**6. دستگاه گوارش**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **اسم آزمایشگاه:** | {{LabName}} | |
| **اسم سند:** | **دستورالعمل نمونه های دستگاه گوارش** | |
| **کد سند:** | D-006-0006 | |
| **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 گوارش بدن شامل نمونه گیری، حجم مورد نیاز، انتقال، نحوه کشت و تفسیر کشت ها می باشد.

**(2) تعاریف و اصطلاحات:**

**اسهال عفونی:** این شکل از اسهال در اثر مصرف غذا یا آب آلوده با میکروارگانیسم های پاتوژن و یا سموم آن ها ایجاد می شود که ممکن است بدون علامت باشد و یا اینکه به سمت یک بیماری تهدیدکننده حیات پیش رود.

اسهال عفونی به دو دسته التهابی و غیر التهابی تقسیم بندی می شود:

* اسهال غیر التهابی از شدت کمتری برخورداری بوده، و به صورت آبکی غیر خونی است، بیمار بدون تب بوده و درد شکمی شدیدی ندارد. در نمونه مدفوع نیز گلبول سفید یا خون مخفی وجود ندارد. این شکل از اسهال در اثر روتاویروس، نوروویروس، استافیلوکوک اروئوس، باسیلوس سرئوس، کلستریدیوم پرفرنجنز، کریپتوسپوریدیوم پاروم و ژیاردیا لامبلیا ایجاد می شود.
* اسهال های التهابی بیماری شدیدتری بوده که بیمار از اسهال خونی، درد شدید شکم و تب رنج می برد. همچنین در نمونه مدفوع تعداد زیادی از گلبول های سفید یافت می شود. اسهال های التهابی در اثر پاتوژن های مهاجم نظیر کمپیلوباکتر ژژونی، شیگلا، سالمونلا، کلستریدیوئیدس دیفیسیل، اشرشیاکلی تولید کننده سم و آنتاموبا هیستولیتیکا ایجاد می شود.

در جدول 1 پاتوژن های رایج درگیر در اسهال و خصوصیات هر کدام و در جدول 2 رایج ترین پاتوژن های غذائی و خصوصیات هر کدام به طور خلاصه آمده است.

جدول 1. پاتوژن های رایج درگیر در اسهال و خصوصیات هر کدام.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **عامل بیماری زا** | **التهاب مدفوع** | **مدفوع خونی** | **تهوع، استفراغ** | **تب** |
| کمپیلوباکتر | معمول | مثبت | مثبت | معمول |
| سالمونلا | معمول | مثبت | مثبت | معمول |
| شیگلا | معمول | مثبت | مثبت | معمول |
| اشریشیاکلی انتروهموراژیک | نادر | معمول | مثبت | غیرمعمول |
| کلستریدیوئیدس دیفیسیل | معمول | مثبت | منفی | مثبت |
| یرسینیا انتروکولیتیکا | مثبت | مثبت | مثبت | معمول |
| آنتاموبا هیستولیتیکا | متغیر | متغیر (معمولاً مثبت) | متغیر | مثبت |
| کریپتوسپوریدیوم | نادر | منفی | مثبت | متغیر |
| سیکلوسپورا | منفی | منفی | مثبت | متغیر |
| ژیاردیا لامبلیا | منفی | منفی | مثبت | منفی |
| ویروس ها | منفی | منفی | معمول | متغیر |

جدول 2. رایج ترین پاتوژن های غذائی و نکات هر کدام.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **ارگانیسم** | **توضیحات** | **علائم معمولی** | **غذاهای مرتبط** | **میانگین مدت زمان** | **متوسط دوره نهفتگی (ساعت)** |
| باسیلوس سرئوس | دو سم تولید می کند، یکی شکل استفراغ که باعث تهوع واستفراغ در عرض چند ساعت و یک فرم اسهال. مشترک تمام سال، جداسازی تعداد زیادی باکتری از غذاها و مدفوع بیمار | حالت تهوع، استفراغ، شکم گرفتگی، اسهال آبکی | برنج آب پز و سرخ شده، گوشت، سبزیجات | یک روز | 2-16 |
| ویبریو پارهمولیتیکوس | عدم وجود خون یا مخاط در مدفوع؛ در داخل بدن تولید انتروتوکسین؛ عدم تهاجم بافتی؛ کشت مدفوع استفاده از محیط TCBS توصیه می شود | درد، استفراغ، تب، اسهال آبکی | صدف | 3 روز | 6-72 |
| استافیلوکوکوس اورئوس | مکانیسم اثر انتروتوکسین از پیش ساخته شده در غذاها است. رایج در تابستان. الایزا یا تست انتروتوکسین | شروع ناگهانی تهوع، درد و استفراغ، اسهال نادر | سالاد تخم مرغ، گوشت،مرغ شیرینی | یک روز | 8 |
| کلستریدیوم پرفرنجنس | تولید انتروتوکسین در داخل بدن؛ برخلاف استافیلوکوکوس اورئوس برای بروز بیماری ارگانیسم های زنده باید بلعیده شوند. رایج در پاییز، زمستان، بهار | گرفتگی شکم، اسهال آبکی؛ استفراغ و تب غیر معمول | گوشت گاو، مرغ، آبگوشت، ماهی | یک روز | 8-22 |
| گونه های سالمونلا | WBC و RBC در مدفوع؛ رایج در زمستان | تب، گرفتگی شکم، اسهال،  استفراغ خفیف تب، درد شدید شکم، اسهال | تخم مرغ، لبنیات، مرغ، گوشت گاو | 3 روز | 12-48 |

**(3) شرح دستورالعمل:**

**تشخیص آزمایشگاهی پاتوژن های دستگاه گوارش**

**پذیرش نمونه:**

چون دانستن تاریخچه بیمار در بیماری های گوارشی در تشخیص بسیار کمک کننده است، برای پذیرش نمونه گوارشی مانند مدفوع در هنگام پذیرش باید فرمی به صورت جدول 3 وجود داشته باشد که سؤالات کلیدی زیر باید از بیمار پرسیده شوند:

جدول 3. نمون فرم پذیرش نمونه گوارشی مانند مدفوع.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **سوالات** | **بلی** | **خیر** |
| اخیراً سفر داشتید؟ |  |  |
| اگر مسافرت خانوادگی گروهی داشته اید، آیا بیماری گوارشی گروهی داشته اید؟ |  |  |
| شنا در استخر یا رودخانه داشته اید؟ |  |  |
| مصرف غذای بیرون داشته اید؟ |  |  |
| آیا علائم مرتبط با التهاب مثل تب، مدفوع خونی و احساس دفع مکرر دارید؟ |  |  |
| طول مدت علائم گوارشی شما چقدر است؟ | **مدت زمان:** | |
| آیا سابقه علائم قبلی دستگاه گوارش دارید؟ |  |  |
| آیا بیماری زمینه ای دارید؟ |  |  |
| آیا داروی خاصی مصرف می کنید؟ (نام دارو) |  |  |
| سابقه اخیر مصرف آنتی بیوتیک دارید؟ |  |  |

**جمع آوري نمونه**

* نمونه گیري مدفوع بهتر است در مراحل اولیه بیماری روده اي (حداکثر در 2 تا 3 روز اول) که عامل بیماري زا به تعداد بیشتري در مدفوع وجود دارد و قبل از شروع درمان آنتی بیوتیکی انجام شود.
* سه نوع نمونه مدفوعی موجود است:

الف( نمونه مدفوع، ب) سوآب مدفوع، ج) سوآب مقعدي

**الف( نمونه مدفوع:**

* نمونه مدفوع باید در ظرف پلاستیکی تمیز (نیاز به استریل بودن نیست)، دهان گشاد با درپوش محکم و فاقد نشتی که بدون مواد نگهدارنده، شوینده، یون هاي فلزي یا کاغذ توالت باشد جمع آوري شود.
* نمونه مدفوع نباید با ادرار مخلوط شده باشد.
* حداقل یک گرم مدفوع با قوام طبیعی (به اندازه یک فندق) یا 2 میلی لیتر مدفوع اسهالی جهت کشت مورد نیاز است.
* هنگامی که نمونه مدفوع به آزمایشگاه می رسد باید در مدت 30 دقیقه و حداکثر 2 ساعت بعد از نمونه گیري مورد آزمایش و کشت قرار گیرد، به خصوص براي جداسازي شیگلا که بسیار حساس است. نمونه هایی را که نمی توان به فاصله 2 ساعت از نمونه گیري کشت داد، باید در محیط انتقالی قرار داد و بلافاصله در یخچال گذاشت. در این صورت نیاز به تهیه سوآب مدفوع می باشد.

**ب) سوآب مدفوع:**

* براي قرار دادن نمونه مدفوع در محیط انتقالی، سوآبی را درون نمونه مدفوع قرار داده و پس از حرکت چرخشی، مقدار کمی از آن را بردارید.
* در صورت مشاهده موکوس و خون در مدفوع باید با سوآب از آنها نیز نمونه گرفت.
* سوآب را بلافاصله به ته لوله محیط انتقالی وارد کنید و اضافی چوب را بشکنید و دور بیندازید تا درپیچ لوله بسته شود.
* در صورت عدم ارسال سریع، لوله را بلافاصله در یخچال قرار دهید. در صورت عدم دسترسی به یخچال آن را در مکانی خنک و دور از نور جهت پایین نگه داشتن دما قرار دهید.

**ج) سوآب مقعدي:**

* در بعضی موارد استفاده از سوآب مقعدي به جاي نمونه مدفوع ضروري است، مخصوصاً در نوزدان یا افراد مسن ناتوان.
* از آنجائیکه بعضی سویه هاي شیگلا به سرما و خشکی حساسند، همچنین مخاط تحتانی روده را مورد هجوم قرار می دهند، سوآب مقعدي در جداسازي این میکروارگانیسم مناسب تر می باشد.

**انتقال نمونه**

* نمونه های مدفوع باید مدت کوتاهی پس از جمع آوری به آزمایشگاه منتقل شوند و در صورت امکان از نگهداری در یخچال خودداری شود.
* در صورت دستور کشت باکتری باید از مواد نگهدارنده اجتناب شود. با این حال، اگر مدفوع باید از نظر تخمک و انگل بررسی شود، باید در محیط های حاوی مواد نگهدارنده مانند پلی وینیل الکل یا فرمالین حمل شود.
* اگر قرار است سواب های رکتوم پردازش شوند، باید از محیط کری-بلیر یا محیط انتقال مشابه استفاده شود. محیط انتقال کري-بلر، محیط انتقال مناسب براي بسیاري از عوامل بیماري زاي روده اي از جمله شیگلا، سالمونلا، ویبریو کلرا، یرسینیا انتروکولیتیکا و کمپیلوباکتر می باشد، البته این محیط توانایی زنده نگه داشتن شیگلا را به خوبی محیط بافر گلیسرول سالین حفظ نمی کند.

**کشت نمونه**

**1. محیط هاي مایع مغذي:**

* این محیطها برای بازیابی مقادیر کم سالمونلا، شیگلا، ویبریو یا کمپیلوباکتر در افراد بدون علامت یا ناقل عامل بیماري و به ویژه در میان کارکنان داراي مشاغل حساس (افراد شاغل در مهد کودك، آشپزخانه ها و...) به کار می روند و رایج ترین آنهاSF براث وGN براث، آب پپتون قلیایی و کمپی-تیوگلیکولات می باشند.
* محیط SF براث، براي برخی از گونه هاي شیگلا داراي اثر مهارکنندگی بوده، لذا بهتر است در موارد مشکوك به جداسازي شیگلا از این محیط استفاده نشود و استفاده ازGN براث به دلیل خاصیت مهارکنندگی کمتر براي گونه هاي سخت رشد شیگلا ارجحیت دارد. هنگام ساخت محیطSF براث، حرارت دادن بیش از اندازه باعث ایجاد ذراتی در محیط می شود که در این صورت نمی توان از آن استفاده کرد. همچنین عملکرد محیطSF براث در شرایط بیهوازي بهتر می باشد. بنابراین مقدار محیط در لوله باید به اندازه اي باشد که حداقل 5 سانتی متر عمق ایجاد شود.
* براث غنی‌کننده کمپی-تیوگلیکولات بازده کشت‌ مثبت را برای کمپیلوباکتر افزایش می‌دهد، اگرچه برای استفاده معمول لازم نیست.
* آب پپتون قلیایی با %1 NaCL (pH: 5/8) نیز محیط غنی کننده ویبریوها می باشد.
* آزمایشگاه ها استفاده از روش غنی سازی با محیط های مایع را کاهش داده اند.

**2. محیط هاي جامد:** نمونه مدفوع باید در یک محیط حمایتی عمومی، یک محیط کمی انتخابی و افتراقی و یک محیط انتخابی کشت شود.

**محیط حمایتی عمومی:**

* محیط بلاد آگار (سویا آگار تریپتیک با 5 درصد خون گوسفند) یک محیط حمایتی عمومی عالی است. این محیط امکان رشد گونه های مخمر، استافیلوکوک ها و باسیل های گرم منفی را می دهد.
* عدم وجود میکروبیوتای مدفوع گرم منفی طبیعی یا وجود مقادیر قابل توجهی از ارگانیسم هایی مانند استافیلوکوکوس اورئوس، مخمرها و سودوموناس آئروژینوزا را می توان در این محیط ارزیابی کرد. همچنین از این محیط باید برای آزمایش اکسیداز استفاده کرد.
* کلنی های رشد کرده در ربع سوم یا چهارم کشت خطی محیط بلاد آگار باید به طور معمول برای تولید سیتوکروم اکسیداز غربال گری شوند. اگر تعداد زیادی کلنی اکسیداز مثبت وجود دارد باید به آئروموناس، ویبریو یا پلزیوموناس مشکوک شد و تست های شناسایی را برای آنها انجام داد.

**محیط کمی انتخابی-افتراقی:**

* این محیط باید از رشد بیشتر انتروباکترال ها، ویبریوها و سایر پاتوژن های احتمالی حمایت کند مثل مک کانکی یا ائوزین-متیلن بلو EMB)). تمام کلنی های لاکتوز منفی در این محیطها باید بیشتر مورد آزمایش قرار گیرند تا از تشخیص کافی ویبریوها و انتروباکترال های بیماریزا (سالمونلا، شیگلا، ادواردسیلا) اطمینان حاصل شود.

**محیط های انتخابی:**

* براي کشت روتین مدفوع، جهت جداسازي بیماریزاهاي روده اي باید از محیطهاي افتراقی و انتخابی استفاده شود.
* یک محیط افتراقی با میزان انتخابی بودن متوسط مانند گزیلوز-لایزین دکربوکسیلاز (XLD) یا هکتون انتریک آگار(HE) براي جداسازي سالمونلا و شیگلا باید استفاده شود.
* محیطXLD چون میزان مهارکنندگی کمتري دارد، براي جداسازي شیگلا مناسب تر از محیطHE می باشد.
* استفاده از آگارهاي انتخابی اضافه تر و براث هاي مغذي، بر حسب علائم بیماري و نوع درخواست پزشک متفاوت است. مثلاً پیشنهاد می شود براي جداسازي *E.coli* O157: H7 از محیط سوربیتول مک کانکی آگار (SMAC) استفاده شود. این محیط فقط باید براي نمونه هاي مدفوع حاوي خون و یا در صورت درخواست پزشک استفاده شود چون در کشت روتین مدفوع مقرون به صرفه نبوده و حضور آن نادر است.

**محیط کمپیلوباکتر:**

* کشت های جداسازی کمپیلوباکتر ژژونی و کمپیلوباکتر کولی باید به ترکیبی از حداقل دو آگار انتخابی حاوی عوامل ضد میکروبی که رشد میکروبیوتای طبیعی را سرکوب می کنند تلقیح شوند.
* محیط هایی که به صورت تجاری در دسترس هستند شامل زغال چوب سفوپرازون دئوکسی کولات آگار (CCDA)، محیط انتخابی مبتنی بر زغال چوب (CSm)، محیط کمپی حاوی خون (CAMPY-BA)، محیط Skirrow و Campy-CVA (سفوپرازون، وانکومایسین، آمفوتریسین) هستند. این پلیت ها در اتمسفر میکروآئروفیل در دمای 42 درجه سانتی گراد انکوبه می شوند و در 24 و 48 ساعت از نظر کلنی های مشکوک بررسی می شوند.

**CIN آگار:** برای تشخیص یرسینیا انتروکولیتیکا و بیشتر گونه های آئروموناس استفاده می شود. کلنی یرسینیا رشد کرده روی این محیط اکسیداز منفی و آئروموناس اکسیداز مثبت است.

**محیط تیوسولفات-سیترات-بایل-ساکارز آگار (TCBS)**: برای جداسازی ویبریوها به کار گرفته می شود.

**محیط سیکلوسرین-سفوکسیتین-فروکتوز آگار (CCFA):** در صورت درخواست کشت برای باکتری کلستریدیوئیدس دیفیسیل و امکان کشت بیهوازی لازم است. این باکتری در این محیط به دلیل تخمیر فروکتوز زرد است.

* همه نمونه های مدفوع باید به شکل روتین برای سالمونلا، شیگلا و کمپیلوباکتر مورد بررسی قرار گیرند. بسیاری از آزمایشگاهها برای *E.coli* O 157: H7 هم بررسی و تست انجام می دهند و برخی به خصوص مناطق دریایی از محیط CIN آگار استفاده می کنند (بسته به میزان شیوع منطقه).
* بنابراین کشت نمونه های اسهالی روی XLD یا HE، بلادآگار، مک کانکی و CAMPY-BA ضروری است و کشت روی محیط SMAC، TCBS، CCFA و CINA بستگی به میزان شیوع و منطقه جغرافیایی و شک و درخواست پزشک برای باکتری ها دارد.
* طبق توصیه آزمایشگاه مرجع سلامت ایران کشت مدفوع غیراسهالی بر روی XLD یا HE و مک کانکی باید به انجام برسد.
* در جدول 4 محیط کشت های معمول مورد استفاده و خصوصیات آنها برای جداسازی باکتری های عامل عفونت گوارشی و اسهال آمده است.

جدول4. محیط کشت های معمول و خصوصیات آنها برای جداسازی باکتری های عامل عفونت گوارشی و اسهال.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| جدول **محیط کشت** | **هدف** | **فلور روده بزرگ** | **عوامل بیماری زا** |
| مک کانکی آگار | برای بازیابی انتروباکتریاسه ولی سایر باسیل‌های گرم منفی غیرسخت هم رشد، ارگانیسم های گرم مثبت و برخی باسیل های گرم منفی سختگیر را مهار می کند. | تخمیرکننده های لاکتوز مانند اشریشیاکلی، کلبسیلا، انتروباکتر، و سیتروباکتر، صورتی تا قرمز تیره به نظر می رسند. تخمیرکننده‌های کند لاکتوز مانند سیتروباکتر، سراشیا، و گونه‌های هافنیا در 24 ساعت بی‌رنگ ظاهر می‌شوند و بعد از 24-48 ساعت کمی صورتی؛ تخمیر کننده های غیر لاکتوزمانند  سیتروباکتر، پروتئوس، پروویدنسیا و  مورگانلا شفاف و بی رنگ. | سالمونلا، شیگلا، ادواردسیلا شفاف و بی رنگ به نظر می رسند |
| آگار هکتون انتریک (HE) | محیط انتخابی برای بازیابی در درجه اول سالمونلا و گونه شیگلا. فلور معمولی روده بزرگ را مهار می کند. حاوی شاخص هایی برای تشخیص تولید سولفید هیدروژن (H2S) است | تخمیرکننده های لاکتوز، مانند اشریشیاکلی، اندکی مهار می شوند و به رنگ نارنجی تا صورتی به نظر می رسند. پروتئوس اندکی مهار می شوند؛ کلنی های کوچک و شفاف با مرکز سیاه ممکن است ظاهر شوند. | گونه های سالمونلا به دلیل تولید H2S سبز تا سبز آبی با مرکز سیاه به نظر می رسد. شیگلا سبز بدون مراکز سیاه به نظر می رسند زیرا H2S تولید نمی کنند |
| Xylose lysine  deoxycholate (XLD)  agar | محیط افتراقی و انتخابی برای جداسازی گونه های سالمونلا و شیگلا از مدفوع؛ اکثر فلور روده بزرگ و اکثر باکتری های گرم مثبت را مهار می کند. گونه های خاص شیگلا (مثل دیسانتری و فلکسنری) ممکن است اندکی مهار شوند. | انتروباکتریاسه‌هایی که ممکن است کاملاً مهار نشوند، مانند پروتئوس ولگاریس، زرد (از ساکارز) با مراکز سیاه به نظر می‌رسند. سیتروباکتر فروندی که H2S تولید می کند، به دلیل ناتوانی در دکربوکسیله کردن لیزین، زرد با مراکز سیاه به نظر می رسد. سایر فلورهای روده ای که ممکن است رشد کنند، یک یا همه کربوهیدرات های موجود در این محیط را تخمیر می کنند و منجر به ایجاد کلنی های زرد می شوند. | گونه های سالمونلا به دلیل تولید H2S قرمز با مراکز سیاه به نظر می رسد. سالمونلا لاکتوز یا ساکارز را تخمیر نمی‌کند، اما زایلوز را تخمیر می‌کند، که در کربوکسیله‌کردن لیزین برای برگرداندن pH اسیدی (زرد ناشی از تخمیر ساکارز) به pH قلیایی (قرمز ناشی از دکربوکسیلاسیون لیزین) ضروری است.  شیگلا هیچ یک از این کربوهیدرات ها را تخمیر نمیکند و قرمز یا شفاف به نظر می رسد. |
| کمپیلوباکتر آگار خوندار (CAMPY-BA) | محیط غنی سازی انتخابی در درجه اول برای جداسازی گونه های کمپیلوباکتر از مدفوع |  | کمپیلوباکتر ژژونی زمانی که در دمای 42 درجه سانتیگراد انکوبه شود خاکستری مایل به صورتی و مرطوب است. |
| سفولودینایرگاسان نووبیوسین (CIN) | محیط انتخابی در درجه اول برای جداسازی و بازیابی گونه های یرسینیا انتروکولیتیکا و آئروموناس. پلزیوموناس شیگلوئیدس نیز ممکن است بازیابی شود. اکثر کوکسی های گرم مثبت به جز انتروکوک ها و اکثر باسیل های گرم منفی به ویژه انتروباکتریاسه را مهار می کند. | به جز سودوموناس آئروژینوزا، سیتروباکتر و سراشیا، اکثر فلور روده بزرگ مهار می شوند. | یرسینیا انتروکولیتیکا کلنی هایی شبیه چشم گاو نر تولید می کند، مرکز قرمز است و حاشیه بی رنگ به نظر می رسد. گونه هایی از آئروموناس هم مانند یرسینیا مانیتول را تخمیر می کنند اما پلزیوموناس شیگلوئیدس منفی است. |
| تیوسولفات-سیترات-بایل-ساکارز آگار (TCBS) | محیط بسیار انتخابی برای ویبریو، از جمله ویبریو کلرا، از مدفوع و غذا. بیشتر فلور روده بزرگ را به دلیل pH بالا و محتوای بالای نمک های صفراوی مهار می کند. آئروموناس ممکن است از این محیط بازیابی شود | مهارکننده اکثر فلورهای روده بزرگ، به جز ایزوله های سودوموناس گاه به گاه، که ممکن است به رنگ آبی-سبز نیز ظاهر شوند. | TCBS حاوی ساکارز است، بنابراین ویبریو مانند ویبریو کلرا و ویبریو آلجینولیتیکوس و کلنی های زرد تولید می کنند.  تخمیرکننده های غیرساکارز، مانند ویبریو پاراهمولیتیکوس و ویبریو ولنیفیکوس کلنی های سبز آبی تولید می کنند. |
| سیکلوسرین-سفوکسیتین-فروکتوز آگار (CCFA)، انکوباسیون بیهوازی لازم است | محیط انتخابی برای جداسازی عمدتاً کلستریدیوئیدس دیفیسیل از مدفوع بیماران مشکوک به اسهال مرتبط با آنتی بیوتیک یا کولیت کاذب غشایی. اکثر فلور روده بزرگ، هم باکتری های گرم مثبت و هم باکتری های گرم منفی را مهار می کند | فلور روده بزرگ مهار می شود. | کلستریدیوئیدس دیفیسیل به دلیل تخمیر فروکتوز زرد به نظر می رسد |
| سوربیتول-مک کانکی آگار (SMAC) | محیط افتراقی برای تشخیص اشریشیاکلی سوربیتول منفی. به جای لاکتوز حاوی سوربیتول است | بیشتر آنها صورتی به نظر می رسند. | *E. coli* O157:H7 بیرنگ به نظر می رسد چون سوربیتول را تخمیر نمی کند |

**تلقیح محیط هاي کشت و انکوباسیون:**

* نمونه هاي مدفوع باید پس از تحویل به آزمایشگاه در اسرع وقت بر روي محیط هاي ذکر شده کشت خطی داده شوند.
* براي تلقیح محیط هایی که میزان انتخابی بودن آنها زیاد است مانند XLD باید مقدار زیادي نمونه مدفوع تلقیح و به صورت خطی کشت داده شود.
* **توجه:** برای کشت اوليه مدفوع بايد از پليت های 8 يا10 سانتی متری استفاده شود تا باکتری ها به خوبی از یکدیگر جدا شوند.
* اگر از محیط های غنی کننده GF یا SF استفاده می شود چند قطره از مدفوع مایع یا سوسپانسیون مدفوع فرم دار در محیط براث ریخته شود.
* اگر نمونه سوآب مقعدي است، سوآب را در داخل محیط براث قرار داده، سر سوآب را که با انگشتان دست تماس داشته شکسته و در لوله بسته شود. براي محیط GF 6-4 ساعت و محیط SF 8-12 ساعت انکوباسیون نیاز می باشد. انکوباسیون بیشتر از این زمان، موجب افزایش رشد باکتری هاي غیربیماریزاي روده اي و بی فایده شدن این مرحله آزمایش می شود. بعد از این زمان از سطح محیط براث بدون مخلوط کردن (به دلیل حرکت بیشتر سالمونلاها در مقایسه با *E.coli* تراکم سالمونلا در سطح براث بیشتر است) یک لوپ برداشته، روي پلیت هاي XLD یا HE به صورت خطی کشت می دهیم.
* براث غنی‌کننده کمپی-تیوگلیکولات به مدت یک شبانه روز یا حداقل به مدت 8 ساعت قبل از کشت در یخچال نگهداری می‌شود و سپس چند قطره در کمپیلوباکتر آگار کشت شده و در دمای 42 درجه سانتی‌گراد در یک فضای میکروآئروفیل انکوبه می‌شود.
* یک روش غنی سازی برای بالا بردن شانس جداسازی گونه های ویبریو این است که قبل از کشت در TCBS، باکتری در حداقل ml 20 آب پپتون قلیایی با %1 NaCL (pH: 5/8) تلقیح و در C° 35 به مدت 8-5 ساعت انکوبه شود و بعد این زمان در محیط TCBS کشت شوند.
* **توجه**: برای کشت اوليه مدفوع به منظور جداسازی بهتر ارگانیسم ها از یکدیگر بايد از پليت های 8 يا 10 سانتی متری استفاده شود.
* همه پلیت ها را به مدت 24 تا 48 ساعت انکوبه می کنیم. بعد از انکوبه گذاری اگر کلنی کاملاً ایزوله روي محیط وجود ندارد، باید از کلنی مشکوك برداشته روي پلیت دیگري کشت خطی داده شود.

**بررسی مستقیم میکروسکوپی:**

* بررسی مستقیم میکروسکوپی مدفوع که معمولاً با عدسی 40 به انجام می رسد ممکن است گلبول های سفید خون را در موارد اسهال التهابی نشان دهد (مانند سالمونلا، شیگلا، یرسینیا، کمپیلوباکتر، EIEC و گونه های مختلف ویبریو).
* گلبول های قرمز ممکن است به دلیل خونریزی دیواره روده وجود داشته باشد.
* در معاینه مستقیم در بیماران مبتلا به اسهال ممکن است انتاموبا هیستولیتیکا (با اسهال خونی) و همچنین بقیه انگلها دیده شود.
* لام گرم برای مدفوع از نظر بررسی باکتری ها کاربرد ندارد بجز یک مورد و آن بررسی وجود باسیل های گرم منفی و خمیده با ظاهر بال مرغ دریایی است که نشان دهنده عفونت کمپیلوباکتر یا ویبریو است.
* اگر آماده‌سازی قطره‌ معلق یا لام مرطوب در یک بیمار مبتلا به عفونت کمپیلوباکتر ژژونی انجام شود، حرکت مشخصه دارتینگ ممکن است دیده شود.

نمودار تشخیصی و اقدامات لازم در کشت مدفوع در نمودار زیر به طور خلاصه آمده است (ID: تشخیص، AST: آنتی بیوگرام):

* تشخیص باکتری های عامل عفونت های گوارشی در دستورالعمل انتروباکترال ها و دستورالعمل باکتری های گوارشی توضیح داده شدند.
* برای شیگلا، سالمونلا و O157 E. coli بعد از شناسایی اولیه لازم است از آنتی سرم ها برای شناسایی سروتیپ یا گونه انها استفاده شود.
* **توجه:** به غير ازآنتی سرم O157 E. coli نبايد ازسايرآنتی سرم های اشریشیاکلی برای تعيين سروگروه های جدا شده از نمونه های مدفوع استفاده شود.

**گزارش جواب منفی کشت مدفوع**

* در صورتی که بیمار فاقد علائم گوارشی و نتیجه کشت رشد فلور نرمال است می توان گزارش منفی را به صورت زیر گزارش کرد:

Growth of mixed normal flora (No growth of *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. and other enteropathogenic bacteria).

* در صورتی که بیمار دارای علائم گوارشی است اما نتیجه کشت منفی است می توان گزارش منفی را به صورت فوق گزارش کرد و به علت های این امر از جمله احتمال مصرف آنتی بیوتیک و همچنین احتمال وجود عوامل ویروسی در کامنت اشاره کرد:

**Comment**: False negative causes: Antibiotic therapy or viral etiology. In addition, diarrhea can be caused by numerous noninfectious causes diseases, such as laxative use, inflammatory bowel disease, malabsorption, problems with motility due to hyperthyroidism, irritable bowel syndrome, surgical reduction of the gut or radiation therapy.

**(4) محدوديت ها و تداخلات:**

* محیط‌ سالمونلا-شیگلا آگار (SS) باعث مهار رشد برخی از گونه هاي شیگلا می شود و نباید از این محیط در موارد مشکوك به جداسازي شیگلا براي کشت مدفوع استفاده نمود و اخیراً در بسیاری از منابع حذف شده است.
* استفاده از محیط کمی انتخابی-افتراقی مثل مک کانکی یا EMB برای کشت مدفوع دارای محدودیت هایی می باشد. برای مثال بسیاری از باکتری های فلور طبیعی مدفوع هم مانند بیماریزاهای اصلی مدفوعی لاکتوز منفی هستند برای مثال پروتئوس، پروویدنسیا و سودوموناس و بعضی ارگانیسم ها هم تخمیرکننده تأخیری لاکتوز هستند مثل سراشیا و سیتروباکتر.
* همچنین باکتریهای لاکتوز مثبت ولی بیماریزا مثل ویبریوهای لاکتوز مثبت مثل ویبریو ولنیفیکوس، اشریشیاکلی بیماریزا و برخی گونه های آئروموناس یا پلزیوموناس ممکن است در این محیطها تشخیص داده نشوند چون لاکتوز مثبت هستند.

**(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 1 ساعت برای نمونه مدفوع و طی این مدت در یخچال قرار نگرفته باشد.
* ظرف پر و دارای نشتی باشد، به علت احتمال آلودگی و بیماری پرسنل باید رد و امحاء گردد.
* بیش از یک نمونه مدفوع از یک بیمار در همان روز ارسال شده باشد.
* نمونه بسیار کم و خشک شده باشد.
* نمونه سواب مقعدی بدون محیط انتقالی ارسال شده باشد.

**(6) نتایج بحرانی:**

* برای نمونه کشت مدفوع نتایج زیر جزو نتایج بحرانی هستند:
* نتيجه مثبت براي باکتری های ويبريوكلرا، شيگلا ديسانتريه و سالمونلا تايفي در همه بیماران و تمام گروه هاي سني
* نتيجه مثبت براي E. coli Enterohemorrhagic مانند E. coli O157 در افراد كمتر از 18 سال
* نتيجه مثبت براي شيگلا در اطفال بستري (کمتر از 12 سال)
* نتيجه مثبت براي كمپيلوباكتر در اطفال در صورت وجود خون يا گلبول سفيد در نمونه بيمار

**(7) مستندات و سوابق:**

* مستندات مربوط به نحوه نمونه گیری و کشت و تفسیر کشت های مدفوع باید در بخش موجود باشد.
* مستندات مربوط به تکرار نمونه و دلایل تکرار و نوع باکتری های رشد کرده (به صورت توصیفی و اولیه) باید موجود باشد.
* مقادیر بحرانی مدفوع بايد به صورت تلفني به پزشک و در صورت نیاز به مرکز بهداشت محل و به مسئول بهداشت بیمارستان اعلام و تمام مستندات در فرم مقادیر بحرانی ثبت شود.

**(9) 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.