آماده سازی و کشت نمونه های مدفوع

Processing and Culture of Fecal Specimens

این راهنما در سه قسمت تنظیم گردیده است : انواع نمونه های مناسب ارسالی به آزمایشگاه ؛ محیط های کشت مناسب و نحوه انجام آزمـایش میکروبی ؛ و در نهایت گزارش نتایج.

I .نمونه SPECIMEN :

الف) مدفوع تازه جمع آوری شده در یک ظرف تمیز پلاستیکی در دار

۱- نمونه بایستی در مدت ۳۰ دقیقه (جهت گونه های شیگلا) و حداکثر ظرف مدت ۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفته و کشت داده شـود.در صـورت پـیش بینی تاخیر (بیش از ۲ ساعت) نمونه باید به محیط ترانسپورت مناسب منتقل گردد.

* در مورد شیگلاها یخچال گذاری نمونه ها حداکثر تا ۲ ساعت پس از نمونه گیری توصیه می شود.همچنین می توان از رکتال سـواب قـرار داده شـده در یک محیط براث جهت انتقال نمونه ها استفاده کرد.

۲- حداقل یک گرم مدفوع تازه با قوام طبیعی (به اندازه یک فندق) و یا ۵ گرم مدفوع اسهالی جهت کشت مورد نیاز می باشد.

* از مخلوط شدن نمونه های مدفوع با ادرار خودداری شود.

* در بیمارانی که بیش از ۳ روز در بیمارستان بستری بوده اند ، کشت روتین مدفوع توصیه نمی شود.

۳- بررسی ماکروسکوپی و مشاهده مستقیم مدفوع از نظر قوام ، لخته خون ، چرک ، موکوس و.... و گزارش آن.

۴- انجام آزمایشات غربالگری مانند :

- تهیه اسمیر نازک از مدفوع و رنگ آمیزی گرم ، رایت و یا بلودومتیلن جهت بررسی و شمارش WBC های مدفوع و همچنین مشاهده مرفوتایپ غالب، وجود سلولهای مخمری یا عدم حضور باسیلهای گرم منفی روده ای.

- تست لاتکس آگلوتیناسیون جهت لاکتوفرین (محصول ناشی از تخریب WBC های مدفوع در موارد نگهداری طولانی مدت).

ب) رکتال سواب (سواب مقعدی)

* جهت جلوگیری از خشک شدن نمونه ، رکتال سواب را بایستی در محیط براث و یا محیط ترانسپورت مناسب نگهداری نموده و انتقال داد.

ج) مدفوع نگهداری شده در محیط ترانسپورت

محیط ترانسپورت کاری بلر (Cary-Blair) محیط مناسب جهت نگهداری و انتقال مدفوع مـی باشـد.در ایـن محـیط شـیگلاها قادرنـد حـدود ۵۰ روز و سالمونلاها ۶۰-۴۵ روز زنده بمانند.

* برخـــــــــی از محـــــــــیط هـــــــــای ترانســـــــــپورت خـــــــــاص ماننـــــــــد آب پپتونـــــــــه قلیـــــــــایی (Alkaline peptone water) جهت ایزولاسیون ویبریوها توصیه می شود.

II. تلقیح و انکوباسیون محیط های کشت

(INOCULATION AND INCUBATION OF MEDIA) :

الف) انتخاب محیط های کشت

تعدادی از محیط های کشت ضروری جهت ایزولاسیون اولیه پاتوژنهای شایع روده ای ، شامل موارد زیر می باشند :

۱- **BAP** (آگار خوندار) به عنوان محیط غیر اختصاصی : این محیط جهت بررسی رشد استافیلوکوک اورئوس و مخمرها به کـار مـی رود کـه در صـورت مشاهده رشد قابل توجه ، بایستی این موارد را گزارش نمـود ، امـا انجـام آزمـایش تعیـین حساسـیت میکروبـی لازم نمـی باشـد.همچنین از ایـن محـیط می توان جهت انجام تست اکسیداز استفاده نمود و در صورت مشاهده واکنش مثبت ، بایستی مشکوک به آئروموناس ، ویبریوکلرا یا پلزیوموناس گردیـده و اقدامات تشخیصی لازم را انجام داد.

۲- **MAC** (مکانکی آگار) یا **EMB** (ائوزین متیلن بلو) به عنوان محیط افتراقی جهت کمک به رشد باکتریهای گرم منفی روده ای

۳- **HE** (هکتون انتریک آگار) یا **XLD** (گزیلوز لیزین دزوکسی کولات) به عنوان محیط انتخابی و افتراقی جهت جداسازی سالمونلا و شیگلا.

۴- **Campy-blood agar** جهت کشت گونه های کمپیلوباکتر.

۵- **SMAC** (مکانکی- سوربیتول آگار) توسط برخی از مراجع بهداشت عمومی جهت کشت Escherichia coli O157:H7 توصیه می گـردد ، که در مورد نمونه های مدفوع حاوی خون و یا در صورت درخواست پزشک ، بایستی مورد استفاده قرار گیرد.

* چنانچه مشکوک به ویبریو ، آئروموناس و یا پلزیوموناس شیگلوئیدس باشیم و یا در صورت درخواست پزشک ، محیط های کشت اختصاصی جهت جـدا سازی و شناسایی این میکروارگانیسم ها (مثل TCBS و...) لازم است.

ب) محیط های مایع مغذی Enrichment Broth

این محیط ها به منظور بازیافت مقادیر کم سالمونلا ، شیگلا یا کمپیلوباکتر در افراد بدون علامت ناقل عامل بیماری (کریرهـا) و بـویژه در میـان کارکنـان دارای مشـــــاغل حســـــاس ماننـــــد افـــــراد شـــــاغل در مهـــــد کودکهـــــا ، آشـــــپزخانه هـــــا و.... بـــــه کـــــار می روند که شایعترین آنها GN براث و سلنیت براث (SF) می باشند.در مورد محیط GN براث ۶-۴ سـاعت انکوباسـیون در C ۳۷-۳۵ و بـرای محـیط سلنیت براث ۱۲-۸ ساعت انکوباسیون در C ۳۷-۳۵ توصیه می گردد.

انکوباسیون طولانی مدت (بیشتر از زمان توصیه شده) در محیط های براث مغذی ، باعث افزایش رشد باکتریهای نان پاتوژن روده ای می شود.پس از طی مدت زمان لازم جهت انکوباسیون ، بایستی از محیط براث بر روی محیط های انتخابی و یا افتراقی نامبرده ، کشت مجدد نمود.

توضیح : مطالعات نشان داده است که به جز در موارد خاص ذکر شده (مانند کریرها و...) استفاده از محیط های براث مغذی منجر بـه جـدا سـازی تعـداد بیشتری از پاتوژنهای روده ای نمی گردد ، لذا استفاده از این محیط ها (به جز در آزمایشگاههای مسئول صدور پروانه بهداشتی مشاغل) بـه صـورت روتـین توصیه نمی شود.

ج) محیط های کشت اختصاصی :

جهت ایزولاسیون سایر پاتوژن های روده ای بر حسب شیوع بیماری و یا با توجه به الزامات بهداشت عمومی و یا درخواست پزشـکان ، محـیط هـای زیـر پیشنهاد می گردد :

SMAC (جهت اشریشیاکلی O157:H7) ، CIN (جهت یرسـینیا انتروکولیتیکـا) ، TCBS (جهـت گونـه هـای ویبریـو) ، SS (جهـت گونـه هـای سالمونلا) ، Bismuth sulfite ager . Brilliant green agar (جهت گونه هـای سـالمونلا) و Inositol-brilliant green bile salts agar (جهت پلزیوموناس شیگلوئیدس).

تذکر : محیط SS (Salmonella-Shigella agar) جهت برخی از گونه های شیگلا دارای اثر مهاری بوده و لذا بهتر اسـت در مـوارد مشـکوک بـه شیگلا ، مورد استفاده قرار نگیرد.

د)تلقیح به محیط کشت :

یک سواب را به نمونه آغشته کرده و در قسـمت کـوچکی از پلیـت کـاملاً مـی چرخـانیم. سـپس بـا لـوپ اسـتریل نمونـه را در تمـامی پلیـت Streak می نماییم تا کلنی های ایزوله بدست آوردیم.هنگام استفاده از محیط های نیمه انتخابی و یا کاملاً انتخابی بایستی مقـدار زیـادی از نمونـه هـا را تلقـیح و کشت داد.

ه) انکوباسیون :

* پلیت ها را به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در انکوباتور C ۳۷-۳۵ قرار می دهیم.

* در موارد خاص مانند ایزولاسیون کمپیلوباکترها ، محیط کشـت را بایسـتی تحـت شـرایط میکروآئروبیـک ($5\%\ O_2$) حـداقل ۷۲ سـاعت در ۴۲ درجـه سانتیگراد انکوبه نمود.انکوباسیون در C ۴۲ مانع از رشد باکتریها می گردد، در حالیکه کمپیلوباکترهای پاتوژن قادر به رشد در C ۳۷-۳۵ نیز می باشند.

III گزارش نتایج (REPORTING OF RESULTS) :

۱- در موارد کشت مثبت (Positive Culture)

* گزارش باکتری جدا شده به صورت نیمه کیفی (Light,Moderate,Heavy) پس از شناسایی کامل میکروارگانیسم در حد جنس و گونه

* انجام آزمایش تعیین حساسیت میکروبی و گزارش نتایج آن

۲- در موارد کشت منفی (Negative Culture)

به این طریق گزارش نمایید :

"No Salmonella ,Shigella,Vibrio,Campylobacter ,….isolated."

در صورت عدم مشاهده میکروارگانیسم های روده ای در کنار جمله ای مانند :

"Decreased of absent usual enteric gram-negative microbiota."

بایستی میکروارگانیسم غالب (چنانچه یکی باشد) را گزارش نمود.

Reference :

1- Isenberg, Henry D.2004.Essential Procedures for Clinical Microbiology , ASM, Washington DC.

تهیه کننده :

دکتر سهیلا حکمت یزدی