**4. مایعات استريل بدن**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **اسم آزمایشگاه:** | {{LabName}} | |
| **اسم سند:** | **دستورالعمل مایعات استريل بدن** | |
| **کد سند:** | D-006-0004 | |
| **دسته بندی سند:** | دستورالعمل های تفسیر کشت های مختلف بدن | |
| **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:**

هدف از این دستورالعمل تشریح روش انجام نمونه های مایعات استريل بدن شامل نمونه گیری، حجم مورد نیاز، انتقال، نحوه کشت و تفسیر کشت ها می باشد.

**(2) تعاریف و اصطلاحات:**

**مایعات استريل بدن:** مایعاتی هستند که نواحی حساس بدن را پر کرده اند و معمولاً وظیفه حفاظت از آن ناحیه یا روان سازی آن را بر عهده دارند. این مایعات عاری از میکروب ها (حتی فلور طبیعی) می باشند و به همین دلیل به آنها استریل گفته می شود.

این مایعات که براي مطالعات ميکروبيولوژيک از آنها نمونه فرستاده مي شود (علاوه بر خون) در جدول 1 فهرست شده اند.

جدول 1. انواع مايعات استریل بدن و محل هاي جمع آوري آنها.

|  |  |
| --- | --- |
| **قسمت بدن** | **نام مايع** |
| قفسه سينه | مایع توراسنتز، مايع پلور، جنب يا آمپيم |
| حفره شکمي | مایع پاراسنتز، آسيت يا مايع صفاقي |
| مفصل | مايع مفصل (اگر مفصل زانو: مایع سينوويال) |
| پريکارد | مايع پريکارد یا مایع قلبی |
| ستون فقرات | مایع مغزی-نخاعی یا CSF |

#### **پریتونیت (Peritonitis): به معنی التهاب صفاق است. دو نوع پریتونیت وجود دارد:**

#### **پریتونیت باکتریایی:** نوعی عفونت است که توسط باکتری ایجاد می شود.

#### **پریتونیت ثانویه:** پریتونیت می تواند به دلیل سوراخی یا پارگی، در داخل اندامی در شکم رخ دهد.

**(3) شرح دستورالعمل:**

**تشخيص آزمايشگاهي عفونت مايعات استريل بدن**

تكنيك هاي آزمايشگاهي جهت كار بر روي تمام مايعات استريل بدن بيشتر اوقات مشابه است.

**جمع آوري و حمل و نقل نمونه**

* اکثر نمونه ها (مايعات جنب، صفاق، پريکارد و سينوويال) با آسپيراسيون با سوزن و سرنگ جمع آوري مي شوند.
* مايعات بدن از محل‌هاي استريل بايد در يک لوله استريل يا ويال بدون هوا به آزمايشگاه منتقل شوند.
* بين 1 تا 5 ميلي ليتر از نمونه براي جداسازي بيشتر باکتري ها کافي است، اما هر چه قدر نمونه بیشتر باشد (5 تا 10 ميلي ليتر)، به ويژه براي جداسازي مايکوباکتريوم توبرکلوزيس و قارچ ها بهتر است و حداقل 5 ميلي ليتر بايد براي بازيابي اين ارگانيسم ها ارسال شود.
* براي تشخيص پريتونيت حداقل 10 ميلي ليتر مايع توصيه مي شود. در صورت مشکوک بودن به گنوکوک يا کلاميديا، مقادير بیشتری مایع بايد براي اسمير و کشت مناسب به آزمايشگاه فرستاده شود.
* به پرسنل آزمايشگاه بايد قبل از انجام عمل هشدار داده شود و اطمينان حاصل شود که محيط های کشت مناسب، محيط کشت بافت و روش‌هاي رنگ‌آميزي فوراً در دسترس هستند.
* بيشتر باكتري هاي مهم از نظر باليني به طور مناسب در ظروف انتقال بيهوازي (مانند سرنگ و لوله هاي درپيچ‌دار استريل)، اگر چركي باشند و مقدار آنها كافي باشد، به مدت كوتاهي زنده مي مانند.
* همچنین اگر نمونه چرکي و حجم مناسبي داشته باشد، بيشتر باکتری های بي‌هوازي با اهميت باليني به‌ اندازه کافي در ظروف حمل ‌و نقل هوازي (مانند لوله‌هاي استريل درب پيچ دار) براي دوره‌هاي کوتاه زنده مي‌مانند. با اين حال، جمع آوري در محيط هاي حمل و نقل بيهوازي توصيه مي شود. ويال هاي حمل و نقل بيهوازي مختلفي در دسترس هستند. اين ويال ها در فضايي بدون اکسيژن تهيه مي شوند و با يک سپتوم لاستيکي يا درپوش کوتاه که مايع از طريق آن تزريق مي شود، کامل بسته مي شوند.
* انتقال مايع در سرنگي که درپوش آن لاستيکي استريل است توصيه نمي شود.
* نمونه‌هايي براي بازيابي قارچ‌ها يا مايکوباکتريوم‌ها در لوله‌هاي استريل و درپوش پيچي حمل می شوند.
* کاتترهاي از راه پوست در طول بسياري از روش هاي جراحي براي جلوگيري از تجمع اگزودا و خون در محل عمل قرار مي گيرند. اغلب، زماني که علائم و نشانه‌ها حاکي از عفونت باشد، آزمايشگاه مايعات تخليه شده از اين کاتترها را براي کشت دريافت مي‌کند. با اين حال، کشت چنين مايعي زماني که مايع در داخل کاتتر يا دستگاه جمع‌آوري آلوده شود، يا زماني که مايع از محل عفونت منشأ نمي‌گيرد، به طور بالقوه گمراه ‌کننده است. آسپيراسيون مستقيم مايع بالقوه آلوده، به جاي مايع تخليه کاتتر، بايد براي ارزيابي عفونت هاي بافت عمقي در بيماران براي کشت ارسال شود.
* نمونه مايع صفاقي يا بوسيلة آسپيراسيون از طريق پوست با قرار دادن سوزن در شکم و خارج کردن مايع (پاراسنتز) و يا در هنگام عمل جراحي، جمع آوري شده و جهت بررسی آميلاز، پروتئين، آلبومين، تعداد سلول، آزمايش اسيد نوکلئيک، سيتولوژي و همچنین تهيه گسترش و كشت به آزمايشگاه فرستاده مي شود.
* براي مايعات پريکارد، پلور، سينوويال و صفاقي، تلقيح به بطري هاي براث کشت خون در کنار بالين يا در آزمايشگاه مفيد است چون در این مایعات حضور هر نوع باکتری اهمیت دارد و نه تعداد.
* در مايع دياليز صفاقي (همچنین در مورد بقیه مایعات استریل) بسياري از مطالعات نشان داده که با استفاده از سيستم‌هاي کشت خون خودکار که در آن 10 ميلي‌ليتر مايع به بطري‌هاي کشت تلقيح مي‌شود، مي‌توان به بهبود حساسيت دست يافت. این نمونه ها بايد در سريعترين زمان ممکن (هنگام جمع آوری نمونه در بالین بیمار) در بطري هاي کشت خون هوازي و بيهوازي تلقيح شوند. نمونه موجود در بطري کشت خون به عنوان يک کشت خون پردازش مي شود، که جداسازی تعداد کمي از ارگانيسم ها را تسهيل مي کند و اثرات آنتي بيوتيک ها را رقيق مي کند. مقداری از نمونه اضافي تلقیح نشده براي رنگ آميزي گرم و انجام کشت مستقیم بر روی محیطها بايد به آزمايشگاه ارسال شود.
* مايعات بيماران دريافت کننده دياليز صفاقي سرپايي (CAPD) را مي توان در يک لوله استريل، ظرف ادرار يا کيسه اصلي به آزمايشگاه ارسال کرد. مايع براي کشت از کيسه با يک سوزن و سرنگ استريل خارج مي شود. این مايع را می توان مستقيماً در بطري هاي کشت خون تلقيح نمود (20 ميلي ليتر، 10 ميلي ليتر در هر دو بطري کشت هوازی و بیهوازی) و مقداری از آن را برای تهیه لام مستقیم و کشت مستقیم به آزمایشگاه ارسال کرد. حجم قابل قبول جهت پذيرش نمونه حداقل 10 ميلي ليتر مي باشد اما از آنجائيكه ممكن است تعداد ارگانيسم عفوني در مايع بسيار پائين باشد (يك باكتري در هر 10 ميلي ليتر مايع) مقدار زيادي از مايع بايد مورد آزمايش قرار گيرد. سانتریفیوژ حداقل 50 ميلي ليتر از مايع و آزمايش رسوب توصيه مي گردد. فيلتراسيون مايعCAPD از طريق يک فيلتر غشايي با منفذ 45/0 ميلي متري اجازه مي دهد تا حجم بيشتري از نمونه پردازش شود و معمولاً نتايج بهتري را به همراه دارد. ليز لکوسيت ها (سیستم ایزولاتور) قبل از تغليظ نمونهCAPD مي تواند به طور قابل توجهي جداسازي ارگانيسم ها را افزايش دهد.
* مايع پلور را مي توان بوسيلة سرنگي كه سر آن بسته شده يا در يك لوله استريل، سريعاً به آزمايشگاه انتقال داد. نمونه مفصلی بايد به ويال هاي مخصوصي كه جهت انتقال باكتريهاي بيهوازي طراحي شده اند منتقل شده تا زنده ماندن باكتري هاي بيهوازي را تضمين نمايد زيرا كه احتمال وجود باكتري هاي بيهوازي زیاد است.

**پردازش نمونه، آزمون مستقيم و کشت**

**پردازش نمونه**

* غالب مايعات استريل بدن مستقيماً توسط پرستار یا پزشک در بالین بیمار در بطري‌هاي کشت خون تلقيح مي‌شوند. اما در صورت مشکوک بودن به عفونت چند ميکروبي نبايد از روش کشت در بطري هاي کشت خون استفاده کرد، زيرا برخي از ارگانيسم ها مي توانند رشد بيش از حد داشته باشند و ساير ارگانيسم هاي کند رشد از دست بروند که منجر به شناسايي ناقص عوامل بيماري زا مي شود.
* علاوه بر بطري‌هاي کشت خون، لوله ايزولاتور روشي حساس و اختصاصي براي کشت است.
* مايع بدن دريافت شده در آزمايشگاه که از قبل لخته شده است بايد براي آزادسازي باکتري هاي به دام افتاده همگن شود و براي آزادسازي سلول هاي قارچي خرد يا بريده شود. پردازش چنين نمونه هايي همانند نمونه بافت در دستگاه همزن بافت يا آسياب دستي آنها در هاون و آسياب بافت در ظرف شيشه اي امکان بازيابي بهتر باکتري ها را فراهم مي کند. آسياب دستي اغلب ترجيح داده مي شود، زيرا آسياب با دستگاه مي تواند گرماي قابل توجهي ايجاد کند و در نتيجه ميکروارگانيسم ها را در نمونه از بين ببرد.
* آسياب ممکن است عناصر قارچي را بشکند و بنابراين، برای قارچ توصيه نمي شود. براي جداسازي قارچ ها مقدار کمي از مواد کامل از يک لخته را بايد با چاقوي جراحي برش داد و مستقيماً روي محيط قرار داد.
* نمونه هایي كه در سرنگ يا لوله هاي انتقال بيهوازي به آزمايشگاه مي رسند بايد حتي الامكان هر چه سريعتر در محيط هاي معمول هوازي و بيهوازي كشت داده شوند و رنگ آميزي گرم روي آنها انجام گردد.
* اگر كيسه دياليز صفاقي‌ (CAPD) به آزمايشگاه رسيد، ابتدا آنرا با الكل 70% تميز نموده و سپس با استفاده از يك سرنگ و سوزن مايع را جهت كشت آسپيره مي نمائيم. مايعات شفاف ممکن است با سانتريفيوژ يا فيلتراسيون تغلیظ شوند تا ارگانيسم ها را تا 1000 برابر بيشتر غليظ کرد، در حالي که مواد چرکي را مي توان مستقيماً به محيط تلقيح کرد.
* نمونه های رقيق مایعات بوسيلة سانتريفوژ كردن نمونه در g1500 به مدت حداقل 15 دقيقه تغليظ مي شوند. سپس در زير هود بيولوژيك مايع روئي بايد به روش آسپتيك و با استفاده از يك پيپت استريل خارج شده و يك ميلي ليتر از مايع روئي جهت مخلوط كردن نمونه باقي بماند. با استفاده از يك پيپت استريل نمونه را چند مرتبه بالا و پائين مي كشيم تا رسوب بخوبي به صورت سوسپانسيون درآيد. از سوسپانسيون آماده شده مي توان جهت كشت و تهيه گسترش استفاده نمود. در مواردی که احتمال دارد تعداد ارگانیسم بسیار کم باشد می توان از این رسوب به ویال های کشت خون اضافه کرد.

**آزمون مستقيم**

* تمام مايعات بايد براي بررسي مستقيم ميکروسکوپي پردازش شوند.
* به طور کلي، اگر يک ارگانيسم در هر ميدان روغني نمونه سانتریفیوژ نشده ديده شود، حداقل 105 ارگانیسم در هر ميلي ليتر از نمونه وجود دارد. البته اغلب فقط تعداد کمي از ارگانيسم ها در مايعات استريل بدن وجود دارند.
* نمونه مايع را جهت بررسي قارچها علاوه بر رنگ آميزي گرم بايد به روش مرطوب و رنگ آميزي اسيد پريوديک شيف ((PAS نيز مورد آزمايش قرار داد.
* از هيدروكسيد پتاسيم 10 درصد يا رنگ كالكوفلور سفيد مي توان جهت مشاهده عناصر قارچي استفاده نمود. مواد حفرة توراسيك (قفسه سينه) ممكن است علاوه بر اشكال ميسيليومي حاوي اسفرولهاي كوكسيديوئيدس يا سلول هاي مخمري جوانه‌دار باشند.
* در رنگ آميزي گرم اگر باسيل هاي گرم مثبت با رشته هاي طويل و نازك ديده شوند، بايد گسترش ديگري را جهت رنگ آميزي اسيد فاست تغيير يافته جهت نوكارديا آماده نمائيم. باسيل هاي رشته اي كه اسيد فاست نباشند معمولاً گونه هاي اكتينومايست هستند.
* تشخيص سريع و مستقيم پاتوژن هاي مايعات استريل با استفاده ازPCR و توالي يابي16SrRNA موفقيت آميز بوده است. حساسيت مرتبط با توالي 16SrRNA به دليل عدم توانايي در تشخيص ارگانيسم ها به دليل شباهت ژنتيکي بالا به طور قابل توجهي متفاوت است و بايد همراه با کشت استفاده شود.

**کشت و شناسایی نهایی**

* رسوب حاصل از تغليظ مايعات با سانتريفيوژ، بايد به آبگوشت غني‌کننده (مثل BHI یا تایوگلیکولات)، آگار خوندار و آگار شکلاتي تلقيح شود. از آنجايي که اين نمونه‌ها از مکان‌هاي استريل هستند، محيط هاي انتخابي به تنهایی توصيه نمي‌شود، زيرا ممکن است از رشد برخي ارگانيسم‌ها جلوگيري کنند اما در صورت شک به گرم منفی ها بهتر است به محیط های مک کانکی یا EMB هم تلقیح شوند.
* اگر نمونهCAPD فيلتر شده باشد، فيلتر بايد به صورت آسپتيک به سه قسمت بريده شود: يکي از آنها روي شکلات آگار با دي اکسيد کربن 5 درصد، يکي در مک کانکي آگار و ديگري روي بلادآگار براي انکوباسيون بيهوازي قرار گيرد.
* نمونه هاي دريافت شده در ويال هاي حمل و نقل بيهوازي علاوه بر محيط هاي بيهوازي، بايد در اسرع وقت به محيط هاي هوازي معمولي شامل براث غني شده، آگار خوندار، شکلات آگار و گاهي اوقات مک کانکي يا EMB تلقيح شوند.
* هنگامي که ارگانیسم هاي خاصي از نظر باليني انديکاسيون دارند و پزشک مشکوک است (بيهوازي ها، مايکوباکتري ها، قارچ ها، گونه هاي کلاميديا و ويروس ها)، بايد از روش هاي مناسب براي جداسازي استفاده شود.
* از آنجائيكه گونه هاي لژيونلا ممکن است از مايع پلور جدا شود، محيط هاي اختصاصي مي تواند جهت جدا كردن اين ارگانيسم مورد استفاده قرار گيرد و پزشك بايد آزمايشگاه را جهت كشت نمونه به منظور جداسازي آن آگاه سازد.
* محيط هاي كشت باكتريولوژيك باید شامل آگار شكلاته و ساير محيط هاي لازم جهت رشد گنوكوك و گاهي گونه هاي هموفيلوس نيز باشند. شناسایی نهایی تمامی باکتری های رشد کرده (حتی فلور نرمال) باید به انجام برسد و برای تمامی آنها آنتی بیوگرام انجام شود.
* بجز موارد گفته شده احتمال جداسازی همزمان چند باکتری نادر است و معمولاً با یک نوع عفونت مواجه هستیم.

**دستورالعمل نمونه مايع مغزي-نخاعي (CSF)**

جهت انجام آزمايش مايع مغزي-نخاعي (CSF) نکات زير باید مورد توجه قرار گیرد:

1. ثبت صحیح اطلاعات، 2. نمونه گيري و ارسال صحیح 3. مراحل صحیح انجام آزمايش

بهتر است طبق جدول 2 اطلاعات مورد نیاز روی برچسب هر نمونه ثبت شود.

جدول 2. اطلاعات مورد نیاز که باید روی برچسب هر نمونه ثبت شود.

|  |
| --- |
| نام بیمار: |
| شماره پرونده: |
| شماره اتاق و تخت:: |
| نوع نمونه: |
| تاریخ و ساعت جمع آوری نمونه: |
| آزمایشات مورد درخواست: |

**نمونه گيري و ارسال**

* تا حد امکان قبل از درمان آنتي بيوتيکي از بيمار بايد نمونه گيري انجام شود تا از نابودي ميکروارگانيسمها جلوگيري شود.
* جمع آوري نمونهCSF یا روش LP یک روش تهاجمي است و توسط پزشک در شرايط آسپتيک انجام می شود.
* لازم است 3 نمونه مجزا و هر کدام به حجم تقريبي حداقلml 1-3 در سه لوله استريل درپيچ دار جمع آوري شود و براي انجام آزمايشات به آزمايشگاه ارسال شوند شامل:

لوله شماره 1: مخصوص آزمايشات بيوشيميايي

لوله شماره 2: مخصوص آزمايشات ميکروب شناسي

لوله شماره 3: جهت بررسي سلولي.

* در صورتي که CSF ارسالي به مقدار کمتر از 1 میلی لیتر و فقط در يک لوله باشد، جهت جلوگيري از آلودگي نمونه، ابتدا آزمايش ميکروب شناسي انجام شده و سپس بقيه نمونه جهت آزمايشات بيوشيميايي و بررسي سلولي ارسال گردد.
* بعد از نمونه گیری، مايع مغزي-نخاعي در هر زمان به عنوان يک آزمايش اورژانس است و بايد هرچه سريع تر به آزمايشگاه منتقل شده و تحت آزمايش قرار گيرند و حداکثر زمان گردش کاري، از لحظه نمونه گیری نبايد بيش از يک ساعت در حرارت اتاق طول بکشد.همچنیناز قراردادن نمونه در يخچال، حرارت زياد و نور شديد اجتناب شود.
* براي آزمايش ويروسي، نمونه‌هاي CSF ممکن است در کوتاه‌ مدت (کمتر از ۴۸ ساعت) در دماي ۲ تا ۸ درجه سانتي‌گراد و در طولاني‌مدت در دماي منفی۷۰ درجه سانتي‌گراد نگهداري شوند.
* از به کار بردن پنبه، جهت بستن سر لوله ها اکيداً خودداري شود و براي انتقال لوله ها از جا لوله اي مناسب استفاده شود.
* اگر احتمال مي دهيد بيمار مبتلا به مننژيت مننگوکوکي باشد و چند ساعت تأخير در انجام آزمايش اجتناب ناپذير است، درپوش لوله محتوي CSF را شل کرده و آن را در حرارت °C 35 و در شرايط 5% CO2 (جار شمع دار) نگه داري کنيد. اين کار احتمال زنده ماندن باکتري در نمونه را افزايش مي دهد.
* اگر انتقال نمونهCSF به آزمايشگاه همان روز مقدور نباشد، نمونه را بايد در شرايط استريل به یک محيط انتقالی و کشت خاص به نام محیط ترانس ایزولیت (TI) منتقل و در انکوباتور°C 35 نگهداري نمود. محیط TIمحيطي بي فازيک، مغذي و نگه دارنده است. این محیط علاوه بر انتقال قابل استفاده به عنوان محیط کشت جهت رشد باکتری ها با کاربری مشابه ویال های خون می باشد.

**نحوه استفاده از محيط** **TI:**

پس از هم دما شدن با دمای اتاق و ضدعفوني کردن سرپوش پلاستيکي محیط TI با بتادين یا الکل، مقدار 1 میلی لیتر از نمونه CSF را در داخل محيط بريزيد و بقيه نمونه را در سرنگ و در حرارت اتاق نگه داشته (و نه يخچال) و از آن رنگ آميزي گرم انجام دهيد. سپس محیط TI را 18-24 ساعت در دماي 35 درجه قرار دهيد. مي توان محيطTI را در حرارت 35 درجه تا هفت روز نگه داري کرد. جهت تهويه محيطTI به محض تلقيح يا بعد از گذشت 24 ساعت، از سوزن استريل انسولين استفاده می شود. پس از گذشت 24 ساعت انکوباسيون، بعد از همزدن محیط، مقدار 1/0 میلی لیتر مايع موجود در لوله TI را به محيط کشت هاي بلادآگار و شکلات آگار منتقل و آن را پخش کرده و مدت 24 تا 48 ساعت در انکوباتور 35 درجه محتوي 5 درصد CO2 قرار مي دهيم. اگر بعد از گذشت 48 ساعت رشدي مشاهده نشد، در روز سوم و سپس هفتم از محيط TIروي محيط هاي ياد شده کشت مجدد تهيه می شود (مشابه کشت خون در محیط های دستی).

**کشت خون براي جداسازي عوامل مننژيت:**

* در صورت عدم امکان انجام LP به دلايل تکنيکي يا وجود منع انجام آن، براي تشخيص مننژيت باکتريايي، بايد کشت خون به انجام برسد.
* در ویال های حاوی مایع CSF بعد از انکوباسیون ممکن است علي رغم عدم وجود کدورت، رشد ميکروبي وجود داشته باشد. بنابراين ضروري است در فواصل 24-6 ساعت اوليه بعد از تلقيح، بعد از 48 ساعت و نيز در روز هفتم، کشت مجدد انجام شود.

**پردازش و کشت اوليهCSF :**

این مراحل مشابه مایعات استریل می باشد.

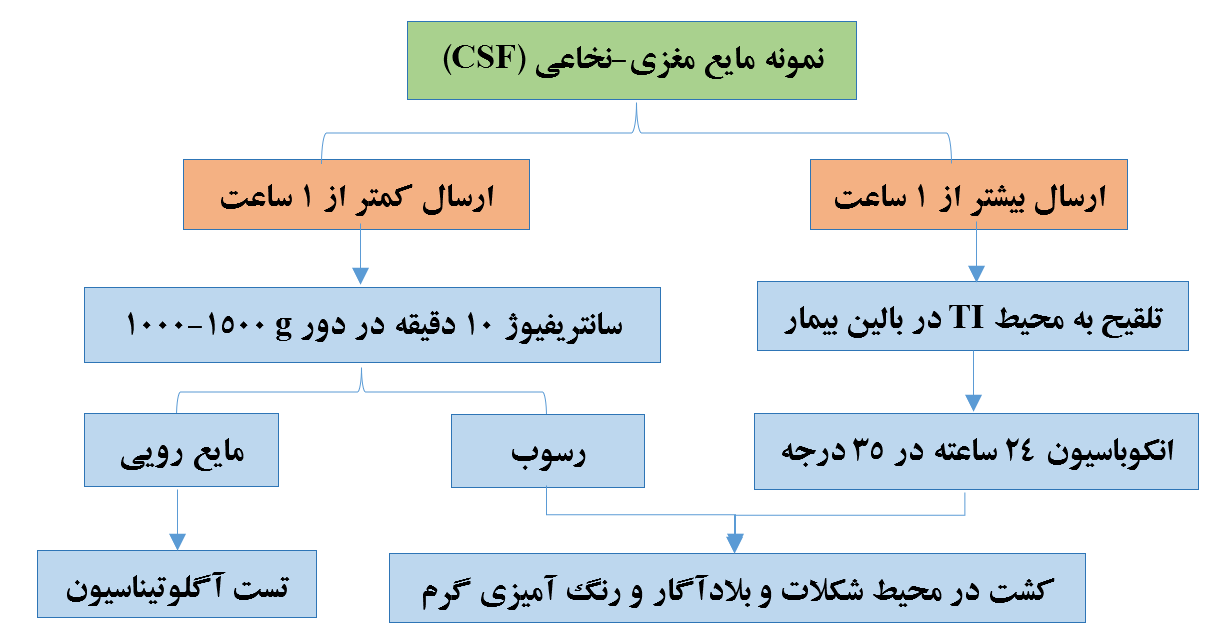
1. به محض دريافت نمونهCSF آن را به مدت 15-10 دقيقه در دور g1000-1500 سانتريفيوژ نمایید. توجه: اگر کمتر ml 1 ازCSF براي کشت و رنگ آميزي گرم در دسترس است بدون سانتريفیوژ به طور مستقيم از آن استفاده کنيد.

2. مايع رويي را با پيپت پاستور کشيده و آن را جهت جستجوي آنتي ژن هاي باکتريايي با روش آگلوتيناسيون لاتکس نگه داريد.

3. حدود 1 میلی لیتر از مایع رویی را همراه با رسوب به خوبي تکان داده يا ورتکس کنيد.

4. براي کشت و رنگ آميزي گرم از چند قطره رسوب استفاده نمایید. کشت بر روی محیط های بلاد و شکلات آگار به انجام می رسد و در صورت شک به گرم منفی ها یا دیده شدن آنها در رنگ آمیزی گرم، بر روی مک کانکی یا EMB هم کشت شود.

در نمودار زیر مراحل آماده سازی نمونه CSF برای آزمایش ها خلاصه شده است.



* بهترين محيط جهت جداسازي استرپتوکوک پنومونيه آگار خون دار با 5% خون گوسفند يا اسب است. خون انسان جانشين مناسبي نيست.
* مناسب ترين محيط براي جداسازي هموفيلوس آنفلوانزا محيط شکلات آگار غنی شده با هِمين و فاکتور رشدي نظير ايزوويتالکس، ساپلمنت B و يا ويتوکس است. در صورت عدم دسترسي به فاکتورهاي رشد ذکرشده مي توان از تلقيح هم زمان استافيلوکوک آرئوس روي پليت آگار خون داري که به آن CSF تلقيح شده است استفاده کرد که کلني هاي هموفيلوس به صورت اقماري در اطراف محل تلقيح و رشد استافيلوکوک ظاهر مي شوند.
* نايسريا مننژيتيديس مانند استرپتوکوک پنومونيه روي هر دو محيط آگار خون دار و شکلات آگار رشد مي کند.
* اگر فقط امکان استفاده از يک نوع محيط کشت وجود دارد، بهترين انتخاب محيط شکلات آگار است چون هر سه عامل اصلی مننژیت روي آن رشد مي کنند. برای تهیه این محیط مي توان از 5% خون دفيبرينه گوسفند، خرگوش، خوکچه و اسب استفاده کرد ولی هرگز نبايد از خون انسان استفاده شود. نکته مهم در زمان تهیه این محیط این است که بعد از اتوکلاوکردن محيط پایه آن (TSA) و خنک شدن آن تا 50 درجه خون را اضافه کرده و پس از مخلوط کردن، آن را در بن ماري با دماي 80 درجه به مدت 15 دقيقه قرار داده تا به رنگ شکلاتي درآيد، سپس محيط را در 50 درجه خنک کنيد. مي توان پس از افزودن خون دفيبرينه شده، هنگامي که دماي محيط 50 درجه است محلول 1% ايزوويتالکس يا ويتوکس و هِمين را اضافه و آن را به آرامي مخلوط کرده تا از توليد حباب هاي هوا جلوگيري شود.
* بهتر است همزمان با تلقيح پليت ها از يک عدد محيط مايع برين هارت اينفيوژن (BHI) براي کشت نمونه باکتريايي استفاده شود تا غنی سازی حتی تعداد کم باکتری هم فراهم شود. کدورت لوله BHI باید حداقل تا سه روز بررسي شود و در صورت مشاهده کدورت، بر روی محیط های آگار فوق کشت شود.
* بهتر است به جاي سواب چند قطر ه رسوب CSF را بر روي محیط ها ريخته و با حرکت دوراني پليت آن را پخش کنيم. پليت هاي آگار تلقيح شده در انکوباتور حاوي 5 درصد CO2 يا جار شمع دار قرار داده مي شوند.

**تشخیص مستقیم**

* استفاده از روش رنگ آميزي گرم روي رسوب مايع مغزي-نخاعي امکان تشخيص احتمالی مننژيت باکتريايي را فراهم مي کند زیرا نتايج مثبت آن حتي در حالت عدم رشد باکتري در محيط هاي کشت ممکن است نشانه بروز عفونت باشد، که البته با وجود سريع بودن اما حساسيت کمتري نسبت به کشت دارند.
* حساسيت رنگ آميزي گرم از 40% تا 90% بسته به شروع درمان ضد ميکروبي متغير است.
* لام تا خشک شدن کامل در زير هود بيولوژيک قرار گرفته و تا وقتي لام به طور کامل خشک نشده از حرارت دادن آن خودداري شود.
* بهترين حالت فيکس کردن استفاده از چند قطره متانول 95 درصد به مدت دو دقيقه است و اگر موجود نبود لام مورد نظر را 3 مرتبه به آرامي روي شعله حرکت دهيد تا ثابت شود.
* مرحله رنگبري دقت شود که زياد طول نکشد (10 ثانيه کافي است).
* نايسريا مننژيتيديس به شکل ديپلوکوک هاي گرم منفي مشابه دانه قهوه در داخل و يا خارج از لکوسيت هاي چندهسته اي، استرپتوکوک پنومونيه ديپلوکوک گرم مثبت و گاهي به شکل زنجيره هاي کوتاه و هموفيلوس آنفلوانزآ به شکل باسيل يا کوکوباسيل هاي گرم منفي چندشکلي و کوچک با آرايش و قرارگيري تصادفي مشاهده مي شوند.
* نحوه گزارش لام مستقیم این باکتری ها:

Gram-positive diplococci (intracellular and extracellular) in pairs were seen.

Gram-negative diplococci (intracellular and extracellular) were seen.

Gram-negative coccobacilli and polymorphic (intracellular and extracellular) were seen.

* رنگ آميزي اسيد فست و رنگ آميزي منفي به ترتيب در تشخيص مننژيت سلي و کريپتوکوکي مفيد است.

**(4) موارد رد و تکرار نمونه**

چون نمونه های مایعات استریل بدن تهاجمی بوده و تکرار آنها سخت است باید با مشورت با پزشک معالج در مورد رد و تکرار این نمونه ها تصمیم گیری شود. موارد رد و تکرار نمونه در مورد این نمونه ها می تواند شامل موارد زیر باشد:

* اطلاعات روی برچسب با اطلاعات درخواست شده مطابقت نداشته باشد، یا برچسب ناقص یا نمونه اصلاً برچسب گذاری نشده باشد (نام بیمار یا منبع نمونه متفاوت است).
* نمونه در دمای نامناسب حمل شده باشد. برای مثال کشت مایع CSF از نظر باکتری های عامل مننژیت اگر در یخ ارسال شده باشد یا قبلاً در یخچال نگه داری شده باشد، باید رد شود.
* در مورد نمونه مایع مفصلی اگر نمونه بدون ضدانعقاد ارسال شده و لخته شده باشد، نمونه با هماهنگی پزشک می تواند رد و تکرار شود، زیرا در نمونه های لخته شده جداسازی ارگانیسم ها دشوار است.
* نمونه در ظرف غیراستریل ارسال شده باشد.
* مقدار نمونه برای آزمایش کافی نباشد. در اینجا با هماهنگی با پزشک فقط آزمایش های اورژانسی که اهمیت بیشتری دارد باید انجام شوند.
* نمونه در حال نشت باشد یا برعکس خشک شده باشد.
* زمان انتقال نمونه بیشتر از زمان توصیه شده پس از جمع آوری تا انجام است (مثلاً نمونه CSF بیشتر از 1 ساعت).

**(4) محدوديت ها و تداخلات:**

در این کشت ها همانند کشت خون احتمال آلودگی نمونه در حین نمونه گیری با فلور طبیعی بیمار وجود دارد و بنابراین بهتر است در صورت رشد این باکتری ها توصیه زیر در جواب بیمار قید شود:

**Comment**: The bacterium X can be as normal microbiota (a Probable Contaminant). Repeat of sample with correct sampling is recommended.

**(5) نتایج بحرانی:**

* هر نتيجه مثبت کشت و اسمیر نمونه های مايع مغزي-نخاعي (CSF) و مايع دياليز در هر رده سنی جزو نتایج بحرانی می باشد.
* برای سایر مايعات استريل بدن شامل: جنب، آسيت، آمنيوتيك، مفصل، زجاجيه، پريكارد و غیره هر نتيجه مثبت کشت و اسمیر در هر رده سنی جزو نتایج بحرانی می باشد. دقت شود اولين تشخيص باكتري در كشت بحراني است اما مثبت شدن مجدد طي يك هفته، ديگر بحراني تلقي نمي گردد.

**(6) مستندات و سوابق:**

* مستندات مربوط به نحوه کشت و تفسیر کشت های مایعات بدن باید در بخش موجود باشد.
* هر زمان که کشت های مایعات بدن مثبت شد، نتيجه اولیه مثل نتیجه لام گرم اورژانس و جزو مقادیر بحرانی بوده و بايد به صورت تلفني به پزشک اعلام شود و در فرم مخصوص مقادیر بحرانی مستند گردد.

**(6) منابع**:

1. کتاب آزمایشگاه باکتری شناسی پزشکی. جلد اول: تشخیص. دکتر داریوش شکری و همکاران. انتشارات تیمورزاده نوین و کیا. 1402.
2. کتاب آزمایشگاه باکتری شناسی پزشکی. جلد دوم: تفسیر کشت. دکتر داریوش شکری و همکاران. انتشارات تیمورزاده نوین و کیا. 1402.
3. کتاب آنالیز و کشت مایعات بدن. دکتر داریوش شکری و همکاران. انتشارات تیمورزاده نوین و کیا. 1403.
4. Baron EJ، Thomson RB Jr: Specimen collection، transport، and processing: bacteriology. In Versalovic J، et al، editors: Manual of clinical microbiology، Ed 10، Washington، DC، 2011، ASM Press، p. 228.
5. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th Edition, HHS Publication No. (CDC) 21-1112, Revised December 2009.
6. Committee on Infectious Diseases. 2006 red book: report of the Committed on Infectious Diseases. ed 27. Elk Grove Village، IL: American Academy of Pediatrics; 2006.
7. Isenberg D. Henry: *Clinical Microbiology Procedures Handbook*، American Society for Microbiology. 2007.
8. Koneman، Elmer W، et al. Color Atlas and Text book of Diagnostic Microbiology. *Philedelphia: Lippincott-Raven Publishers. Seventh edition.* 2021.
9. Mahon CR, Lehman DC. Textbook of Diagnostic Microbiology-E-Book: Textbook of Diagnostic Microbiology. Elsevier Health Sciences; 2022 Nov 2.
10. Tille، Patricia. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology-e-book*. Elsevier Health Sciences، fifteenth edition. 2021.