**7. پوست، زخم، بافت و استخوان**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **اسم آزمایشگاه:** | آزمایشگاه نوبل اصفهان | |
| **اسم سند:** | **دستورالعمل نمونه های پوست، زخم، بافت و استخوان** | |
| **کد سند:** | D-006-0007 | |
| **دسته بندی سند:** | دستورالعمل های تفسیر کشت های مختلف بدن | |
| **شماره ویرایش:** | ویرایش 1 | |
| **تاریخ ویرایش:** | 01/02/1403 | |
| **تاریخ بازنگری سند:** | 01/02/1404 | |
| **تهیه کننده:** | **تایید کننده:** | **تصدیق و امضاء :** |
| شرکت دارا ویرا آزما  دکتر داریوش شکری |  |  |

**(1) هدف:**

هدف از این دستورالعمل شرح روش انجام نمونه های پوست، زخم، بافت و استخوان بدن شامل نمونه گیری، انتقال، نحوه کشت و تفسیر کشت ها می باشد.

**(2) تعاریف و اصطلاحات:**

**اریزیپلاس**: بیماری پوستی که در درجه اول درم و سطحی ترین بخش های بافت زیرجلدی را درگیر می کند. ضایعات دردناک، قرمز و متورم اند. در بیماران تب، لنفادنوپاتی منطقه ای (تورم غدد) و یک مرز مشخص برجسته وجود دارد.

**اریتراسما:** عفونت مزمن لایه کراتینه شده اپیدرم؛ ضایعات خشک و پوسته پوسته، خارش دار و قرمز تا قهوه ای رنگ.

**اریزیپلویید**: ضایعه پوستی ارغوانی-قرمز، بدون وزیکول، نامنظم، با مرز برجسته. ضایعات با سوزش و خارش همراهند. تب و سایر علائم سیستمیک دیگر غیر معمول اند.

**ایپیتیگو** (Impetigo): با اریتماتوز (قرمزی) همراه است، ضایعاتی که ممکن است تاولی (کمتررایج) یا غیر تاولی باشند.

**سلولیت**: عفونت پراکنده، عفونت در حال گسترش به لایه های عمیق تر درم؛ ضایعات نامشخص، مسطح، دردناک، قرمز و متورم؛ بیماران دارای تب، لرز و لنفادنوپاتی منطقه ای.

**درماتوفیت:** عفونت های قارچی سطح پوست و ضمائم آن (شامل درماتوفیتوز، پای ورزشکار، jock itch وعفونت ناخن و مو).

**هیدرادنیت:** عفونت مزمن از آپوکرین (غدد عرق) در نواحی زیر بغل، تناسلی، یا نواحی پری آنال و اغلب با تخلیه چرک بدبو.

**کیست مویی:** کیستی که در اثر فشار مو ایجاد می شود و با درد، تورم و قرمزی همراه است.

در جدول 1 عوامل ایجاد عفونت های لایه های اپیدرمی و درمی پوست آمده است.

جدول 1. عفونت های لایه های اپیدرمی و درمی پوست.

|  |  |
| --- | --- |
| **عفونت** | **اتیولوژی** |
| اریزیپلاس | استرپتوکوک های گروه A (استرپتوکوک پیوژنز و گاهی اوقات گروهB، C، یا G ) |
| اریتراسما | کورینه باکتریوم مینوتیسیموم |
| اریزیپلویید | اریزیپلوتریکس رزیوپاتیه |
| ایپیتیگو | نوع تاولی به نام بولوس (Bullous ): استافیلوکوک آرئوس، غیرتاولی: استرپتوکوکوس های گروه A |
| سلولیت | **معمول**: گروه A استرپتوکوکوس ها و دیگر گروه های استرپتوکوکوس ها و استافیلوکوک آرئوس  **غیرمعمول**: هموفیلوس آنفولانزاکه بیشتر کودکان را تحت تأثیر قرار می دهد، ویبریو و آئروموناس |
| درماتوفیت | قارچ های اپیدرموفیتون، میکروسپوروم و تریکوفیتون |
| هیدرادنیت | استافیلوکوک آرئوس، گروه استرپتوکوک آنجینوس، استرپتوکوک های بیهوازی و باکتروئیدها |
| کیست مویی | باکتری های بیهوازی: باکتروئیدس فراژیلیس، پرووتلا، فوزوباکتریوم و کوکسی های گرم مثبت بیهوازی و کلستریدیومها |

* ارگانیسم هایی که در عفونت های زخم بعد از عمل مشاهده می شوند شامل موارد زیر هستند: استافیلوکوک آرئوس، استافیلوکوک های کواگولاز منفی، انتروکوک، اشریشیاکلی، سودوموناس آئروجینوزا و بقیه سودوموناس ها، استرپتوکوک پایوژنز، استرپتوکوک های گروه ویریدانس، پروتئوس، مورگانلا، پروویدانسیا، بقیه انتروباکترالها، کاندیداها، باسیل های گرم مثبت، باکتری های بی هوازی (شامل باکتروئید، پرووتلا، پورفیروموناس، فوزوباکتریوم، کلستریدیوم، پپتواسترپتوکوکس و بی هوازی های غیراسپورزا).

**(3) شرح دستورالعمل:**

**تشخیص آزمایشگاهی** **عفونت های پوست و زخم**

در جدول 2 شرایط لازم برای نمونه های مربوط به پوست آمده است.

* جدول 2. شرایط لازم برای نمونه های مربوط به پوست.

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **توضیحات** | **بررسی**  **میکروسکوپی** | **محیط های**  **کشت اولیه** | **انتقال به**  **آزمایشگاه** | **دستورالعمل­های ویژه** | **آماده­سازی بیمار** | **ظرف انتقال** | **نمونه** |
| درصورتی­که اسمیر مخلوطی از باکتری­های گرم مثبت و منفی را نشان می­دهد، محیط CNA را اضافه ­کنید | رنگ­آمیزی  گرم | بلادآگار  شکلات آگار  مک کانکی  تایوگلیکولات | حداکثر تا 24 ساعت در دمای اتاق در محیط نگه­دارنده | نمونه­گیری با سواب  از لبه­ی زخم یا در صورت امکان آسپیراسیون | تمیزکردن محل  با نرمال­سالین  استریل یا الکل  70 درصد | سواب انتقالی در  محیط استوارت  یا آمیس | آبسه  (زخم، پوستول و  زخم­های سطحی) |
| شستشوی گرانول­ها  (درصورت وجود) و  داخل کردن آن در سرم  فیزیولوژی | رنگ­آمیزی  گرم | بلادآگار  شکلات آگار  مک کانکی  تایوگلیکولات  بیهوازی | حداکثر تا 24  ساعت در دمای  اتاق در محیط  نگه­دارنده | آسپیراسیون از دیواره  و بافت­ها | تمیزکردن محل با نرمال سالین استریل یا الکل 70 درصد | محیط انتقالی  بی­هوازی | زخم عمیق |
| درصورت نیاز آن را  هموژنیزه و یکنواخت کنید | رنگ­آمیزی  گرم | بلادآگار  مک کانکی  تایوگلیکولات  بیهوازی | حداکثر تا 24  ساعت در دمای  اتاق در محیط  نگه­دارنده | از خشک شدن نمونه  جلوگیری کنید )با  مرطوب کردن آن با آب  مقطر استریل درصورتی  که خونی نباشد) | ضدعفونی پوست | محیط انتقالی  بی­هوازی یا  لوله­ی درپیچ­دار  استریل | بافت |

**ارزيابی و بررسی اولیه نمونه های زخم**

* نمونه های مربوط به عفونت های پوست و زخم باید همراه با اطلاعات بالينی باشد. اين اطلاعات شامل نوع نمونه (برای مثال، زخم جراحی، زخم های ناشی از تروما، زخم پا يا زخم های فشاری)، محل زخم، علائم بالينی عفونت، وجود نکروز و درمان آنتي بيوتيکی است که در پيش بيني ميکروارگانيسم هايی که بيشتر درگير هستند، به ميکروب شناس کمک بزرگی خواهد کرد تا در انتخاب نوع کشت و نوع محيط و آناليزهای تکميلی استفاده شود.
* همچنين، توصيف زخم و ذکر محل مانند زخم های ناحيه کولورکتال يا زخم های فشاری ناحيه ساکرال (خاجی) بيان کننده اين موضوع است که زخم ممکن است با ميکروارگانيسم های مدفوع همراه باشد و بنابراين، ممکن است مخلوطی از باکتری های هوازی و بیهوازی وجود داشته باشند.
* از آن جا که نتايج کشت های ميکروبی و آزمايش حساسيت ميکروبی در کمتر از 48 ساعت حاصل نمی شود، بنابراين، بهتر است در موارد اورژانسی تعدادی از روش های سريع تر مثل PCR هم استفاده شوند.

**روش نمونه گيری**

نمونه های حاصل از ضایعات پوستی به سه صورت سواب، آسپیراسیون و بیوپسی بافت جمع آوری می شوند که دو نوع اول توسط پرسنل آموزش دیده آزمایشگاه هم قابل انجام است و نوع سوم توسط متخصص به انجام می رسد.

**استفاده از سواب:**

* با وجود کم ارزش بودن سواب های سطحی برای نمونه برداری، اين روش، ارزان، غيرتهاجمی و در دسترس است. همچنین سواب می تواند به صورت نیمه کمی، کانت ميکروبی را تخمين بزند، که آسان تر از روش کاملاً کمی است. اما استفاده از سواب در زخم های سطحی در صورت تميز نکردن زخم و عدم برداشت دبریهای سطحی، ممکن است فقط نشان دهنده آلودگی های سطحی باشد و موجب تشخيص نادرست شود.
* این نمونهاغلب به وسيله سواب های پنبه ای انجام می شود و برای نمونه برداری زخم های سطحی و دبری های بافتی برای ارزيابی نيمه کمی و کيفی فلور ميکروبی زخم به کار می رود.
* در صورت استفاده از سواب آلژينات می توان ارزيابی را نسبتاً کمی انجام داد؛ زيرا سواب در مايع حل می شود و همه ميکروارگانيسم ها را آزاد می کند.

**آسپيراسيون:**

* اصولاً آسپيراسيون مايع چرکی توسط سرنگ برای جداسازی بيماری زاها، به خصوص بیهوازی ها، بر نمونه برداری با سواب ارجحيت دارد و مفيدترين روش نمونه برداری از ترشحات چرکی و آبسه های جلدی است زيرا استفاده از اين روش موجب حفظ شرايط طبيعی بدون تغيير ميکروبی در حين انتقال می شود )رطوبت و شرايط احيای محيط).
* در زخم های عمقی که باعث تشکيل حفره می شود (آبسه)، شستشو با نرمال سالين استريل غيرباکتريوستاتيک و ماساژ آرام موضع برای جمع شدن مایع و سپس آسپيراسيون مايع بهتر است.
* نمونه برداری توسط سواب و آسپیراسیون دارای مراحل اولیه مشابه شامل دبری کردن (برداشت لایه های آلودگی) و پاکسازی ناحیه توسط سرم فیزیولوژی استریل یا الکل 70 درصد برای حذف فلور طبیعی سطحی پوست است.

**بیوپسی:** بیوپسی توسط پزشک متخصص از بافت های عمیق با اجتناب از تماس با لایه های سطحی و آلودگی با نرمال فلور به دست می آید. این نمونه به خصوص چون باید به صورت کمی گزارش شود باید با دقت نمونه برداری شود.

**الف) زخم، ندول و وزيکول**

1- سطح زخم را به وسيله شستشو با سرم فيزيولوژی استريل يا الکل 70 درصد تميز کنيد و بگذاريد خشک شود. اگر زخم وسیع است ترجیحاً از محلول الکلی برای پاکسازی ناحیه استفاده نشود.

2- از سرنگ 5-3 میلی لیتر با سرسوزن 22 يا 23 برای جمع آوری نمونه استفاده کنيد. بايد تا حد امکان آسپيراسيون عمقی انجام شود. در ضمن، درصورت وجود ندول یا وزيکول، دو نمونه، يکی از مايع داخل و يکی از قاعده آن جمع کنيد.

3- در صورتی که آسپيراسيون اوليه ناموفق باشد، می توان با تلقيح مقداری سرم فيزيولوژی غيرباکتريوستاتيک در زير جلد مجدد نمونه گرفت.

4- اگر آسپيراسيون را دوباره تکرار کرديد و موفق نشديد هيچ مايعی برداريد، خود سوزن و سرنگ را که احتمال زیاد حاوی نمونه (هرچند کم) است با کشيدن مقداری محيط مايع به داخل آن شستشو دهيد و مايع را در محيط ها تلقيح کنيد.

5- اگر در نهایت امکان نمونه گیری با آسپیره کردن وجود نداشت با سواب آغشته به نرمال سالین استریل نمونه گیری را انجام دهید.

**ب) بافت زيرجلدی، پانچ نمونه های پوست،** **زخم و بافت های عميق**

1- **پانچ بيوپسی های پوست:** سطح پوست را با الکل 70 درصد ضدعفونی کنيد. mm 4-3 از قسمت درم را پانچ کنيد. در لوله استريل بدون فرمالين و يا دارای سرم فيزيولوژی استريل غيرباکتريوستاتيک به بخش ميکروب شناسی ارسال کنيد (معمولاً توسط پزشک انجام می شود).

2- **آسپيراسيون بافت نرم و زخم و بافت های عميق:** سطح پوست را با الکل 70 درصد ضدعفونی کنيد و عميق ترين قسمت زخم يا مجرای سينوس را آسپيره کنيد تا از آلودگی سطح پوست اجتناب شود. در صورتی که نمونه به وسيله جراحی گرفته می شود، قسمتی از ديواره زخم نيز بايد برای کشت ارسال شود. يک بطري يا ظرف پلاستيکي دهان گشاد با درپوش پيچي برای جمع آوری نمونه توصيه مي شود. ممکن است مقدار کمي از سالين استريل و غير باکتريواستاتيک براي مرطوب نگه داشتن نمونه اضافه شود.

* ارگانیسم های بيهوازي به اندازه کافي در بافت آلوده زنده مي مانند تا از کشت بازيابي شوند.
* اگر ارگانيسم‌هاي بي‌هوازي مدنظر باشند، مي‌توان مقدار کمي از بافت را در يک لوله پلاستيکي با درپوش شل قرار داد و آن را در يک سيستم کيسه‌اي بي‌هوازي قرار داد.
* لژيونلا ممکن است توسط سالين مهار شود بنابراین نمونه از بافت ريه براي جداسازي لژيونلا بايد بدون سرم نمکي ارسال شود.
* بافت فيکس شده با فرمالدئيد براي بازيابي ميکروارگانيسم هاي زنده مفيد نيست و جراح نبايد يک نمونه مشترک براي پاتولوژي و کشت ارسال کند اگرچه برخي از ارگانيسمها را مي توان پس از مدت زمان بسيار کوتاهي بازيابي کرد.
* مواد حاصل از تخليه مجاري سينوسي بايد شامل بخشي از ديواره دستگاه باشد که با کورتاژ عميق به دست مي آيد.
* بافت ناشي از اندوکارديت عفوني اگر بيمار در حال تعويض دريچه است بايد حاوي بخشي از دريچه و پوشش باشد.
* در برخي موارد، ممکن است بافت آلوده به فلور نرمال براي بررسي ميکروبيولوژيکي ارسال شود. نمونه‌هايي مانند بافت لوزه‌ها يا بافت کالبد شکافي را می توان با يک کاردک داغ شده تيکه کرد يا در آب جوش به مدت 5 تا 10 ثانيه براي کاهش آلودگي سطحي گذاشت. سپس نمونه را مي توان با ابزار استريل مثل تيغ پيستوري تشريح کرد تا امکان کشت مرکز نمونه فراهم شود، که تحت تأثير حرارت قرار نمي گيرد. بافت‌هاي بزرگ‌تر را مي‌توان با قيچي استريل يا تيغه به دو نيم کرد و قسمت داخلي آن را براي ميکروب‌ها کشت داد.
* از آنجايي که نمونه هاي جراحي با ريسک و هزينه زيادي براي بيمار به دست مي آيند و از آنجايي که نمونه هاي تکميلي را نمي توان به راحتي تهيه کرد، مهم است که آزمايشگاه بخشي از بافت اصلي را در مقدار کمي آبگوشت استريل در يخچال و در دماي 70- درجه سانتيگراد (يا در صورت نبود آن در 20- درجه سانتيگراد) به مدت حداقل 4 هفته برای انجام مطالعات اضافي ذخيره کند.
* اگر کل بافت بايد براي کشت آسياب شود، مقدار کمي از سوسپانسيون بايد در يک لوله استريل قرار و در يخچال نگهداري شود.

**انتقال نمونه:**

* پس از نمونه برداری، انتقال صحیح نمونه ها به آزمايشگاه به ويژه در کشت بیهوازی اهميت فراوانی دارد چون نمونه های سواب به خشکی و فشار اکسيژن حساس اند. استفاده از محيط های انتقالی از قبل احياء شده (Pre-reduced) و غيرمغذی تجاری در مواردی که انتقال نمونه 2-1 ساعت طول بکشد، مناسب ترند.
* این روش انتقال سواب به عنوان روش مؤثر و ارزان برای کشت هوازی و بیهوازی و حفظ هر دو نوع ارگانيسم ها مناسب است. همچنین، سیستم های انتقال بیهوازی مختلف تجاری نیز وجود دارند. اغلب باکتری های بیهوازی در کشت های مخلوط بهتر زنده می مانند.
* اگر این سیستم ها موجود نیست سواب باید در محیط انتقالی معمولی مانند محیط استوارت یا آمیز منتقل شود.
* بهتر است نمونه در دمای اتاق ارسال گردد و سریعاً کشت شود.

**نحوه آماده سازی بافت برای کشت و لام**

**هموژن و يکنواخت کردن بافت:**

* از آنجايي که همگن سازي با يک آسياب مي تواند برخي از ارگانيسم ها به خصوص قارچها را توسط نيروهاي برشي ايجاد شده در طول آسياب از بين ببرد، اغلب بهتر است از قيچي و پنس استريل (روش اسکالپل استريل) براي خرد کردن نمونه هاي بافت بزرگتر به قطعات کوچک مناسب براي کشت استفاده شود.
* بافت بايد در کابينت هود ايمني بيولوژيکي با جريان آرام دستکاري و خرد و يکنواخت شود و بهتر است پردازش بافت در يک محفظه بيهوازي به انجام برسد. ميکروبيولوژيست بايد با يک تيغه چاقوي جراحي استريل ناحيه عفوني (که اغلب تغيير رنگ دارد) را برش داده و آن را روی محیط بگذارید و بعد از چند بار غلتاندن آن بر روی قسمت اول محیط به کمک سواب، با لوپ استریل به صورت خطی کشت دهید.
* علاوه بر روش اسکالپل استريل، روش های دیگری برای يکنواخت کردن بافت وجود دارد شامل روشMortar & Pastle با استفاده از پودر کربوراندوم و کوبیدن بافت در هاون استریل با دسته هاون، روش خرد کردن بافت در لوله و روش Stomacher با استفاده از کيسه خردکننده.
* ممکن است برای مرطوب نگه داشتن نمونه به يک محيط مايع مانند نوترینت براث نياز باشد که می توان حدود 1 تا 2 میلی لیتر از یک محیط براث (مانند TSB‌یا BHI) را به بافت اضافه نمود و سپس عمل هموژن کردن را انجام داد.
* کشت مستقيم قسمتی از مرکز بافت ممکن است نتايج باکتريولوژيکي مشابه با هموژن کردن را به همراه داشته باشد و ممکن است به تمايز عفونت ميکروبي در مرکز بافت از کلونيزاسيون سطحي کمک کند.

**آماده سازی اسمير**

**اسمیر بافت:** از نمونه به دست آمده در مراحل قبل به هر روش می توان مقداری از بافت له شده یا عصاره به دست آمده را روی لام گذاشت. برای مثال بافت تهیه شده با اسکالپل جراحی را با پنس استريل برداريد و آن را به چند قطعه تقسيم کنيد و روی لام نو برای رنگ آميزی گرم و ديگر رنگ آميزی های لازم قرار دهيد.

**اسمير نازك:** وقتی نمونه بافت نرم يا ترشحات چرکی ضخيم است، به روش زیر يک اسمير نازك تهيه کنيد:

الف) قسمت کوچکی از اگزودای ضخيم را برداريد و آن را با استفاده از سواب يا قيچی استريل ببريد و روی لام تميز قرار دهيد.

ب) سپس دومين لام تميز را بالای نمونه بگذاريد و دو لام را روی يکديگر فشار دهيد.

ج) لام ها را به وسيله ی کشيدن برخلاف جهت هم از يکديگر جدا کنيد.

د) ممکن است مرحله ب و ج با استفاده از چند لام تازه برای تهيه اسمير نازك تکرار شود.

* برخي از نمونه ها بايد براي بررسي مستقیم بافت شناسي به بخش پاتولوژي فرستاده شود. بافت ممکن است با ايمونوفلورسانس براي وجود ويروس هرپس سيمپلکس، ويروس واريسلا زوستر، سيتومگالوويروس يا ذرات ويروسي هاري بررسي شود. همچنین بافت ريه بايد با آزمايش آنتي بادي فلورسنت مستقيم براي گونه هاي لژيونلا بررسي شود.

**تلقيح نمونه ها در محيط های کشت:**

* محیط های معمول آگار خوندار، شکلات آگار و مکانکی آگار به صورت عموم برای کشت های بافت، ضایعات پوستی و زخم استفاده می شوند.
* نيمي از نمونه را مي توان براي کشت قارچ و نيمي ديگر را براي کشت باکتري استفاده کرد. هر دو نوع عوامل ميکروبي بايد در تمام نمونه هاي بافتي در نظر گرفته شوند.
* نمونه هایی که به صورت آسپتیک گرفته می شوند بهتر است در محیط براث مثل تایو گلیکولات کشت شوند.
* برای نمونه های بافت عمقی محیط بیهوازی هم اضافه می شود.
* در موارد شک به بیهوازی ها مثل وجود بوی تعفن و گنديدگی که مشخصه آنهاست و نشان دهنده رشد مخلوطی از باکتری های بیهوازی به همراه بیهوازی اختياری است، کشت در شرايط هوازی و بیهوازی باید انجام شود.
* بافت تمام جنين ها، نوزادان نارس و نوزاداني که در اثر يک فرآيند عفوني فوت کرده اند بايد براي ليستريا کشت داده شوند. نمونه هايي از مغز، مايع نخاعي، خون، کبد و طحال به احتمال زياد حاوي اين ارگانيسم هستند.
* در صورت درخواست، نمونه ها بايد براي ويروس ها يا باسيل هاي اسيد فست پردازش شوند. براي جداسازي ويروس ها، نمونه باید به سلول هاي کشت بافت تلقيح شود. مغز، ريه، مايع نخاعي و خون معمولاً نمونه‌هاي خوبي براي جداسازي ويروس هستند.
* موادي که قرار است براي انگل‌ها کشت شوند، بايد قبل از تلقيح در آبگوشت، به صورت ريز خرد شده يا ساييده شوند. بررسي مستقيم بافت هاي رنگ آميزي شده براي انگل ها اغلب در آزمايشگاه پاتولوژي آناتوميک انجام مي شود.
* محيط هاي اضافي را مي‌توان براي انکوباسيون در دماهاي پايين‌تر تلقيح کرد، که ممکن است بازيابي قارچ‌ها و مايکوباکتريوم‌هاي سيستميک خاص را تسهيل کند.

**کشت کمی و نیمه کمی سواب، مواد آسپیره و بافت:**

برای تلقيح محيط های جامد مانند آگار خوندار، آگار شکلات و آگار مکانکی بايد از يک روش استاندارد استفاده نمود تا بتوان آناليز کمی یا نيمه کمی را روی آن انجام داد. عموماً از دو روش کمی و نیمه کمی برای کشت بافت يا ترشحات زخم استفاده می شود.

**روش نیمه کمی:** قبلاً نحوه انجام و تفسیر روش کشت خطی 4 ناحیه ای برای جداسازی نيمه کمی کلنی ها توضیح داده شد (دستورالعمل کشت خطی). در روش نیمه کمی سواب به دست آمده یا بافت و آسپیره ارسال شده در قسمت اول پلیت میکروبی کشت شده و سپس به روش کشت خطی 4 ناحیه ای با لوپ کشت انجام می شود. طبق دستورالعمل های قبلی کانت به صورت نیمه کمی بر اساس کلنی رشد کرده به صورت Rare، Light/few، ModerateوHeavy گزارش خواهد شد.

**روش کمی:**

* برای تعيين دقیق بار ميکروبی بافت استفاده می شود.
* درجه یا میزان آلودگی زخم باکتریایی به طور مستقیم با خطر سپسیس زخم مرتبط است. به دلیل این رابطه، پزشکان از نتایج یک کشت کمی تعداد واحدهای تشکیل دهنده کلنی (CFUs) در هر گرم بیوپسی اسکار در مدیریت بیماران دچار سوختگی شدید استفاده می کنند (برای بقیه بافتها هم می تواند مفید باشد).
* این نوع کشت در واحدهای کلنی شکل دهندهCFUs در هر گرم بافت گزارش می شود که نتیجه برابر یا بیشتر از CFUs/g 105 نشان دهنده یک عفونت بالقوه جدی است (به خصوص در کشت بافت سوختگی).

**نحوه انجام روش کمی:**

برای انجام کشت کمی در مرحله اول در صورت وجود بافت های مرده سطحی، برداشت اين بافت ها به وسيله کورتاژ (دبری) به خصوص در زخم های ديابتيک ضروری است.

**الف**. یک تکه بافت را به اندازه چند میلی متر مکعب به صورت آسپتیک بر روی یک ظرف استریل کوچک و از پیش وزن شده برش دهید و با ترازوی دیجیتال وزن بافت را تعیین کنید.

**ب**. نمونه و 2 میلی لیتر از یک محیط براث مغذی استریل (مانند TSB‌یا BHI) را در یک چرخ دستی یا هاون استریل قرار دهید. نمونه را خیس و کاملاً هموژن کنید.

**ج**. مقدار 1/0 و 01/0 میلی لیتر از نمونه را در دو پلیت بلاد آگار و دو پلیت بلاد آگار بیهوازی (در صورت درخواست) تلقیح کنید. به کمک لوپ استریل مایع را در کل محیط ها پخش کنید. برای تشخیص باکتری های گرم منفی، کشت 01/0 میلی لیتر از مایع را بر روی محیط مک کانکی آگار (یا EMB) را نیز انجام دهید.

**د**. پلیت های بلادآگار هوازی را در 5 تا 10 درصد دی اکسید کربن به مدت یک شبانه روز و کشت بلادآگار بیهوازی را تحت شرایط بیهوازی به مدت 48 ساعت انکوبه کنید. سپس کلنی های باکتری ها را روی پلیت هایی بشمارید که حاوی 30 تا 300 CFU کلنی هستند. اگر در هر دو رقت بیش از 300 کلنی به دست آید، ضریب 300 به عنوان N (تعداد) برای محاسبات استفاده می شود. اگر کشت منفی است تا سه روز روزانه بررسی کنید. در نهایت تعداد CFU در هر گرم بافت را با فرمول زیر محاسبه کنید:

تعداد CFU های شمارش شده (N) × عکس حجم نمونه تلقیح شده (1/0 یا 01/0) × 2 (حجم براث اولیه اضافه شده برای همگن سازی بافت) تقسیم بر وزن بافت

به عنوان مثال، برای یک بافت با وزن 002/0 گرم، با 68 CFU در پلیت ای کشت شده با رقت 01/0 سوسپانسیون:

**عفونت های اپیدرم و درم**

**اریزیپلویید:**

در اریزیپلویید معمولاً رنگ آمیزی گرم یا کشت زخم سطحی ترشحات منفی است با این حال، کشت بیوپسی حاشیه ضایعه یک ناحیه پوست ضخیم می تواند تشخیص بالینی را تأیید کند.

**میکوز سطحی و اریتراسما:**

* اگر فردی مشکوک به عفونت درماتوفیت باشد، باید ضایعه تمیز شود و خراش ها از مرز فعال ضایعه به دست آید. این خراش ها باید با هیدروکسید پتاسیم 10% شفاف و از نظر وجود هیف بررسی شوند. نمونه نیز ممکن است در صورت لزوم کشت داده شود. بررسی ضایعات پوستی با لامپ وود برای تینا ورسیکالر ممکن است فلورسانس زرد طلایی را نشان دهند.
* اریتراسما در اثر ابتلا به عفونت کورینه باکتریوم مینوتیسیوم با تهیه اسمیر از ضایعه قابل تشخیص است و به صورت باسیل های پلئومورفیک گرم مثبت آشکار می شود. در صورت لزوم، پوست خراشیده شده ممکن است در محیط های حاوی سرم کشت شوند. بررسی با لامپ وود ضایعات پوستی حاصل از تولید پورفیرین توسط باکتری فلورسانس قرمز مرجانی را نشان دهد.

**اریزیپلاس و سلولیت :**

* تشخیص اریزیپلاس و سلولیت معمولاً بر اساس مشاهدات بالینی انجام می شود. نمونه های سواب از تاول ها، جوش ها یا زخم ها ممکن است کشت داده شوند.
* در این بیماری ها کشت آسپیراسیون سرنگ یا نمونه های بیوپسی پانچ توصیه نمی شود و به ندرت توصیه می شود و کشت خون نیز معمولاً منفی است.

**وزیکول ها و تاول ها:**

* این ضایعات پر از مایع مشخصاً با ارگانیسم های خاصی درگیر هستند. مواد موجود در ضایعه تاول مانند ممکن است به صورت مایع سروزی که شبیه سرم بوده و سروسانگوینس متشکل از خون و سرم و یا مایع خونی باشند.
* از تاول های بزرگ می توان مایع را توسط آسپیراسیون سوزنی گرفت اما نمونه ها از وزیکول های کوچک با سواب جمع آوری می شوند. پزشک معمولاً می تواند پیش بینی کند که آیا ضایعه ویروسی است یا باکتریایی و حتی ممکن است به یک ارگانیسم مشکوک شود و بنابراین نمونه ها باید بر اساس بررسی های بالینی برای کشت ویروسی یا باکتریایی ارسال شود.
* ضایعات بولوز (تاولی) اغلب با سپسیس همراه هستند و نیاز به جمع آوری خون برای آزمایش اسید نوکلئیک یا کشت دارند.
* گانگرن گازی ناشی از کلستریدیوم پرفرنجنس و سایر کلستریدیاها توسط پوست برنزی با ضایعات بولوز مشخص می شود و رنگ آمیزی گرم از مایع موجود در ضایعات به طور معمول باسیل های گرم مثبت را نشان می دهد.

**عفونت های بافت زیر جلدی**

* نمونه برای تشخیص عفونت بافت زیر جلدی دشوار است زیرا بسیاری از این ضایعات باز هستند و به آسانی توسط پاتوژن های بیمارستانی که ممکن است در بیماری سیستمیک دخیل نباشند کلونیزه می شوند.
* قابل اطمینان ترین نمونه ها برای تعیین عامل عفونت زخم ها و ندول ها آنهایی هستند که از پایه به دست می آیند مثلاً زخم یا ندول پس از برداشتن بقایای دبری قبلی یا به کمک جراحی و بیوپسی از بافت های عمیق با اجتناب از تماس با لایه های سطحی.
* رنگ آمیزی گرم از نمونه باید انجام شود و به صورت هوازی روی بلاد آگار و مک کانکی آگار کشت داده شوند.
* اگر فردی مشکوک به قارچ، نوکاردیا یا عفونت مایکوباکتریایی باشد، باید از محیط های قارچی یا محیط های مایکوباکتریال استفاده شود.
* چالش های مشابهی در جمع آوری مواد برای کشت از مجرای سینوس وجود دارد. مواد باید از عمیق ترین قسمت مجرای سینوسی به دست آید.
* اگر علائم سیستمیک مانند تب وجود داشته باشد، کشت خون نیز باید جمع آوری شود.
* رنگ آمیزی گرم باید به طور معمول انجام شود.
* کشت ها باید هم از نظر بیهوازی های اختیاری و هم باکتری های بیهوازی مانند باکتری های موجود در زخم های جراحی بررسی شوند.
* سنجش های مبتنی بر اسید نوکلئیک ممکن است برای شناسایی مستقیم ارگانیسم ها استفاده شود مانند بررسی حضور استافیلوکوکوس اورئوس در عفونت زخم؛ علاوه بر این، زمانی که بافت عمیق است و به عفونت های استخوانی می توان مشکوک شد و نتایج کشت منفی است، سنجش مولکولی ممکن است به شناسایی عامل عفونی کمک کند.

**عفونت فاسیای عضلانی و عضلات**

* کشت خون باید همیشه از بیماران مبتلا به میونکروز گرفته شود.
* برای نمونه گیری در مرحله اول نمونه بافتی توصیه می شود و بعد جمع آوری مواد چرکی، و به طور کمتر سواب و انتقال در شرایط بیهوازی باید به انجام برسد.
* رنگ آمیزی گرم باید به طور معمول انجام شود.
* برای بازیابی هر دو باکتری های اختیاری و بیهوازی باید در محیط کشت ها به همان روش جراحی زخم ها تلقیح شوند.

**عفونت های زخم**

**عفونت های زخم بعد از عمل:**

* از آنجایی که باکتری های بیهوازی در بسیاری از این عفونت ها نقش دارند، باید دقت شود تا میکروبیوتای بومی در شرایط بیهوازی به نمونه انتقال نیابد.
* ارگانیسم های غیرمعمول مرتبط با زخم های پس از جراحی، مانند مایکوپلاسما هومینیس، مایکوباکتریوم چلونی، مایکوباکتریوم فورتیتوم، قارچ ها و حتی گونه های لژیونلا نباید نادیده گرفته شوند.
* یک اسمیر رنگ آمیزی گرم از مواد ارسالی برای کشت باید بررسی شود.
* ترشحات ناشی از زخم های سطحی باید به طور معمول به بلادآگار، مک کانکی آگار و کولیستین-نالیدیکسیک آگار (CNA) در صورت وجود و همچنین یک براث غنی‌کننده مثل تایوگلیکولات تلقیح شوند.
* مواد از عمق زخم ها باید روی محیط های بیهوازی و هوازی تلقیح شوند.

**نیش زدن:**

* عفونت زخم گزش معمولاً شامل ضایعات و اگزودای نسبتاً کوچک است و یک نمونه سواب برای کشت هوازی و یک نمونه در محیط کشت انتقال بیهوازی باید جمع آوری شوند.
* پوست اطراف باید قبل از تهیه نمونه کاملاً ضد عفونی شود. بهترین نمونه برای کشت، اگزودای چرکی است که از عمق زخم یا نمونه‌های به‌دست‌آمده در طی جراحی شامل برش و درناژ یا دبریدمان (حذف تمام سلول های مرده و بافت نکروزه) می باشد.
* اسمیرهای رنگ آمیزی گرم باید تهیه و بررسی شوند.
* برای کشت های هوازی، حداقل بلاد آگار، مک کانکی و شکلات آگار باید تلقیح شود.

**سوختگی:**

* برای بسیاری از بیماران سوختگی، تشخیص عفونت بر اساس علائم بالینی و معاینه زخم سوختگی است.
* در صورت امکان، کشت باید بر روی هر گونه ترشحات زخم چرکی انجام شود و کشت خون نیز باید جمع آوری شود.
* نمونه های سطحی باید با یک سواب استریل مرطوب با استفاده از حداقل فشار جمع آوری می شود.
* گاهی یک کشت کمی یا نیمه کمی از نمونه بیوپسی بافتی برای نظارت بر عفونت یا شناسایی شایع ترین ارگانیسم در عفونت چند میکروبی استفاده می شود.
* در صورت ارسال بافت سوختگی نتیجه کشت در واحدهای کلنی شکل دهنده (CFUs) در هر گرم بافت گزارش می شود که نتیجه برابر یا بیشتر از CFUs/g 105 نشان دهنده یک عفونت بالقوه جدی است.

**زمان و دمای انکوباسيون**

* محيط های تلقيح شده بايد در دمای C°35 نگه داری شوند.
* محيط شکلات آگار را باید در جار شمع دار باCO2 5-3 درصد نگه داری نمود.
* به طور کل، انکوباسيون محيط های کشت هوازی به مدت 72 ساعت برای موارد معمول، و درصورت شک به باکتری های سخت رشد مانند نوکارديا، ادامه انکوباسيون به مدت یک هفته ضروری است.
* پليت ها بايد روزانه از نظر رشد کلنی های مشکوك بررسی شوند.
* در صورت شک به وجود قارچ های دوشکلی، کشت در دو پليت هم زمان (محيط بلاد آگار يا BHIآگار) و محیط قارچ مثل SDA و نگه داری آنها در دو دمای C° 35 و C° 22 توصيه می شود.

**کشت بیهوازی**

* از آن جا که بخش وسيعی از عفونت های زخم و جراحی توسط ميکروب های بیهوازی ايجاد می شوند، کشت صحيح ضروری است.
* در صورت استفاده از روش های نمونه گيری مناسب برای کشت بیهوازی، ميزان عفونت با ميکروب های بیهوازی در زخم ديابت می تواند حدود 95% درصد باشد که بيشترين ميزان جداسازی مربوط به پپتواسترپتوکوکوس، باکتروئيدس و پرووتلا است.
* ميزان عفونت های بیهوازی در زخم های بستر و زخم های فشاری حدود 30 % از کل ايزوله ها را تشکيل می دهد.
* نمونه ها بايد تا حد امکان بلافاصله پس از رسيدن به آزمايشگاه کشت داده شوند.
* کشت همزمان هوازی نمونه ها الزامی است. اين عمل به منظور مقايسه رشد و تشخيص رشد باکتری های هوازی و بیهوازی اختياری از باکتری های بیهوازی اجباری انجام می شود (باکتری های هوازی و بیهوازی اختياری در هر دو شرايط رشد می کنند، اما رشد باکتری های بیهوازی اجباری در شرايط هوازی منفی است).
* برای کشت بیهوازی نمونه ها بايد از محيط های از قبل احياء شده استفاده نمود. اين پليت ها به صورت آماده مصرف در بسته بندی های ويژه (فاقد اکسيژن) توسط شرکت های مختلف توليد کننده محيط های کشت فراهم شده است. برای تهيه و آماده سازی محيط های از قبل احياء شده در آزمايشگاه می توان پليت ها را حداقل 2 ساعت قبل از کشت درون جار بیهوازی قرار داد تا اکسيژن آن کاملاً خارج شود.
* محيط های معمول شامل پليت بلاد آگار بیهوازی (CDC بلاد آگار يا بروسلا بلاد آگار)، محيط مهارکننده باکتری های گرم مثبت و باسيل های گرم منفی بیهوازی اختياری مانندKVLB (کانامايسين، وانکومايسين بلاد آگار)، يک محيط افتراقی يا اختصاصی برای بیهوازیهای گرم منفی مانند) BBE باکتروئيديس بايل اسکولين) و يک محيط اختصاصی برای گرم مثبت ها (کليستين-ناليدیکسيک اسيد بلاد آگار يا فنيل-اتيل الکل بلاد آگار) هستند. بنابراين، برای کشت نمونه های مشکوك به باکتری های بیهوازی حداقل بايد از يک محيط اختصاصی و يک محيط غيراختصاصی استفاده نمود. همچنين، می توان يک ديسک مترونيدازول µg 5 را روی سطح آگار غيراختصاصی (برای تشخيص بیهوازی ها) قرار داد که هاله تشکیل می دهند چون حساس هستند و پس از 72-48 ساعت انکوباسيون تحت شرايط بیهوازی، حضور باکتری های بیهوازی به وسيله وجود هر هاله عدم رشد دور ديسک مترونيدازول آشکار می شود.
* محيط ها بايد بلافاصله پس از کشت در شرايط بیهوازی قرارگيرند (جارهای بیهوازي یا دستگاههای بیهوازی). رشد اين باکتری ها، آهسته تر از باکتری های هوازی يا بیهوازی اختياری است و به 48 ساعت انکوباسيون اوليه نياز دارند. در صورت منفی بودن پليت ها، انکوباسيون به مدت 5-3 روز ادامه می يابد و سپس گزارش نهايی داده می شود. برای جداسازی آکتينوميست ها و برخی بیهوازی های سخت رشد زمان طولانی تری لازم است (حداقل 10 روز).

**بررسی لام مستقیم**

* رنگ آميزی گرم در تشخيص اوليه و درمان مناسب و همچنين، شناسايی عامل بيماری زا (برای مثال کوکسی گرم مثبت خوشه ای برای استافیلوکوک آرئوس) به خصوص در نمونه های گرفته شده از بيوپسی بافت های عمقی با ارزش است.
* همچنین در رنگ آميزی گرم می توان تعداد سلول های اپیتلیال و WBC‌ را شمارش کرد که در پی بردن به کیفیت نمونه کمک کننده خواهد بود. برای مثال وجود سلول های التهابی فراوان همراه با یک مورفوتیپ باکتری خالص نشانه عفونت واضح خواهد بود.
* رنگ آميزی گرم روی نمونه زخم انجام می شود و در صورت مشاهده لکوسيت بالا و باکتری غالب از نظر شکل مورفولوژيک در لام، به صورت گزارش ابتدايی به پزشک اعلام می شود (برای مثال، کوکسی گرم مثبت زنجيره ای). اما در بيشتر انواع زخم ها که به وسيله ی ميکروفلور هوازی و بیهوازی ايجاد می شود، رنگ آميزی گرم ارزش کمی دارد. از طرف ديگر در عفونت های ديابتی و زخم های سوختگی به علت وجود فلور ميکروبی طبیعی و ميکروب بيماری زا به طور همزمان، نمی توان ارتباط مناسبی بين رنگ آميزی گرم و تخمين نتايج کشت برقرار کرد.
* مشکل ديگر در اتکاء به رنگ آميزی گرم، تغيير رنگ باکتری های گرم مثبت بیهوازی در مواجهه با اکسيژن است که اغلب تشخيص را پيچيده تر می کند (گرم منفی رنگ می گيرند). برای جلوگیری از این خطا يک روش اختصاصی رنگ آميزی گرم برای شناسايی باکتری های بیهوازی به نام روش کوپلوف استفاده می شود که دستورالعمل آن قبلاً آمد.

**گزارش و تفسير کشت و لام نمونه های ضایعات پوستی**

* پس از انکوباسيون در شرايط هوازی و بیهوازی برای 48-24 ساعت، باکتری های شايعی چون استافيلوکوك اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا، انتروباکتریالها و استرپتوکوك های بتاهموليتيک رشد می کنند که رشد آن ها بسته به نوع نمونه به روش کمی با کلنی کانت در هر گرم بافت یا به صورت نيمه کمی و به صورتRare (1+) تاHeavy (+4) گزارش می شود.
* اکثر بیهوازی ها به صورت مخلوط با ميکروفلور هوازی رشد می کنند. در صورتی که کشت هوازی منفی بود، اما زخم عفونی به نظر می رسيد، شک به عفونت بیهوازی مطرح است و بايد کامل بررسی شود.
* بيشتر باکتری های بیهوازی با منشأ داخلی (اندوژن) طی 5-2 روز روی محيط های انتخابی رشد می کنند.
* با توجه به اهميت نقش بیهوازی ها و مشکلات جداسازی و شناسايی آنها، روش های اوليه مانند مشاهده ميکروسکوپی (رنگ آميزی گرم از کلنی های رشد يافته)، توليد پيگمان روی بلاد آگار (اغلب در کنار ميکروارگانيسم هايی مانند استافيلوکوك اورئوس ايجاد می شود) و حساسيت به ديسک مترونيدازول µg 5 در شناسايی مقدماتی بیهوازی ها کاربرد دارد.
* از انواع مختلف کلنی که به ديسک مترونيدازول حساس هستند، رنگ آميزی گرم انجام می شود تا به سرعت انواع باکتری های بیهوازی (باسيل های گرم منفی بیهوازی متعلق به گونه های باکتروئيدس، پرووتلا و فوزوباکتريوم) مورد شناسايی اوليه قرار گيرند.
* ممکن است در برخی زخم ها ميکروارگانيسم های غيرمعمول وجود داشته باشند، مانند زخم های ناشی از گازگرفتگی يا مخمرها در زخم بيمارانی که داروهای سرکوب کننده ايمنی دريافت می کنند.
* در نمونه هایی که امکان تکرار نمونه وجود ندارد مثل بیوپسی تهیه شده در حین جراحی و همچنین آسپیراسیون دقیق که امکان آلودگی بسیار پایین است باید فارغ از کیفیت نمونه کار کامل (تشخیص قطعی و آنتی بیوگرام) بر روی پاتوژنهای بالقوه به انجام برسد.
* برای نمونه های اسمير و کشت زخم سه روش مختلف برای نحوه تفسير و گزارش وجود دارد:

1- بر اساس ارجحيت نسبی گلبولهای سفيد چند هسته ای (PMN)

2- بر اساس تعداد سلول های PMN و سلول های اپیتليال سنگفرشی (SEC) درLPF یا همان سیستم نمره دهی Q (Q-Score)

3- بر اساس تعداد ارگانيسم های بيماریزای بالقوه (PP) و سيستم درجه بندی Q/ 2, 3, 4

* به طور کلی نکته های مهم تصميم گيری درباره اقدامات لازم شامل این موارد است: نوع نمونه چيست (سواب، آسپيره يا بافت)؟ آيا احتمال آلودگی مطرح است؟ در حالت سواب احتمال آلودگی با نرمال فلور پوست از جمله استافیلوکوکهای کواگولاز منفی بالاست و بنابراین به عنوان نرمال فلور گزارش می شوند اما در نمونه های آسپیره یا بافت عمقی گرفته شده توسط بیوپسی این ارگانیمسها می توانند عامل بیماریزا باشند. در این موارد برای انجام اقدامات بیشتر از جمله انجام آنتی بیوگرام با پزشک معالج يا سرويس عفونی باید مشورت شود.
* بهترین مسیر انجام کشت زخم به صورت زیر است: به محض ورود نمونه زخم یا نمونه گیری توسط پرسنل یک رنگ آمیزی گرم به انجام برسد و طبق پروتکل قبلی گفته شده برای کشت خلط بر اساس تعداد سلول های پلی مورفونوکلئر (PMN) و سلول های اپیتلیال (SEC) نمره دهی کیفیت Q انجام شود و بر اساس آن نمونه برای کشت رد یا تأیید شود.

**حالت اول رد نمونه زخم**

* نمونه های زخم با Q-Score برابر صفر و کمتر (0 تا منفی 3) (یا به طور کلی تعداد سلول های SEC برابر یا بیشتر از PMN ها) دارای سلول های اپیتلیال فراوان و کیفیت بسیار کمی است و باید تکرار شوند. در این مورد اگر بیمار سرپایی است نمونه مجدد تکرار گردد. اگر بیمار بستری است با پزشک یا واحد پرستاری مشاوره شود و تکرار نمونه توصیه گردد.
* در این حالت گزارش این مورد به صورت زیر با کامنتی خواهد بود که در آن اشاره شده است که اگر ملاحظات بالینی نیاز به پردازش کامل نمونه را دارد، لطفاً با بخش میکروب شناسی مشورت کنید و همچنین نمونه تا 5 روز در یخچال باید نگه داری شود.

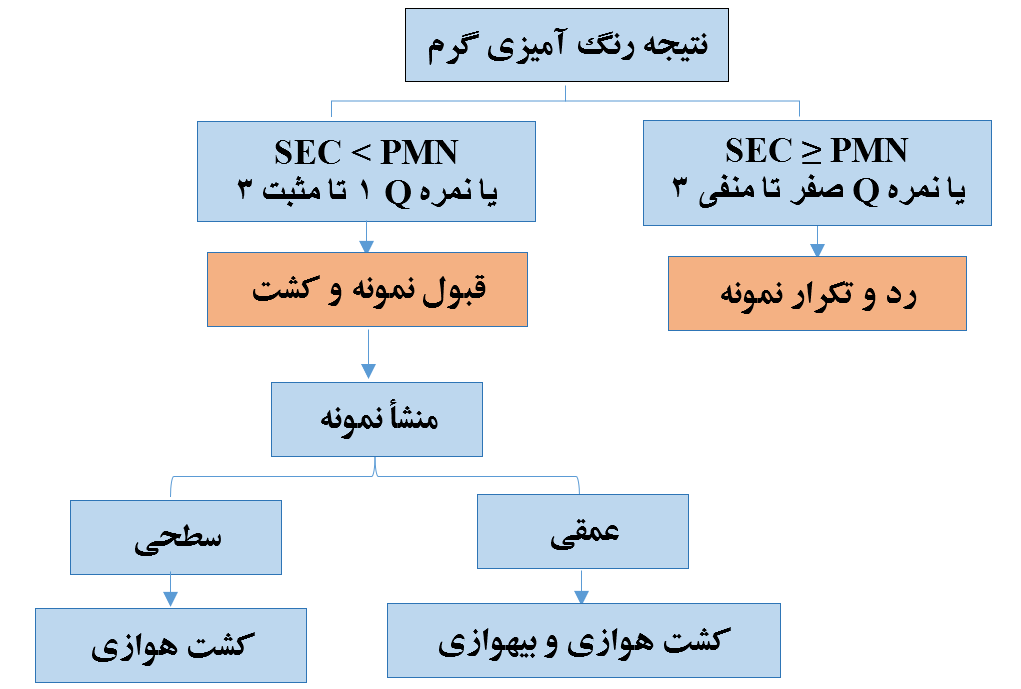
**Report**: Squamous epithelial cells in this specimen indicate the presence of superficial material which may contain contamination or colonizing bacteria unrelated to infection. Repeat of sample is recommended.

**Comment**: Please consult microbiology service if clinical considerations warrant complete processing of the specimen (Specimen will be held for 5 days).

**حالت دوم تأیید نمونه زخم**

اگر نمونه های زخم دارایQ-Score برابر 1 و بیشتر است (1 تا مثبت 3) یعنی اگر تعداد PMN‌ بیشتر از تعداد SEC‌ باشد نمونه قابل قبول است و کشت به انجام می رسد.

نمودار زیر خلاصه دو حالت فوق و مراحل کشت در صورت مورد قبول بودن آن آمده است.



**حالات ممکن بعد از تأیید نمونه زخم و کشت مثبت**

**1. تعداد انواع پاتوژن بالقوه رشد کرده مساوی یا کمتر با عدد Q**

اگر تعداد پاتوژن بالقوه Potential Pathogens: PP)) مساوی یا کمتر با عدد Q باشد (Q-Score ≥ PP)، در این حالت چون حداکثر عدد Q‌ برابر با 3 می باشد بنابراین تعداد باکتری های بیماریزا هم برابر 3 یا کمتر خواهد بود و تا سه ارگانيسم بيماری زای بالقوه کار کامل (ID/AST) بر روی آنها انجام می شود.

**مثال 1:** اگر میانگین تعداد PMN بیشتر از 25 عدد در lpf است و هیچ سلول SEC وجود ندارد یا بسیار نادر است (Q-Score = 3) و 3 باکتری بیماریزا رشد کرده است یعنی عدد Q و عدد pp مساوی است (Q-Score = PP) یا 2 باکتری بیماریزا رشد کرده است یعنی عدد Q از عدد pp بیشتر است (Q-Score ˃ PP) در این حالات ID و AST‌ برای همه باکتریها به انجام می رسد.

**مثال 2:** اگر میانگین تعداد PMN بیشتر از 25 عدد در lpf است و 8 عدد SEC در lpf وجود دارد (Q-Score = 2) و 2 باکتری بیماریزا رشد کرده است یعنی عدد Q و عدد pp مساوی است (Q-Score = PP) یا 1 باکتری بیماریزا رشد کرده است یعنی عدد Q از عدد pp بیشتر است (Q-Score ˃ PP) ID و AST‌ برای همه باکتریها به انجام می رسد.

**2- اگر Q-Score < PP باشد:**

**الف) رشد 2 یا 3 باکتری بیماریزا**: به طور کلی در کشت های زخم معمولی رشد بیشتر از یک باکتری کمتر اتفاق می افتد مگر اینکه زخم وسیع و بیمار بستری باشد یا از نواحی خاص مثل ناحیه کولورکتال یا ساکرال نمونه گرفته شده باشد. بنابراین در این مواقع با توجه به رشد بیشتر از یک باکتری و بیشتر بودن تعداد بیماریزاها از عدد Q احتمال آلودگی زیاد است و بهتر است نمونه تکرار گردد. اگر امکان تکرار نمونه وجود ندارد (مثلاً بلافاصله بعد از نمونه اول آنتی بیوتیک تراپی شروع شده است) یا با تکرار نمونه نتایج یکسانی به دست میاید، باید به يافته های لام گرم توجه کرد: اگر تمام بيماریزاهای بالقوه رشد کرده در اسمير گرم هم موجود هستند، کار کامل باید انجام شود. بقیه ارگانيسم های رشد کرده که در لام مستقیم دیده نشده اند نیازی به انجام کار کامل ندارند و فقط به صورت توصيفی گزارش می شوند.

**مثال**: در اسمير گرم تعداد PMN بیشتر از 25 عدد در lpf است و 8 عدد SEC در lpf وجود دارد (Q = 2) و در کشت 3 باکتری بیماریزا رشد کرده است (pp=3) یعنی عدد pp از عدد Q بیشتر است (Q-Score < PP)، در این حالت بهتر است ابتدا نمونه تکرار شود. سپس مورفولوژی های لام گرم را بررسی می کنیم:

**حالت اول**: در اسمیر گرم تعداد زیادی کوکسی گرم مثبت خوشه ای، تعداد زیادی کوکسی گرم مثبت زنجیره ای و تعداد کمی باسیل گرم منفی دیده شده است. در کشت تعداد سنگین باکتری استافیلوکوک آرئوس و استرپتوکوک پایوژنز و تعداد کمی اشریشیاکلی رشد کرده است. اقدام شما چیست؟

**جواب**: چون سه باکتری بیماریزا رشد کرده است و هر سه باکتری هم در اسمیر مستقیم دیده شده اند کار کامل باید برای هر سه باکتری به انجام برسد و جواب اسمير گرم و کشت به صورت زیر خواهد بود:

**Direct smear**: Many neutrophils, few epithelial cells, gram positive cocci in clusters,

gram positive cocci in chains and few gram-negative bacilli were seen.

**Culture**: Heavy growth of *S. aureus*, Heavy growth of Group A *Streptococci* and few colonies of *Escherichia coli* +**Antibiograms**.

**حالت دوم**: در اسمیر گرم تعداد زیادی کوکسی گرم مثبت خوشه ای و تعداد زیادی کوکسی گرم مثبت زنجیره ای دیده شده است. در کشت تعداد سنگین باکتری استافیلوکوک آرئوس و استرپتوکوک پایوژنز و تعداد کمی اشریشیاکلی رشد کرده است. اقدام شما چیست؟

**جواب**: چون سه باکتری بیماریزا رشد کرده است و فقط دو باکتری گرم مثبت در اسمیر مستقیم دیده شده اند کار کامل باید برای هر دو این باکتری به انجام برسد و باکتری گرم منفی به صورت توصیفی گزارش خواهد شد (بدون نیاز به انجام آنتی بیوگرام).

**نکته**: گاهی ممکن است کاربر در دیدن لام دقت کافی نداشته باشد و باکتری گرم منفی را ندیده باشد. توصیه می شود کار کامل برای آن هم انجام شود به خصوص اگر با تکرار نمونه نتایج مشابه به دست آید.

دقت شود در صورت رشد باکتریهای نرمال فلور به طور همزمان با این باکتریهای بیماریزا باید آنها را در نظر نگرفت.

**ب) رشد بیشتر از سه باکتری بیماریزا:** در این حالت فقط به صورت توصیفی مثل زیر گزارش خواهند شد چون احتمال آلودگی بالاست و بهتر است نمونه تکرار شود اما پلیت های کشت به مدت 72 ساعت برای مشورت با پزشک نگهداری شود و با کامنت زیر ذکر می شود اگر ملاحظات بالینی نیاز به پردازش کامل نمونه را دارد، با بخش میکروب شناسی مشورت شود:

**Direct smear**: Many neutrophils and multiple bacteria morphotypes were seen.

**Culture**: Growth of more than three potential pathogens indicating potential contamination.

**Comment**: Repeat of sample is recommended. Please consult microbiology service if clinical considerations warrant complete processing of the specimen (Culture plates will be held for 72 hours more for consultation).

**مثال**: اگر تعداد PMN بیشتر از 25 عدد در lpf است و هیچ سلول SEC وجود ندارد یا بسیار نادر است (Q = 3) و 4 باکتری بیماریزا رشد کرده است (pp=4) یعنی عدد pp از عدد Q بیشتر است (Q-Score < PP) طبق جواب بالا نمونه تکرار می شود. اگر نمونه کولورکتال باشد ممکن است در این حالت پزشک دستور انجام کار کامل بر روی همه باکتریها را صادر کند و به همین دلیل پلیت نباید تا دستور پزشک اوت شود.

**کشت و تفسیر عفونت هاي استخوان**

**آسپيراسيون و بيوپسي مغز استخوان**

* تشخيص بيماري‌هايي از جمله بروسلوز، هيستوپلاسموز، بلاستومايکوز، سل و ليشمانيوز گاهي اوقات با شناسايي ارگانيسم‌هاي موجود در مغز استخوان امکان‌پذير است.
* بروسلاها را مي توان مانند قارچ ها روي محيط هاي کشت جدا کرد، اما عوامل انگلي بايد در اسمير يا برش هاي ساخته شده از مواد مغز استخوان بررسی و مشاهده شوند.
* آسپيراسيون مغز استخوان به احتمال زياد به شناسايي بيشتر بيماري هاي باکتريايي کمک نمي کند. بسياري از مراکز پيوند، آسپيره هاي مغز استخوان را در لوله هاي سانتريفيوژ ليز يا ظروف استريل براي کشت باکتري ارسال مي کنند. در صورت دريافت ظروف استريل، نمونه بايد در بطري کشت خون قرار داده شود و در دستگاه خودکار (در صورت وجود) انکوبه شود. بسياري از عوامل اتيولوژيک مرتبط با عفونت هاي منتشر در بيماران مبتلا به ويروسHIV ممکن است از مغز استخوان ديده يا جدا شوند. برخي از اين موجودات شامل سيتومگالوويروس، کريپتوکوکوس نئوفورمانس و مايکوباکتريوم آويوم کمپلکس هستند.

**بيوپسي استخوان**

* استئوميليت در بيماران جوان اغلب با يک عامل منفرد همراه است و معمولاً منشاء هماتوژن دارند. استافيلوکوکوس اورئوس، که در طول باکتريمي کاشته مي‌شود، شايع‌ترين عامل اتيولوژيک استئوميليت در بين بيماران در تمام گروه‌هاي سني است.
* ساير ارگانيسم هاي جدا شده از استئوميليت اکتسابي هماتوژن شامل استافيلوکوک کواگولاز منفي، فينگولديا، گونه هاي سالمونلا، هموفيلوس، انتروباکترال ها، سودوموناس، فوزوباکتريوم نکروفوروم و قارچ هاي مختلف هستند.
* استافيلوکوکوس اورئوس يا سودموناس آئروجينوزا اغلب از بيماران معتاد به مواد مخدر جدا می شود.
* باسيل هاي گرم منفي به طور فزاينده اي در بين بيماران بستري در بيمارستان شايع هستند و شکستگي در سد پوست (جراحي يا لاین داخل وريدي) ممکن است باعث ايجاد استئوميليت گرم منفي شود.
* بهداشت ضعيف دهان ممکن است منجر به استئوميليت فک با گونه هاي اکتينوميست، کاپنوسيتوفاگا و ساير ميکروبيوتیاي دهان، به ويژه بيهوازي ها شود. پرووتلا و پورفيروموناس هاي رنگدانه‌دار، فوزوباکتريوم و فينگولديا اغلب درگير هستند.
* عفونت لگن در زنان ممکن است منجر به استئوميليت ترکيبي هوازي و بيهوازي استخوان شرمگاهي شود.
* عفونت های زخم دیابتی معمولاً چند ميکروبي شامل باکتري هاي بيهوازي و هوازي هستند. پرووتلا و پورفيروموناس و ساير بيهوازي هاي گرم منفي، از جمله گروه باکتروئيد فراژيليس و فينگولديا و همچنین استافيلوکوک آرئوس و استرپتوکوک گروه A و ساير استرپتوکوک ها عوامل رايج هستند.

**پردازش نمونه، آزمون مستقيم و کشت**

* مغز استخوان معمولاً از بينابيني تاج ايلياک (ستيغ تهيگاهي) آسپيره مي شود. معمولاً اين ماده براي باکتری های معمولي همانطور که قبلاً ذکر شد پردازش نمي‌شود، زيرا کشت خون به همان اندازه مفيد است و کشت‌هاي مثبت کاذب با باکتری های پوست رايج است.
* يک قطعه کوچک از استخوان عفوني که در عمل جراحي يا با بيوپسي از راه پوست برداشته مي شود در يک ظرف استريل به آزمايشگاه ميکروبيولوژي فرستاده مي شود تا عامل ايجاد کننده استئوميليت را شناسايي کند..
* آسپيراسيون ها يا نمونه برداري هاي مغز استخوان لخته شده بايد همگن يا آسياب شوند (به روش گفته شده در قسمت بافت) تا ميکروارگانيسم هاي به دام افتاده آزاد شوند.
* شکستن نمونه استخوان طبيعي ارسال شده دشوار است. آسياب کردن نمونه در هاون ممکن است برخي از قطعات را بشکند. با اين حال، بيشتر استخوان هاي آلوده نرم و نکروزه هستند که باید از این نواحی کشت به انجام برسد. براده هاي کوچک از نکروزترين نواحي نمونه استخوان ممکن است گاهي به صورت آسپتيک خراشيده شده و روي محيط تلقيح شوند.
* نمونه ها به همان محيط هايي که براي مايعات بدن استريل است (بلادآگار، شکلات آگار و مک کانکی در صورت شک به گرم منفی ها و همینطور محیط براث تایوگلیکولات) تلقيح مي شوند.
* يک محيط مخصوص براي افزايش رشد گونه هاي بروسلا و انکوباسيون در دي اکسيد کربن 10% ممکن است مورد نياز باشد.
* بخشي از نمونه ممکن است مستقيماً به محيط قارچ تلقيح شود.
* براي بازيابي قارچ ها، قطعات بايد مستقيماً در محيط قرار داده شوند. تکه هاي کوچک استخوان را مي توان با آبگوشت استريل آسياب کرد تا سوسپانسيوني براي کشت هاي باکتريولوژيک و مايکوباکتريايي به دست آید.
* اگر قرار است بيهوازي ها بازيابي شوند، همه دستکاري ها بهتر است در يک محفظه بيهوازي انجام شوند. اگر چنين محيطي در دسترس نباشد، ميکروبيولوژيست ها بايد به سرعت در يک کابينت ايمني زيستي تکه هاي استخوان را در پليت هاي بيهوازي و محيط آبگوشت بيهوازي تلقيح کنند.
* از مواد بيوپسي استخوان برش‌هاي پاتولوژی براي تثبيت، رنگ‌آميزي و بررسي (معمولاً توسط پاتولوژيست‌هاي آناتوميک) براي وجود عوامل مايکوباکتري، قارچي يا انگلي به دست مي آيند.

**عفونت پروتز یا مفصل مصنوعي**

* شايع‌ترين باکتری هایي که باعث عفونت پروتز مي‌شوند، آلاينده‌هاي رايج پوست مانند استافيلوکوک‌هاي کواگولاز منفي هستند که تشخيص را پيچيده‌تر می کند.
* برخي از مطالعات گزارش کرده اند که کشت نسبتاً غير حساس است، احتمالاً به دليل ارگانيسم هاي ساکن در بيوفيلم ها، در حالي که سنجشPCR قادر به تشخيص بيشتر پاتوژن هاي مرتبط با عفونت هاي مفصل مصنوعي است. با اين حال، يک مطالعه با استفاده از PCR و کشت با استفاده از انواع محيط هاي متعدد و انکوباسيون طولاني مدت نشان داد که کشت مناسب براي تشخيص عفونت باکتريايي در پروتزهاي هيپ کافي است وPCR حساسيت تشخيصي براي عفونت را افزايش نمي دهد.

**کشت منفی زخم، بافت و استخوان**

* اگر کشت منفی است و در لام مستقیم نیز باکتری دیده نشده است باید پلیت های کشت حداقل برای 3 روز نگهداری شوند و سپس جواب منفی گزارش شود:

No bacteria growth at 72 hours.

* وجود ترشحات چرکی و دیدن باکتری در لام مستقیم و عدم رشد می تواند در اثر مصرف آنتی بیوتیک یا حضور باکتریهای سخت رشد یا باکتریهای بیهوازی همچنین تأخیر در انتقال نمونه یا انتقال نمونه بدون محیط انتقالی باشد. این پلیت های کشت حتماً باید حداقل تا 5 روز نگهداری شوند (در صورت شک به قارچها تا 14 روز) و سپس مورفولوژی لام مستقیم دیده شده را با کامنت دلایل کشت منفی را گزارش کنیم.
* همچنین در صورت دیدن باکتری گرم مثبت باسیلی و عدم رشد باید به سل بافتی هم شک کرد و انجام لام اسید فاست توصیه شود.
* برای مثال دیدن باکتریهای کوکسی گرم مثبت و عدم رشد باکتری به صورت زیر گزارش خواهد شد:

**Direct smear**: Many neutrophils and many gram-positive cocci were seen.

**Culture results**: No Bacteria growth at 5 days.

**Comment**: Reasons of false negative culture can be as follow:

Antibiotic therapy, sample transport delay/without transport media, presence of anaerobic bacteria.

Appropriate recollection of sample after at least 24 hours with timely delivery to laboratory and anaerobic culture are recommended.

**(4) محدوديت ها و تداخلات:**

در کشت ها زخم و بافت به علت فلور طبیعی سطح پوست به خصوص استافیلوکوک های کواگولاز منفی و دیفتروئیدها احتمال آلودگی نمونه در حین نمونه گیری با آنها 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) 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.
* نمونه های زخم با Q-Score برابر صفر و کمتر (0 تا منفی 3) (یا به طور کلی تعداد سلول های SEC برابر یا بیشتر از PMN ها) باید تکرار شوند.
* بیش از یک نمونه از یک بیمار در همان روز ارسال شده باشد.
* نمونه بسیار کم و خشک شده باشد.
* نمونه سواب بدون محیط انتقالی ارسال شده باشد.
* نمونه بیوپسی یا بافت با فرمالین ارسال شده باشد.
* کشت نمونه از نظر بیهوازی در محیط انتقالی بیهوازی ارسال نشده باشد.

**(6) نتایج بحرانی:**

* هر نتيجه مثبت کشت و اسمیر بيوپسي بافت مانند مغز، كبد، كليه، استخوان و مغز استخوان در هر رده سنی جزو نتایج بحرانی می باشد.
* جداسازی استرپتوكوك گروه A در نمونه هاي فاسيت و يا زخم، يك ناحيه استريل معمول يا ناحيه تناسلي در تمام گروه هاي سني جزو نتایج بحرانی می باشد.
* هر نتيجه مثبت یا منفی کشت و اسمیر نمونه هاي بخش جراحي مانند آبسه هاي مغزي و مايعاتي كه در حين جراحي برداشته مي شوند در تمام گروه هاي سني بحرانی هستند. در این موارد منفی بودن اسمیر هم علاوه بر مثبت بودن آن سریعاً باید گزارش شود.
* نمونه زخم مشکوک به قانقارياي گازي شامل دیدن باسيل هاي گرم مثبت درشت مشابه كلستريديوم در تمام گروه هاي سني جزو نتایج بحرانی می باشد.

**(7) مستندات و سوابق:**

* مستندات مربوط به نحوه نمونه گیری و کشت و تفسیر کشت ها 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.
* مستندات مربوط به نتایج بحرانی گفته شده باید 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.