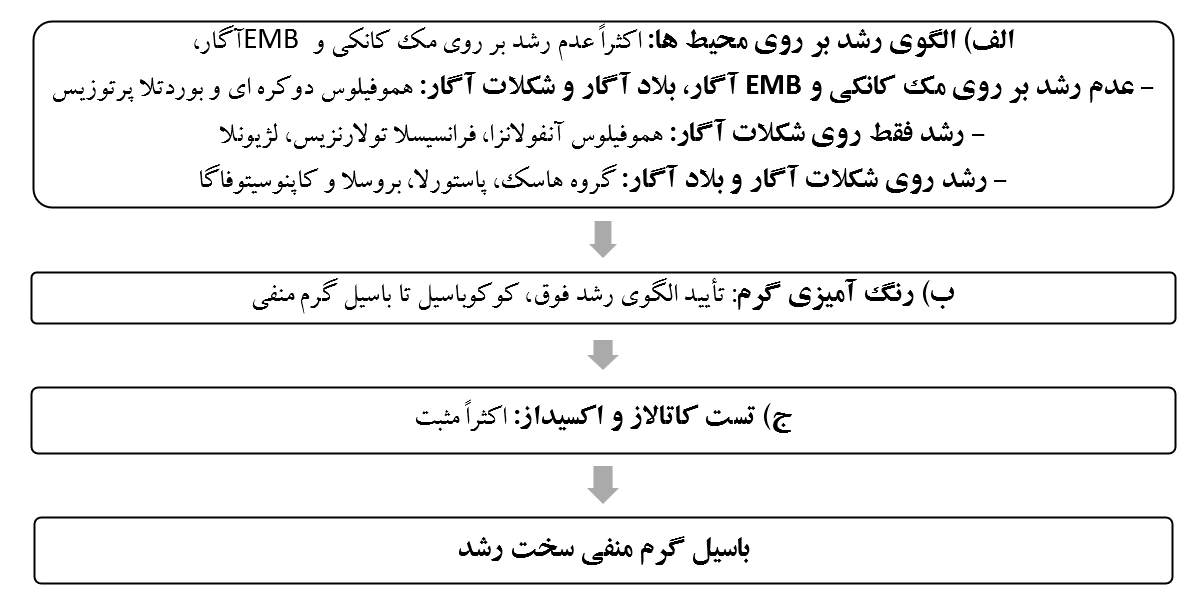
**9. باسيل گرم منفي سخت رشد**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **اسم آزمایشگاه:** | {{LabName}} | |
| **اسم سند:** | **نمودارها و جداول تشخیصی باسيل هاي گرم منفي سخت رشد** | |
| **کد سند:** | D-005-0009 | |
| **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}} |

باسيل هاي گرم منفي سخت رشد شامل: هموفيلوس، بوردتلا، لژيونلا، گروه هاسک، کاپنوسيتوفاگا، فرانسيسلا، بروسلا، پاستورلا هستند.

**1. تشخیص دسته بندی**



**2. تشخیص جنس و گونه**

**تشخیص آزمایشگاهی هموفيلوس ها**

**جمع آوري نمونه:** نمونه هاي متنوعی قابل بررسی است شامل: خون، CSF، مايع گوش مياني، مايع مفصلي، نمونه دستگاه تنفس فوقاني و تحتاني، نمونه سواب از کونژوکتيويت، سواب از واژن و ترشحات آبسه.

* براي کشت نمونه هاي دستگاه تنفسی تحتاني ابتدا برونش بايد شستشو شود بجز در مورد بيماران مبتلا به سيستيک فيبروزيس.
* نمونه سواب از بيني و نازوفارنکس ارزش باليني براي عفونت هموفيلوس آنفولانزا دستگاه تنفس فوقاني ندارد چون می تواند فلور طبیعی باشد.

**انتخاب محیط کشت:** زماني که هدف جداسازي هموفيلوس آنفولانزا باشد شکلات آگار محيط انتخابي است که در C° 33-37 با 5-10% CO2 انکوبه مي شود. رشد روي شکلات آگار معمولاً پس از 24-18 ساعت انکوباسيون ديده مي شود. شکلات آگار غني شده با باسيتراسين (mg/l300) يک محيط عالي براي جداسازي گونه هموفيلوس از نمونه هاي دستگاه تنفسي است چون باسيتراسين از رشد فلور نرمال دستگاه تنفس جلوگيري مي کند.

**تشخیص اولیه:**

* رشد کوکوباسيل گرم منفي پلئومورفيک روي شکلات آگار و عدم رشد روي بلادآگار و مک کانکي آگار در کشت خالص اولين راهنما است که نشان مي دهد يک نمونه احتمالاً از جنس هموفيلوس است.
* تخميرکننده کربوهيدرات، معمولاً اکسيداز و کاتالاز مثبت و توانايي احياء نيترات به نيتريت را دارند.
* رشد در حضور فاکتورهاي X و V، تست هاي رايج بيوشيميايي، هموليز روي محيط حاوي خون خرگوش يا اسب، اکسيداز و کاتالاز است.

**آزمايش بررسي نياز به فاکتورهاي X و V:** هموفيلوس هاي مهم را از روي نياز آن ها به فاکتورهاي X و V به سه دسته تقسيم مي کنند (جدول 1):

1ـ گونه های آنفولانزا، اجيپتيکوس و هموليتيکوس: به هر دو فاکتور X و Vنياز دارند.

2ـ گونه های دوکره اي و آفروفيلوس (به جنس اگريگاتي باکتر منتقل شده): فقط به فاکتور X نياز دارند.

3ـ گونه های پارا آنفولانزا، پارا آفروفيلوس، پاراهموليتيکوس، پاراسوئيس و پاراگاليناروم: فقط به فاکتورV نياز دارند (گونه هاي هموفيلوس با پيشوند پارا تنها به فاکتور V نياز دارد).

جدول 1. شناسایی گونه های هموفیلوس بر اساس نیازهای رشد و وجود همولیز.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| گونه ها | نیاز به فاکتورهای x و v | وجود همولیز β روی آگار خوندار |
| X V |  |
| هموفیلوس آنفولانزا  هموفیلوس پارا آنفولانزا  هموفیلوس همولیتیکوس  هموفیلوس پاراهمولیتیکوس  هموفیلوس آفروفیلوس  هموفیلوس پارآفروفیلوس | + +  - +  + +  - +  + -  - + | -  -  +  +  -  - |

\*هموفیلوس پارافروفیلوس اورنیتین منفی است در حالی که هموفیلوس پاراآنفولانزا مثبت است.

**نحوه انجام تست:** از پليت حاوي کلني هاي تازه، سوسپانسيون غليظي از باکتري در يک محيط مايع مناسب (TSB يا آب پپتونه) درست کنيد. به وسيله يک سواب استريل از اين سوسپانسيون برداشته و به محيط TSA منتقل و به صورت چمنی کشت مي دهیم؛ به اندازه اي که نيمي از پليت تا کل پلیت (بسته به دیسک های موجود) کشت داده شود. بعد از خشک شدن محل تلقيح سوسپانسيون، ديسک هاي حاوي فاکتورهاي X و V و XV را در محل قرار مي دهيم.

**محدودیت تست:** هنگام برداشت کلني ها دقت کنيد تا از انتقال حتي مقادير ناچيز آگار به محيط مايع جلوگيري شود؛ زيرا ممکن است مقادير اندک آگار نيز نتايج آزمايش را متأثر ساخته و تشخيص نادرست داده شود.

**پديده اقماري:**

* پديده اقماري يا ماهواره اي که براساس نياز به فاکتور V است به تشخيص گونه هموفيلوس کمک مي کند.
* اين تست مي تواند جايگزين نيازمندي به فاکتورهاي X و V شود.
* باکتري هايي مانند استافيلوکوک آرئوس، استرپتوکوک پنومونيه يا نايسريا براساس متابوليت هايي که دارند (يا با هموليز) فاکتور V را توليد کنند و هموفيلوس در اطراف آن ها رشد مي کند.

**روش انجام:** در يک محيط بلاد آگار باکتري مشکوک به هموفیلوس را کشت داده و يک کشت از استافيلوکوک آرئوس را بر روي آن به صورت يک خط مستقيم به کمک سواب کشت مي دهيم. ايزوله هاي هموفيلوس فاکتور X را از محيط بلاد آگار و فاکتورV را از اين استافيلوکوک آرئوس به دست مي آورند چون خون را همولیز کرده و فاکتور V را آزاد می کند و به اين ترتيب کلني هاي کوچک هموفيلوس در اطراف ارگانيسم هاي توليد کننده فاکتور V رشد مي کنند.

**تست های بیوشیمیایی:**

جدول 2 ليستي از تست هاي افتراقي براي هموفيلوس و گونه اگريگاتي باکتر است که بر اساس 4 الگوی اصلی تقسیم بندی شده اند:

- فاکتورx مثبت، فاکتورv مثبت، پورفيرين منفي

- فاکتورx منفي، فاکتورv مثبت، پورفيرين مثبت

- فاکتورx مثبت، فاکتورv منفي، پورفيرين منفي

**-** فاکتورx منفي، فاکتورv منفي، پورفيرين مثبت

جدول 2. تست هاي افتراقي براي گونه هاي هموفيلوس و اگريگاتي باکتر

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| اوره | ايندول | اورنيتين | اسکولين | نيترات | لاکتوز | گزيلوز | مالتوز | مانيتول | فروکتوز | مانوز | سوکروز | گلوکز | ONPG | افزايش رشد با CO2 | هموليز خون اسب و خرگوش | کاتالاز | اکسيداز | ارگانيسم |
| فاکتورx مثبت، فاکتورv مثبت، پورفيرين منفي | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|  |  | جدول بيوتايپ | منفي | مثبت | منفي | مثبت | منفي | منفي | متغير | منفي | منفي | مثبت | منفي | منفي | منفي | مثبت | مثبت | هموفيلوس آنفولانزا |
| مثبت | متغير | منفي | منفي | مثبت | منفي | متغير | منفي | منفي | متغير | منفي | منفي | مثبت | منفي | منفي | مثبت | مثبت | مثبت | هموفيلوس هموليتيکوس |
| فاکتورx منفي، فاکتورv مثبت، پورفيرين مثبت | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|  |  |  | منفي | مثبت | منفي | منفي | مثبت | منفي | مثبت | متغير | مثبت | مثبت | متغير | متغير | منفي | متغير | مثبت | هموفيلوس پاراآنفولانزا |
| مثبت | منفي | متغير | منفي | مثبت | منفي | منفي | مثبت | منفي | مثبت | منفي | مثبت | مثبت | منفي | منفي | مثبت | مثبت | مثبت | هموفيلوس پاراهموليتيکوس |
| مثبت | منفي | منفي | منفي | مثبت | منفي | منفي | مثبت | منفي | مثبت | منفي | مثبت | مثبت | متغير | مثبت | مثبت | مثبت | مثبت | هموفيلوس پارافورهموليتيکوس |
| مثبت | منفي | جدول بيوتايپ | منفي | مثبت | منفي | منفي | ضعيف | منفي | ضعيف | منفي | ضعيف | ضعيف | منفي | منفي | منفي | متغير | منفي | اگريگاتي باکتر سگنيس |
| فاکتورx مثبت، فاکتورv منفي، پورفيرين منفي | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| منفي | منفي | منفي | منفي | مثبت | منفي | منفي | منفي | منفي | منفي | منفي | منفي | منفي/  مثبت | منفي | مثبت/منفي | مثبت/  منفي | منفي | منفي | هموفيلوس دوکره اي |
| فاکتورx منفي، فاکتورv منفي، پورفيرين مثبت | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| منفي | منفي | منفي | منفي | مثبت | مثبت | منفي | مثبت | منفي | مثبت | متغير | مثبت | مثبت | مثبت | مثبت | منفي | منفي | منفي/  مثبت | اگريگاتي باکتر آفروفيلوس |

در جدول 3 خلاصه ويژگي هاي فيزيولوژيک و بيوشيميايي گونه هاي هموفيلوس آمده است.

جدول 3. خلاصه ويژگي هاي فيزيولوژيک و بيوشيميايي گونه هاي هموفيلوس.

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| β گالاکتوزيداز | مانوز | سوکروز | گزيلوز | گلوکز | لاکتوز | کاتالاز | هموليزβ روي آگار خون دار خرگوش | فاکتورV | فاکتورX | ارگانيسم |
| منفي | منفي | منفي | مثبت | مثبت | منفي | مثبت | منفي | مثبت | مثبت | هموفيلوس آنفولانزا |
| منفي | منفي | منفي | منفي | مثبت با تأخیر در بعضي سويه ها | منفي | مثبت | مثبت | مثبت | مثبت | هموفيلوس آجيپتوس |
| منفي | منفي | منفي | متغير | مثبت | منفي | مثبت | مثبت | مثبت | مثبت | هموفيلوس هموليتيکوس |
| متغير | منفي | مثبت | منفي | مثبت | منفي | متغير | مثبت | مثبت | منفي | هموفيلوس پاراهموليتيکوس |
| متغير | مثبت | مثبت | منفي | مثبت | منفي | متغير | متغير | مثبت | منفي | هموفيلوس پاراآنفولانزا |
| مثبت | مثبت | مثبت | منفي | مثبت | منفي | مثبت  ضعيف | مثبت | مثبت | منفي | *H.pittmaniae* |
| متغير | منفي | مثبت | منفي | مثبت | منفي | مثبت | مثبت | مثبت | منفي | هموفيلوس پاراهموليتيکوس |
| منفي | منفي | منفي | منفي | متغير | منفي | منفي | منفي با تأخیر | منفي | مثبت | هموفيلوس دوکره اي |

**تشخیص آزمایشگاهی گروه هاسک، کاپنوسيتوفوگا و ارگانیسم های مشابه**

جدول 6. خلاصه اي از واکنش هاي کليدي و ويژگي هاي لام گرم گروه هاسک و کاپنوسيتوفوگا.

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| نکات | لاکتوز | سوکروز | مالتوز | گلوکز | اکسيداز | کاتالاز | باکتری و رنگ آميزي گرم |
|  | مثبت | مثبت | مثبت | مثبت | متغير | منفي | اگريگاتي باکتر آفروفيلوس  کوکوباسيل کوچک |
|  | منفي | منفي | متغير | مثبت | متغير | مثبت | اگريگاتي باکتر اکتينومايستم کوميتانس  کوکوباسيل بسيار کوچک |
| ايندول مثبت، احیای نيترات منفي | منفي | مثبت | مثبت | مثبت | مثبت | منفي | کارديوباکتريوم هومينيس  باسيل راست، دوکي و روزت شکل |
| اورنيتين مثبت، بويي شبيه مایع سفيد کننده دارد | منفي | منفي | منفي | منفي | مثبت | منفي | ايکنلا کرودنس  باسيل راست |
| احیای نيترات منفي | منفي | منفي | مثبت | مثبت | مثبت | منفي | کينگلا گينگا  کوکوئيد تا باسيل راست، زنجيره و جفت، انتهاي مربعي |
| اسکولين متغير | متغير | منفي | مثبت | مثبت | منفي | منفي | کاپنوسيتوفوگا  دراز، باسيل باريک، انتهاي مخروطي |

جدول 7. ويژگي هاي بيوشيميايي و فيزيولوژيک اگريگاتي باکتر (اکتينوباسيلوس) و ارگانيسم هاي وابسته.

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **تره هالوز** | **لاکتوز** | **گزيلوز** | **هيدروليز اسکولين** | **اوره** | **ايندول** | **احياء نيترات** | **کاتالاز** | **اکسيداز** | **ارگانيسم** |
| منفي | منفي | متغير | منفي | منفي | منفي | مثبت | مثبت | متغير | اگريگاتي باکتر اکتينومايستم کوميتانس |
| مثبت | مثبت | منفي | منفي | منفي | منفي | مثبت | منفي | متغير | اگريگاتي باکتر آفروفيلوس |
| مثبت | مثبت | مثبت | منفي | مثبت سرم خرگوش تلقيح زياد. | منفي | مثبت | متغير | مثبت | *Actinobacillus equuli* |
| منفي | متغير | منفي/ مثبت | منفي | مثبت | منفي | مثبت | متغير | مثبت | *A. lignieresii* |
| مثبت | منفي/ مثبت | مثبت | مثبت | مثبت | منفي | مثبت | متغير | مثبت | *A. suis* |
| منفي | منفي | منفي | منفي | مثبت | منفي | مثبت | متغير | مثبت | *A. ureae* |
| نامشخص | منفي | منفي | منفي | منفي | مثبت | منفي | منفي | مثبت | کارديوباکتر هومينيس |
| نامشخص | منفي | منفي | منفي | منفي | منفي | مثبت | منفي | مثبت | کينگلا دنتريفيکانس |
| نامشخص | منفي | منفي | منفي | منفي | منفي | منفي | منفي | مثبت | کينگلا کينگا |

جدول 9. ويژگي هاي بيوشيميايي کليدي گونه های پاستورلا.

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| مالتوز | سوکروز | مانيتول | اورنيتين دکربوکسيلاز | کاتالاز | احياء نيترات | اوره | ايندول | ارگانيسم |
| مثبت | مثبت | مثبت | منفي | مثبت | مثبت | منفي | منفي | *P. haemolytica* |
| مثبت | مثبت | منفي | متغير | مثبت | مثبت | مثبت | منفي | *P.aerogenes* |
| منفي | منفي | منفي | منفي | منفي | مثبت | منفي | مثبت | *P.* *bettyae* |
| مثبت | مثبت | مثبت | مثبت | منفي | مثبت | منفي | منفي | *P.caballi* |
| منفي | مثبت | منفي | مثبت | مثبت | مثبت | منفي | مثبت | *P.canis* |
| مثبت | مثبت | منفي | منفي | مثبت | مثبت | مثبت | مثبت | *P.dagmatis* |
| منفي | مثبت | مثبت | مثبت | مثبت | مثبت | منفي | مثبت | *P.multocida* |
| مثبت | مثبت | منفي | مثبت | مثبت | مثبت | مثبت \* | مثبت | *P.pneumotropica* |
| منفي | مثبت | منفي | منفي | مثبت | مثبت | منفي | مثبت | *P.stomatis* |
| مثبت | مثبت | منفي | منفي | متغير | منفي | منفي | مثبت | *P.indologenes* |

\* نياز به يک قطره از سرم خرگوش روي سطح شيب دار يا تلقيح زياد.

**تشخیص آزمایشگاهی بروسلا**

**جمع آوری نمونه:**

* تشخيص قطعي نياز به جداسازي ارگانيسم در کشت خون، مغز استخوان، CSF، مايع پلور، مفصل، ادرار، آبسه و ساير بافت ها دارد.
* گونه هاي بروسلا پاتوژن هاي کلاس 3 هستند و برچسب خطر زیستی بر روی نمونه بايد برای کشت بروسلا مشخص باشد.
* خون براي کشت معمولاً درون محيط هاي تجاري کشت خون و سيستم سانتريفيوژ ليزکننده جمع آوري مي شود.
* براي ساير نمونه ها باليني نياز ويژه اي براي جمع آوري، انتقال يا پردازش نيست.

**آزمایش مستقیم:** رنگ آميزي مستقيم در نمونه هاي باليني براي تشخيص بروسلوزيس مناسب نيست. با این وجود در رنگ آميزي گرم ارگانيسم هايي به شکل کوکوباسيل کوچک گرم منفي کمرنگ که شبيه به دانه هاي شن هستند ديده مي شود. اگر به جای سافرانین از فوشین به مدت طولانی تری (۳-۱ دقیقه) استفاده شود باکتری بروسلا بهتر رنگ خواهد گرفت.

**کشت:**

* بيشتر گونه هاي بروسلا روي شکلات آگار و بلادآگار رشد مي کنند و بعضي نمونه ها قابليت رشد روي مک کانکي را هم دارند.
* روي تاير مارتين و تاير مارتين لوئيس هم رشد می کنند.
* رشد معمولاً در 18 ساعت مشاهده مي شود اما پليت قبل اينکه منفي گزارش شود بايد براي 4 روز نگهداري شود.
* محيط بروسلا آگار براي نمونه هايي به غير از خون پيشنهاد مي شود. اضافه کردن سرم خرگوش يا سرم اسب گرم شده 5% شانس رشد روي اين محيط را افزايش مي دهد.
* کشت بايد در 5-10% CO2 در شرايط مرطوب انکوبه شود هرچند نياز بروسلا به CO2 مي تواند بر اساس گونه متفاوت باشد. محيط هاي تجاري خون، به تشخيص موفقيت آميز بروسلا در خون کمک مي کند.
* محيط هايي که کشت مجدد شده اند بايد حداقل براي 7 روز نگهداري شوند. محيط تلقيح شده خون براي بيشتر از 3 هفته قبل از اينکه منفي گزارش شوند انکوبه مي شود.
* بيشتر نمونه هابين 5-7 روز با استفاده از سيستم هاي تجاري و کشت هاي اتومات مثل سيستم بک تک تشخيص داده مي شوند. در اينجا بطري ها نياز نيست تا طولانی مدت انکوبه شوند چون بطري کشت احتمالاً کدر مي شود، اما در کشت سنتي خون مثل محيط کاستانيدا باید تا 21 روز (گاهي تا 28 روز) نگهداري و بررسي شوند.
* پس از گذشت 48 ساعت از انکوباسيون در صورت حضور باکتری، کلني ها کوچک، محدب، صاف، نيمه شفاف، غيرهموليتيک و کمي زرد و کدر ظاهر مي شوند.
* در شرایطی که کشت خون منفی است، کشت مغز استخوان هنوز می تواند مثبت باشد.
* بروسلا اکسيداز و کاتالاز مثبت است و تست اوره آز در کمتر از 2 ساعت مثبت مي شود (شاه کليد شناسايي).

**شناسایی نهایی:**

* گونه هاي بروسلا غيرمتحرک، اوره آز و نيترات مثبت و هوازي مطلق هستند.
* سريع ترين تست براي تشخيص احتمالی بروسلا تست آگلوتيناسيو.ن با آنتي سرم صاف بروسلا است.
* تشخيص احتمالی مي تواند براساس مورفولوژي کلني و کاتالاز، اکسيداز، اوره آز و واکنش آگلوتيناسيون اسلايدي مثبت گزارش شود. گونه هاي بروسلا به وسیله تست سريع اوره (گاهي در عرض 2 دقيقه) تشخيص اوليه داده مي شوند.
* نمونه هاي بروسلا براي شناسايي قطعي بايد به آزمايشگاه مرجع فرستاده شوند به دليل اينکه بيشتر آزمايشگاه هاي باليني فاقد مواد لازم و امکانات تشخیصی هستند.

جدول 10. ويژگي هاي افتراقي گونه هاي بروسلا مرتبط با عفونت هاي انساني.

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **ممانعت از رشد در رنگ فوشين** | **ممانعت از رشد در رنگ تيونين** | **افزايش رشد با CO2** | **اوره آز** | **H2S** | **آگلوتيناسيون سرم (وجود آنتي بادي)** | **ميزبان طبيعي** | **گونه بروسلا** |
| منفي | منفي | منفي | متغير تا کمتر از 2 ساعت (ندرتاً 24 ساعت) | منفي | مثبت | گوسفند، بز | بروسلا ملي تنيس |
| منفي | مثبت | مثبت/ منفي | مثبت کمتر از 2 ساعت | مثبت | مثبت | گاو | بروسلا آبورتوس |
| مثبت | منفي | منفي | مثبت کمتر از نیم ساعت | مثبت | مثبت | خوک | بروسلا سوئيس |
| مثبت | منفي | منفي | مثبت کمتر از نیم ساعت | منفي | منفي | سگ | بروسلا کنيس |

**تشخیص آزمایشگاهی فرانسيسلا**

**جمع آوری و انتقال نمونه:** فرانسيسلا تولارنزيس یک عامل بسیار عفونی با فقط 50 ارگانیسم است که از طریق پوست (شکل اولسرگلاندولار) یا تنفسی (پنومونی) باعث عفونت می شود و علت بسیاری از عفونت های آزمایشگاهی بوده است، بنابراین هود بيولوژيکي کلاس 3 زماني که با نمونه مشکوک کار مي شود نياز است و به عنوان یک اقدام احتیاطی، مراحل آزمایشگاهی باید داخل آن انجام شود تا زمانی که این باکتری رد شود.

* باسيل يا کوکوئيد گرم منفي کوچک، غيرمتحرک، بدون اسپور و هوازي مطلق است.
* يک تشخيص احتمالی با نتايج تست مثبت احتمالاً با يکي از شيوه هاي زير انجام مي شود: آنتي بادي فلئورسانس مستقيم DFA، رنگ آميزي ايمنوهيستولوژيک با آنتي بادي منوکلونال، PCR، آگلوتيناسيون اسلايدي.

**تشخیص آزمایشگاهی لژيونلا**

* باسيل هايي گرم منفي پلئومورفیک، هوازي اجباري، بدون اسپور و کپسول، داراي پيلي و معمولاً داراي حرکت و تاژک قطبي مي باشند.
* چندين روش شامل آزمايش مستقيم، کشت و تشخيص آنتي ژن و آنتي بادي براي تشخیص عفونت هاي لژيونلا در دسترس هستند. بيماري لژيونر با استفاده از ترکيب کشت و تشخيص آنتي ژن بهتر تشخيص داده مي شود.
* در دستگاه تنفسي حتي پس از درمان آنتي بيوتيکي بيماری لژيونر معمولاً تعدادي ارگانيسم موجود هستند و ممکن است PCR بعد از درمان هم مثبت باقی بماند.

**جمع آوری نمونه:**

* نمونه ها براي کشت و آزمايش مستقيم شامل خلط، نمونه برونکوآلئولار و شستشوي برونش هستند. ساير بافت ها، مواد بيوپسي يا مايعات مثل مایع پلور هم به طور معمول قابل قبول هستند.
* به دليل اينکه خلط در بيماران لژيونر معمولاً غيرچرکي و به شکل خوني يا آبکي است سيستم امتیازدهی به نمونه خلط بر اساس تعداد WBC و سلول های اپیتلیال براي بررسي کیفیت لام (برخلاف بقیه موارد عفونی خلط) مناسب نيست.
* تکه هاي کوچک از بافت برای انتقال به دليل اثر ممانعت کنندگی سديم روي باکتری باید با مقدار کمی آب استريل ارسال شود و نباید در محيط نگهدارنده، بافر يا سالین منتقل شوند.
* زماني که بين جمع آوري و ادامه مراحل آزمايش يک تأخیر 2 ساعته باشد (به خصوص ترشحات تنفسي)، نمونه ها براي جلوگيري از رشد فلورهاي آلوده کننده بايد در يخچال قرار داده شوند و اگر چند روز تأخیر وجود دارد بايد نمونه ها در دمايC° 70- فريز شوند.
* کشت هاي خون اتوماتيک اغلب برای شناسایی این باکتری غيرحساس هستند و جایگزین بهتر استفاده از سیستم سانتریفیوژ لیزکننده (لیز سلولها و تغلیظ باکتریها) و سپس کشت نمونه تغلیظ شده است (که البته بعد از این مرحله می توان مقداری از نمونه به دست آمده را به محیط کشت خون اتومات اضافه کرد).
* ادرار یک نمونه مهم براي تشخيص آنتي ژن این باکتری است و براي سروگروه 1 لژيونلا پنوموفيلا بسيار کاربردي است و اگر بيماري وجود داشته باشد نمونه هاي اوليه اغلب مثبت هستند.

**پردازش نمونه:**

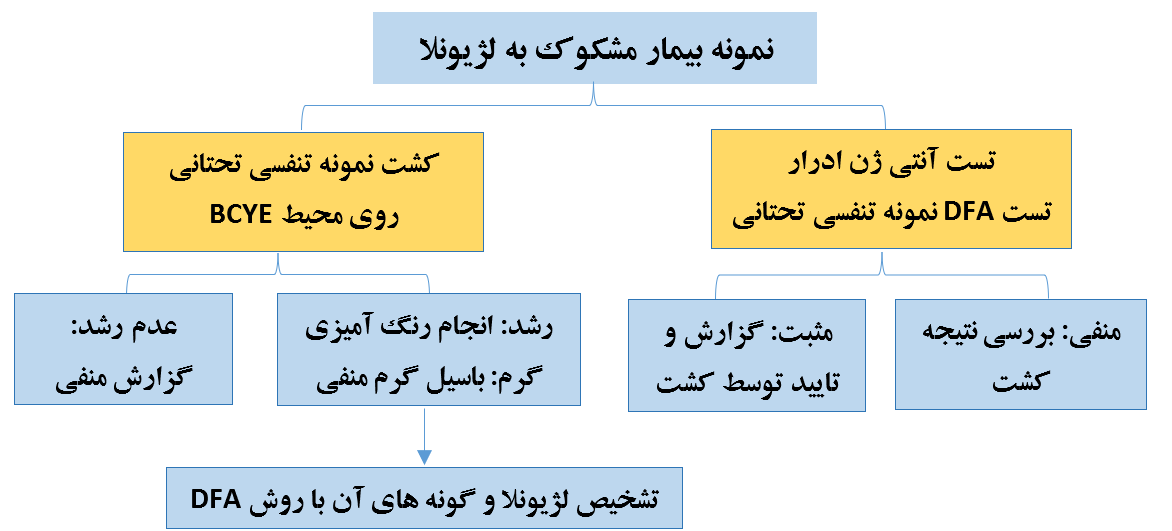
* همه نمونه ها برای کشت لژيونلا بايد در هود بيولوژيکي کلاس دو مورد آزمايش قرار گيرند.
* وقتي نمونه ها از نواحي غير استريل بدن براي کشت جمع آوري مي شوند (مانند نمونه خلط) محيط انتخابي يا تيمار نمونه براي کاهش تعداد ارگانيسم هاي آلوده کننده پيشنهاد مي شود. تيمار شامل مجاورت اندک نمونه خلط با هيدروکلريک اسيد قبل از کشت است که احتمال جداسازي لژيونلا را افزايش مي دهد. اين تکنيک زمان بر بوده و تنها براي بيماران با سيستيک فيبروزيس پيشنهاد مي شود. در اين روند ابتدا يک قسمت از نمونه با نسبت 1:10 باKCl-HCl رقيق شده و اجازه داده می شود تا براي 5 دقيقه باقي بماند و سپس به محیط ها تلقيح مي شود. نمونه بافت قبل از کشت و تهيه لام بايد هموژنيزه و شفاف شود.
* مايع استريل بدن براي 30 دقيقه در g 4000-3000 سانتريفيوژ مي شوند. سپس اين رسوب ورتکس و براي کشت و لام استفاده مي شود.
* همچنين نمونه ها جمع آوري شده به وسیله لاواژ برونکوآلوئولار کاملاً رقيق هستند و بنابراين به وسیله سانتريفيوژ قبل از کشت حداقل بايد 10 برابر تغليظ شوند.
* خون براي کشت لژيونلا با سيستم سانتريفيوژ ليز کننده آماده شده و به شکل مستقيم در بافر آگار عصاره مخمر شارکول قرار داده مي شود.

**آزمایش میکروسکوپی:**

* لژيونلا به شکل ضعيف رنگ و باسيل های گرم منفي پلئومورفيک در خارج يا درون ماکروفاژ و نوتروفيل قطعه قطعه دیده می شود.
* حداکثر داراي اندازه 5/0× 2-1 ميکرومتر هستند.
* افزایش زمان براي رنگ متضاد سافرانين در مرحله آخر برای 10 دقيقه مي تواند تعداد ارگانيسم قابل دیدن را افزايش دهد. همچنين مي توان از فوشين 1/0 % به جاي سافرانين در رنگ آميزي گرم استفاده کرد تا احتمال مشاهده ارگانيسم افزايش يابد.
* برای بافت هاي مشکوک به **لژيونلا ميکدادئي** بهتر است رنگ آميزي با کينيون اصلاح شده انجام شود چون به شکل ضعيف در بافت اسيد فاست است.

**کشت:**

* مهمترين تست براي تشخيص لژيونلا حتي زماني که از تست سريع مانند شناسايي آنتي ژن ادراری استفاده مي شود کشت ارگانيسم است.
* لژيونلا باکتري هاي مشکل پسند هوازي هستند که به دليل نياز به آهن و سيستيئن جهت رشد، در محيط هاي معمولي مثل بلادآگار رشد نمي کنند اما روي شکلات آگار که شامل ال-سيستئين است رشد کرده و کلني هاي بسيار کوچک ظاهر مي شود.
* محيط انتخابي جهت کشت نمونه هاي آلوده محيط آگار بافری شده حاوي زغال و عصاره مخمر يا BCYE حاوی ال-سيستئين مي باشد. با افزودن آنتي بيوتيک هاي مختلف مانند پلي ميکسين B و آنيزومايسين به محيط BCYE از رشد ساير باکتري ها جلوگيري مي شود.



* محيط تلقيح شده در دمایC° 35-37 در هوا براي حداقل 7 روز انکوبه مي شود (طيف دمايي C° 42-20) که کلني هاي لژيونلا بين 5-3 روز قابل مشاهده هستند. پليت بايد براي دو هفته قبل از اينکه دور انداخته شود نگهداري شود.
* رويBCYE آگار کلني هاي خاکستري سفيد يا آبي سبز، محدب، دايره اي و درخشان با قطر حداکثر 2-4 ميلي متر ظاهر مي شوند که نمايي شبيه خرده شيشه یا پنبه ای شکل با ذرات گرانول داخلي را نمايش مي دهند.

**تشخیص بوردتلا**

**جمع آوري و انتقال نمونه:**

* آسپيراسيون نازوفارنکس يا نمونه گيري با سواب داکرون نمونه هاي انتخابي براي کشت،DFA و PCR براي بوردتلا هستند.
* سواب هاي Flocked (حالت شانه ای با تعداد سطح بالا) زماني که بيماريزاهاي تنفسي مثل بوردتلا بايد جداسازي شوند داراي حساسيت بالاتری هستند.
* نمونه هاي به دست آمده از گلو، خلط يا بيني قدامي قابل قبول نيست و حساسيت پايين دارد چون اين نواحي با اپيتليوم مژک دار که محل زندگي باکتري هستند پوشيده نشده اند.
* معمولاً 2 سواب از هر دو سوراخ هاي بيني جمع آوري مي شود که سواب به قسمت داخلي نازوفارنکس وارد شده، چرخيده و براي چند ثانيه نگهداري و سپس به آرامي خارج می شود.
* نمونه سواب نازوفارنژيال به شکل مستقيم در محيط کشت قرار داده مي شود يا به يک محيط انتقالي مناسب مانند محلول 1% هيدروليز کازئين (کازآمينواسيد) و محيط انتقالي آميز با شارکول وارد می شود که تا 48 ساعت قابل انتقال است.
* نمونه ها بايد در در دماي اتاق منتقل و در کوتاه ترين زمان که به آزمايشگاه مي رسند کشت شوند.

**آزمایش میکروسکوپی:**

* تنها رنگ آميزيDFA بايد برای بررسی میکروسکوپی نمونه هاي باليني استفاده شود ولی به علت نتايج منفي و مثبت کاذب که حتي به دست ماهرترين فرد هم اتفاق مي افتد این بررسی فاقد حساسيت بوده و بهتر است این تست بر روي کشت مثبت هم صورت گيرد.
* روشDFA نبايد به عنوان جايگزين کشت استفاده شود. لام هايDFA ممکن است به شکل مستقيم از نمونه سواب يا پس از حل کردن سر سواب در محلول 1% هيدروليز کازئين تهيه شوند.
* حتماً بايد 2 اسلايد تهيه شود، لام ها خشک و با حرارت فيکس شده و در همان روز جمع آوري رنگ آميزي شوند.
* مواد فلئورسانس پلي کلونال براي هر دو باکتري بوردتلا پرتوسيس و بوردتلا پاراپرتوسيس در لام به دست آمده از مواد نازوفارنژيال به شکل معمول استفاده مي شود. در این آزمايش ارگانيسم ها به صورت کوچک، باسيل چاق، کوکوباسيل با فلئورسانس زرد-سبز محيطي و مرکز تيره تر ظاهر مي شوند.

**کشت و تشخیص نهایی:**

* حساسيت کشت بستگي به مرحله بيماري در زمان جمع آوري نمونه و روش مورد استفاده براي جمع آوري نمونه، کيفيت نمونه و انتقال و شرايط کشت دارد.
* محیط اولیه توسعه یافته برای بوردتلا به نام محیط بورده-ژانگو آگار با گليسرول و خون اسب يا گوسفند بوده است.
* همچنین محیط رگان لووه شامل شارکول، نشاسته، خون اسب، سفالکسین و آمفوتریسین B و محیط استینر-اسکولت که شامل کازوآمینواسیدهاست مفید بوده است.
* بخاطر ماهیت سخت رشد این باکتری انجام تست های بیوشیمیایی سخت است و باید حتماً رشد کامل باکتری ها مشاهده شود تا تست های شناسایی بیوشیمیایی را بتوان انجام داد.

جدول 11. تشخیص گونه های بوردتلا.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **بوردتلا برونشي سپتيکا** | **بوردتلا پاراپرتوسيس** | **بوردتلا پرتوسيس** | **ويژگي ها** |
| مثبت(1-2 روز) | مثبت(3-2 روز) | مثبت(3-5 روز) | رشد روي شارکول خون اسب |
| مثبت | مثبت | منفي | بلاد آگار |
| مثبت | منفي | منفي | مک کانکي |
| مثبت | مثبت | مثبت | کاتالاز |
| مثبت | منفي | مثبت | اکسيداز |
| مثبت (4 ساعته) | مثبت (24 ساعت) | منفي | توليد اوره آز |
| مثبت | منفي | منفي | احيا نيترات |
| مثبت | منفي | منفي | حرکت |

**خلاصه پروسه تشخیص بوردتلا:**

* جمع آوري دو نمونه پرينازال از پشت حلق با استفاده از سواب آلژينات کلسيم و داکرون ياflocked
* انجام مستقيم DFA يا انتقال سواب ها توسط سيستم هاي انتقالي
* آماده سازي 2 لام براي تست DFA براي بوردتلا پرتوسيس
* تلقيح در محيط شارکول-خون اسب (با سفالکسين و بدون سفالکسین) و انکوباسيون در رطوبت اتاق بدونCO2 درC° 35 براي 7 روز
* بررسي پليت ها 2 روز بعد با استفاده از ميکروسکوپ استريو براي کلني هاي تيپيک**،** بررسي کلني ها با رنگ آميزي گرم و آنتي بادي فلئورسانس يا آنتي سرم آگلوتيناسيون
* تشخيص قطعي به وسیله کشت مجدد، تکرار تست هاي آنتي سرم و تست هاي بيوشيميايي**،** رنگ آميزي گرم از کلني ها (ارگانيسم هايي بسيار کوچک به شکل کوکوباسيل کم رنگ به شکل منفرد يا جفتي)
* برای تأیید نهایی انجام تست PCR