیا به راحتی رنگ آمیزی می شود و تشخیص آن به کمک رنگ آمیزی گیمسا یا رایت از اسمیر خون محیطی است که در تب های دوره ای با میکروسکوپ نوری معمولی اسپیروکت ها در بین سلول های قرمز مشخص هستند.
* در 70% موارد که نمونه خون از بیمار تب دار گرفته می شود ارگانیسم یافت می شود.

**کشت:** اکثر بورلیاها از جمله بورلیا رکورنتیس را می توان در محیط کِلی یا تلقیح در حیوانات (موش یا رات) جداسازی کرد اما به ندرت انجام می شود.

**سرولوژی:** تنوع آنتی ژن در اسپیروکت های عامل تب عودکننده، تشخیص سرولوژی بیماری را مشکل و غیرعملی می کند.

**تشخیص آزمایشگاهی بورلیا بورگدوفری**

* این باکتری قابل مشاهده و کشت است.
* به طور معمول دیدن اسپیروکت ها در خون بیمار مبتلا به لایم برای تشخیص میکروسکوپی دارای محدودیت است. با این وجود برای تشخیص بیماری لایم تست سرولوژی قابل اطمینان است.
* نمونه ها شامل خون، بیوپسی بافت از بیمارانEM و مایع مغزی-نخاعی و مایع مفصلی برای رنگ آمیزی یا کشت استفاده می شود ولی مناسب ترین نمونه شامل مایع مفصلی و بیوپسی بافت است.
* آماده سازی با نقره دیترل برای این باکتری و مشاهده زیر میکروسکوپ مورد استفاده است.
* برای انتقال مایعات بدن نیازی به مواد نگهدارنده نیست و نمونه بیوپسی بافت باید درون سالین استریل برای جلوگیری از خشک شدن قرار گیرد.
* PCR در تشخیص بیماری لایم هرچند دارای محدودیت است اما مهم است. توانایی شناسایی اسپیروکت ها در خون و پلاسما به وسیله PCR بستگی به مرحله بیماری دارد.
* کشت بورلیا بورگدوفری در محیط غذایی غنی در شرایط میکروآئروبیک کشت می شوند که به دلیل اینکه فرایندی سخت است معمولاً به عنوان ابزار تحقیقاتی استفاده می شود.
* بهترین نمونه برای کشت در بیماران درمان نشده شامل ناحیه اطراف زخمEM یا بافت سینویال است. مایع مغزی-نخاعی، خون، پلاسما یا بیوپسی بافت تکه تکه شده درون محیط اصلاح شده کِلی تلقیح و در دمای 34-30 درجه سانتی گراد برای بیشتر از 12 هفته در شرایط میکروآئروبیک انکوبه می شود. کشت مجدد از محیط به صورت هفتگی در محیط تازه انجام می شود و مقداری نمونه به وسیله میکروسکوپ زمینه تاریک یا فلئورسنت پس از رنگ آمیزی با آکریدین اورنج برای حضور اسپیروکت ها به انجام می رسد.

**تشخیص آزمایشگاهی ترپونما**

**جمع آوری نمونه و آزمایش میکروسکوپی:**

* زخم سیفلیس اولیه و ثانویه معمولاً حاوی تعداد زیادی اسپیروکت است.
* سطح زخم با سالین تمیز شده و با گاز استریل به آرامی خشک می شود و نباید باعث خونریزی شود. ترشحات روی اسلاید قرار می گیرد و اگر نمونه بسیار ضخیم باشد با سالین رقیق می شود. سپس یک لامل اضافه می شود و به سرعت به آزمایشگاه برای مشاهده با میکروسکوپ زمینه تاریک منتقل می شود. این روش رایج نیستزیرامیکروسکوپ زمینه تاریک نیاز به مهارت دارد و بسیار پر هزینه است با این حال اثبات حرکت ترپونما در مواد شانکر برای تشخیص سیفلیس اولیه کمک می کند.
* زخم های دهان به دلیل حضور اسپیروکت هایی که غیر پاتوژن هستند منجر به تشخیص اشتباه می شوند و نباید آزمایش شوند.
* روش های کشت در دسترس نیست و میکروسکوپ زمینه تاریک و روش های سرولوژی رایج ترین روش تشخیص هستند.
* استفاده از میکروسکوپ الکترونی هم برای شناسایی کاربرد دارد.

**تشخیص آزمایشگاهی کلامیدیا**

* جدول 1 بیشترین کاربرد تست ها و تشخیص در گروه های با جمعیت بالا و پر خطر را مشخص می کند.
* تست های مناسب یا ترکیبی از تست ها بستگی به فاکتورهای زیر دارد:شناخت جمعیت پر خطر، قابلیت و امکانات موجود برای تست ها و آزمایش، هزینه روش ها، توانایی در دسته بندی نوع نمونه و مهارت تکنسین آزمایشگاه.
* شیوع در جمعیت در به کار بردن روش تشخیصی یا روش های ترکیبی بسیار مهم است و نوع نمونه انتخاب شده برای پردازش آزمایشگاهی بستگی به علائم بالینی و جمعیت بیمار دارد (جدول 1).

جدول 1. استفاده از تست های آزمایشگاهی افتراقی برای تشخیص عفونت کلامیدیا تراکوماتیس بسته به نوع نمونه و سن.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **تست های تشخیصی قابل قبول** | **نوع نمونه** | **جمعیت بیمار** |
| کشت (اگر کشت قابل انجام نباشد تست تکثیر اسید نوکلئیک انجام می شود) | واژن | دختران پیش دبستانی |
| کشت، DFA | نازوفارنژیال | نوزادان |
| کشت | رکتال |
| EIA ,DFA، تکثیر DNA، کشت | کونژوکتیو |
| تکثیر DNA ، کشت، DFA، EIA,NAH | سرویکال | زنان |
| تکثیر DNA | واژینال |
| تکثیر DNA ، کشت، DFA، EIA,NAH | مجرای ادراری |
| تکثیر DNA | ادرار |
| کشت، DFA، تکثیر DNA | رکتال | کودکان، زنان و مردان |
| NAAT ( EIA،DFA زمانی که NAATدر دسترس نیست روش هیبریدیزاسیون DNA (NAH) پیشنهاد می شود) | مجرای ادراری | مردان |
| NAAT | ادرار |

**جمع آوري نمونه:**

* چون باکتری در سلول های اپیتلیال موجود است، نمونه باید شامل این سلول ها باشد.
* این ارگانیسم از سلول های عفونی ادرار، سرویکس، کونژوکتیویت، نازوفارنکس، رکتوم و مواد آسپیره از لوله های فالوپ و اپیدیمیس قابل تشخیص و جداسازی است. ابتدای ادرار و سواب واژن نمونه های بسیار مناسبی برای تشخیص عفونت هستند.
* سواب کلسیم آلژینات و داکرون کتان می تواند استفاده شود و سواب پلاستیکی نسبت به نوع چوبی که برای سلولها سمی است برتری دارد.
* به دلیل اینکه کلامیدیا ناپایدار است باید نمونه ها در دمای 4 درجه سانتیگراد و در کمترین زمان (طی 24 ساعت) در محیط انتقالی بافر گلوتامات فسفات سوکروز وارد شود تا زنده باقی بماند.

**آزمایش مستقیم میکروسکوپی:**

* آزمایش میکروسکوپی به کمک روش سیتولوژی که شامل تراکوما و انکلوزیون کونژوکتیویت باشد انجام می شود. حساسیت این روش را 95% تخمین زده اند اما بستگی به نوع تکنیک و کیفیت نمونه و مهارت تکنسین آزمایشگاه دارد. همچنین این روش برای کار با تعداد زیادی نمونه مشکل است و برای نمونه های انتخابی به ویژه در عفونت چشمی نوزادان پیشنهاد می شود.
* تست آنتی بادی مستقیم فلورسنت (DFA) برای اندوسرویکال یا نمونه های ادراری حساسیت 85-80% دارد. آزمایش مستقیم اجازه کنترل کیفیت سریع از نمونه ها که دارای سلول های اپیتلیال است را می دهد.

**کشت سلولی:**

* تا قبل از پیشرفتPCR ، کشت سلولی روش استاندارد برای تشخیص عفونت کلامیدیا تراکوماتیس بوده است اما کشت سلولی مفید نیست و به دلیل پیچیدگی تکنیک، زمان دریافت و آماده سازی نمونه، قیمت و طبیعت متغیر ارگانیسم دارای محدودیت است و حتی تحت شرایط سخت و مناسب برای جداسازی کلامیدیا تقریباً 80% حساسیت دارد.
* به شکل رایج برای کشت سلولی و تشخیص کلامیدیا از سلول های Mc Coy, Hep2, Hela و کلیه میمون سبز استفاده می شود.

**روش ایمنواسی:**

* رایج ترین روش آنتی ژن سریع مورد استفاده برای تشخیص این باکتری روش ایمونواسی آنزیمی (EIA) است.
* بسته به سازنده، EIA آنتی ژن کلامیدیا LPS غشای خارجی یا MOMP را تشخیص می دهد.

**تشخیص آزمایشگاهی کلامیدوفیلا پنومونیه**

* نمونه های مورد استفاده برای کلامیدوفیلا پنومونیه شامل خلط، مایع لاواژ برونشیال، آسپیره نازوفارنژیال، شستشوی گلو و سواب گلو است.
* کلامیدوفیلا را می توان کشت سلولی داد و با آنتی بادی های منوکلونال فلئورسانس کونژوگه شده مشاهده کرد.
* آنتی بادی منوکلونال هرچند می تواند انکلوزیون باکتری را تشخیص دهد ولی با کل خانواده واکنش دارد و نمی تواند این ارگانیسم را از سایر کلامیدیاها تشخیص دهد.
* در روش سرولوژی بررسی یک تیتر اگر چه به تشخیص کمک نمی کند اما یک نشانه است. یک تیترIgM بیشتر از 1:32 یا یک تیتر IgG بیشتر از 1:512 کلامیدوفیلا پنومونیه را به عنوان عامل اخیر عفونت پیشنهاد می کند. تیتر 1:16IgG یا بالاتر اما پایین تر از 1:512 نشان دهنده عفونت قبلی است.

**تشخیص آزمایشگاهی ریکتزیال** (Rickettsiales)

* به دلیل احتمال انتقال عفونت، جداسازی و کشت ریکتزیا توصیه نمی شود و پیشنهاد می شود که تنها با هود کلاس 3 کار شود.
* برای کشت خون باید در ابتدای بیماری خون جمع آوری شود.
* تشخیص ایمنوهیستوشیمی و تشخیص ملکولی روش های اولیه برای تشخیص عفونت های ریکتزیا است.
* آنتی بادی مستقیم منوکلونال که به شکل تجاری در دسترس است علیه تب خال دار یا گروه تیفوس استفاده می شود.
* به طور رایج روش های سرولوژیک تنها تست های آزمایشگاهی هستند که برای تشخیص بیماری ریکتزیایی انجام می گیرند.
* آزمایش رنگ آمیزی مستقیم (گیمسا، رایت) از خون محیطی یا بافی کوت برای مورولا در تشخیص عفونت ارلیشیا کافینسیز استفاده می شود که البته روش حساسی نیست (29% حساسیت).
* تشخیص آنتی ژن در بافت هایی مانند مغز استخوان، کبد و طحال شرح داده شده است که البته باز هم، حساسیت کم است (40%) و واکنش متقاطع با گونه های دیگر ذکر شده است. این باعث می شودNAATs یا روش های ملکولی به عنوان متداول ترین روش برای تشخیص مستقیم آن باشد.
* این باکتری همچنین از خون محیطی در تک لایه های کشت سلولی جدا شده است.
* اکثر موارد بیماری به صورت گذشته نگر با آزمایش سرولوژیک تشخیص داده می شوند وIFA پرکاربردترین روش است.

**تشخیص آزمایشگاهی آناپلاسما:**

* همانند ریکتزیال ها، برای تشخیص آن می توان از رنگ آمیزی خون محیطی و بافی کوت استفاده کرد.
* مورول ها در گرانولوسیتها یافت می شوند و حساسیت آن به دلیل تعداد زیادی گلبول سفید آلوده حدود 60٪ است.
* تشخیص را می توان با تشخیص مستقیم آنتی ژن،NAAT و جداسازی در کشت های سلولی نیز انجام داد.
* کیت های سرولوژیکIFA برای تشخیص آنتی بادی های آناپلاسما فاگوسیتوفیلوم در دسترس هستند.

**تشخیص آزمایشگاهی کوکسیلا بورنتی**

* تشخیص آزمایشگاهی این باکتری که عامل تب Q است را می توان با روش ایمونوفلورسانس مستقیم بافت آلوده و ایمونوهیستوشیمی انجام داد. با این حال، به استثنای بافت قلب در موارد اندوکاردیت، بافت عفونی حاوی تعداد کمی باکتری است.
* روش های ملکولی NAATها مانند روش PCR نیز در تشخیص عفونت‌ها موفق بوده‌اند. خون کامل و بافی کوت اغلب در تشخیص ارگانیسم موفق هستند.
* کوکسیلا بورنتی بسیار مسری است و جداسازی در کشت سلولی باید فقط در تأسیسات ایمنی زیستی سطح 3 انجام شود.
* چندین سنجش سرولوژیک برای تشخیص آنتی بادی در موارد حاد و مزمن شرح داده شده است. IFA روش انتخابی است. همچنین کیت های EIA به صورت تجاری در دسترس هستند و دارای حساسیت ها و ویژگی های قابل مقایسه باIFA هستند.

**باکتری های کلاس مولیکوتس**

**تشخیص آزمایشگاهی مایکوپلاسما**

* به دلیل اینکه جداسازی مایکوپلاسما پنومونیه از کشت دشوار است (حساسیت 40%) و رشد نیاز به چند هفته و مهارت دارد، جداسازی از دستگاه تنفسی به ندرت انجام می شود.
* مایکوپلاسما هومینیس و گونه های اوره آپلاسما نیازهای سخت گیرانه کمتری دارند اما نیاز به کلسترول برای سنتز غشای پلاسمایی دارند.
* مایکوپلاسما هومینیس تنها گونه ای است که روی بلادآگار و شکلات آگار رشد می کند.

**جمع آوری نمونه و انتقال نمونه:**

* نمونه برای کشت مایکوپلاسما شامل مایعات بدن از قبیل خون، خلط، مایع سینوویال،CSF، مایع آمنیوتیک، ادرار، آسپیره زخم، نازوفارنژیال، سرویکال و سواب واژن است. نمونه بافت هم برای کشت استفاده می شود.
* به دلیل عدم وجود دیواره سلولی، مایکوپلاسماها به حرارت و خشک شدن حساس هستند و به دلیل این حساسیت به طور ایده آل نمونه ها باید در کنار بستر بیمار تلقیح شوند.
* برای جداسازی مایکوپلاسما از خون 10 میلی لیتر خون برای بزرگسالان توصیه می شود.SPS ممانعت کننده برای مایکوپلاسما است و اضافه کردن ژلاتین 1% به اثر مهاریSPS غلبه می کند.
* به همین دلیل محیط های تجاری خون مورد استفاده در دستگاه های اتوماتیک استفاده نمی شود یا باید ژلاتین به ویال های آنها اضافه شود. مایعات باید سانتریفیوژ شوند و سلول های ته نشین در حجم کمی از محیط مایع تلقیح شوند.
* قبل از تلقیح مهم است که نمونه ها به کمک محیط براث تا غلظت سه برابر رقیق شوند (سه رقت از یک دهم تا یک هزارم تهیه شود) و بعد کشت شوند تا اثرات ممانعت کنندگی مواد ضدباکتریال، آنتی بادی و سایر ممانعت کننده ها که در نمونه حضور دارند جلوگیری شود.
* اگر کشت امکان پذیر نیست نمونه ها باید سریعاً در محیط انتقالی شامل SP4 (بافر سوکروز فسفات، بیس مایکوپلاسما، سرم اسب 20% و نوترال رد) یاShepards 10B مایع یا 2SP که برای مایکوپلاسما طراحی شده اند منتقل شوند.
* استفاده از سواب با سر کتانی و دسته چوبی به دلیل تأثیرات بازدارندگی احتمالی توصیه نمی شود. بیشتر منابع استفاده از سواب پلی استر داکرونی یا آلژینات کلسیم با دسته آلومینیوم یا پلاستیکی را پیشنهاد می کنند.
* اگر کشت در 24 ساعت انجام نشود به محض رسیدن به آزمایشگاه نمونه ها باید در دمای 70- درجه سانتی گراد قرار گیرند.
* چون این باکتریها دیواره ندارند و ریز هستند مایعات را می توان با استفاده از فیلتر سرنگی 45/0 میکرومتری استریل فیلتر کرد که از آن عبور می کنند و بقیه باکتریها گیر می افتند. سپس مایع عبوری را می توان کشت داد.
* در جدول 3 شرایط انتقال و ذخیره برای مایکوپلاسما پنومونیه، مایکوپلاسما هومینیس و اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم آورده شده است.

جدول 3. شرایط انتقال و ذخیره برای مایکوپلاسما پنومونیه، مایکوپلاسما هومینیس و اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **پردازش** | **ذخیره** | **محیط انتقالی** | **شرایط انتقال** | **نوع نمونه** |
| به وسیله سانتریفیوژ با سرعت بالا تغلیظ شده و به شکل 1:10 یا 1:1000 تقسیم شده و محیط مایع برای جدا کردن مواد ممانعت کننده و باکتری های آلوده کننده، با استفاده از فیلتر 45/0 میکرومتری ادرار فیلتر شود. | برای 24 ساعت یا بیشتر در ºC 4 \* | نیازی نیست | به مدت 1 ساعت از زمان جمع آوری یا بر روی یخ نگهداری شود یا در دمای ºC 4 | مایعات بدن یا نمونه های مایع بجز خون |
|  | برای 24 ساعت یا بیشتر در ºC 4 \* | %5 آلبومین در تیریپتیکاز سوی مایع اصلاح شده استوارت 2SP)  Shepard’s 10B broth برای اوره آپلاسما  SP4 مایع برای سایر مایکوپلاسما و مایکوپلاسما پنومونیه  محیط انتقالی مایکوپلاسما (تریپتیکاز فسفات مایع، 10% آلبومین سرم گاو 100000 واحد پنی سیلین در هر میلی متر، محیط انتقالی universal) | به سرعت در محیط انتقالی قرار می گیرد | سواب |
| چرخ شده (نه خرد شده) و تقسیم شده (1:10،1:100) در محیط انتقالی | برای 24 ساعت یا بیشتر در ºC 4 \* | نیازی نیست فقط از خشک شدن ممانعت شود. | به مدت 1 ساعت از زمان جمع آوری یا بر روی یخ نگهداری یا در دمای ºC 4 | بافت |

\*: اگر پس از سانتریفیوژ در محیط انتقالی تقسیم شود باید در درمای 70- تا 80- درجه سانتیگراد ذخیره می شود.

**تشخیص مستقیم:**

* به دلیل فقدان دیواره سلولی، مولیکوتس ها به وسیله رنگ آمیزی گرم قابل مشاهده نیستند و رنگ آمیزی DNA فلئورسانس (آکریدین اورنج) استفاده می شود اما اختصاصی نیست.
* تشخیص آنتی ژن دارای حساسیت پایین است و معمولاً پیشنهاد نمی شود.

**کشت**:

* چندین محیط برای جداسازی مولیکوتس ها گسترش یافته و معمولاً پنی سیلین برای کاهش غلظت باکتری های مزاحم به محیط ها اضافه می شود (جدول 4).
* مایکوپلاسما هومینیس و اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم به کلسترول برای سنتز غشاء پلاسمایی نیاز دارند و همچنین سایر فاکتورهای رشد مثل سرم جنین گوسالهv/v20%) ) یک منبع تغذیه سنتی برای آنهاست.
* مایکوپلاسما پنومونیه و مایکوپلاسما ژنیتالیوم به گلوکز نیاز دارند (منبع بزرگ انرژی است)، مایکوپلاسما هومینیس به آرژینین نیاز دارد و گونه اوره آپلاسما به اوره نیاز دارد. همچنین گونه اوره آپلاسما نیاز به محیط باpH برابر 6 نیاز دارد.
* حفظ گونه اوره آپلاسما در کشت دشوار است زیرا زمانی که اوره محیط تمام شده باشد، باکتری به علت تغییرpH به دلیل مصرف اوره حساس است و سریعاً می میرد.
* به دلیل اینکه مایکوپلاسما کدورت در محیط مایع تولید نمی کند معرفpH شامل فنل رد باید برای تشخیص رشد اضافه شود.SP4 مایع و آگار برای مایکوپلاسما پنومونیه و مایکوپلاسما هومینیس مناسب است.
* محیط های A7 وA8 آگار به عنوان محیط جامد برای جداسازی مایکوپلاسما هومینیس و گونه اوره آپلاسما استفاده می شود. در حال حاضر کیت های آماده برای جداسازی و شناسایی این باکتریها گسترش یافته است.

جدول 4. کشت مایکوپلاسما پنومونیه، مایکوپلاسما هومینیس و گونه های اوره آپلاسما.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **شرایط انکوباسیون** | **محیط** | **ارگانیسم** |
| مایع: ºC 37 شرایط محیط برای 4 هفته  جامد: ºC37 شرایط محیط به همراه 5-10% CO2 یا بیهوازی همراه با 95%N2  و%5 CO2  همه کشت ها باید تا 4 هفته نگهداری شوند. | محیط دوفازی SP4(Ph7/4)  سیستم سه فازی Mycotrim RS, Irvine Scientific, Irvine, CA  PPLO مایع یا آگار و عصاره مخمر و سرم اسب  محیط اصلاح شده N.Y City | مایکوپلاسما پنومونیه |
| مایع: ºC 37 شرایط محیط برای بیشتر از 7 هفته  جامد: ºC37 شرایط محیط به همراه 5-10% CO2 یا بی هوازی همراه با 95%N2  و%5 CO2 برای 2-5 روز  کشت تناسلی برای 7 روز باید نگهداری شود قبل از اینکه منفی گزارش شود. | محیط A7,A8 پنیسیلین باید برای کم کردن باکتری ها اضافه شود.  محیط N.Y City  محیط اصلاح شده N.Y City  محیط SP4 گلوکز همراه با آرژینین£  محیط SP4 گلوکز همراه با اوره€  سیستم سه فازی Mycotrim GU, Irvine Scientific  Shepard’s 10B broth (or Ureaplasma 10C broth) | برای اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم  اوره آپلاسما پاروم  مایکوپلاسما هومینیس + |

+ تبدیل آرژینین به اورنیتین و رشد طیف وسیعی از pH، £ برای مایکوپلاسما هومینیس، € برای اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم،\*استفاده از اوره و نیاز به محیط اسیدی

**جداسازی و تشخیص:**

* بعد از تلقیح محیط مایع باید در دمای 37 درجه سانتی گراد در شرایط اتمسفر قرار گیرد و محیط آگار جامد در شرایط اتاق با 5-10 درصدCO2 یا اتمسفر بیهوازی از 95% N2 و 5%CO2 انکوبه شود. انکوبه کردن در جار شمع دار هم کفایت می کند.
* سرعت رشد، محل جداسازی از بدن و ظاهر کلنی می تواند به تشخیص مایکوپلاسماها کمک کند. کلنی مایکوپلاسما هومینیس و اوره آپلاسما در طی 2-4 روز ظاهر می شود در حالی که مایکوپلاسما پنومونیه در طول 21 روز یا طولانی تر ظاهر می شود.
* گونه های مایکوپلاسما اغلب در زیر سطح محیط جامد رشد می کنند. بنابراین، انتقال کلنی ها با یک لوپ بی اثر است.
* کلنی های مایکوپلاسما با داینس (Dienes) یا متیلن بلو رنگ می شوند. رنگ آمیزی به وسیله قرار دادن یک قسمت کوچک آگار حاوی کلنی روی لام و پوشاندن با رنگ انجام می شود و سپس یک لامل اضافه شده و در زیر میکروسکوپ استریو با نور کم مشاهده می شود. با داینس یا متیلن بلو کلنی ها به رنگ آبی روشن در اطراف و مرکز آبی تیره دیده می شوند.
* گونه های مایکوپلاسما در جداسازی اولیه زمانی که با میکروسکوپ استریو مشاهده شوند اغلب دارای کلنی های مخلوط هستند.

**تست های بیوشیمیایی:**

جدول 5. افتراق بیوشیمیایی گونه های مهم مایکوپلاسما و اوره اپلاسما اوره الیتیکوم.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| اوره | متابولیسم آرژینین | متابولیسم گلوکز | ارگانیسم |
| منفی | مثبت | مثبت | مایکوپلاسما فرمنتانس |
| منفی | منفی | مثبت | مایکوپلاسما ژنیتالوم |
| منفی | مثبت | منفی | مایکوپلاسما هومینیس |
| منفی | منفی | مثبت | مایکوپلاسما پنومونیه |
| مثبت | منفی | منفی | اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم |

