**8. نايسريا و موراکسلا**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **اسم آزمایشگاه:** | {{LabName}} | |
| **اسم سند:** | **نمودارها و جداول تشخیصی باكتري هاي سخت رشد، کندرشد و بدون رشد:**  **1. نايسريا، موراکسلا و ارگانيسم هاي مشابه** | |
| **کد سند:** | D-005-0008 | |
| **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 سخت رشد، کندرشد یا بدون رشد شامل 4 دسته زیر هستند:**

**1.** **کوکسي هاي گرم منفي سخت رشد**: نايسريا (*Neisseria*)، موراکسلا و ارگانيسم هاي مشابه

**2.** **باسيل هاي گرم منفي سخت رشد**: هموفيلوس (*Haemophilus*)، بوردتلا (*Bordetella*)، لژيونلا (*Legionella*)، گروه هاسک (*HACEK group*)، کاپنوسيتوفوگا (*Capnocytophaga*)، فرانسيسلا (*Francisella*)، بروسلا (*Brucella*) و پاستورلا (*Pasteurella*)

**3.** **باکتری های بسیار کندرشد یا بدون رشد** **(غیرقابل کشت)**: اسپیروکت ها (لپتوسپیرا، بورلیا، ترپونما)، کلامیدیا، ریکتزیا و ارگانیسم های مشابه (شامل ارلیشیا، آناپلاسما و کوکسیلا)، مایکوپلاسما و اوره آپلاسما و مایکوباکتریوم.

**4.** **کوکسي گرم مثبت**: پنوموکوک و استرپتوکوک های نقص تغذیه ای (که قبلاً کامل بحث شدند).

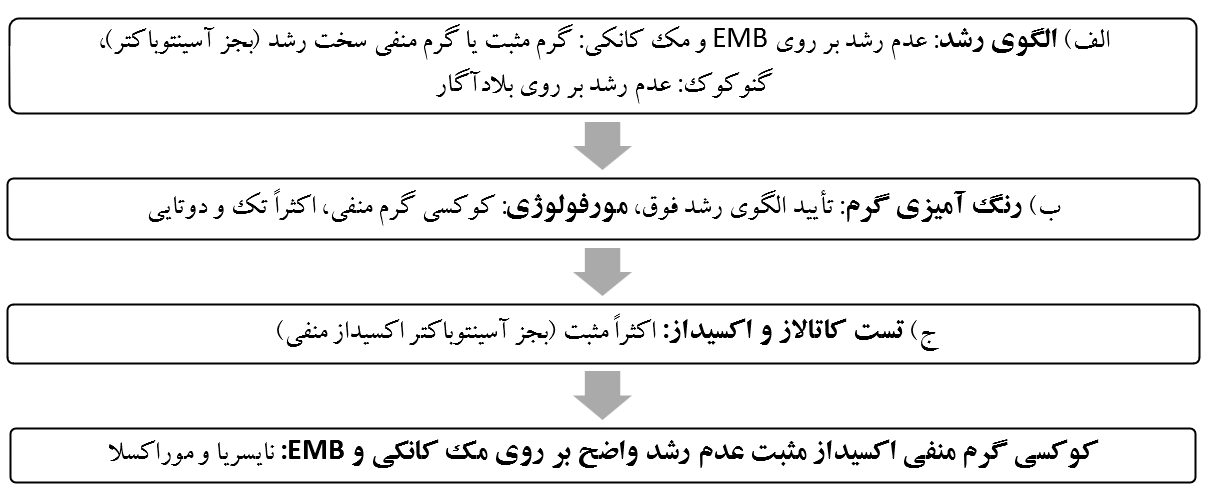
**کوکسی های گرم منفی سخت رشد: نايسريا، موراکسلا و ارگانيسم هاي مشابه**

**محيط هاي انتخابي اختصاصی نایسریاها**

برای جداسازی نایسریاها به خصوص گنوکوک که از نقاط دارای فلور طبیعی باید جدا شود باید از محیط های کشت انتخابی استفاده نمود تا این فلور طبیعی را مهار کرد. مهمترین محيط انتخابي معمول برای نایسریاها تایرمارتین (Thayer-Martin) می باشد.

**تشخيص آزمايشگاهي کوکسي هاي گرم منفي**

**1. تشخیص دسته بندی کلی:**



**2. تشخیص جنس و گونه:**

گونه هاي نايسريا و جنس هاي مشابه به سه گروه تقسيم شده اند:

**گروه يک:** پاتوژن هاي بالقوه و سنتي، **گروه دو:** گونه هاي کومنسال نايسريا که توانايي رشد در محيط هاي انتخابي مانند تایر مارتین را دارند.**گروه سه:** گونه هاي کومنسال نايسريا که معمولاً روي محيط هاي انتخابي رشد نمي کنند.

ارگانيسم هاي متعلق به گروه دو و سه براساس تخمير کربوهيدرات به دو گروه ساکارولايتيک (داراي توانايي تخمير کربوهيدرات) و آساکارولايتيک (فاقد توانايي تخمير) تقسيم مي شوند.

جدول 1. تست هاي شناسايي گونه هاي نايسريا و جنس هاي مشابه شامل موراکسلا و کینگلا. ML: مارتین لوئیس، MTM: تایرمارتین اصلاح شده، NYC: نیویورک سیتی.

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| ارگانیسم | تست­هاي سنتي | | | | | | | | تست­هاي اضافي | | | | | |
| رشد روي ML، MTM يا NYC | کاتالاز | اکسيداز | گلوکز | مالتوز | لاکتوز (ONPG) | سوکروز | فروکتوز | رشد روي BA يا CHOC agar در °c 22 | رشد روي نوترينت آگار در °c 35 | | احیا نيترات | احیا نيتريت | DNase |
| گروه 1: پاتوژن ­هاي بالقوه و سنتي | | | | | | | | | | | | | | |
| *N. gonorrhoeae*  *N. meningitides* | +  + | +  + | +  + | +  + | -  + | -  - | -  - | -  - | -  - | -  - | | -  - | -  V | -  - |
| گروه 2: گونه­هاي کومنسال با توانايي رشد روي محيط هاي آگار انتخابي | | | | | | | | | | | | | | |
| ساکارولايتيک | | | | | | | | | | | | | | |
| *K. denitrificans* | *V* | *-* | *+* | *(+)* | *-* | *-* | *-* | *-* | *+* | *+* | *+* | | *V* | *-* |
| *N. lactamica* | *+* | *+* | *+* | *+* | *+* | *+* | *-* | *-* | *v* | *+* | *-* | | *V* | *-* |
| *N. polysaccharea* | *+* | *+* | *+* | *+* | *+* | *-* | *V* | *-* | *-* | *+* | *-* | | *V* | *-* |
| آساکارولايتيک | | | | | | | | | | | | | | |
| *N. cinerea* | V | + | + | - | - | - | - | - | - | + | | - | + | - |
| *M. catarrhalis* | V | + | + | - | - | - | - | - | V | + | | + | + | + |
| گروه 3. گونه­هاي کومنسال فاقد توانايي رشد روي محيط هاي آگار انتخابي | | | | | | | | | | | | | | |
| ساکارولايتيک | | | | | | | | | | | | | | |
| *N. mucosa* |  | + | + | + | + | - | + | + | + | + | | + | + |  |
| *N. sicca* | - | + | + | + | + | - | + | + | + | + | | - | + | - |
| *N. Subflava* Biovars: | | | | | | | | | | | | | | |
| *Subflava*  *Flava*  *perflava* | - | + | + | + | + | - | - | - | + | + | | - | V | - |
| - | + | + | + | + | + | - | + | + | + | | - | V | - |
| - | + | + | + | + | - | + | + | + | + | | - | V | - |
| گروه 3. گونه­هاي کومنسال فاقد توانايي رشد روي محيط هاي آگار انتخابي | | | | | | | | | | | | | | |
| آساکاروليتيک | | | | | | | | | | | | | | |
| *N. flavescens* | - | + | + | - | - | - | - | - | + | + | | - | + | - |
| *N. elongate* | - | - | + | - | - | - | - | - | + | + | | - | + | - |
| *N. weaver* | - | + | + | - | - | - | - | - | + | + | | - | + | - |
| *N. bacilliformis* | - | V | + | - | - | - | - | - | + |  | | V | V |  |

جدول 2. خلاصه شناسایی گونه هاي اصلی بیماریزای نايسريا و ارگانيسم هاي مرتبط.

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| *Kingella* | *Moraxella* | *N.flavescens* | *N.sicca* | *N.cinerea* | *N.lactamica* | *N.meningitidis* | *N.gonorrhoeae* | خصوصيات |
| - | - | + | + | - | - | - | - | توليد پيگمان در نوتريت آگار |
| - | + | + | + | + | + | + | + | کاتالاز (3% H2O2) |
| - | - | - | - | - | - | - | + | سوپراکسول (30% H2O2) |
| + | D | - | - | D | + | + | + | رشد روي MTM، ML، NYC |
| - | + | + | + | + | + | - | - | رشد روي نوترينت در °C35 |
| + | - | - | + | +٭ | + | + | + | گلوکز |
| - | - | - | + | - | + | + | - | مالتوز |
| - | - | - | + | - | - | - | - | سوکروز |
| - | - | - | - | - | + | - | - | لاکتوز (ONPG) |
| - | - | - | + | - | - | - | - | فروکتوز |
| - | + | - | - | - | - | - | - | DNase |
| + | + | - | - | - | - | - | - | احياء نيترات |

درصورت جداسازی کوکسی گرم منفی اکسیداز مثبت در مناطقی که فلور طبیعی هم حضور دارند مانند مجرا نیاز است که نايسرياهاي بيماري زا از غير بيماري زای فلور طبیعی افتراق داده شوند. نايسرياهاي بيماري زا برخلاف غیرپاتوژنها فاقد رشد در نوترينت آگار C֯ 35 دما و روي شکلات آگار يا بلاد آگار در C֯ 22 درجه است و روی تاير مارتين رشد دارند (جدول 3).

جدول 3. افتراق نايسرياهاي بيماري زا از غير بيماري زا بر اساس الگوی رشد بر روی محیط های کشت.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **خصوصيت** | **پاتوژن** | **غير پاتوژن** |
| رشد در نوترينت آگار در C֯ 35 درجه | ندارد | دارد |
| رشد روي شکلات آگار يا بلاد آگار C֯ 22 درجه | ندارد | دارد |
| رشد روي تاير مارتين يا محيط نيويورک سيتي | دارد | ندارد |

**تشخیص آزمایشگاهی نایسریا گنوره آ (گنوکوک)**

* نمونه هاي مناسب براي جداسازي گنوکوک شامل نمونه هاي دستگاه تناسلي، مقعد، حلق و مايع مفصل هستند.
* نمونه هاي انتخابي براي عفونت هاي دستگاه تناسلي در مردان نمونه مجراي ادراري و در زنان نمونه دهانه ي رحم مي باشد.
* در مردان ترشحات چرکي به طور مستقيم با سواب جمع آوري و کشت مي شوند. اگر هيچگونه ترشحي وجود نداشته باشد، سواب را تا 2 سانتي متري مجراي ادراري وارد کرده، به آرامي چرخانده تا ترشحات جمع آوري شوند.
* براي کشت از مقعد، نمونه بايد از 5-4 سانتي متري کانال مقعد با سواب جمع آوري شود. از به کاربردن مواد ضدعفوني کننده قبل از نمونه گيري خودداري شود.
* نمونه هايي که براي جداسازي نايسريا گونوره آ جمع آوري مي شوند بايد بلافاصله کشت داده شود. از آنجايي که گنوکوک شديداً حساس به خشکي و تغييرات دماي محيط است، کشت مستقيم بر روي محیط ها و نه انتقال نمونه در محيط هاي انتخابي گنوکوک نتايج مطلوب تري دارد.
* سواب هاي پنبه اي و آلژينات کلسيم مهارکننده باکتري هستند. اگر سوآب پنبه اي استفاده شود، محيط انتقالي بايد حاوي شارکول یا ذغال فعال (مهارکننده اسيدهاي چرب سمي موجود در فيبرها) باشد؛ بنابراين سواب هاي ساخته شده با الياف مصنوعي ريوني يا داکرون مناسب ترند.
* نهايتاً محیط ها در °C 35 در حضور %5-3 CO2 انکوبه مي شوند. زماني که کشت مستقيم ممکن نباشد سواب هاي تلقيح شده بايد در يک محيط انتقالي مناسب مثل آمیس بهمراه شارکول سريعاً به آزمايشگاه انتقال داده شود و ظرف حداکثر 6 ساعت کشت داده شود.
* نمونه هاي مايع (مثل CSF) بايد تا زمان کشت در °C37 ذخيره شوند چون هم نايسريا گنوره آ و هم نايسريا مننژيتيديس به سرما حساس اند. حدود ml 1 از مايعات مشکوک به حضور هر کدام از اين دو پاتوژن بايد در دماي اتاق و دورg ×1500 به مدت 15 دقيقه سانتريفيوژ شده و رسوب باقي مانده ورتکس شده و از آن به محيط هاي کشت مناسب تلقيح شود.

**رنگ آميزي گرم:**

* از نمونه هاي ادراري-تناسلي بايد اسمير تهيه و رنگ آميزي گرم شود. به دليل وجود نايسرياهاي کومنسال، رنگ آميزي گرم نمونه هاي حلقي توصيه نمي شود.
* هم گونه هاي جنس نايسريا و هم موراکسلا کاتاراليس به شکل ديپلوکوک هاي گرم منفي هستند که از سمت مسطح خود در مجاورت هم قرار مي گيرند و به همين دليل لوبيا يا کليه اي شکل هستند.
* وجود ديپلوکوک گرم منفي داخل سلولي در ترشحات مجراي ادراري مرداني که داراي علائم بيماري نيز هستند، شاهدي است بر وجود عفونت گنوکوکي که به ميزان %89 با نتايج کشت هم خواني دارد.
* از آن جايي که زنان داراي فلور نرمال کومنسال واژن و مقعد هستند که شبيه گنوکوک اند، رنگ آميزي گرم از نمونه مستقيم واژن زنان فقط در %70-50 موارد با کشت هم خواني دارد؛ بنابراين در زنان داراي ترشحات و ساير علائم باليني، رنگ آميزي گرم تا حدودی مفيد بوده اما کشت براي تأیید عفونت لازم است.
* رنگ آميزي گرم مستقيم مايعات بدن هم براي نايسريا گونوره آ و هم براي نايسريا مننژيتيديس با استفاده از سانتريفيوژ بهترين نتايج را دارد زيرا با اين روش تعداد کم ارگانيسم هاي نمونه تا صد برابر افزايش مي يابد.
* در يک رنگ آميزي گرم با وجود بيش از 5 نوتروفيل پلي مورفونوکلوئر در هر ميدان ميکروسکوپي روغنی بدون مشاهده باکتري، اورتريت غير گنوکوکي ناشي از کلاميديا تراکوماتيس يا اوره آپلاسما اوره آليتيکوم پيشنهاد مي شود.
* **نحوه گزارش لام مستقیم ناحیه تناسلی برای عفونت گنوکوک و غیرگنوکوک:**

**Gonococcus**: Intracellular and extracellular gram negative diplococci were seen.

**Non-gonococcal urethritis (NGU):** No gram negative diplococci were seen.

**Comment**: Presence of >5 WBC/oil field without bacterial observation, can recommend non-gonococcal urethritis (*Chlamydia trachomatis* or *Ureaplasma urealyticum*).

**کشت:**

* گنوکوک معمولاً روي بلادآگار رشد نداشته اما روي شکلات آگار رشد مي کند.
* مننگوکوک و موراکسلا کاتاراليس و گونه هاي ساپروفيت نايسريا رويBA گوسفندي و شکلات آگار به خوبي رشد مي کنند.

**انکوباسیون:**

* پليت هاي تلقيح شده، در دمای C° 35-37 و در حضور %5-3 CO2 و در شرايط مرطوب، انکوبه مي شوند. براي فراهم شدن اتمسفرCO2 ، انکوباسيون در انکوباتورCO2 يا کيسه هاي توليدکنندهCO2 يا در جار بيهوازي يا جار شيشه اي حاوي شمع انجام مي شود.
* شمع ها باید يک تا دو عدد کوچک و غيررنگي و غيرمعطر باشند چون ممکن است رشد گنوکوک و مننگوکوک را مهار کنند؛ بنابراين فقط شمع هايي در جار بيهوازي استفاده مي شود که از موم سفيد ساخته شده اند.
* نايسريا گونوره آ، نايسريا مننژيتيديس و موراکسلا کاتاراليس بهترين رشد را در حضور غلظت هاي بالاتري از CO2 (3-7 درصد) دارند. محيط هاي کشت تا 72 ساعت بايد به طور روزانه از نظر رشد بررسي شوند.

جدول 4. شناسایی گونه های اصلی نایسریا به کمک مصرف کربوهیدراتها.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **گونه ها** | **تولید اسید از:** | | | |
| گلوکز | مالتوز | لاکتوز | سوکروز |
| نایسریا مننژیتیدیس | + | + | - | - |
| نایسریا گونوره آ | + | - | - | - |
| نایسریا سیکا | + | + | - | + |
| نایسریا لاکتامیکا | + | + | + | - |
| موراکسلا کاتارالیس | - | - | - | - |

**تشخیص آزمایشگاهی نایسریا مننژیتیدیس (مننگوکوک)**

**اسمير مستقيم:** در اسمير مستقیم ديپلوکوک هاي گرم منفي در داخل لکوسيت هاي پلي مورفو نوکلئر ديده مي شوند.

**کشت و انکوباسیون:‌** روي بلاد آگار و شکلات آگار کشت مي شوند.

* نمونه هايي که از سطوح مخاطي جمع آوري شده اند حاوي فلور نرمال بوده و بنابراين بايد در محيط هاي کشت انتخابي تلقيح شوند یا در محیط های غیرانتخابی مثل شکلات یا بلاد آگار به صورت خطی کشت داده شوند که در این مورد چون باکتری به کولیستین مقاوم است، هنگام تلقیح باکتری بر روی محیط ها می توان یک دیسک کولیستین هم برای شناسایی اولیه و هم مهار فلور طبیعی گذاشت.
* شرايط انکوباسيون مشابه نايسريا گونوره آ همراه با CO2 مي باشد و کشت ها تا 72 ساعت بايد روزانه بررسي شوند. کلني هاي مننگوکوک معمولاً بعد از 24-18 ساعت روي بلاد آگار رشد مي کنند (بر خلاف گنوکوک که روی بلادآگار رشد ندارند).
* کلنی مننگوکوک خاکستري، محدب، شفاف و داراي اندازه متوسط (حدود 1 ميليمتر) و سويه هاي کپسولدار کلنی موکوئيدی دارند.
* بلاد آگار در نواحي زيرين کلنی به رنگ سبز ملايم مشاهده مي شود. نايسريا مننژيتيديس در محيط هاي انتخابي به شکل کلنی هاي بي رنگ تا خاکستري، محدب و صاف ظاهر مي شود.

**لام گرم از کلنی:** شناسايي مننگوکوک با رنگ آميزي گرم کلنی هاي مشکوک آغاز مي شود. مورفولوژي ميکروسکوپي نايسريا مننژيتيديس به شکل ديپلوکوک هاي گرم منفي است که از سطوح صاف در مجاورت هم قرار گرفته اند.

**شناسايي قطعي:** اولين تست تأییدي براي نايسرياها تست اکسيداز است که براي اين باکتري ها مثبت است. همچنین تست کاتالاز مثبت ولی سوپراکسال منفی است. شناسايي قطعي نايسريا مننژيتيديس با انجام تست هاي تخمير قند، تست هاي رنگزاي آنزيم يا تست هاي چندگانه صورت مي گيرد. مننگوکوک قادر به تخمير هر دو نوع قند گلوکز و مالتوز مي باشد.

**سروتایپینگ:** اگر ايزوله اي به عنوان نايسريا مننژيتيديس تشخيص داده شد، براي تعيين نوع سروگروه، تست هاي سرولوژي بايد انجام شود. براي اين منظور در صورت وجود این آزمایش در آزمایشگاه، ايزوله ها به يک آزمايشگاه مرجع فرستاده مي شوند. علاوه بر اين، تکنيک هاي مولکولي نيز توسط آزمايشگاه هاي تخصصي انجام مي شود. دوازده سروگروه مختلف براي نايسريا مننژيتيديس شناسايي شده است که شامل سروگروه هاي A، B، C، H، I، K، L، W135، X، Y، Z و (29E (Z مي باشند.

سروگروه هاي A، B، C، W135 وY شايع ترين عامل بيماري هاي سيستميک در ايالت متحده هستند. بعضي توليدکننده ها آنتي سرم هاي چندمنظوره (پلي والان) حاوي ترکيبي از سروگروه ها براي شناسايي توليد مي کنند. شناسايي سرولوژيکي معمولاً از طريق آگلوتيناسيون اسلايدي انجام مي شود.

**تشخیص آزمایشگاهی موراکسلا کاتارالیس**

* نمونه هايی که براي موراکسلا کاتاراليس جمع آوري مي شوند شامل ترشحات گوش مياني، نازوفارنکس، آسپيراسيون سينوس، آسپيراسيون خلط يا آسپيراسيون برونش هستند.
* ارگانيسم روي شکلات آگار و بلادآگار رشد کرده و کلنی هايي صاف، کدر و به رنگ خاکستري تا سفيد توليد مي کند. اصطلاح "توپ هاکي" براي اين کلنی ها به کار مي رود زيرا اگر کلنی ها با يک لوپ تحت فشار قرار گيرند همچنان دست نخورده و بدون آسيب باقي مي مانند. کلنی هاي قديمي تر ممکن است ظاهري مثل "چرخ واگن" پيدا کنند.
* موراکسلا کاتاراليس از نظر مورفولوژی و خصوصیات کشت می تواند بسیار مشابه نایسریاها باشد و همانند آنها اکسيداز و کاتالاز مثبت است اما فاقد توانايي تخمير قندها است.
* علاوه بر این خاصیت، اين ارگانيسم بر اساس اين ويژگي ها از گنوکوک و مننگوکوک افتراق داده مي شود: رشد روي بلاد آگار در دمای C° 22 و نوترينت آگار در دمای C° 35، احياء نيترات به نيتريت، کولیستین حساس، توليد DNase و واکنش بوتيرات استراز مثبت. موراکسلا کاتاراليس تنها عضو اين گروه است که DNA را هيدروليز مي کند. تري بوتيرين به عنوان سوبسترا براي تشخيص فعاليت بوتيرات استراز به کار مي رود.