**5. دستگاه تنفسی**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **اسم آزمایشگاه:** | {{LabName}} | |
| **اسم سند:** | **دستورالعمل نمونه های دستگاه تنفسی** | |
| **کد سند:** | D-006-0005 | |
| **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 دستگاه تنفسی بدن شامل نمونه گیری، حجم مورد نیاز، انتقال، نحوه کشت و تفسیر کشت ها می باشد.

**(2) تعاریف و اصطلاحات:**

**عفونت های دستگاه تنفسی فوقانی:** انواع این عفونت ها شامل التهاب حنجره، لارنگوتراکئوبرونشیت، گلو درد و ورم لوزه، سینوزیت، عفونت گوش میانی (اوتیت)، اپیگلوتیت، پرتوزیس یا سیاه سرفه، رینیت یا التهاب غشای مخاطی داخل بینی، رینواسکلروما و رینیت آتروفیک، عفونت های حفره دهان و عفونت گردن می باشد.

**عفونت های دستگاه تنفسی تحتانی**: انواع این عفونت ها شامل برونشیت و برونشیولیت، پنومونی اکتسابی از جامعه (CAP)، پنومونی بیمارستانی (مثل پنومونی مرتبط با ونتیلاتور یا VAP)، پنومونی آسپیراسیون (آتیپیک)، پنومونی مزمن و اِمپیما (Empyema) می باشد.

**(3) شرح دستورالعمل:**

**عفونت های دستگاه تنفسی فوقانی**

عوامل ایجاد کننده عفونت های دستگاه تنفسی فوقانی، سندرم­های بالینی هر کدام، نحوه نمونه گیری و توضیحات مربوطه در جدول 3 آمده است.

جدول 3. عفونت های دستگاه تنفس فوقانی.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **توضیحات** | **نمونه گیری** | **عوامل ایجاد کننده** | **سندرم­های بالینی** |
| کشت نایسریا گنوره آ یا کورینه باکتریوم دیفتریه در صورت وجود علائم بالینی | برای استرپتوکوک پیوژنز سوآب لوزه و فارنکس خلفی، قرار دادن در محیط انتقالی کشت ویروسی نیاز نیست. | کودکان: استرپتوکوکوس پیوژنز   بزرگسالان: ویروس­ها | فارنژیت |
| نمونه گیری مستقیم برای بیمارانی که به درمان تجربی جواب نداده اند، بیماران بدحال، نقص سیستم ایمنی یا در صورت مشکوک بودن به یک پاتوژن غیرمعمول | نمونه گیری مستقیم از سینوس | شایع ترین: رینوویروس، ویروس پاراآنفلوانزا، ویروس آنفلوانزا  عوامل با شیوع کمتر: استرپتوکوکوس پنومونیه، هموفیلوس آنفلوانزا | سینوزیت |
| کشت مستقیم برای بیماران بدحال، دارای نقص سیستم ایمنی یا درصورت مشکوک بودن به یک پاتوژن غیرمعمول یا مقاوم | کشت مستقیم با تمپانوسنتز | شایعترین: پنوموکوک و هموفیلوس آنفلوانزا  شیوع کمتر: استرپتوکوک پیوژنز، موراکسلا کاتارالیس و استافیلوکوک ارئوس | عفونت گوش میانی (اوتیت مدیا) |
| سوآب مستقیم فقط در صورت آسیب ندیدن راه های هوایی انجام شود | سوآب مستقیم از اپیگلوت، کشت خون | شایعترین: استرپتوکوکوس، استافیلوکوکوس ، هموفیلوس آنفلوانزای تیپ b  شیوع کمتر: هموفیلوس پاراآنفلوانزا | اپیگلوتیت |
| اگر مدتی از بیماری گذشته باشد، در صورت منفی بودن سایر روش ها، سرولوژی مفید است. | سوآب نازوفارنکس:   1. تست PCR مستقیم 2. قرار دادن در بوردت ژانگو یا ریگان لووه برای کشت | شایعترین: بوردتلا پرتوسیس، بوردتلا پاراپرتوسیس  شیوع کمتر: بوردتلا برونشی سپتیکا، بوردتلا هولمسی | سیاه سرفه یا پرتوسیس |

جدول 4. باکتری های درگیر در فارنژیت و ورم لوزه.

|  |  |
| --- | --- |
| **باکتری** | **بیماری ها** |
| استرپتوکوک پایوژنز | فارنژیت و ورم لوزه، تب روماتوئید، تب اسکارلت |
| استرپتوکوک های بتاهمولیز گروه C و G | فارنژیت و ورم لوزه |
| آرکانوباکتریوم همولیتیکوم | فارنژیت و ورم لوزه و راش |
| فوزوباکتریوم نکروفوروم | فارنژیت و ورم لوزه |
| نایسریا گنوره آ | فارنژیت و ورم لوزه، بیماری منتشر و جنسی |
| کورینه باکتریوم اولسرانس | فارنژیت |
| مایکوپلاسما پنومونیه | فارنژیت و برونشیت |
| یرسینیا انتروکولیتیکا | فارنژیت و انتروکولیت |

**تشخیص آزمایشگاهی عفونت‌های دستگاه تنفسی فوقانی**

**جمع‌آوری و انتقال نمونه‌ها:**

* نوع سواب مورد استفاده برای جمع آوری نمونه های تنفسی بسیار مهم است. به عنوان مثال، در شک به بیماری سیاه سرفه سواب های پنبه ای هرگز نباید برای کشت استفاده شوند، زیرا الیاف حاوی اسیدهای چرب در سطح هستند که قادر به کشتن بوردتلا هستند.
* برای جمع‌آوری و انتقال نمونه‌ها، سواب‌های استریل داکرون یا ابریشم مصنوعی با شفت‌های پلاستیکی برای جمع‌آوری بیشتر میکروارگانیسم‌های دستگاه تنفسی فوقانی مناسب هستند. سواب‌های ساخته شده از داکرون و آلژینات کلسیم معمولاً برای جمع‌آوری نمونه‌های نازوفارنکس (به استثنای نمونه‌های کلامیدیا یا کشت ویروسی که نوع آلژینات کلسیم بازدارنده است) استفاده می‌شود. همچنین سواب آلژینات کلسیم برای کشت بهینه است. برای آزمایش مبتنی بر اسید نوکلئیک سواب داکرون یا ریون روی شفت های پلاستیکی ترجیح داده می شود. سواب Flocked نیز ممکن است در صورت موجود بودن استفاده شود.
* ترشحات نازوفارنکس با هر دو روش آسپیراسیون یا شستشو باعث بهبود جداسازی برای گونه های بوردتلا می شود، زیرا مقدار بیشتری از مواد به دست می آید.
* اگر سواب مرطوب بماند، نیازی به اقدامات احتیاطی بیشتری برای نمونه های کشت داده شده طی 4 ساعت پس از جمع آوری نیست اما بیشتر از این زمان برای حفظ زنده ماندن و جلوگیری از رشد بیش از حد ارگانیسم های آلوده، به محیط انتقالی نیاز است.
* سواب برای تشخیص استرپتوکوک های گروه A تنها استثناء است. این ارگانیسم در برابر خشک شدن بسیار مقاوم است و به مدت 48 تا 72 ساعت روی یک سواب خشک زنده می ماند.
* محیط انتقالی برای جداسازی مایکوپلاسما و کلامیدیا برای اطمینان از زنده ماندن مورد نیاز است.
* سواب گلو برای بازیابی آدنوویروس ها و ویروس های تبخال، کورینه باکتریوم دیفتریه، مایکوپلاسما، کلامیدیا و گونه های کاندیدا کافی است. بازیابی کورینه باکتریوم دیفتریه با کشت گلو و نازوفارنکس افزایش می یابد.
* سواب نازوفارنکس برای جداسازی بوردتلا پرتوزیس، گونه های نایسریا و چندین ویروس، از جمله ویروس سنسیشیال تنفسی، ویروس پاراآنفلوآنزا و سایر ویروس های ایجاد کننده رینیت مناسب تر است.
* نمونه‌های کشت بوردتلا پرتوزیس در حالت ایده‌آل باید مستقیماً در محیط تازه در کنار بالین بیمار تلقیح شوند. در صورت عدم امکان حمل و نقل به مدت کمتر از 2 ساعت در محیط کازوآمینو اسید 1 درصد در دمای اتاق قابل قبول است. اگر نمونه ها در روز جمع آوری کشت شوند، محیط انتقال آمیز با زغال چوب قابل قبول است و اگر نمونه ها بیش از 24 ساعت پس از جمع آوری کشت شوند، محیط انتقال رگان-لووه یا جونز-کندریک مناسب است که هر دو حاوی زغال چوب، نشاسته و مواد مغذی و همچنین سفالکسین هستند. اگر تأخیرهای طولانی در حمل و نقل انتظار می رود، انتقال نمونه ها در محیط رگان-لووه در دمای 4 درجه سانتی گراد توصیه می شود.

**تشخیص مستقیم و بررسی میکروسکوپی:**

* رنگ آمیزی گرم از مواد به دست آمده از ترشحات یا ضایعات تنفسی فوقانی ممکن است به تشخیص کمکی نکند. اما سلول های مخمر مانند را می توان شناسایی کرد که در شناسایی برفک مفید هستند و همچنین الگوی مشخصه دوکی شکل و اسپیروکت های عامل بیماری آنژین وینسنت قابل مشاهده است.
* رنگ کریستال ویوله یا محلول رقیق کربول فوشین به صورت مجزا (اجازه داده می شود قبل از شستشو با آب به مدت 1 دقیقه روی لام بماند) و رنگ آمیزی گرم می تواند برای شناسایی باسیل های دوکی شکل آنژین وینسنت استفاده شود. با این حال، اگر از کریستال ویوله استفاده شود، اسمیر باید بسیار نازک باشد، زیرا همه چیز به شدت گرم مثبت خواهد بود و خواندن یک اسمیر غلیظ دشوار است.
* برای بررسی علل فارنژیت، رنگ آمیزی گرم قابل اعتماد نیستند. اسمیر مستقیم اگزودا از ضایعات غشایی که برای افتراق دیفتری از علل دیگر استفاده می شود نیز قابل اعتماد نیست و توصیه نمی شود.
* عناصر قارچی، از جمله سلول های مخمر و شبه هیف‌ها، ممکن است با آماده‌سازی 10% هیدروکسید پتاسیم (KOH)، رنگ فلورسنت سفید کالکوفلور یا رنگ آمیزی اسید پریودیک شیف (PAS) قابل مشاهده باشند.
* برای شناسایی عوامل ویروسی متعدد هم روش های مختلفی از جمله معرف‌های رنگ‌آمیزی آنتی‌بادی فلورسنت، سنجش ایمنی آنزیمی (EIAs) و روش های ملکولی (NAAT) نیز به صورت تجاری در دسترس هستند.

**کشت:**

* کشت نمونه های تنفسی به علت موجود بودن فلور طبیعی باید به صورت خطی (استریک) و با دقت به انجام برسد.
* کشت **نازوفارنكس** بر روی محیط های بلادآگار (BA) و شکلات آگار (CA) به انجام می رسد.
* کشت **بینی** بر روی محیط بلادآگار و در صورت درخواست بررسی حامل بودن فرد به باکتری استافیلوکوک آرئوس بر روی محیط کروموژن MRSA به انجام می رسد.
* کشت **گلو** بر روی محیط بلادآگار و محیط جداسازی استرپتوکوک گروه A به انجام می رسد.
* در جدول 5 شرایط لازم برای شرایط لازم برای نمونه های تنفسی فوقانی آمده است.

جدول 5. شرایط لازم برای شرایط لازم برای نمونه های تنفسی فوقانی**.**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **نمونه** | **ظرف** | **دستورالعمل ویژه** | **انتقال به آزمایشگاه** | **نگهداری قبل از انجام فرایند** | **بررسی مستقیم** | **محیط کشت** |
| نازوفارنكس | سوآب مرطوب شده با محيط هاي استوارت یا آمیس | سوآب انعطاف پذیر را از طریق بینی وارد نازوفارنکس پشتی کرده و به مدت 5 ثانیه بچرخانید؛ نمونه انتخابی برای بوردتلا | 15 دقيقه یا کمتر در دماي اتاق بدون محيط انتقال دهنده  2 ساعت یا کمتر در دماي اتاق همراه با محيط انتقال دهنده | 24 ساعت در دماي اتاق |  | BA  CA |
| بيني | سواب انتقالی | سواب خیس به نرمال سالین را به اندازه یک تا 2 سانتی متر داخل بینی فرو کنید تا مخاط بینی را نمونه گیری کنید | 2 ساعت یا کمتر در دماي اتاق | 2 ساعت یا کمتر در دماي اتاق |  | BA  محیط کروموژن MRSA |
| حنجره (گلو) | سوآب مرطوب شده با محيط هاي استوارت یا آمیس | سوآب پشت حلق و لوزه ها | 2 ساعت یا کمتر در دماي اتاق | 24 ساعت در دماي اتاق | گرم: شناسایی برفک و آنژین وینسنت | BA  محیط استرپ A |

**تشخیص آزمایشگاهی فارنژیت**

* شایع ترین علت باکتریایی فارنژیت، استرپتوکوک پیوژنز (GAS) است که در 15 تا 30 درصد از کودکان 5 تا 15 ساله که با فارنژیت مراجعه می کنند مثبت است در حالی که در بزرگسالان و کودکان بسیار خردسال با تظاهرات بالینی مشابه بسیار کمتر (<15 درصد) جدا می شود.
* سایر استرپتوکوک‌های بتا همولیتیک، از جمله گروه‌هایC و G اغلب در کشت جدا می‌شوند و به نظر می‌رسد داده‌های اخیر از توانایی آنها در ایجاد علائم مشابه علائم GAS پشتیبانی می‌کند، اگرچه این موضوع مورد بحث است.
* موارد فارنژیت همچنین می تواند توسط پاتوژن های باکتریایی غیرمعمول مانند نایسریا گونوره آ، آرکانوباکتریوم همولیتیکوم، فوزوباکتریوم نکروفوروم و کورینه باکتریوم دیفتری ایجاد شود.
* در بیشتر موارد فارنژیت حاد، هدف اولیه از تست آزمایشگاهی (کشت یا تست سریع) تمایز فارنژیت استرپتوکوکی از فارنژیت ناشی از عوامل شایع ویروسی می باشد.
* اکثر آزمایشگاه ها به طور معمول کشت های گلو را برای استرپتوکوک‌ گروه A غربال می کنند. کشت گلو از نظر تاریخی استاندارد طلایی برای تشخیص استرپتوکوک پایوژنز در نظر گرفته شده است و حساسیت 95-90% دارد.
* باید توجه کرد که یک تست مثبت به معنای تشخیص قطعی استرپتوکوک نمی باشد زیرا برخی بیماران باGAS کلونیزه شده اند اما ممکن است همزمان یک بیماری ویروسی علائم را به وجود آورده باشد. تا به حال هیچ روش دقیقی برای تمایز این بیماران از مبتلایان به عفونت واقعی وجود ندارد.
* استرپتوکوک های گروهA معمولاً بتا همولیتیک هستند و کمتر از 1٪ غیرهمولیتیک هستند.
* در مواردی که مشکوک به عفونت عوامل باکتریایی دیگری نظیر نایسریا گنوره آ و کورینه باکتریوم دیفتریه باشند، کشت های اختصاصی باید انجام گیرد.

**نمونه گیری گلو**

* برای به حداقل رساندن آلودگی با میکروبیوتای دهان و رقیق شدن نمونه، سوآب نباید با دیگر ساختارهای زبانی و دهانی برخورد کند. به این منظور از چوب آبسلانگ استفاده می شود که زبان را باید با آن نگه داشته تا از تماس ممانعت کرد و سپس سواب را به سمت فارنکس و لوزه حرکت می دهیم.
* باید سوآب در هر دو ناحیه لوزه و بخش پشتی حلق محکم کشیده شود و اگر هرگونه ترشح التهابی (اگزودا) در لوزه مشاهده شد باید سوآب مستقیماً با آن ناحیه تماس پیدا کند.
* بعد از جمع آوری نمونه، سوآب ها باید روی محیط های غیر انتخابی مثل بلاد آگار گوسفندی کشت شوند یا در محیط انتقالی قرار گرفته و ارسال شوند، هرچند در حالت طبیعی به محیط انتقالی نیاز نیست چون این ارگانیسم نسبت به خشک شدن مقاوم است.
* رنگ آمیزی گرم از قسمت فوقانی دستگاه تنفس همانند سواب پوست دارای ارزش کمی است، به دلیل اینکه این نواحی دارای میزان زیادی کوکسی گرم مثبت به عنوان فلور نرمال هستند.

**کشت گلو**:

برای کشت موفقیت آمیز باکتری استرپتوکوک پایوژنز از نمونه های حلقی، 4 متغیر باید در نظر گرفته شود: نوع کشت، محیط، اتمسفر و مدت زمان انکوباسیون.

**روش خط و خنجر (استب کردن: stab)**: برای تشخیص همولیز در شرایط بیهوازی بر روی آگار خوندار در تشخیص فارینژیت استرپتوکوکی استفاده می شود. در این تکنیک بعد از تلقیح نمونه سواب گلو در قسمت اول پلیت، با کمک لوپ کشت خطی به انجام می رسد. سپس همان لوپ را بدون استریل شدن در قسمت های مختلف پلیت شامل ناحیه اول کشت و چند ناحیه کشت نشده از پلیت به صورت عمودی (خنجری) فرو می کنیم تا شرایط بیهوازی برای انجام همولیز توسط همولیزین حساس به اکسیژن باکتری (آنزیم استرپتولیزینO) فراهم شود. در نواحی که لوپ فرو رفته است در صورت حضور باکتری استرپتوکوک پایوژنز تشدید همولیز بتا مشهود است.

چهار روش برای جداسازی این باکتری از گلو می توان استفاده کرد:

1. کشت خطی نمونه در محیط بلادآگار و انکوبه در شرایط بیهوازی.

2. کشت خطی نمونه در محیط بلادآگار حاوی آنتی بیوتیک کوتریموکسازول و انکوبه در شرایط هوازی و استب کردن لوپ.

3. کشت خطی نمونه در محیط بلادآگار حاوی آنتی بیوتیک کوتریموکسازول و انکوبه در شرایط بیهوازی یا 5-10 درصد CO2.

4. کشت خطی نمونه در محیط بلادآگار و گذاشتن دیسک باسیتراسین 04/0 واحدی و دیسک کوتریموکسازول در منطقه اول کشت (قسمت A)، استب کردن و انکوبه در شرایط هوازی یا 5-10 درصد CO2 که بهترین تشخیص در سریع ترین زمان را خواهد داد. همه استرپتوکوک های گروهA و درصد بسیار کمی از استرپتوکوک های گروهB حساس به باسیتراسین هستند. استرپتوکوک گروهA به کوتریموکسازول مقاوم است.

همچنین محیط آگار خون دار گوسفندی همراه با سولفومتاکسازول و کلیستین یا پلی میکسینB و برخی فرمول های دیگر به عنوان محیط آگار دار انتخابی برای بررسی و مشاهده بهتر استرپتوکوکوس بتاهمولیتیک از کشت گلو پیشنهاد شده است.

**بررسی پلیت:** پلیت ها باید در دمای 35 درجه سانتی گراد در هوا یا در 5 تا 7% CO2 انکوبه شوند و پس از 24 ساعت کلنی های با همولیز بتا مورد بررسی قرار می گیرند. صرف نظر از نوع محیط و شرایط انکوباسیون مورد استفاده، اگر همولیز مشاهده نشود قبل از اینکه کشت منفی گزارش شود محیط برای 24 ساعت دیگر انکوبه می شود. رشد باکتری کوکسی گرم مثبت با همولیز بتا که به باسیتراسین حساس است حضور احتمالی این باکتری را قوت می بخشد. کلنی های استرپتوکوک پایوژنز روی آگار خون دار کوچک، واضح و صاف با ناحیه ای مشخص از همولیز بتا است. رنگ آمیزی گرم کوکسی گرم مثبت با زنجیره های کوتاه را نشان می دهد.

* علی رغم اینکه کلنی ها می توانند بر اساس آنتی ژن لانسفیلد با روش سروتایپینگ سریع و قطعی تشخیص داده شوند اما می توان از تست های بیوشیمیایی هم استفاده کرد. تست کلیدی دیگر علاوه بر حساسیت به باسیتراسین، هیدرولیز PYR هستند در حالی که بقیه گروه های بتاهمولیتیک نسبت به باسیتراسین مقاوم وPYR منفی هستند.
* استرپتوکوکوس گروه C و گروه G معمولاً نسبت به باسیتراسین حساس است. بهترین راه افتراقی بین گروه هایC و G از استرپتوکوکوسی گروه A (GAS)، آنتی ژن لانسفیلد است. همچنین این گروهها به کوتریموکسازول حساس هستند.

**نمودار خلاصه تشخیصی فارنژیت**

* لام گرم مستقیم نیاز نیست فقط در صورت شک به بیماری آنژین وینسنت (باکتری دوکی فوزوباکتریوم نکروفوروم) و ضایعات برفکی (دیدن مخمرها).
* کشت روتین فقط به صورت خطی بر روی بلادآگار و محیط اختصاصی استرپتوکوک A باید انجام شود، در صورت سابقه بستری محیط مک کانکی هم بهتر است استفاده شود. در منطقه A کشت یک دیسک باسیتراسین و یک دیسک کوتریموکسازول بگذارید و لوپ را stab کنید.
* کوکسی گرم مثبت حساس به باسیتراسین و همولیز بتا و کاتالاز منفی: استرپتوکوک A: تأیید با تست PYR.
* منفی بودن تست سریع استرپتوکوک A و PCR ولی کشت مثبت: استاندارد طلایی کشت است و باید مثبت گزارش شود. در حالت برعکس مثبت بودن تست سریع استرپتوکوک A و PCR هم می توان جواب مثبت را گزارش کرد.
* کوکسی گرم مثبت با همولیز بتا و کاتالاز منفی و حساس به کوتریموکسازول: استرپتوکوک های گروه C و G: با کانت غالب و بالا می توانند عامل فارنژیت باشند.
* باسیل گرم مثبت با همولیز بتا: آرکانوباکتریوم همولیتیکوم: تأیید با واکنشCAMP معکوس.
* وجود باسیل دوکی بلند بدون رشد: فوزوباکتریوم نکروفوروم: انجام کشت بیهوازی.
* شک به گنوکوک و مننگوکوک، سیاه سرفه و دیفتری باید توسط پزشک مطرح شود: کشت بر روی محیط های اختصاصی هر کدام
* رشد باکتری های غیرمعمول با کانت بالا مثل استافیلوکوک آرئوس و گرم منفی ها ارزشمندند به خصوص اگر کانت غالب باشند.
* منفی بودن کشت بعد از 24 ساعت: نگهداری حداقل تا 48 ساعت.

**تشخیص عفونت گوش میانی (اوتیت مدیای حاد یا AOM)**

* به دلیل تهاجمی بودن آسپیراسیون مستقیم مایع از گوش میانی و به دلیل شناخته بودن پاتوژن های غالب عامل AOM، تهیه نمونه برای کشت قبل از شروع درمان در اکثر موارد نه توصیه می شود و نه ضروری است.
* اگر مشکوک به وجود ارگانیسم غیرمعمول یا مقاوم به دارو باشیم و بیمار به درمان تجربی آنتی بیوتیکی پاسخ ندهد، کشت مستقیم مایع گوش میانی با تمپانوسنتز اندیکاسیون دارد.
* کشت نازوفارنکس در شناسایی پاتوژن های گوش میانی مفید نیست و یک کشت مثبت برای پاتوژن های باکتریایی دارای ارزش پایینی برای جداسازی همان ارگانیسم از گوش میانی است.
* اگر ترشحات از گوش خارج می شود، نمونه گیری از ترشحات ارزشمند است و کشت بر روی هر سه محیط روتین شامل بلادآگار، شکلات آگار و مک کانکی آگار باید به انجام برسد. مطالعات ویروسی اطلاعات مفیدی را در موارد AOM ارائه نمی‌دهند، زیرا هرچند عفونت‌های ویروسی مقدم برAOM باکتریایی هستند اما وجود ویروس، عفونت همزمان باکتریایی را رد نمی‌کند.

**تشخیص سینوزیت**

* استاندارد طلایی تشخیص آزمایشگاهی عفونت سینوس، سوراخ کردن و آسپیراسیون سینوس است. این روش تهاجمی و دردناک، به طور روتین در آزمایشگاه های پزشکی مناسب نیست اما در صورتی که احتمال گسترش عفونت به جمجمه وجود داشته باشد یا اگر بیمار به درمان ضدمیکروبی تجربی جواب ندهد و یا اینکه بیمار بسیار بدحال یا سرکوب سیستم ایمنی باشد، کشت آسپیره سینوس باید انجام شود.
* جمع آوری ترشحات بینی و یا سوآب بینی با پاتوژن های ایجاد کننده عفونت حاد سینوسی ارتباطی ندارند و نباید کشت این نمونه ها به صورت روتین انجام گیرد و یا برای تصمیمات بالینی استفاده شود.
* کشت سینوزیت از نظر باکتری های عامل که معمولاً استرپتوکوک پنومونیه، هموفیلوس آنفولانزا، استرپتوکوک پیوژنز، استافیلوکوک اورئوس و در عفونت های بیمارستانی همچنین باسیل های گرم منفی هستند، باید روی بلادآگار، شکلات آگار و مک کانکی آگار به انجام برسد و حضور این باکتریها با انجام کشت خطی دقیق برای جداسازی احتمالی مخلوط آنها انجام شود.
* بیمارانی که مشکوک به عفونت قارچی سینوس هستند باید فوراً برای کشت و بقیه آزمایشات با یک متخصص گوش و حلق و بینی یا عفونی مشورت کنند. در اینجا کشت بر روی محیط های قارچی مثل SDA‌ حاوی آنتی بیوتیک باید به انجام برسد.

**کشت نمونه اپیگلوتیت**

* کشت سواب مستقیم (سواب های به دست آمده توسط پزشک) از ناحیه اپیگلوت برای ایجاد تشخیص مفید است، اما تنها زمانی باید انجام شود که راه هوایی ایمن باشد چون ممکن است منجر به انسداد تنفسی شود.
* اسمیر مستقیم اگزودای اپیگلوت برای بررسی میکروسکوپی ممکن است گلبول های سفید متعدد و باسیل های پلئومورفیک و گرم منفی مشخصه هموفیلوس آنفولانزا یا سایر پاتوژن های باکتریایی را نشان دهد.
* نمونه های بالینی از موارد اپیگلوتیت باید در آگار خون گوسفند، آگار شکلاتی (برای بازیابی گونه های هموفیلوس) و یک محیط انتخابی استرپتوکوک قرار داده شوند.
* یک محیط غنی شده شکلات آگار دارای فاکتورهای هِمین (X) و نیکوتین آمید آدنوزین دی نوکلئوتید با غلظت بالای CO2 (10-5٪) مناسب برای کشت هموفیلوس آنفلوانزا است.
* سایر ارگانیسم هایی که گاهی اوقات بیماری اپیگلوتیت ایجاد می کنند شامل هموفیلوس پاراآنفلوانزا، کلبسیلا پنومونیه، استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس پیوژنز و استرپتوکوکوس پنومونیه هستند.
* در تمام بیمارانی که مشکوک به اپیگلوتیت هستند باید کشت خون انجام شود.

**تشخیص عفونت در حفره دهان و گردن**

* جمع آوری و جلوگیری یا به حداقل رساندن آلودگی با میکروبیوتای دهان هنگام جمع آوری مواد دهان و دندان برای تشخیص عفونت مهم است.
* برای جمع آوری مواد از عفونت ریشه، دندان با استفاده از یک سد لاستیکی (rubber dam) مخصوص دندانپزشکی از کانال ریشه فاصله داده می شود، با الکل 70 درصد یک میدان استریل ایجاد می شود و پس از نمایان شدن کانال ریشه، یک تکه کاغذ استریل مخصوص دندانپزشکی برای نمونه گیری وارد ناحیه شده و سپس در محیط بلادآگار و محیط بیهوازی کشت می شود.
* در صورت وجود مواد چرکی کافی، می توان از آسپیراسیون سوزنی نیز استفاده کرد.
* نمونه هایی از عفونت های فضای گردن را معمولاً می توان با سرنگ و سوزن یا با بیوپسی در طی یک عمل جراحی به دست آورد. حمل و نقل این نمونه ها باید در شرایط بیهوازی باشد.
* **بررسی میکروسکوپی:** تمام مواد ارسالی برای کشت باید در صورت درخواست با رنگ آمیزی گرم و سایر تکنیک های مناسب برای قارچ ها (مانند کالکوفلور سفید، KOH یا PAS) مورد بررسی قرار گیرد.
* **کشت**: عفونت هایی مانند آبسه های پری لوزه، عفونت های دهان و دندان و عفونت های فضای گردن معمولاً شامل باکتری های بیهوازی هستند. بی‌هوازی‌های درگیر معمولاً از حفره دهان منشأ می‌گیرند و اغلب سخت رشدتر از بی‌هوازی‌های جدا شده از سایر مواد بالینی هستند و بنابراین روش های بسیار دقیقی برای تهیه نمونه‌های بهینه برای کشت بی‌هوازی و همچنین جمع‌آوری و حمل و نقل برای بازیابی و شناسایی عوامل اتیولوژیک مورد نیاز است و به مدت طولانی تری (تا یک هفته) باید پلیت های کشت بررسی شوند. تشخیص این باکتری ها در دستورالعمل باکتری های بیهوازی آمده است.

**تشخیص بقیه عفونت های سیستم تنفسی فوقانی**

* برای اسکروفولا کشت و لام زیل-نلسون برای مایکوباکتریوم اسکروفولاسئوم یا کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم یا انجام PCR‌ باید انجام شود.
* برای عفونت غدد بزاقی یا پاروتیت، کشت بر روی محیط بلادآگار و مک کانکی باید به انجام برسد چون استافیلوکوکوس اورئوس پاتوژن اصلی است و در مواردی انتروباکترال ها و سایر باسیل های گرم منفی هم دخیل هستند.
* در صورت مشکوک بودن به بیهوازی های دهانی کشت بیهوازی نیز باید به انجام برسد. در بیماری برفک در صورت درخواست کشت چون گونه های کاندیدا عامل اصلی بیماری هستند کشت در محیط SDA حاوی آنتی بیوتیک کفایت می کند و باید تا حداقل 5 روز پلیت ها مورد بررسی قرار گیرند، هرچند در 48 ساعت اول کاندیداها رشد خواهند کرد.
* در مورد درخواست بررسی ترشحات ضایعات بینی از نظر رینواسکلروما و رینیت آتروفیک، کشت علاوه بر بلادآگار باید روی محیط مک کانکی آگار نیز به انجام برسد و از نظر دو کلبسیلای عامل این بیماری ها کشت بررسی شود.

**عفونت های دستگاه تنفسی تحتانی**

جدول 6. شایع ترین پاتوژن های عفونت های دستگاه تنفسی تحتانی بر اساس سن.

|  |  |
| --- | --- |
| **سن** | **ارگانیسم** |
| نوزادان (زیر 2 ماه) | استرپتوکوک گروه B، اشریشیاکلی، سیتومگالوویروس، لیستریا منوسیتوژنز |
| نوزادان (2 ماه تا 5 ماه) | کلامیدیا تراکوماتیس، ویروس های تنفسی مثل سین سیشال تنفسی و ویروس پاراآنفولانزا تیپ 3،  استرپتوکوک پنومونیه، بوردتلا پرتوزیس، استافیلوکوک آرئوس |
| بچه ها (5 ماه تا 5 سال) | ویروس های تنفسی، استرپتوکوک پنومونیه، هموفیلوس آنفولانزا، مایکوپلاسما پنومونیه، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس |
| نوجوان (5 سال تا 18 سال) | مایکوپلاسما پنومونیه، کلامیدوفیلیا پنومونیه، استرپتوکوک پنومونیه، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس |
| بالغین جوان (18 تا 45 سال) | استرپتوکوک پنومونیه، استافیلوکوک آرئوس، هموفیلوس آنفولانزا (تیپ b و غیرتیپ بندی)، کلامیدوفیلیا پنومونیه، مایکوپلاسما پنومونیه، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس |
| بالای 45 سال | استرپتوکوک پنومونیه، هموفیلوس آنفولانزا (تیپ b و غیرتیپ بندی)، مایکوپلاسما پنومونیه، گونه های لژیونلا و مایکوباکتریوم توبرکلوزیس |
| بالغین مسن | باسیل های گرم منفی، استافیلوکوک آرئوس، استرپتوکوک پنومونیه |

جدول 7. عوامل اصلی پنومونی بیمارستانی بر اساس درصد.

|  |  |
| --- | --- |
| **باکتری** | **فراوانی (٪)** |
| کوکسی های گرم مثبت |  |
| استافیلوکوک آرئوس | 17 |
| استرپتوکوک پنومونیه | 2-20 |
| باسیل های گرم منفی هوازی: سودوموناس آئروجینوزا، انتروباکتر، کلبسیلا پنومونیه، آسینتوباکتر، لژیونلا | 60 |
| بیهوازی ها | 10-20 |
| قارچها | 0-10 |

**دستورالعمل تشخیص آزمایشگاهی عفونت های دستگاه تنفسی تحتانی**

**تشخیص آزمایشگاهی پنومونی**

**نمونه برداری و انتقال نمونه**:

* به طور کل، روش نمونه برداری برای تشخيص پنومونی به دو دسته غيرتهاجمی و تهاجمی تقسيم می شوند.
* روش های غیرتهاجمی شامل جمع آوری خلط به روش معمولی و به روش القایی و انجام کشت خون است که در موارد پنومونی غیربیمارستانی یا مواردی که بیمار بستری توانایی دادن نمونه خلط را دارد کاربرد دارند.
* روش های تهاجمی شامل آسپيراسيون آندوتراکئال، آسپيراسيون شيره معده، برونکوسکوپی، آسپیراسیون ترانس تراشیال، توراسنتز و نهایتاً بيوپسی ريه باز می باشد. روش های تهاجمی مخصوص پنومونی بیمارستانی یا مواردی است که نمی توان از بیمار نمونه خلط گرفت.

**خلط:**

* برای بیمارانی که نیازی به تهویه مکانیکی ندارند، کشت خلط ساده ترین و ارزانترین نمونه غیرتهاجمی است.
* تهیه نمونه های خلط خوب به آموزش کامل کارکنان مراقبت های بهداشتی و درک بیمار در تمام مراحل فرآیند جمع آوری بستگی دارد. بیمار 1 تا 2 ساعت قبل از خلط نباید غذا خورده شود (خلط صبحگاهی بهتر است) و باید قبل از دادن نمونه، دهان خود را با آب نمک یا آب بشوید و در صورت امکان روی زبان مسواک زده شود. سپس باید بیمار یک نمونه سرفه عمیق تهیه کند و با تلاش برای به حداقل رساندن آلودگی با بزاق، نمونه باید در یک ظرف استریل جمع آوری شود.
* نمونه ها باید بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شوند زیرا حتی زمان کوتاه در دمای اتاق می تواند منجر به از بین رفتن عوامل عفونی زنده و بازیابی کم آنها شود.

**غربال گری کیفیت نمونه خلط (معیار Q):**

* اغلب توصیه می شود که نمونه خلط غربال گری شوند تا اطمینان حاصل شود که آنها حداکثر 10 سلول اپیتلیال سنگفرشی و حداقل 25 سلول پلی مورفونوکلئر در میدان کم توان (lpf) ندارند تا نمونه مورد قبول قرار گیرد.
* کیفیت لام طبق معیار یا نمره Q به انجام می رسد (جدول 8). نمره Q‌ برابر با جمع نمره میانگین سلول های اپیتلیال و نمره میانگین سلول های نوتروفیل است. نمونه با نمره 1+ و بیشتر باید کشت شود. نمره صفر و کمتر نشانه کیفیت بد نمونه است و باید درخواست کشت مجدد شود. نمونه های حاوی بیش از 25 سلول اپیتلیال سنگفرشی حتی با وجود تعداد بسیار بالای نوتروفیل ها نباید کشت شوند.
* پیش از این، تنها بررسی کیفیت نمونه خلط برای رد بر اساس غربال گری میکروسکوپی انجام می گرفت. با این حال، آسپیرات داخل تراشه (ETAs) از بیماران بالغ با تهویه مکانیکی مشکلات مشابهی دارند، زیرا لوله‌های داخل تراشه و تراکئوستومی‌ها اغلب با باکتری‌هایی کلونیزه می‌شوند که ممکن است برای تشخیص عفونت دستگاه تنفسی تحتانی بی‌ربط باشند بنابراین این نمونه ها هم می توانند با رنگ آمیزی گرم غربال گری شوند. معیارهای مورد استفاده برای رد نمونهETA از بیماران بالغ شامل وجود بیش از 10 سلول اپیتلیال سنگفرشی در هر میدان کم توان یا عدم مشاهده ارگانیسم تحت لام با روغن است (1000×) است.
* برای اهداف غربال گری در نمونه های به دست آمده با برونکوسکوپی یاBAL ، وجود سلول های اپیتلیال برونش ستونی مژه ای، سلول های جامی یا ماکروفاژهای ریوی نشان دهنده نمونه مناسبی از دستگاه تنفسی تحتانی است. برای رد يا تأیید نمونه BAL اگر کمتر از 1% سلول ها حاوی سلول های اپیتلیال باشند، نمونه قابل قبول است و بيشتر از 1% نمونه مناسبی نیست و بهتر است این مورد به پزشک اطلاع داده شود. این نمونه چون تهاجمی است باید کشت شود و در صورت عدم داشتن شرط فوق بهتر است در در قسمت جواب به صورت توصیه آورده شود.
* از طرفی تعداد گلبول های سفید ممکن است مرتبط با کیفیت نمونه نباشد، زیرا برخی از بیماران لکوپنی یا نوتروپنی (تعداد کم نوتروفیل) هستند (بيماران پيوند مغز استخوان يا بيماران با ايمنی سرکوب شده) و نمونه های این بیماران در بررسی گرم، گلبول های سفید ندارند. نمونه خلط بیماران لکوپنی حاوی سلول های اپیتلیال مژکدار نیاز به تأیید لام ندارند و باید کشت شوند.
* در پنومونی لژیونلا، خلط ممکن است کم و آبکی باشد و سلول های میزبان و WBC کم باشد یا اصلاً وجود نداشته باشد. چنین نمونه هایی نباید تحت روش غربال گری لام قرار گیرند و ممکن است با رنگ آمیزی و کشت آنتی بادی فلورسنت مستقیم (DFA) مثبت شوند.
* خلط بیماران مبتلا بهCF باید غربال گری شود. به علت سختی گرفتن نمونه خلط در بیماران مبتلا بهCF سواب گلو یک نمونه قابل قبول است و باید به روشی مشابه خلط کشت و پردازش شود.

جدول 8. نحوه محاسبه معیار یا نمره Q‌ که برابر با جمع نمره میانگین سلول های اپیتلیال و نمره میانگین سلول های نوتروفیل است. حداقل نمره برابر +3 و حداکثر نمره -3 می باشد و هر نمره بالاتر نشانه کیفیت بهتر است. برای مثال وجود میانگین 15 عدد سلول اپیتلیال دارای نمره 2- است و وجود میانگین 8 عدد سلول نوتروفیل دارای نمره 1+ است و نمره Q برابر 1- خواهد بود و نمونه باید رد شود.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | | سلول های اپیتلیال اسکواموس | | | |
| No Cells | 1-9/ lpf | 10-24/ lpf | > 25/ lpf |
| نوتروفیل | نمره | 0 | -1 | -2 | -3 |
| No Cells | 0 | 0 | -1 | -2 | -3 |
| 1-9/lpf | +1 | +1 | 0 | -1 | -2 |
| 10-24/lpf | +2 | +2 | +1 | 0 | -1 |
| > 25/ lpf | +3 | +3 | +2 | +1 | 0 |

**جمع آوری خلط از طريق روش های القایی:**

* بيمارانی که قادر به نمونه گیری خلط نیستند، باید به کمک کارکنان آزمایشگاه یا بیمارستان با تحريک بتوانند يک نمونه قابل قبول تهيه کنند. اين نوع نمونه برای جداسازی عواملی چون مايکوباکتريوم ها و قارچ ها و همچنين تشخيص پنوموسيستيس کارينی مفيد است.
* خلط القایی به واسطه استنشاق محلول نمکی حاوی 3 درصد سديم کلرايد برای حدود 10 تا 20 دقيقه با نبولايزر تا شروع سرفه عميق به دست می آيد. ترشحات دستگاه تنفسی تحتانی که به اين روش تهيه می شود آبکی و شبيه آب دهان است چون حاوی محتویات فضای کيسه های هوايی است (نباید به اشتباه فکر شود که نمونه بزاق است).
* اين نمونه ها معمولاً برای کشت کافی هستند و در آزمايشگاه بايد بدون بررسی مقدماتی (غربال گری لام) پذيرش شوند. گرفتن چنين نمونه هايی ممکن است در بيشتر موارد پزشک را از استفاده از روش های تهاجمی تر مانند برونکوسکوپی بی نیاز کند.

**کشت خون از بیماران تنفسی:**

* کشت خون در حدود 20-8 درصد از پنومونی های مرتبط با ونتيلاسيون مثبت است، هرچند باکتريمی هميشه مربوط به عفونت های ريوی نيست و در 50 درصد از مواردی که کشت خون مثبت است، منشأ عفونت در قسمت ديگری از بدن بوده و ميکروارگانيسم جدا شده از خون و ترشحات دستگاه تنفسی يکسان نبوده است.
* درصورتی که از کشت خون و نمونه تنفسی بيمار مبتلا به عفونت ريوی، ارگانيسم مشابه با الگوی حساسیت دارویی مشابه جدا شود، نشان دهنده وجود کانون عفونت در ريه است.

**نمونه های ساکشن نای یا تراشه یا تراکئوستومی:**

* بیماران دارای لوله تراشه (تراکئوستومی) قادر به تولید خلط به روش طبیعی نیستند، اما ترشحات دستگاه تنفسی تحتانی را می توان به راحتی در ظرف مخصوص استریل با ساکشن جمع آوری کرد.
* آسپیراسیون تراکئوستومی یا نمونه های ساکشن تراکئوستومی یا آسپیراسیون اندوتراکئال (ETAs) باید به عنوان خلط توسط آزمایشگاه در نظر گرفته شوند.
* کشت ترشحات ساکشن شده از لوله تراکئال در بیمارانی که از تهویه مصنوعی استفاده می کنند مناسب نیست چون تراکئوستومی ها و لوله های اندوتراکئال مکرراً توسط باکتری های گرم منفی و سایر باکتری های بیمارستانی کلونیزه می شوند که ممکن است نتایج کشت با علائم و نشانه های بالینی مرتبط نباشد.

**برونکوسکوپی**:

* نمونه های برونکوسکوپی شامل لاواژ برونش آلوئولار (BAL)، شستشوی برونش (BW)، براشینگ برونش (BB) و بیوپسی ترانس برونشیال (TBLB) یا آسپیراسیون ترانس تراشیال از راه پوست (TTAs) است.
* برونکوسکوپی با روش جدید فیبر نوری به طور چشمگیری بر ارزیابی و مدیریت این عفونت ها تأثیر گذاشته است. با این روش می توان مخاط برونش را مستقیماً برای بیوپسی مشاهده و جمع آوری کرد و بیوپسی ترانس برونشال بافت ریه را به کمک آن انجام داده و برای ارزیابی سرطان ریه و سایر بیماری های ریوی ارسال کرد. نمونه باید در سالین 85/0% استریل حمل شود.
* لاواژها مثل BAL مخصوصاً برای تشخیص کیست های پنوموسیستیس و عناصر قارچی مناسب هستند. در طی این روش، حجم بالایی از نمک (100 تا 300 میلی‌لیتر) از طریق برونکوسکوپ به یک بخش ریه تزریق می‌شود تا سلول‌ها و پروتئین های بینابینی ریوی و فضاهای آلوئولی به دست آید. تخمین زده می شود که در طی این فرآیند بیش از 1 میلیون آلوئول نمونه برداری می شود.
* ارزش این تکنیک در ارتباط با کشت کمی برای تشخیص بیشتر پاتوژن های اصلی دستگاه تنفسی، از جمله پنومونی باکتریایی، مستند شده است و یک روش ایمن و عملی برای تشخیص عفونت های ریوی فرصت طلب در بیماران مبتلا به سرکوب سیستم ایمنی است.
* روش مینی بال روش غیربرونکوسکوپی با استفاده از کاتتر متراسMetras است که در آن به طور معمول، 20 میلی لیتر یا کمتر نمک تزریق می شود.
* نوع دیگری از نمونه تنفسی از طریق یک برس برونش کاتتر محافظت شده به عنوان بخشی از معاینه برونکوسکوپی به دست می آید. نمونه‌های به‌دست‌آمده از این روش جمع‌آوری (با میزان تهاجم متوسط) ​​برای مطالعات میکروب شناسی، به‌ ویژه در پنومونی آسپیراسیون برای کشت‌های بی‌هوازی و هوازی مناسب هستند. برس های نمونه محافظت شده از 01/0 تا 001/0 میلی لیتر مواد جمع آوری می کنند.
* آسپیراسیون ترانس تراشیال از راه پوست (TTAs) با وارد کردن یک کاتتر پلاستیکی کوچک به داخل نای از طریق سوزنی که قبلاً از طریق پوست و غشای کریکوتیروئید وارد شده است، به دست می‌آید. اگرچه این تکنیک به ندرت مورد استفاده قرار می گیرد، بیهوازی ها، مانند اکتینومایسس و آنهایی که با پنومونی آسپیراسیون مرتبط هستند، می توانند از نمونه هایTTA جدا شوند.

**بيوپسی ريه باز:**

* تهاجمی ترین روش برای تهیه نمونه های دستگاه تنفسی بیوپسی باز ریه است. این روش که توسط جراحان انجام می شود، برای تهیه یک تکه از بافت ریه استفاده می شود.
* نمونه‌های بیوپسی برای تشخیص عفونت‌های ویروسی شدید، مانند ذات‌الریه هرپس سیمپلکس، تشخیص سریع پنومونی پنوموسیستیس و سایر پنومونی‌هایی که سخت قابل تشخیص هستند یا تهدیدکننده حیات هستند بسیار مفید هستند.
* اين روش علاوه بر تشخيص، در مواردی کاربرد دارد که از ساير روش های کمتر تهاجمی نتوان استفاده کرد (در بيماران مبتلا به پنومونی منتشر). مقايسه روش های تشخيصیVAP نشان داده که بهترين روش، کشت از بافت ريه است. برای نمونه بيوپسی هم مانند نمونه های برونوسکوپی بايد کشت کمی انجام شود.

**توراسنتز:**

* هنگامی که آمپیم پلور وجود دارد، توراسنتز (جمع آوری مایع پلور) ممکن است برای به دست آوردن مایع عفونی برای معاینه و کشت مستقیم استفاده شود. این یک نمونه عالی است که به طور دقیق باکتریولوژی یک ذات الریه مرتبط را منعکس می کند و می تواند علت پنومونی را مشخص کند.
* توراسنتز شامل برداشتن مایع جنب به وسیله سوزن یا لوله برای به دست آوردن نمونه مایع جنبی انجام می شود. نمونه های مایع جنب برای کشت باید مستقیماً در یک سرنگ استریل آسپیره شود. هرگونه هوای اضافی باید سریعاً از این سرنگ خارج شود تا شرایط را برای باکتری های بیهوازی فراهم کند. اگر بار اول هیچ ماده ای وارد سرنگ نشده باشد، 3 میلی لیتر سالین استریل می تواند تزریق شود و بعد توسط سرنگ برداشته شود.

**پردازش نمونه های تنفسی تحتانی**

آناليز میکروبی نمونه های تنفسی تحتانی شامل: بررسی ميکروسکوپی، کشت (کمی و نیمه کمی)، استفاده از روش های سريع تعيين آنتی ژن و روش های ملکولی مانند PCR است. در جدول 9 شرایط لازم برای شرایط لازم برای نمونه های مربوط به پنومونی آمده است.

جدول 9. شرایط لازم برای نمونه های مربوط به پنومونی.

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| نمونه | ظرف | دستورالعمل ویژه | انتقال به آزمایشگاه | نگهداری قبل از انجام فرایند | بررسی مستقیم | محیط کشت | توضیحات |
| BAL  BB  BW  آسپیره اندوتراکئال | ظرف در پیج دار استريل | كشت بي هوازي تنها در صورت استفاده از كاتتر محافظت شده مناسب است. | 2 ساعت یا کمتر در دماي اتاق | کمتر از 24 ساعت در دماي 4 درجه | لام گرم و ساير تست هاي خاص درصورت در خواست (به عنوان مثال DFA لژیونلا و اسيد فاست) | بلادآگار، شکلات آگار و مک کانکی تايوگليکولات برای آسپیره و نمونه های بیوپسی و تهاجمی | موارد دیگر: کشت شمارشی  AFB ، لژیونلا، نوکاردیا، مایکوپلاسما، پنوموسیستس،  سایتومگالوویروس |
| خلط | ظرف در پیج دار استريل | نمونه باید از سرفه های عمیق جمع شود و از نظر مناسب بودن برای کشت با رنگ آمیزی گرم بررسی شود. | 2 ساعت یا کمتر در دماي اتاق | کمتر از 24 ساعت در دماي 4 درجه | لام گرم و ساير سويه هاي خاص درصورت در خواست (به عنوان مثال لژیونلا DFA و اسيد فاست) | بلادآگار، شکلات آگار و مک کانکی | موارد دیگر: AFB و نوکاردیا |

**بررسی مستقیم نمونه (میکروسکوپی و PCR)**

* بر خلاف نمونه تنفسی فوقانی، رنگ آمیزی نمونه های تنفسی تحتانی مفید است و باید با نتایج کشت مقایسه شود تا خطاها در روش ها، جمع آوری نمونه و حمل و نقل یا شناسایی اولیه آشکار شود.
* برای ارزیابی و شناسایی باکتری ها و مخمرها، نمونه باید ثابت و رنگ آمیزی شود.
* یکی از مهمترین کاربردهای رنگ آمیزی گرم، ارزیابی کیفیت خلط دریافتی برای کشت معمول باکتریولوژیک است که کامل صحبت شد و نمونه هایی که عمدتاً حاوی مواد دستگاه تنفسی فوقانی هستند باید رد شوند.

**فسير و گزارش رنگ آميزی گرم:**

طبق مطالب قبلی شمارش سلول ها (گلبول های سفید، گلبول های قرمز و سلول های اپیتلیال سنگفرشی) با بررسی 10 تا 20 ميدان در بزرگنمایی 100Lpf) یا عدسی 10) و ارگانیسم ها با بررسی میانگین 20 تا 40 ميدان در عدسی روغنی به صورت کمی یا نیمه کمی طبق جدول 10 گزارش می شوند:

جدول 10. گزارش کمی یا نیمه کمی سلول ها (گلبول های سفید، گلبول های قرمز و سلول های اپیتلیال) و ارگانیسم ها.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| گزارش | سلول ها | ارگانیسم ها |
| Many (Heavy) or +4 | تعداد 25 عدد یا بیشتر در عدسی کم قدرت (LPF) | تعداد بیشتر از 10 عدد در عدسی روغنی |
| Moderate or +3 | تعداد 10-24 عدد در عدسی کم قدرت (LPF) | تعداد 6-10 عدد در عدسی روغنی |
| Few or +2 | تعداد 2-10 عدد در عدسی کم قدرت (LPF) | تعداد 3-5 عدد در عدسی روغنی |
| Rare or +1 | کمتر از 2عدد در عدسی کم قدرت (LPF) | کمتر از 10 عدد در کل لام مستقیم |
| None | بدون سلول | بدون ارگانیسم |

**بررسی و گزارش سلول ها**

1- اگر هيچ سلول اپیتليال سنگفرشی ديده نشد، گزارش کنيد:

No squamous epithelial cells were seen.

2- اگر فقط تعداد کمی از سلول های اپی تليال سنگفرشی يافت شود، گزارش کنيد:

Few squamous epithelial cells were seen.

3- اگر ميزان زيادی از سلول های اپی تليال سنگفرشی (بیشتر از 25 عدد در lpf) مشاهده شوند، و طبق عدد Q نمونه باید تکرار شود گزارش کنيد:

Many squamous epithelial cells (>25/lpf) were seen indicating oropharyngeal/saliva contamination. Submission of another specimen is recommended.

**نکته:** اين گزارش را فقط برای نمونه های خلط با سلول های اپیتليال بالا و بدون وجود ارگانيسم غالب و WBC استفاده کنيد. جدیداً برای نمونه های تراشه هم می توان کیفیت نمونه را با لام چک کرده و این گزارش را داد (در صورت وجود بیشتر از ده عدد سلول اپیتلیال نمونه نامناسب). موارد استثناء که نیاز به این بررسی ندارند قبلاً گفته شد.

4- اگر هیچWBC دیده نشد، گزارش کنید: No WBCs were seen.

در این حالت اگر سلول های اپیتليال به صورت غالب وجود داشته باشند طبق بحث قبلی چون احتمال نمونه گیری اشتباه بسیار زیاد هست نمونه باید تکرار شود و بررسی اسمیر از نظر ارگانیسمها ارزشی ندارد. گزارش بند 3 را می توان قید نمود.

**بررسی و گزارش ارگانیسم ها**

اگر نمونه محتوی WBC باشد و تعداد اپیتلیال کم باشد و کیفیت لام با معیار Q تأیید شود، می توان اسمير را با عدسی 100 برای ارگانیسمها بررسی کرد. بر مناطقی تمرکز کنيد که ميزان WBCبالاتر است و آلودگی با فلور ناحيه حلق-دهانی کمتر است.

**ارگانيسم غالب**: اگر يک ارگانيسم در نواحي با تعداد زياد WBC، غالب باشد، آن را گزارش کنيد. در این حالت ارگانيسم را شمارش کنید و به صورت نیمه کمی گزارش کنید: Rare، Few، Moderate و .Many برای مثال، اگر باسيل گرم منفی غالب است و به تعداد زیاد (بیشتر از 10 عدد در عدسی روغنی) وجود دارد گزارش کنيد:

Many Gram-negative bacilli as predominant organism were seen.

همچنين، اگر اشکال ديگری از باکتریها در اسمير حضور دارند این جمله را اضافه کنيد:

Mixed bacterial morphotypes also were existed.

**بدون ارگانيسم غالب**: اسميرهایی که ارگانيسم غالبی در نواحی با WBC زياد نشان نمی دهند و بيشتر از يک نوع ارگانيسم در منطقه وجود دارد، به صورت زیر گزارش می شود:

Mixed bacterial morphotypes were existed. No predominant organism were seen.

**بدون ارگانيسم**: اسميرهایی که هيچ ارگانيسمی در آن ديده نمی شود به اين صورت گزارش شوند:

No organisms were seen.

* این گزارش ارگانیسمها را برای خلط و نمونه های دیگر سیستم تنفسی تحتانی می توان گزارش کرد.
* از نتايج رنگ آميزی گرم برای ارزيابی پليت های کشت استفاده کنيد. برای مثال، اگر ديپلوکوک گرم مثبت در رنگ آميزی گرم غالب باشد، پليتهای کشت را با دقت برای استرپتوکوکوس پنومونيهبررسی کنيد. اگر ديپلوکوک گرم منفی در رنگ آميزی گرم غالب باشد، از نظر موراکسلا کاتاراليس بررسی نماييد.

**کشت**

* بیشتر عوامل رایج عفونت های دستگاه تنفسی تحتانی در محیط های معمولی شامل آگار خون گوسفندی 5 درصد (غالب باکتری ها)، مک کانکی آگار یا EMB (باسیل های گرم منفی) و آگار شکلاتی (هموفیلوس و نایسریا) جدا می شوند.
* به دلیل آلودگی میکروبیوتای طبیعی دهان، نمونه‌های خلط، نمونه‌های به‌دست‌آمده از شستشو و لاواژ برونش، آسپیراسیون تراشه و آسپیره‌های تراکئوستومی یا لوله تراشه نیازی به تلقیح به براث غنی‌کننده ندارند و به صورت بی‌هوازی کشت نمی‌شوند.
* فقط نمونه‌های به‌دست‌آمده از آسپیراسیون از راه پوست (از جمله آسپیراسیون اندوتراشه) و برس محافظ شده برونش برای کشت بی‌هوازی مناسب هستند و باید به محیط تیوگلیکولات غنی شده هم تلقیح شوند.
* پليت های نمونه هايی از خلط که حاوی سلول های اپیتليال فراوان است و ارگانيسم غالب وجود ندارد (نمره Q کمتر از 1+) اگر کشت شده اند دارای نتایج بی ارزشی هستند و باید درخواست نمونه و کشت مجدد شوند.
* برای موارد مشکوک به بیماری لژیونر، نمونه در محیط آگار بافر عصاره مخمر زغال چوب BCYE)) وBCYE انتخابی باید تلقیح شود. طبق مطالب گفته شده قبلی برای لژیونلا پلیت باید در چهار ربع با غلظت های رقیق شده کشت شوند تا مبنایی برای نیمه کمی سازی عینی برای تعیین میزان رشد فراهم شود.
* در کشت های معمول پس از 24 تا 48 ساعت انکوباسیون در دمای 35 درجه، تعداد و انواع کلنی ها بررسی می شود.
* برای کشت لژیونلا، کلنی ها روی آگار انتخابی پس از 3 تا 5 روز تشکیل می شوند.
* نمونه‌های خلط بیمارانی کهCF دارند باید به آگار انتخابی، مانند آگار کروموژنیک اختصاصی، برای بازیابی استافیلوکوکوس اورئوس و خون اسب انتخابی با باسیتراسین به صورت بی‌هوازی و هوازی، برای بازیابی هموفیلوس آنفلوانزا انکوبه شوند چون ممکن است این باکتری ها توسط سودوموناس موکوئیدی در محیط های معمولی پنهان شود. در این بیماران استفاده از یک محیط انتخابی برای بورخولدریا سپاسیا مانند آگارPC یاOFPBL نیز ضروری است. از آنجایی که این محیطها ممکن است به صورت معمول موجود نباشند کشت خطی دقیق بر روی محیط های بلاد و شکلات آگار برای جداسازی ایزوله های مختلف بسیار مهم است.

**انجام کشت کمی برای نمونه های براشينگ برونش، مايع BAL و بقیه نمونه های تنفسی**

* طبق رویکرد کمی برای تفسیر کشت در هریک از روش های نمونه گیری سیستم تنفسی تحتانی، باید یک مقدار آستانه ای از رشد باکتری وجود داشته باشد تا بتوان آن باکتری شناسایی شده را به عنوان عامل عفونت و افتراق با کلنيزاسيون گزارش کرد.
* مطالعات کشت های کمیBAL یا نمونه برس محافظت شده (PSB) نشان داده شده است که در روزهای اول بستری (5-4 روز اول) آسپيراسيون فلور نرمال اروفارنکس يا عفونت های اکتسابی از جامعه مانند هموفيلوس آنفلوانزا، استرپتوکوك پنومونیه، موراکسلا کاتاراليس و ويروس ها بیشترین درصد را داشته اند درحالی که در بيماران بستری برای طولانی مدت و يا تحت درمان با آنتی بيوتيک ها، استافیلوکوک آرئوس و باسيل های گرم منفی از عوامل شايع ايجاد بيماری هستند.
* عفونت های سودومونايی، آسينتوباکتر يا بيماریزاهای مقاوم به آنتی بيوتيک ها در بيمارانVAP يا تحت درمان با آنتی بیوتیک های وسيع الطيف شيوع بيشتری دارند و در اين بيماران 50-20 درصد عفونت ها، چند ميکروبی هستند.
* دو روش کمی برای شمارش تعداد باکتری ها در نمونه های حاصل از دستگاه تنفسی تحتانی شرح داده شده است:

**1- روش رقيق سازی**

ابتدا نمونه را به مدت 1 دقیقه ورتکس کرده و سپس مقدار ml 1/0 از آن را به طور مستقیم بر روی محیط های کشت لازم (بلاد آگار، شکلات آگار و مک کانکی آگار) کشت می دهیم (رقت 10/1). سپس از نمونه رقت های متوالی تهیه می شود. به این ترتیب که مقدار ml 1/0 از مایع لاواژ در ml 9/9 نرمال سالین استریل ریخته (رقت 100/1) و سپس این مرحله را یک بار دیگر تکرار می کنیم تا رقت 1000/1 به دست آید. سپس از هر کدام از رقت ها مقدار ml 1/0 روی محیط ها کشت داده می شود. اگر رشد مشاهده شد، تعداد کلنی را محاسبه کنيد.

تعداد نهایی کلنی در یک میلی لیتر از نمونه عبارت از: تعداد کلنی به دست آمده عکس ضریب رقت عکس ضریب مقدار تلقیح شده (10). برای مثال اگر 100 کلنی باکتری با غلظت 100/1 رشد کرده باشد تعداد نهایی کلنی طبق فرمول عدد زیر خواهد بود:

**2- استفاده از لوپ کاليبره**

به جای تهيه رقت، بعضی آزمايشگاه ها از لوپ های کاليبره استفاده می کنند (مانند کشت ادرار). برای تلقيح نمونه در سطح پليت ها از يک لوپ کاليبره یک دهم و یک صدم میلی لیتر به صورت مجزا استفاده می شود. سپس کشت به صورت خطی 4 ناحیه ای به انجام می رسد.

* مقدار 5 میلی لیتر از نمونه BAL برای بررسی های ميکروبيولوژيکی و سلولی کفايت می کند.
* برس براشينگ برونش (PSB) حاوی نمونه را در یک میلی لیتر سرم فيزيولوژی قرار دهيد و سپس لوله را ورتکس کنيد تا مواد از برس به طور کامل جدا شوند و به صورت سوسپانسيون درآيند و سپس روی محیط های لازم با یکی از روش های کمی که توضیح داده شد کشت دهید. خود برس را هم به صورت استريل به وسيله يک پنس استريل در سطح پليت BA بغلتانيد و سپس آن را در لبه پليت آگار قراردهيد.
* وقتی يک نمونهBAL و PSB‌ به آزمايشگاه ارسال می شود، رنگ آميزی و کشت بايد براساس نوع درخواست انجام شود (به عنوان مثال: باکتری، قارچ، مايکوباکتريوم يا پنوموسيستيس کارينی يا ويروس ها). کشت روی محيط اختصاصی لژيونلا، مخمر، قارچ يا مايکوباکتريوم براساس درخواست پزشک يا شرح حال بيمار است. اگر بيمار دچار نقص ايمنی باشد، بايد تمام عوامل گفته شده در بالا را جستجو کرد.
* ممکن است استفاده از روش های تعيين آنتی ژن برای تشخيص بيماریزاهای اختصاصی مانند لژيونلا يا استرپتوکوکوس پنومونيه نتايج بهتری از کشت داشته باشد.
* کشت خلط و تراشه را می توان با لوپ کالیبره به صورت خطی کشت داد و آنها را نیز به صورت کمی گزارش کرد. این گزارش هم می تواند در راهنمایی پزشک در تشخیص احتمالی بین کلینیزاسیون و عفونت راهنما باشد هر چند که ارتباط کمتری نسبت به روش های برونوسکوپی در مورد این روشها موجود است.
* قبل از کشت خلط نمونه را کاملاً هموژن نمایید. سعی کنید در صورت وجود از قسمت موکوییدی و خونی کشت را با یک لوپ کالیبره به انجام برسانید.
* برای کشت تراشه می توان از روش رولینگ یا مالش چرخشی بر روی محیط های کشت استفاده کنید. در این حالت لوله تراشه ارسالی را با پنس استریل بگیرید و بر روی محیط های کشت در قسمت A بچرخانید و سپس با کمک لوپ استریل کشت خطی را به انجام برسانید. این حالت باعث کشت ترشحات موجود در سطح خارجی لوله تراشه می شود. راهکار بهتر گرفتن لوله تراشه با یک پنس استریل و خالی کردن محتویات داخل لوله با ضربه زدن داخل ظرف استریل می باشد. سپس می توان از محتویات خارج شده با یک لوپ کالیبره کشت را به انجام رساند. این حالت استاندارد بهتری برای جداسازی و تشخیص عفونتهای احتمالی می دهد.
* اگر نمونه های تراشه یا خلط را به صورت کمی گزارش نمی کنید می توانید آنها را به صورت نیمه کمی که قبلاً شرح داده شد گزارش نمایید.

**انکوباسیون و بررسی کشت ها:**

* محيط های تلقیح شده را در CO2 در دمای C° 35 انکوبه نمایید. تایوگلیکولات و مک کانگی (یا EMB) بهCO2 نیاز ندارد.
* همه پليت ها را پس از 24 ساعت انکوباسيون بررسی کنيد. درصورتی که هيچ رشدی مشاهده نشد، پليت ها را مجدد انکوبه و پس از 24 ساعت مشاهده کنيد. بررسی حداقل تا 3 روز لازم است.
* برای کشت بیهوازی در صورت درخواست پزشک از محيط های اختصاصی مثل بلادآگار بیهوازی استفاده کنيد. درصورتی که بیهوازی ها در آسپيراسيون محتويات داخل نای رشد کردند، با پزشک برای لزوم شناسايی کامل آن مشورت کنيد.
* محيط تایوگلیکولات استفاده شده برای نمونه های تهاجمی را روزانه تا 5 روز بررسی کنيد: اگر محيط شفاف باشد، نشان می دهد که هيچ رشدی وجود ندارد و می توان آن را دور انداخت. درصورت شک به ارگانيسم های سخت رشد و ديررشد، مدت زمان انکوباسيون را طولانی تر کنيد. اگر ظاهر محيط مايع کدر باشد، يک اسمير گرم از مايع تهيه و مشاهده کنيد: اگر ارگانيسم ها در اسمير گرم مشاهده شوند، آن را با رشد پليت ها مقايسه کنيد. اگر ارگانيسم های ديده شده در رنگ آميزی گرم متفاوت از کلنی های رشد يافته در روی پليتها باشد، محيط مايع را روی محيط های جامد قبلی و فنيل اتيل الکل آگار (در صورت وجود و احتمال حضور پروتئوس) کشت مجدد دهيد.
* اگر سلول های مخمر دیده شد بر روی محیط SDA (حاوی کلرامفنيکل) هم کشت دهید.
* در صورت عدم رشد در محیط های جامد اولیه و مثبت شدن کشت مجدد از روی محیط تایو چون غنی سازی اتفاق افتاده است نمی توان گزارش کمی را انجام داد. در این حالت باید فقط باکتری و آنتی بیوگرام بدون کانت گزارش شود. می توان کامنت زیر را در این حالت گزارش کرد که تأکیدکننده این موضوع است:

Because the bacterial growth was obtained from the enrichment medium in which the number of bacteria increased compared to the original sample, the colony count of the original sample is not reportable.

**تفسیر کمی کشت های تنفسی:**

* طبق مدل ارتباط تعداد باکتری با عفونت، نمونه خلط خارج شده و همچنین نمونه تراشه برای اینکه عفونت محسوب شود نیازمند حضور حداقل تعداد /CFU 106 باکتری و در روش های برونکوسکوپی /CFU 103 می باشد.
* ارتباط معنی داری بین ذات الریه حاد باکتریایی و حضور بیش از 103 تا 104 کلونی باکتری در هر میلی لیتر مایعBAL موجود است.
* در نمونه برس برونشیال با کاتتر محافظت شده تعداد کلنی حداقل 1000 ارگانیسم در یک میلی لیتر از محیط براث که توسط لوپ یک صدم کشت شده است (یاCFU/mL 106 در نمونه اصلی) با عفونت در ارتباط است.
* معيار باکتريولوژی بيوپسی ريه باز، شامل رشد بيشتر از 103 باکتری به ازای هر گرم بافت ريه است.
* این کمیت ها برای باکتری هایی مثل مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، لژیونلا، قارچ های اندمیک و عوامل بیوتروریسم مثل فرانسیسلا به کار گرفته نمی شوند زیرا این باکتری ها در هر غلظتی که ایزوله شوند (جدا شدن حتی یک کلونی)، بیماریزا در نظر گرفته می شوند.

**تفسير نتايج کشت نمونه های مجاری تنفسی تحتانی**

**الف) نمونه های خلط و تراشه**

ارگانيسم غالبی را که در اسمير گرم مشاهده شده است در صورت رشد روی محيط کشت اگر فلور نرمال قسمت حلقی-دهانی نباشد شناسایی و تست حساسيت آنتی بيوتيکي را انجام دهيد. کشت فاقد ارگانيسم غالب را به صورت زیر گزارش کنيد و شناسايی بيشتر لازم نيست: Growth of Mixed bacterial morphotypes with no predominant organism.

**ب) شستشوی برونش ها، براشينگ برونش ها، نمونه های بيوپسي برونش ها، مايع BAL، آسپيراسيون ريه و مواد داخل نای و نمونه های بيوپسی ريه**

* همه ايزوله هايی که در شرايط هوازی رشد کرده اند بجز فلور نرمال را با هر تعداد شناسایی و آنتی بیوگرام کنيد. برای آسپيراسيون ريه و نمونه های بيوپسی، باکتری های بیهوازی را نیز شناسايی کنيد.
* در صورتی که فلور نرمال قسمت حلقی دهانی از نمونه جدا شد، نتيجه رشد را به این صورت گزارش کنيد:

Growth of Normal Oropharyngeal organisms.

* نمونه بیوپسی بافت ریه و برس براشینگ محافظت شده چون فاقد نرمال فلور هستند هر ارگانیسمی حتی اگر جزو نرمال فلور باشد باید شناسایی و آنتی بیوگرام شوند.

**1- رشد گونه های استرپتوکوکوس**

**- استرپتوکوكهای آلفا هموليتيک:**

در صورت رشد استرپتوکوك آلفا هموليتيک، بايد برای تأیید وجود يا نبود استرپتوکوك پنومونیه آزمايش های تشخيصی انجام شود.

درصورتی که استرپتوکوك پنومونیه جدا نشد، گزارش کنید:

Growth of normal microbiota alpha-hemolytic *Streptococci*.

**- استرپتوکوك های بتاهموليتيک:**

اگر کلنی های مشکوك به استرپتوکوك های بتاهموليتيک به صورت مخلوط با ميکروارگانيسم های ديگر يا ميزان رشد کم باشد، ابتدا روی يک پليت BAکشت مجدد دهيد و در قسمت اوليه تلقيح به وسيله لوپ پليت را به منظور مشاهده هموليز حساس به اکسيژن Stab نماييد و یک دیسک باسیتراسین و یک دیسک کوتریموکسازول را در ناحیه A قرار دهید. BA را برای 24-18 در C° 35 قراردهيد. همچنين می توانيد BA را به صورت بیهوازی برای افزايش هموليز انکوبه کنيد. اگر نتيجه تست برای استرپتوکوك گروه A مثبت باشد، ارگانيسم را به اين صورت گزارش کنيد:

Group A *Streptococcus* (*Streptococcus pyogenes*) Isolated.

اگر در کشت اوليه رشد غالب و زیاد از استرپتوکوك های بتاهموليتيک وجود دارد، برای تشخيص استرپتوکوك های بتاهموليتيک به جدول های تشخيصی قبلی مراجعه شود. اگر تست های شناسايی بيشتری برای شناسايی استرپتوکوك های بتاهموليتيک ديگر (غير از گروه (A لازم است، بايد تست سروتايپينگ برای گروه های C، F و G انجام گيرد.

**2- گونه های هموفيلوس:**

اگر باسيل گرم منفی مشابه گونه های هموفيلوس به عنوان ارگانيسم غالب در کشت رشد کرده باشد تست های تشخيصی تکمیلی را انجام دهید. اگر کشت خالص نبود ابتدا آن را روی يک محیط شکلات آگار با کشت خطی جداسازی کنید.

**3- گونه های نايسريا و موراکسلا:**

اگر رشد غالبی از گونه های نايسريا يا موراکسلا ديده شود يا اگر ديپلوکوک های گرم منفی در رنگ آميزی گرم غالب باشند، از جدول های تشخيصی برای شناسايی باکتری استفاده کنيد.

**4- برای ساير ارگانيسم های گرم منفی** به غير از نايسريا، موراکسلا و هموفيلوس عملکرد طبق جدول 11 خواهد بود.

اگر باسيل گرم منفی غالب در رنگ آميزی گرم با WBC همراه باشد و فقط يک نوع کلنی در کشت جدا شده يا يک نوع کلنی در کشت غالب باشد، آن را شناسايی کنيد و تست حساسيت آنتی بيوتيکی را انجام دهيد. اگر بيشتر از دو نوع کلنی از باسيل های گرم منفی جدا شود و هيچ کدام غالب نباشد احتمال کلنیزاسیون و نه عفونت زیاد است و باید به صورت زیر گزارش شود:

Growth of multiple species (>2 types) of gram-negative bacilli with no predominant organism.

در اینجا می توان به جواب توصیه به تکرار نمونه یا استفاده از روش های برونوسکوپی را اضافه کرد:

**Comment**: There is possibility of colonization. Sample repeating or its collection by bronchoscopic methods are recommended.

جدول 11. اقدامات لازم در صورت رشد ارگانيسم های گرم منفی به غير از نايسريا، موراکسلا و هموفيلوس.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| عمل | میکروبیوتای طبیعی | کلنی ها | تعداد انواع کلنی |
| ID و AST | تعداد کمی یا اصلاً وجود ندارد، یا اگر باسیل گرم منفی در رنگ آمیزی گرم غالب باشد | نادر تا چند عدد | 1-2 |
| ID و AST فقط در صورت درخواست پزشک | متوسط تا فراوان |  |  |
| ID و AST | حاضر یا غایب | متوسط تا فراوان | 1-2 |
| ID و AST فقط در صورت درخواست پزشک. گزارش:  Multiple (>2 types) species of gram-negative bacilli, No predominant organism Isolated. | حاضر یا غایب | کم تا فراوان | 2< |

**5- گونه هایاستافيلوکوکوساز خلط*:***

در صورت رشد گونه های استافیلوکوک اقدامات لازم طبق جدول 12 خواهد بود.

جدول 12. اقدامات لازم در صورت رشد گونه های استافیلوکوک.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| گزارش | عملکرد | میکروبیوتای طبیعی | نوع کلنی | تعداد کلنی ها |
| Growth of mixed normal Microbiota | نیاز نیست | متوسط تا زیاد | استافیلوکوک های کواگولاز منفی | هر تعداد |
| Growth of Coagulase-negative *Staphylococci* (CoNS) as normal Microbiota | ID | غایب تا کم | استافیلوکوک های کواگولاز منفی | متوسط تا زیاد و غالب |
| Growth of Moderate/Many colonies of mixed normal microbiota and Few/rare *Staphylococcus aureus*. | نیاز نیست | متوسط تا زیاد | *S. aureus* | نادر تا کم |
| *S. aureus* | ID, AST | غایب تا کم یا کوکسی گرم مثبت غالب در لام گرم | *S. aureus* | نادر تا کم |
| *S. aureus* | ID, AST | حاضر یا غایب | *S. aureus* | متوسط تا زیاد و غالب |

**6- مخمرها:**

* اگر رشد بسيار کم (Rare)تا رشد متوسط (Moderate) از سلول های مخمر و رشد متوسط تا بسيار زياد (Abundant/Heavy) از باکتریهای فلور نرمال وجود داشته باشد، به عنوان فلور نرمال گزارش کنيد:

Growth of Normal microbiota.

* اگر رشد کم تا متوسط از سلول های مخمر وجود داشته باشد، اما هيچ فلور نرمالی رشد نکرده باشد يا رشد آن کم باشد يا اگر سلول های مخمر به صورت غالب در رنگ آميزی گرم و کشت مشاهده شوند، مخمر را شناسايی و گزارش کنید.
* اگر تعداد زياد يا رشد غالب از سلول های مخمر وجود داشته باشد، مخمر را شناسايی و گزارش کنيد.

**7- کپکها:** درصورت جداشدن و رد احتمال آلودگی، بايد شناسايی و گزارش شوند.

**8- مايکوباکتريوم و نوکاردیا:**اگر ايزوله مشابه کلنی های مايکوباکتريوم يا نوکارديا باشد، آن را شناسايی و گزارش کنيد.

**(4) محدوديت ها و تداخلات:**

* در کشت های تنفسی به خصوص کشت خلط احتمال آلودگی نمونه در حین نمونه گیری با فلور طبیعی بیمار زیاد است و بنابراین در صورت رشد باکتری های فلور طبیعی و عدم رشد بیماریزاها و وجود علائم عفونت در بیمار بهتر است نمونه تکرار شود.
* استفاده از دیسک باسیتراسین در ناحیه اولیه تلقیح برای کشت گلو، حساسیت و ویژگی کشت و شناسایی را ممکن است کاهش دهد.
* گاهی اوقات هم رشد تعداد بسیار کمی از کلنی های بتا همولیتیک یا رشد بیش از حد سایر ارگانیسم ها تفسیر را دشوار می کند و گاهی فلور نرمال دستگاه تنفس تمایل دارد به شکل استرپتوکوکسی بتاهمولیتیک رشد کند به ویژه وقتی در حضور CO2 انکوبه شود. بنابراین استفاده از دیسک باسیتراسین و همولیز به عنوان تنها روش شناسایی توصیه نمی شود.
* معایب کشت گلو شامل زمان طولانی انکوباسیون (24 تا 48) ساعت برای تشکیل کلنی قابل مشاهده و وجود ارگانیسم های بتا همولیتیک دیگر غیربیماریزا برای شناسایی قطعی است. اگر تعداد کافی کلنی خالص برای شناسایی در دسترس نباشد، یک کشت مجدد ضروری است.

**(5) موارد رد و تکرار نمونه**

* 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).
* زمان انتقال نمونه بیشتر از زمان توصیه شده پس از جمع آوری تا انجام باشد، برای مثال بیشتر از 2 ساعت برای نمونه خلط.
* نمونه خلط با نمره Q صفر و کمتر نشانه کیفیت بد نمونه است و باید درخواست کشت مجدد شود. نمونه های حاوی بیش از 25 سلول اپیتلیال سنگفرشی حتی با وجود تعداد بسیار بالای نوتروفیل ها نباید کشت شوند.
* رد نمونه تراشه از بیماران بالغ شامل وجود بیش از 10 سلول اپیتلیال سنگفرشی در هر میدان کم توان یا عدم مشاهده ارگانیسم تحت لام با روغن است (1000×) است.
* برای رد نمونه BAL اگر بيشتر از 1% سلول ها حاوی سلول های اپیتلیال باشند، نمونه مناسبی نیست و بهتر است این مورد به پزشک اطلاع داده و با هماهنگی با ایشان نمونه رد و تکرار شود.

**(6) نتایج بحرانی:**

نتیجه مثبت اسمير اسيد فست و کشت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در نمونه هاي تنفسي در تمام گروه هاي سني جزو نتایج بحرانی می باشد. در صورتي كه از نمونه مجدد بيمار طي دو هفته دوباره باكتري جدا شود، ديگر به گزارش شفاهي يا فوري نيازي نيست.

**(7) مستندات و سوابق:**

* مستندات مربوط به نحوه نمونه گیری و کشت و تفسیر کشت های تنفسی باید در بخش موجود باشد.
* مستندات مربوط غربال گری نمونه های کشت های تنفسی و دلایل رد هر نمونه و نوع باکتری های رشد کرده اولیه (به صورت توصیفی و اولیه) باید در بخش موجود باشد.
* مستندات مربوط به گزارش نتایج بحرانی (اسید فست و کشت سل) باید در بخش موجود باشد.

**(8) 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.