روش‌های آزمایشگاهی در تشخیص منتژیت

نویسندگان به‌ترتیب حروف الفبا:

دکتر حمیدرضا امیرمقدمی
کارشناس مسئول امور آزمایشگاه‌های معاونت بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی زنجان

دکتر فریناز راشدمرندی
رئیس آزمایشگاه میکروب‌شناسی مرکز تحقیقات آزمایشگاه‌های رفرانس کشور

دکتر سعید صباغی
کارشناس امور آزمایشگاه‌های معاونت درمان دانشگاه علوم پزشکی ایران

دکتر افشین صفایی
کارشناس مسئول امور آزمایشگاه‌های مرکز مدیریت بیماری‌ها

دکتر فرشته عسگری
کارشناس مسئول مرکز مدیریت بیماری‌ها

هما فروهش تهرانی
عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی ایران

دکتر محمدجواد کاویانی
کارشناس مسئول ادارهٔ کل امور آزمایشگاه‌ها

دکتر سعید مهدوی
کارشناس مسئول ادارهٔ امور آزمایشگاه‌های دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

به اهتمام: ناهید پدرام

زیرنظر:
دکتر محمدمهدی گویا

وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی
معاونت سلامت
مرکز مدیریت بیماری‌ها

مرکز نشر صدا

روش‌های آزمایشگاهی در تشخیص منتژیت/ نویسندگان: حمیدرضا امیرمقدمی ... [و دیگران]؛ به اهتمام؛ ناهید پدرام؛ زیر نظر: محمدمهدی گویا؛ [برای] وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، معاونت سلامت، مرکز مدیریت بیماری‌ها.
تهران، مرکز نشر صدا، ۱۳۸٤.
۸۸ ص. مصور.
ISBN: 964-359-139-5
فهرستنویسی براساس اطلاعات فیپا.
۱. منتژیت. الف. حمیدرضا، امیرمقدمی. ب. پدرام، ناهید. ج. ایران. وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی. مرکز مدیریت بیماری‌ها.
RC۳۷٦/ر۹ ٦۱٦/۸۲
کتابخانه ملی ایران ۸٤-٤۰۸۳۳م

مرکز نشر صدا
مرکز مدیریت بیماری‌ها
تلفن: ۸۸۵۵۳٤۲۹ و ۸۸۵۵۳٤۰۳
دورنگار: ۸۸۷۱۳٦۵۳

روش‌های آزمایشگاهی در تشخیص منتژیت

نویسندگان: حمیدرضا امیرمقدمی، فریناز راشدمرندی، سعید صباغی، افشین صفایی، فرشته عسگری، هما فروهش تهرانی، محمدجواد کاویانی، سعید مهدوی
به اهتمام ناهید پدرام
زیرنظر: دکتر محمدمهدی گویا
خدمات چاپ و نشر: مرکز نشر صدا
ویراستار ادبی: مهری تقی‌پور
صفحه‌آرایی: محمود عباس‌نژاد
اجرای طرح جلد: الهه سبزپوشان
نوبت چاپ: اول(۱۳۸٤)
شمارگان: ٤۰۰۰ نسخه
شابک: ۵-۱۳۹-۳۵۹-۹۶۴ **ISBN:** 964-359-139-5

«حق چاپ برای مرکز مدیریت بیماری‌ها محفوظ است.»

سـرآغـاز

مرکـز مدیریت بیـمـاری‌ها که مسئـولیت تـدویـن راهنمـاهـای علمی- عملیاتی کشـور را به‌عهده دارد، در راستای وظایف سنـگین خود در جهت تأمین، حفظ و ارتقای سطح سلامت جامعه، ناگزیر است از سیستم‌های مراقبت اپیدمیولوژیک، پیشگیری اپیـدمیـولوژیک، گزارش‌دهی، همه‌گیرشناسی، آموزش، مشاوره و پروفیلاکسی‌های گوناگون بهره‌گیرد. این مـرکـز در مسیـر حـرکـت خـود، بـه عشق و فداکاری انسان‌های علاقه‌مند به علم و دانش اساتید دلسوز، به خرد و اندیشهٔ عارفانهٔ محققان خاموش و پرکار و به عمل هنرمندانهٔ عـاملان بی‌تکلف و تلاش کارشناسان زبده همواره وابسته است.

مجموعهٔ حاضر تحت عنوان ***روش‌های آزمایشگاهی در تشخیص مننژیت*** با توجه بـه نـیـاز مبرم ایـن مرکز در ارتقای توانمندی آزمایشگاه‌های کشور در تشخیص عـوامل بیماری مننژیت تـوسط صـاحب‌نظران مراکز مختلف دانشگـاهـی و پـژوهـشی و بـا استفـاده از منابـع مورد تأیید سازمان جهانی بهـداشت تهیـه شده‌است. تـلاش بـراین بـوده کـه بـر جنبه‌هـای کاربردی تکیه‌شود، به‌گونه‌ای که هر کـارشناس و کـاردان آزمایشگاه فارغ از مباحث نظری که در کتـاب‌هـای دیگـر در دستـرس است بتـوانـد مـراحل انجـام آزمایش را به‌صورت مدون دراختیار داشته‌باشد.

مرکز مدیریت بیماری‌ها از نقطه‌نظرهـا، پیشنهادهـا و انتقادهـای تمام صـاحب‌نظران و دست‌انـدرکـاران آمـوزشی، پـژوهشی و اجـرایی امـور بهداشتی‌درمانی استقبال‌می‌کنـد؛ بنابراین خواهشمند است ایـن مرکز را در جهت بهبود کیفی متـون عملی و پژوهشی یاری‌فـرمایید.

«دکتر محمدمهدی گویا»
رئیس مرکز مدیریت بیماری‌ها

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
پیش‌گفتار	**۹**
مقـدمـه	**۱۱**
تعـریـف	**۱۳**
مایع مغزی‌نخاعی	۱۳
۱. ثبـت اطلاعـات	**۱۳**
۱-۱- فرم درخواست انجام آزمایش‌های CSF/ خون	۱۳
۱-۲- اطلاعات مورد نیاز ثبت‌شده روی برچسب هر نمونه	۱۴
۱-۳- اطلاعات لازم جهت پذیرش نمونه(CSF/ خون) در آزمایشگاه	۱۴
۲. نمونـه‌گیـری	**۱۵**
روش جمع‌آوری CSF	۱۵
۳. مراحل انجام آزمایش روی مایع مغزی‌نخاعی	**۱۶**
۳-۱- بررسی فیزیکی(ظاهر - حجم)	۱۶
۳-۲- آزمایش شمارش سلولی	۱۸
الف) آزمایش شمارش سلولی با استفاده از لام نئوبار	۱۸
ب) شمارش افتراقی گلبول‌های سفید CSF	۲۱
۳-۳- آزمایش‌های بیوشیمیایی CSF(لولهٔ شمارهٔ ۱)	۲۲
الف) اندازه‌گیری پروتئین CSF	۲۲
ب) اندازه‌گیری قند CSF	۲۴
ج) اندازه‌گیری سطح لاکتات CSF	۲۵
۳-۴- آزمایش‌های سرولوژی CSF	۲۵
الف) آزمایش CRP	۲۵
ب) آزمایش آگلوتیناسیون لاتکس	۲۵
آزمایش‌های بـاکتـری‌شناسی	**۲۶**
۱. مایع مغزی‌نخاعی(لولهٔ شمارهٔ ۲)	۲۶
انتقال نمونهٔ CSF	۲۶
نحوهٔ استفاده از محیط T-I	۲۷
کشت از محیط انتقالی CSF(T-I)	۲۸
کشت اولیه، کشت مجدد و تشخیص احتمالی	۲۸
۱. کشت اولیه CSF	۲۸
الف) روش رنگ‌آمیزی گرم برای CSF	۲۹
ب) روش کلی انجام آزمایش‌های آگلوتیناسیون لاتکس	۳۱
۲. خون	۳۲
نمونه‌گیری و انتقال	۳۲
بررسی ظاهر کلنی‌ها	**۳۶**
۱. شناسایی *نایسریا منتژیتیدیس*	۳۷
آزمایش اکسیداز به روش کواکس	۳۷
شناسایی گروه‌های سرمی *نایسریا منتژیتیدیس*	۳۸
مصرف کربوهیدرات‌ها توسط *نایسریا منتژیتیدیس*	۴۰
۲. شناسایی *استرپتوکوکوس پنومونیه*(*پنوموکک*)	۴۱
تعیین حساسیت به اپتوچین	۴۲
آزمایش حلالیت در صفرا	۴۳

عنوان **صفحه**

۳. شناسایی *هموفیلوس آنفلوانزه* ٤٤

شناسایی سروتایپ‌های *هموفیلوس آنفلوانزه* ٤٤

آزمایش بررسی نیاز به فاکتورهای X و V ٤٥

پلیت‌های شناسایی هموفیلوس ٤٧

نگه‌داری و انتقال *نایسریا منتژیتیدیس*، *استرپتوکوکوس پنومونیه* و *هموفیلوس آنفلوانزه* **٤٨**

نگه‌داری باکتری‌ها ٤٨

۱. نگه‌داری کوتاه‌مدت ٤٨

۲. نگه‌داری بلندمدت ٤٨

کنترل کیفیت محیط‌ها و معرف‌ها **٥٠**

انجام آزمایش‌های کنترل کیفی ٥١

ضمیمه **٥٣**

طرز تهیهٔ محیط‌ها و معرف‌ها ٥٣

۱. محیط‌های مایع و جامد(حاوی آگار) مورد استفاده در روش‌های متداول آزمایشگاهی ٥٣

۲. محیط‌های اختصاصی ٥٨

۳. محیط‌های انتقال‌دهنده و ذخیره‌سازی باکتری‌ها ٦٢

معرف‌های متفرقه ٦٢

منابع **٨٧**

پیش‌گفتار

از عصـری که ابن‌سینـای بـزرگ تشخیـص بیمـاری قند را با آزمایش ادرار ممکن دانست، از زمانی کـه پاستـور دانشمند فقیـد فرانسوی نظریهٔ تولید خودبه‌خودی عوامل بیماری‌ها را بـه چالش کشیـد، از هنگامی‌که کخ عامل بیماری سل را کشف‌نمود و بر باورهای غلط پیشینیان خط بطلان کشید، از آن هنگام که آدمیـان تکیه بـر روش‌هـای علمـی و تجـربی را جهت تبیین حادثه‌هـای طبیعـی بـر کلی‌گویی‌هـای شبـه فلسفی برگزیدند، آزمـون و آزمـایش جایگاه ویژه‌ای در علوم بشـری یافت.

در علوم پزشکی نیز آزمایشگاه به‌عنوان یکی از محل‌هایی که با آزمون و سنجش و تشخیص عـوامل بیمـاری‌هـا بـه یـاری پزشـکان و دردمنـدان می‌آید، روزبه‌روز اهمیـت بیشتری می‌یابد. به‌گـونه‌ای که امـروز سـازمان جهـانی بهداشت، آزمایشگاه‌ها را نه‌تنها به‌عنوان محلی برای تشخیص یک بیماری، بلکه مکانی برای دیده‌بانی و مراقبت جامعه از بیماری‌ها می‌شناسد.

بیماری مننژیت به‌عنوان یکی از اولویت‌های بیماری‌ها در سطح جهانی و کشوری است. تشخیص این بیماری به‌خصوص به لحاظ نحوهٔ نگه‌داری و انتقال نمونه و ازنظر یکسان‌سازی و روشمنـدنمودن نیاز بـه مجموعه‌ای داشت. مجموعه‌ای که با تکیه بر خرد جمعی افرادی که مستقیماً با تشخیص آزمایشگاهی مننژیت مواجه هستند تهیه‌شود.

این کتاب جهت استفادهٔ کارشناسان و کاردانانی تدوین شـده‌است کـه درپی یک دستورالعمل استاندارد در تشخیص آزمایشگاهی مننژیت هستند. جـادارد از استـاد گـرامی جناب آقای دکتر محمدمهدی گویا رئیس محترم مرکز مدیریت بیماری‌ها که با حمایت‌های بی‌دریغ ایشان جان تازه‌ای در کالبد آزمایشگاه‌های بهداشت و درمان کشور دمیده‌شد تشکرنماییم.

همچنین از جنـاب آقـای دکتر محمد عباسی ریاست محترم آزمایشگاه

ملی سلامت، جناب آقای دکتر محمد صاحب‌الزمانی مدیر کل محترم ادارهٔ کـل امـور آزمـایشـگـاه‌های تشخیص طبی و جنـاب آقـای دکتر عبدالرضا استقامتی ریاست محترم ادارهٔ بیماری‌های قابل پیشگیری بـا واکسـن تقدیر و تشکر می‌نماییم.

در پایان، از کارکنان مرکز نشر صدا که در چاپ و انتشار این کتاب ما را همراهی کردند متشکریم.

این مجموعه بی‌شک خالی از نقص نیست. بی‌صبرانه در انتظار نظرات اصلاحی شما بزرگواران که پاسداران سلامت جامعه هستید می‌باشیم.

نویسندگان
تابستان ۱۳۸٤

مقدمه

کنترل مننژیت یکی از اولویت‌های سازمان جهانی بهداشت است که براساس وضعیت ابتلا به این بیماری در کشورهای مختلف منطقهٔ خاورمیانه، مستلزم سیستم‌های مراقبتی متفاوتی خواهدبود.

تعداد موارد ابتلا به مننژیت در دنیا سالیانه ۱/۲ میلیون نفر و مرگ ناشی از آن ۱۳۵،۰۰۰ نفر برآورد می‌شود.

نایسریا مننژیتدیس، *هموفیلوس آنفلوانزه* و *استرپتوکوکوس پنومونیه* به‌عنوان شایع‌ترین باکتری‌های پاتوژن مطرح‌بوده و مراقبت مننژیت ناشی از آنها یکی از بهترین راهکارهای کنترل این بیماری است. درحال حاضر توجه سازمان جهانی بهداشت به مراقبت از بیماری مننژیت در کودکان زیر ۵ سال معطوف شده و به‌طبع عفونت با ارگانیزم *هموفیلوس آنفلوانزه* که بیشترین درصد ابتلا را در کشورهای درحال توسعه تشکیل‌می‌دهد اهمیت زیادی دارد.

از سوی دیگر تعیین اثربخشی برنامهٔ واکسیناسیون علیه *هموفیلوس آنفلوانزه* و *استرپتوکک پنومونیه* و انجام واکسیناسیون درصورت نیاز و همچنین تشخیص زودرس اپیدمی بیماری منگوککی و مقابلهٔ مناسب با آن مستلزم تشخیص دقیق ثبت و گزارش‌دهی به‌موقع است.

مشکلاتی نظیر عدم توانایی آزمایشگاه‌ها در جداسازی پاتوژن مولد مننژیت، همچنین عدم گزارش‌دهی به‌هنگام و دقیق در سطوح مختلف ازجمله مواردی است که مراقبت از این بیماری را با مشکل مواجه‌می‌سازد. بنابراین ضمن بازنگری دستورالعمل اجرایی مراقبت از این بیماری، به‌منظور هماهنگی و ارتباط دقیق و منسجم بین آزمایشگاه و بخش‌های بهداشت

و درمان در سطوح مختلف سیستم مراقبت در تلاش هستیم. باشد که فراهم‌آوردن این مجموعه گامی باشد در این راستا و رسیدن به هدف متعالی سلامت جامعه و توسعهٔ انسانی.

«دکتر عبدالرضا استقامتی»
رئیس ادارهٔ بیماری‌های قابل پیشگیری با واکسن

تعـریـف

مایع مغزی‌نخاعی

CSF[1] اولین بار تـوسـط Cotango در سـال ۱۷٦٤ شناخته‌شد. عملکـرد این مایع که در اطراف مغز و نخاع جریـان دارد، تـأمین مـواد غـذایی، دفع مواد زائـد و حفاظت از سیستم اعصاب مـرکـزی است.

مایع مغـزی‌نخاعی از شبـکهٔ کـوروئید تـولیـدشده و مقـدار تـام آن در نوزادان ۶۰-۱۰ml و در بالغیـن ۱۷۰-۱٤۰ml است.

نمونهٔ CSF یک نمونهٔ اورژانس بوده و باید هرچه سریع‌تر آزمایش و نتایج آن گزارش‌شود.

جهت انجـام آزمـایش مـایع مغـزی‌نخـاعی و خـون مـراحـل زیـر مورد توجه قـرارمی‌گیـرد:

۱. ثبت اطلاعات
۲. نمونه‌گیری
۳. مراحل انجام آزمـایش روی مایع مغزی‌نخاعی

۱. ثبـت اطلاعـات

۱-۱- فرم درخواست انجام آزمایش‌های CSF/ خون

تـوصیه‌می‌شود اطلاعات مربوط بـه تمـام نمونه‌های بالینی در فرمی حـاوی موارد زیر ثبت‌شود:

۱. نام بیمار

1. Cerebrospinal Fluid

۲. نام پدر
۳. سن و جنس
۴. نام بیمارستان
۵. شمارهٔ اتاق/ شمارهٔ تخت
۶. نام و نشانی پزشک
۷. محل آناتومیک جمع‌آوری نمونه(نخاع کمری، شانت و ...)
۸. تاریخ و ساعت جمع‌آوری نمونه
۹. تشخیص بالینی و تاریخچهٔ بیماری
۱۰. مصرف آنتی‌بیوتیک و نوع آن در ٤۸ ساعت اخیر
۱۱. نوع نمونه(CSF / خون)
۱۲. آزمـایش مـورد درخـواست(کشت، شمارش سـلولی، بیـوشیمی(قنـد ـ پروتیئن ـ LDH[1]) و سـرولوژی[آگلوتیناسیـون لاتـکس[2] ـCRP[3]]).

۱-۲- اطلاعات مورد نیاز ثبت‌شده روی برچسب هر نمونه

نام بیمار:
شمارهٔ اتاق: شمارهٔ تخت:
نوع نمونه:
تاریخ و ساعت جمع‌آوری نمونه:
آزمایش مورد درخواست:

۱-۳- اطلاعات لازم جهت پذیرش نمونه(CSF/ خون) در آزمایشگاه

- کد پذیرش
- نام بیمار
- نوع نمونهٔ دریافتی
- تاریخ و ساعت نمونهٔ دریافتی

1. Lactate-Dehydroganase
2. Latex agglutination
3. C-Reactive Protein

۲. نمونه‌گیری

جمع‌آوری نمونه‌های بالینی در جداسازی و تعیین هویت عوامل میکروبی مولد منتژیت بسیار حائز اهمیت است. توصیه‌می‌شود تاحد امکان قبل از درمان آنتی‌بیوتیکی از بیمار نمونه‌گیری‌شده تا از نابودی میکروارگانیزم جلوگیری شود. **البته باید توجه‌داشت هرگز به‌منظور جمع‌آوری نمونه درمان بیمار به‌تأخیر نیفتد.** مایع مغزی‌نخاعی و خون باید هرچه سریع‌تر به آزمایشگاه منتقل‌شده و تحت آزمایش قرارگیرند.

روش جمع‌آوری CSF

جمع‌آوری نمونهٔ CSF روشی تهاجمی است و باید به دست افراد کارآزموده و در شرایط آسپتیک انجام‌شود. درصورت احتمال وجود منتژیت در بیمار، CSF بهترین نمونهٔ بالینی برای جداسازی و تعیین هویت عامل بیماری‌زا است. جمع‌آوری CSF توسط پزشک به روش LP[1] و کاملاً آسپتیک(عاری از هرگونه آلودگی میکروبی) و فقط برای تشخیص انجام‌می‌شود.

لازم است نمونه‌ها هرکدام به حجم تقریبی ۱-۳ml در سه لولهٔ استریل درپیچ‌دار شامل لولهٔ شمارهٔ ۱(مخصوص آزمایش‌های بیوشیمیایی)، لولهٔ شمارهٔ ۲(مخصوص آزمایش‌های میکروب‌شناسی)، لولهٔ شمارهٔ ۳(جهت بررسی سلولی) جمع‌آوری شود و برای انجام آزمایش‌های مربوط به آزمایشگاه ارسال شوند.

درصورتی که CSF ارسالی به مقدار کمتر از ۱ml و فقط در یک لوله باشد، جهت جلوگیری از آلودگی نمونه، ابتدا با سرسمپلر استریل مقداری از آن برای بررسی سلولی به بخش خون‌شناسی فرستاده‌می‌شود. سپس بقیهٔ آن سانتریفوژ شده، مایع رویی جهت آزمایش‌های بیوشیمیایی

1. Lumbur Puncture

به بخش بیوشیمی ارسال‌گردیده و از رسوب باقیمانده آزمایش میکروب‌شناسی به‌عمل می‌آید.

لازم به‌ذکر است که حداکثر زمان گردش کاری یادشده، نباید بیش از یک ساعت(در حرارت اتاق) باشد.

نکات ضروری

۱. انجام آزمایش CSF در هر زمان به‌عنوان یک آزمایش اورژانس تلقی‌می‌شود.
۲. از قراردادن نمونه در یخچال، حرارت زیاد و نور شدید اجتناب شود.
۳. از به‌کار بردن پنبه، جهت بستن سر لوله‌ها اکیداً خودداری‌شود.
۴. برای انتقال لوله‌ها از جالوله‌ای مناسب استفاده‌شود.
۵. درصورتی که امکان آزمایش فوری نمونه در آزمایشگاه میکروب‌شناسی وجود نداشته‌باشد، از محیط ترانس‌ایزولیت (T-I)[1] استفاده‌شود.
۶. لازم است نمونه توسط پزشک یا پرستار به آزمایشگاه منتقل‌شود.

۳. مراحل انجام آزمایش روی مایع مغزی‌نخاعی

۳-۱- بررسی فیزیکی(ظاهر - حجم)

- **حجم**: حجم CSF برحسب میلی‌لیتر گزارش‌می‌شود.
- **ظاهر**[2]: ظاهر طبیعی CSF زلال و شفاف(Clear-Crystal) است. ظاهر CSF را پس از بررسی به یکی از موارد صفحهٔ بعد(جدول‌های شمارهٔ ۱ و ۲) توصیف‌کنید.

1. Trans-Isolate
2. Appearance

جدول شمارهٔ ۱. اهمیت بالینی ظاهر CSF

ظاهر	موارد	علت‌ها
زلال ـ شفاف		نرمال
مه‌آلود، کدر، ابری	WBCs[1]	منتژیت
روغنی	مواد حاجب رادیوگرافیک	تزریق مادهٔ حاجب
خونی	RBCs[2]	خونریزی
زردفام	هموگلوبین	تخریب گلبول‌های قرمز در اثر خونریزی قدیمی یا صدمه ناشی از نمونه‌گیری
	بیلی‌روبین	افزایش سطح بیلی‌روبین سرم
	مرتیولات	آلودگی
	کاروتن	افزایش سطح سرمی کاروتن

جدول شمارهٔ ۲. تفکیک نمونه با ظاهر خونی(Bloody) با منشأ خونریزی یا نمونه‌گیری همراه با صدمه

مشاهده/ عامل	ناشی از خونریزی	ناشی از نمونه‌گیری همراه با صدمه
نحوهٔ توزیع خون	در هر سه لوله به‌صورت یکنواخت دیده‌می‌شود	در لولهٔ ۱ بیشتر است و کم‌کم در لوله‌های بعدی ازبین می‌رود
تشکیل لخته	بدون تشکیل لخته	به‌دلیل وجود فیبرینوژن پلاسما ممکن‌است لخته ایجادشود
محلول رویی زردفام	بلافاصله بعد از کشیدن مایع نخاعی وجوددارد	چون همولیز بعد از ۲ ساعت شروع‌می‌شود کم‌کم زردفام می‌شود

1. White Blood Cell
2. Red Blood Cell

اهمیت بالینی ظاهر CSF

توجه داشته‌باشید که ممکن‌است تا ۲۰۰ عدد WBC و تا ۴۰۰ عدد RBC در هر میکرولیتر، ظاهر طبیعی CSF را تغییرندهد، بنابراین باید همهٔ نمونه‌ها به‌طور میکروسکپی بررسی‌شوند.

۳ـ۲ـ آزمایش شمارش سلولی

اساس آزمایش، شمارش و شناسایی گلبول‌های سفید و قرمز در CSF است.

برای انجام شمارش سلولی لولهٔ مربوط ابتدا باید به‌آرامی مخلوط‌شود.

شمارش سلولی باید به‌سرعت انجام‌شود؛ زیرا طی مدت ۲ ساعت، ۴۰٪ لکوسیت‌ها ازبین می‌روند. درصورتی که نمونه‌ها به‌سرعت آزمایش نشوند، باید نمونهٔ مربوط به آزمایش‌های سلولی در یخچال با درجهٔ حرارت ۴°C نگه‌داری‌شود.

الف) آزمایش شمارش سلولی با استفاده از لام نئوبار

وسایل مورد نیاز:

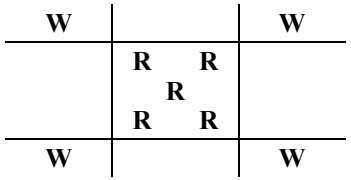
- لام نئوبار و لامل سنگی
- ملانژور شمارش RBC و WBC
- محلول رقیق‌کننده، مانند سرم فیزیولوژی‌ـمارکانو

روش انجام آزمایش

برای انجام شمارش سلولی ابتدا باید محتوی لوله را به‌آرامی مخلوط‌کنیم.

یک قطره CSF را بین لام و لامل گذاشته و زیر میکروسکوپ با درشت‌نمایی ۴۰x بررسی‌می‌نماییم. درصورتی که تعداد گلبول‌های سفید کمتر از ۵۰ عدد و گلبول‌های قرمز کمتر از ۱۰۰ عدد بود، نمونه مستقیم و بدون رقت توسط لام نئوبار شمارش می‌شود و اگر بیشتر بود، لازم است به نسبت مناسب با محلول رقیق‌کننده رقیق شود.

برای شمارش سلولی CSF به‌هیچ وجـه از سل‌کانتر استفاده‌نشود و باتوجـه به فرمول داده‌شده تعداد سلول‌ها مطابق شِمای زیر شمارش می‌شـود:



چنانچه نمونه برای شمارش گلبول‌های سفید رقیق نشده‌باشد، تعداد کل سلول‌هـای شمارش‌شـده در ٤ مربع WBC که با علامت W مشخص‌شـده در ۲/۵ ضرب و عـــدد نهایی به‌عنـوان تعداد کل گلبول‌های سفید در میلـی‌متر مکعب CSF گزارش‌شود و درصورت رقیق‌شدن، شمارش WBC طبق فرمول زیر محاسبه‌می‌شود:

$$\text{تعداد کل سلول در هر میلی‌متر مکعب} = \frac{\text{فاکتور رقت} \times \text{تعداد کل سلول شمارش‌شده}}{\text{حجم یک مربع} \times \text{تعداد مربع‌های شمارش‌شده}}$$

درصورتی که تعداد زیاد RBC در شمارش WBC اختلال به‌وجود آورد، طبق روش زیر عمل‌کنید.

روش تخریب RBC درصورت خونی بودن CSF

۱. بعد از مخلوط‌کردن لولـه، چهار قطـره از CSF را بـرداشتـه و در لـولهٔ دیگـری می‌ریـزیم.
۲. مقداری اسید استیک گلاسیال را در یک پیپت پاستور کشیده و خالی می‌کنیم.
۳. چهار قطره CSF فوق را داخل پیپت پاستور کشیده یک دقیقه صبرمی‌کنیم.
۴. بعد از تخلیهٔ کامل محتویات پیپت پاستور در لوله، آنها را مخلوط می‌نماییم.
۵. مجدداً محتویات لوله را با پیپت پاستور کشیده قطرهٔ اول را دورمی‌ریزیم و مابقی را با هموسیتومتر می‌خوانیم.
۶. تعداد WBC را شمارش می‌کنیم.

اگر جهت شمارش گلبول‌های قـرمـز عمل رقیق‌سـازی انجـام‌نگرفت، تعـداد کل گلبول‌های قـرمز شمارش‌شـده در ۵ مربـع مربوط به RBC که با علامت R مشخـص‌شده در ۵۰ ضـرب‌شده و عدد نهایی به‌عنوان تعداد کل گلبول‌هـای قـرمـز در میلی‌متـر معکب CSF گزارش‌شود. درصـورت انجام رقت، شمارش RBC طبق فرمول بـالا انجـام‌شـود.

تـوجـه: حجم خـوانش در یـک مـربـع W(شـمارش گلبـول سفیـد) بـرابـر بـا طـول × عرض × ارتفاع به‌ترتیب ۱ × ۱ × ۱/۱۰=۱/۱۰ خـواهدبـود.

تـوجـه: حجم خـوانـش در یـک مربـع R(شمـارش گلبـول قـرمـز) بـرابـر بـا طـول × عرض × ارتفاع به‌تـرتیب ۱/۵ × ۱/۵ × ۱/۱۰=۱/۲۵۰ خـواهدبـود.

تصحیـح تعـداد گلبول‌هـای سفیـد مـایع مغـزی‌نخـاعی در نمونـه‌هـای خـونی(Bloody)

زمانی که CSF بـه خـون آغشتـه باشـد، می‌تـوان تـعـداد گـلبول‌هـای سفید را ازطریق فرمـول زیر اصلاح‌نمـود، لازم است ابـتدا تعـداد WBC و RBC خون محیطی تعیین شود.

$$\text{گلبول سفید اضافه‌شده به CSF} = \text{گلبول سفید خون} \times \frac{\text{گلبول قرمز CSF}}{\text{گلبول قرمز خون}}$$

گلبول سفید اضافه‌شده به CSF ـ گلبول سفید شمارش‌شده CSF = گلبول سفید واقعی CSF

اگـر RBC و WBC خـون طبیعی باشـد، می‌تـوان به ازای هر ۷۰۰ عدد RBC موجود در CSF، یک سلول از لکوسیت‌هـای CSF حذف‌کرد.

مقادیر مرجع برای گلبول‌های سفید CSF

تعـداد WBC در افـراد بالغ ۵-۰ سلول در میکـرولیتـر و در نـوزادان ۳۰-۰ سلول در میکرولیتـر است.

ب) شمارش افتراقی گلبول‌های سفید CSF

به‌دلیل عدم دقت لازم در تشخیص و افتراق سلولی، از انجام شمارش افتراقی توسط لام نئوبار خودداری‌شود.

برای حصول اطمینان از مشاهدهٔ حداکثر تعداد سلول‌ها، نمونه باید قبل از تهیهٔ اسمیر سانتریفوژ شود.

اگر تعداد گلبول‌های سفید CSF زیاد باشد، نیازی به سانتریفوژ نمونه نیست.

وسایل مورد نیاز:

۱. لام نو
۲. سانتریفوژ
۳. رنگ رایت
۴. میکروسکوپ
۵. روغن ایمرسیون
۶. شمارشگر دستی سلولی(کانتردیف)

روش انجام آزمایش

- ابتدا لولهٔ شمارهٔ ۳ را به‌مدت ۱۰–۵ دقیقه در ۲۰۰۰rpm سانتریفوژ کنید.
- مایع رویی را برای آزمایش‌های دیگر جداکرده و نگه‌دارید و رسوب را با حجم کمی از این مایع مخلوط‌کنید.
- یک قطره از رسوب را روی لام قرارداده و بعد از پخش و خشک‌کردن در حرارت آزمایشگاه، با استفاده از رنگ رایت رنگ‌آمیزی کنید.
- با استفاده از عدسی × ۱۰۰ میکروسکوپ نوری و کانتردیف گلبول‌های سفید را شمارش افتراقی کنید.

باید همان دقتی را که درخصوص شمارش افتراقی WBC خون داریم در این‌جا نیز داشته‌باشیم. در CSF، سلول‌های شبکهٔ کوروئید–اپاندیم(سلول‌های داخلی بطن‌ها) و سلول‌های بدخیم ممکن‌است دیده‌شوند که در مورد اول طبیعی است. درصورت وجود سلول‌های به‌هم چسبیده با نامنظمی هسته یا هستک‌های پررنگ با یک پاتولوژیست مشورت کنید.

۳-۳- آزمایش‌های بیوشیمیایی CSF(لولهٔ شمارهٔ ۱)

چون CSF درواقع ناشی از فیلتراسیون خون و ترشح فعال به داخل بطن‌ها است، ترکیبات آن مشابه پلاسما نیست و تغییر در نفوذپذیری سد خونی مغزی(BBB)[1] موجب تغییرات بیوشیمیایی در آن می‌شود.

الف) اندازه‌گیری پروتئین CSF

روش‌های اندازه‌گیری پروتئین CSF

کدورت سنجی: این کار با استفاده از ۲ ماده اسید سولفوسالی سیلیک و تری‌کلرو استیک اسید انجام‌می‌شود. در روش اول بیشتر آلبومین رسوب داده‌می‌شود تا گلوبولین. در روش دوم آلبومین و گلوبولین به یک نسبت رسوب‌می‌کنند، بنابراین استفاده از روش دوم ارجحیت دارد. بهتر است هنگام انجام آزمایش از سرم انسانی با مقدار پروتئین مشخص یا سرم کنترل با آلبومین و گلوبولین جهت استاندارد استفاده‌شود.

در روش‌های یادشده، پروتئین تام اندازه‌گیری‌می‌شود و درصورت درخواست تعیین اجزای تشکیل‌دهنده لازم است از روش‌های نفلومتری یا ایمنوالکترو فورزیس استفاده‌شود.

وسایل و مواد مصرفی:

۱. فتومتر یا اسپکتروفتومتر

1. Blood Brain Barier

۲. محلول اسید سولفوسالی سیلیک ۳٪ یا TCA[1] ۱۰٪
۳. سمپلر
۴. لولـهٔ آزمایش
۵. کاغذ شطرنجی جهت رسم منحنی استاندارد

انجـام آزمـایش CSF بـا استفـاده از رفراکتومتر و یـا کیت‌هـای اندازه‌گیری پروتئین خون به‌دلیل مقادیر کم‌پـروتئین در CSF بـی‌ارزش است.

جدول شمارهٔ ۳. روش انجـام آزمایـش پـروتئین مـایع مغزی‌نخاعی بـه‌روش اسیـد سولفوسـالی سیلیک ۳٪

اسید سولفوسالی سیلیک ۳٪	آب مقطر	کنترل*	استاندارد**	مایع CSF	لوله
۲ml	–	–	–	۵۰۰λ	تست
۲ml	–	–	۵۰۰λ	–	استاندارد
۲ml	–	۵۰۰λ	–	–	کنترل
۲ml	۵۰۰λ	–	–	–	بلانک

* **تهیهٔ محلول سرم کنتـرل:** بـرای این کـار می‌توان از سرم کنترل‌هـای تجاری به نسبت ۱/۱۰۰، رقیق‌شـده با آب مقطر استفاده‌کـرد.

** **تهیهٔ محلول استاندارد:** جهت تهیهٔ محلول استاندارد، می‌توان از استاندارد کیت آلبومین یا پروتئین سرم استفاده‌کرد. باتوجه به این‌که غلظت پروتئین در استانداردهای فوق به‌میزان «گرم در دسی‌لیتر» است، باید آن را به نسبت ۱/۱۰۰(آب مقطر ۹/۹ml + ۱۰۰λ) رقیق‌کـرد.

پـس از ۱۰ دقیقه، انکوبـاسیون در درجـه حرارت اتـاق، در طـول موج ۶۲۰ نانومتر خوانده‌شده و با استفاده از فرمول زیر محاسبه‌می‌شود:

$$\text{غلظت استاندارد} \times \frac{ODT^{2}}{ODST^{3}} \times C^{4} = mg/dl$$

1. Trichloroacetic Acid
2. Optical Density Test
3. Optical Density Standard
4. Concentration

مقادیر مرجع پروتئین مایع مغزی‌نخاعی:

۱ روز – نوزاد(یک ماه)= ۲۵–۷۵mg/dl
۲–۳ ماه = ۲۰–۷۲mg/dl
۴–۶ ماه =۱۵–۲۰mg/dl
۷–۸ سال =۱۰–۴۵mg/dl
بزرگسال < = ۴۵mg/dl

ب) اندازه‌گیری قند CSF

وسایل و مواد مصرفی:

۱. لولهٔ آزمایش
۲. سمپلر
۳. فتومتر، اسپکتروفتومتر یا اتوانالایزر
۴. کیت آنزیمی اندازه‌گیری گلوکز
۵. محلول استاندارد و کنترل گلوکز
۶. بن‌ماری ۳۷°C

آزمایش گلوکز CSF مشابه آزمایش گلوکز سرم یا پلاسما انجام‌می‌شود. باتوجه به اینکه میزان گلوکز CSF، در فرد سالم معمولاً ۶۰٪ مقدار سرم یا پلاسما است، نتـایج بایـد بـا سطح پلاسمایی گلوگـز مقایسه‌شود. بنابراین جهت مقایسه قند خون و قند CSF، لازم است نیم‌ساعت قبل از نمونه‌گیری CSF، خون بیمار جهت تعیین مقدار گلوکز گرفته‌شـود تا فرصت تبادل بین خون و CSF وجود داشته‌باشد.

بـه‌علت انجـام سـریـع فرآیند گلیکولـیز در CSF، اندازه‌گیـری قنـد آن باید به‌سرعت انجام‌شود.

باید بـه این نکته تـوجه‌داشت کـه کاهش مقدار گلوکز در CSF علاوه‌بر

مصرف آن توسط باکتری‌ها، بیشتر ناشی از تغییر در مکانیزم انتقال آن از سد خونی مغزی(BBB) و افزایش مصرف آن توسط سلول‌های مغزی است.

ج) اندازه‌گیری سطح لاکتات CSF

افزایش سطح لاکتات در منتژیت باکتریایی یا قارچی نسبت به کاهش گلوکز حساس‌تر و قابل اعتمادتر است. این مقدار قبل از درمان بالابوده و با درمان موفقیت‌آمیز کاهش‌می‌یابد، بنابراین می‌توان جهت ارزیابی درمان استفاده‌شود.

چون RBC حاوی مقدار زیادی لاکتات است، در CSFهای زردفام ناشی از همولیز RBC، مقدار لاکتات به‌صورت کاذب بالا می‌رود.

جهت اندازه‌گیری سطح لاکتات در CSF می‌توان از روش‌های استاندارد انجام آن روی سرم یا پلاسما استفاده‌کرد.

۳ـ ۴ـ آزمایش‌های سرولوژی CSF

الف) آزمایش CRP

آزمایش CRP روی CSF، یکی از راه‌های افتراق منتژیت باکتریایی از ویروسی است. روش انجام این آزمایش مانند روش انجام آن با سرم است (انجام آزمایش CSF با کیت‌های معتبر مجاز است).

ب) آزمایش آگلوتیناسیون لاتکس

برای یافتن ذرات یا بقایای باکتری‌ها در CSF، می‌توان از آنتی‌سرم‌های اختصاصی براساس روش آگلوتیناسیون طبق دستورالعمل کیت استفاده‌کرد. اگر بلافاصله پس از دریافت نمونه قادر به انجام روش آگلوتیناسیون لاتکس نباشید، می‌توان نمونه را در حرارت ۸°C–۲ برای چند ساعت یا در برودت ۲۰°C– برای زمان بیشتری نگه‌داری‌کرد. جزئیات روش فوق در قسمت میکروب‌شناسی توضیح‌داده خواهدشد.

آزمایش‌های باکتری‌شناسی

هر چند میکروارگانیزم‌های متعددی عامل منتژیت عفونی هستند، ولی شایع‌ترین میکروارگانیزم‌های عامل این بیماری *استرپتوکک پنومونیه*، *هموفیلوس آنفلوانزه* و *نایسریا منتژیتیدیس* است. بنابراین در این بخش به تشخیص آزمایشگاهی این عوامل در مایع نخاعی و خون پرداخته‌می‌شود.

۱. مایع مغزی‌نخاعی(لولهٔ شمارهٔ ۲)

انتقال نمونهٔ CSF

شایع‌ترین میکروارگانیزم‌های عامل منتژیت *استرپتوکک پنومونیه*، *هموفیلوس آنفلوانزه* و *نایسریا منتژیتیدیس* هستند که ارگانیزم‌های بسیار سخت‌رشد و شکننده‌ای می‌باشند. بنابراین اگر مایع مغزی‌نخاعی هرچه سریع‌تر آزمایش‌شود با احتمال زیادتری از آن جدا خواهندشد.

نمونهٔ CSF باید به‌محض جمع‌آوری به آزمایشگاه میکروب‌شناسی منتقل‌شده و ظرف یک‌ساعت پس از نمونه‌گیری آزمایش‌شود(شکل شمارهٔ ۱). از قراردادن نمونهٔ CSF درمعرض نور خورشید، گرما و سرمای زیاد خودداری‌کنید.

اگر احتمال‌می‌دهید بیمار مبتلا به منتژیت منگوککی باشد و چند ساعت تأخیر در انجام آزمایش اجتناب‌ناپذیر است، درپوش لولهٔ محتوی CSF را شل‌کرده و آن را در حرارت ۳۵°C و در شرایط CO_2 ۵٪(جار محتوی شمع) نگه‌داری‌کنید. این کار احتمال زنده‌ماندن باکتری در نمونه را افزایش‌می‌دهد.

اگر انتقال نمونه به آزمایشگاه همان روز مقدور نباشد، نمونهٔ CSF را باید در شرایط استریل به محیط T-I منتقل و در طول شب در انکوباتور ۳۵°C نگه‌داری‌کرد.

محیط T-I محیطی بی‌فازیک است که برای کشت اولیهٔ منگوکک و سایر عوامل منتژیت باکتریال از CSF و خون به‌کار می‌رود(شکل ۲). این محیط به‌عنوان محیطی مغذی، نگه‌دارنده و نیز برای انتقال استفاده‌می‌شود.

نحوهٔ استفاده از محیط T-I

۱. محیط کشت T-I را در انکوباتور ۳۷°C–۳۵ گرم کرده یا مدتی در حرارت اتاق(۲۵°C) نگه‌داری‌کنید.
۲. سرپوش پلاستیکی سر لولهٔ حاوی T-I را ابتدا با الکل و سپس با بتادین ضدعفونی‌کرده و صبرکنید تا خشک‌شود.
۳. ۱ml از CSF را به داخل محیط T-I تلقیح‌کنید.
۴. بقیهٔ CSF را در سرنگ و در حرارت اتاق نگه‌داشته و رنگ‌آمیزی گرم انجام‌دهید. از قراردادن نمونه در یخچال خودداری‌کنید.
۵. لولهٔ T-I را به‌مدت ۲۰–۱۸ ساعت در حرارت ۳۵°C قراردهید.
۶. برچسب حاوی مشخصات بیمار، تاریخ و ساعت جمع‌آوری نمونه را روی لولهٔ T-I بچسبانید.

می‌توان محیط T-I را در حرارت ۳۵°C تا هفت روز نگه‌داری‌کرد. بهتر است جهت تهویهٔ محیط T-I، به‌محض تلقیح یا بعد از گذشت ۲۴ ساعت، با استفاده از سوزن استریل(مخصوص تزریقات زیرجلدی مانند سرنگ انسولین) شرایط تهویهٔ محیط کشت را فراهم‌کنیم. دراین صورت امکان حیات و رشد عوامل بیماری‌زا راحت‌تر فراهم‌می‌شود. اگر انتقال نمونه به آزمایشگاه با تأخیر باشد، لولهٔ T-I تهویه‌شده را می‌توان به‌مدت طولانی در حرارت اتاق(۳۰°C–۲۵) نگه‌داری‌کرد. قبل از ارسال نمونه سوزن تهویه را جداکنید. لازم است درحین تلقیح نمونه به محیط یا کشیدن نمونه از محیط برای جلوگیری از آلودگی محیط کشت شرایط استریل رعایت‌شود.

کشت از محیط انتقالی CSF(T-I)

پس از گذشت ۲۴ ساعت انکوباسیون با استفاده از سرنگ، مقدار ۰/۱ml از مایع موجود در لولهٔ T-I را به محیط کشت‌های آگار خون‌دار و آگار شکلاته منتقل و آن را پخش‌کرده و مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۵°C حاوی CO_2 قرارمی‌دهیم.

جهت اطمینان از خلوص کلنی‌ها، اسمیر تهیه‌کرده و رنگ‌آمیزی گرم انجام‌دهید.

اگر بعد از گذشت ۴۸ ساعت رشدی مشاهده‌نشد، در روز سوم و سپس هفتم از محیط T-I، روی محیط‌های یادشده کشت مجددی تهیه‌کنید.

کشت اولیه، کشت مجدد و تشخیص احتمالی

۱. کشت اولیه CSF

۱. به‌محض دریافت CSF در آزمایشگاه میکروب‌شناسی نمونه را مدت ۱۵ دقیقه در ۲۰۰۰rpm سانتریفوژ کنید.
۲. مایع رویی را با پیپت پاستور کشیده و آن را جهت جستجوی آنتی‌ژن‌های باکتریایی با روش آگلوتیناسیون لاتکس نگه‌دارید.
۳. لولهٔ حاوی رسوب را به‌خوبی تکان‌داده یا ورتکس کنید.
۴. برای کشت و رنگ‌آمیزی گرم از ۲–۱ قطره رسوب استفاده‌کنید.

توجه: اگر کمتر از ۱ml CSF در دسترس است، بدون سانتریفوژ به‌طور مستقیم برای کشت و رنگ‌آمیزی گرم از آن استفاده‌کنید.

بهترین محیط جهت جداسازی *استرپتوکک پنومونیه* آگار خون‌دار محتوی ۵٪ خون گوسفند یا اسب است. **خون انسان جانشین مناسبی نیست.** مناسب‌ترین محیط برای جداسازی *هموفیلوس آنفلوانزه* محیط شکلات آگار مغذی‌شده با «همین»[1] و فاکتور رشدی نظیر ایزوویتالکس، ساپلمنت B

1. Haemin

و یا ویتوکس است(جهت ساخت محیط شکلات آگار استاندارد به ضمیمه مراجعه‌کنید).

درصورت عدم دسترسی به فاکتورهای رشد ذکرشده می‌توان از تلقیح هم‌زمان *استافیلوکک ارئوس* روی پلیت آگار خون‌داری که به آن CSF تلقیح شده‌است استفاده‌کرد.

درصورت تلقیح *استافیلوکک ارئوس*، کلنی‌های اقماری هموفیلوس در اطراف محل تلقیح استافیلوکک ظاهر خواهندشد.

نایسریا منتژیتیدیس مانند *استرپتوکک پنومونیه* روی هر دو محیط آگار خون‌دار و شکلات آگار رشدمی‌کند. اگر فقط امکان استفاده از یک نوع محیط کشت وجوددارد، بهترین انتخاب محیط شکلات آگار است؛ زیرا هر سه عامل بیماری‌زا روی آن رشدمی‌کنند.

روش صحیح کشت جهت دستیابی به کلنی‌های مجزا از هر یک از باکتری‌های فوق، در شکل‌های شمارهٔ ۳، ٤ و ۵ نشان‌داده شده‌است.

پلیت‌های آگار بعد از تلقیح در انکوباتور حاوی CO_2 ۵٪ یا جار محتوی شمع قرار داده‌می‌شود. بهتر است هم‌زمان با تلقیح پلیت‌ها از یک عدد محیط مایع برین هارت اینفیوژن(BHI)[1] برای کشت نمونه باکتریایی استفاده‌شود تا در زمان بروز هر نوع مشکل در روند جداسازی یا شناسایی باکتری، دسترسی به باکتری زنده امکان‌پذیر باشد.

درصورت استفاده از محیط T-I بعد از ۲٤ ساعت، با استفاده از سرنگ و سوزن استریل مقدار ۱۰۰µL از سوسپانسیون T-I را به داخل محیط آگار خون‌دار و محیط شکلات آگار تلقیح‌کرده و کشت دهید.

الف) روش رنگ‌آمیزی گرم برای CSF

استفاده از روش رنگ‌آمیزی گرم روی رسوب مایع مغزی‌نخاعی یا جستجوی آنتی‌ژن‌های اختصاصی در CSF به روش آگلوتیناسیون لاتکس،

1. Brain Heart Infusion

امکان تشخیص احتمالی منتژیت باکتریایی با عوامل یادشده را فراهم‌می‌کند. به‌گونه‌ای که نتایج مثبت هر کدام از این روش‌ها، حتی درحالت عدم رشد باکتری در محیط‌های کشت ممکن‌است نشانگر بروز عفونت در CSF باشد.

رنگ‌آمیزی گرم

وسایل مورد نیاز

۱. اسلاید نو و تمیز
۲. لوپ یا پیپت پاستور استریل

جهت ساخت محلول‌های رنگ گرم به قسمت ضمیمه مراجعه‌شود.

تأکیدمی‌شود از کیت‌های آماده مصرف رنگ‌آمیزی گرم استفاده‌نشود.

روش کار

۱. مایع مغزی‌نخاعی را مدت ۱۵ دقیقه در ۱۵۰۰g سانتریفوژ کنید.
۲. یک عدد لام را با الکل تمیزکرده و خشک‌کنید. سپس با قراردادن ۲-۱ قطره از رسوب مایع فوق، بدون پخش‌کردن قطره‌ها گستره تهیه‌کنید. از قراردادن قطره‌های خیلی زیاد روی لام خودداری‌کنید.
۳. لام را تا خشک‌شدن کامل ترجیحاً در زیر هود بیولوژیک قراردهید تا وقتی لام به‌طور کامل خشک‌نشده از حرارت‌دادن آن خودداری‌کنید.
۴. گسترهٔ موردنظر را ۳ مرتبه روی شعله حرکت‌دهید تا ثابت‌شود. به‌جای استفاده از روش شعله می‌توان از متانول ۱۰۰٪-۹۵٪ جهت ثابت‌کردن آن استفاده‌کرد.
۵. کریستال ویوله را روی لام ریخته و ۱ دقیقه صبرکنید.
۶. به‌آرامی آب‌کشی کرده و آب اضافی را سرازیرکنید.
۷. محلول ید را روی لام ریخته و ۱ دقیقه صبرکنید.

۸. به‌آرامی آب‌کشی کرده و آب اضافی را سرازیرکنید.
۹. توسط الکل استن عمل رنگ‌بری را در سریع‌ترین زمان ممکن انجام‌دهید.
۱۰. سافرانین را روی لام ریخته و ۳۰ ثانیه صبرکنید.
۱۱. لام را به‌آرامی آب‌کشی کرده و بگذارید خشک‌شود.
۱۲. لام رنگ‌شده را توسط میکروسکوپ نوری و با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ بررسی‌کنید.

نایسریا منتژیتیدیس به شکل دیپلوکک‌های گرم منفی مشابه دانهٔ قهوه در داخل و یا خارج از لکوسیت‌های چندهسته‌ای مشاهده‌می‌شود. (شکل شمارهٔ ٦ـالف)

استرپتوکک پنومونیه دیپلوکک گرم مثبتی است که گاهی به شکل زنجیره‌های کوتاه دیده‌می‌شود. (شکل شمارهٔ ٦ـب)

هموفیلوس آنفلوانزه به شکل باسیل یا کوکوباسیل‌های گرم منفی چندشکلی و کوچک با آرایش و قرارگیری تصادفی مشاهده‌می‌شود. (شکل شمارهٔ ٦ـج)

ب) روش کلی انجام آزمایش‌های آگلوتیناسیون لاتکس

در این قسمت به برخی از توصیه‌های عمومی برای یافتن آنتی‌ژن‌های محلول باکتریایی در مایع CSF می‌پردازیم. در زمان استفاده از هر یک از کیت‌های تجاری رعایت دقیق دستورالعمل سازنده الزامی است.

برای دستیابی به نتایج بهتر لازم است بعد از انجام سانتریفوژ به‌سرعت مایع رویی CSF را آزمایش‌کنید. درصورت عدم امکان انجام این کار، می‌توان نمونه را به‌مدت چند ساعت در حرارت ۸°C-۲ در یخچال قرارداده و یا به‌مدت طولانی‌تر در سرمای ۲۰°C- در فریزر نگهداری‌کرد.

معرف‌ها را بعد از انجام آزمایش مجدداً در یخچال قراردهید تا از فاسدشدن آنها جلوگیری‌شود. درغیر این‌صورت نتایج آزمایش قابل اعتماد نخواهدبود. سوسپانسیون لاتکس را هرگز منجمدنکنید.

روش انجام آزمایش

- مایع رویی CSF را به‌مدت ۵ دقیقه در بن‌ماری جوش قراردهید.
- سوسپانسیون لاتکس را به‌آرامی تکان‌دهید تا یکنواخت شود.
- یک قطره از هر یک از سوسپانسیون‌های لاتکس را روی یک اسلاید تمیز بچکانید.
- ۳۰-۵۰µL از CSF را به هریک از قطره‌های سوسپانسیون اضافه‌کنید.
- لام را به‌مدت ۱۰-۲ دقیقه با دست و درصورت وجود روتاتور در ۱۰۰rpm بچرخانید.

خواندن نتایج

در زیر نور کافی و بدون استفاده از ذره‌بین بررسی‌کنید.

نتیجهٔ مثبت: کلامپینگ قابل مشاهدهٔ ذرات لاتکس ظرف ۲ دقیقه ظاهرمی‌شود.

نتیجهٔ منفی: سوسپانسیون در این حالت به‌صورت هوموژن(یکنواخت) و شیری باقی‌می‌ماند.

۲. خون

برای تشخیص منتژیت باکتریایی، درصورت عدم امکان انجام LP به دلایل تکنیکی یا وجود منع انجام آن باید اقدام به کشت خون نمود.

نمونه‌گیری و انتقال

در زمان خون‌گیری، امکان انتقال عفونت از بیمار به نمونه‌گیر و یا برعکس وجوددارد. عوامل ویروسی بیشترین خطر را دارند و ممکن‌است حتی به عفونت‌های کشنده منجرشوند. ازاین میان می‌توان به ویروس‌های مولد هپاتیت و HIV اشاره‌کرد. برای کاهش خطر انتقال این عفونت‌ها توصیه‌می‌شود از دستکش لاتکس غیرقابل نفوذ به مایعات استفاده‌شود.

روش تهیهٔ نمونه خون برای کشت:

۱. ابتدا محل رگ قبل از ضدعفونی مشخص‌شود.
۲. سطح پوست به‌صورت دایره‌ای در حدود 5cm با الکل ۷۰٪ تمیزشده و در هوا خشک‌شود.
۳. از مرکز دایره با Povidone-iodine(بتادین) کاملاً ضدعفونی‌شده و حداقل ۱ دقیقه زمان گرفته‌شود.
۴. پس از انجام خون‌گیری بدون تعویض سرسوزن، خون به بطری کشت خون تلقیح‌شود.
۵. پس از خون‌گیری محل نمونه‌گیری با الکل ۷۰٪ تمیز شود.

نکات مهم:

— در هنگام خون‌گیری از بیماران مختلف پوشیدن و تعویض دستکش اجباری است.
— خون جمع‌آوری‌شده از بیمار باید به‌سرعت به محیط کشت خون تلقیح‌شود تا از لخته‌شدن آن در سرنگ جلوگیری‌گردد. باید سرنگ و سرسوزن را در ظرف مخصوص(Safety box) که قابلیت اتوکلاوشدن دارد قرارداده، از هر نوع تلاش برای گذاشتن درپوش روی سرسوزن جداً خودداری‌شود.
— برچسب حاوی مشخصات بیمار به سطح شیشهٔ کشت خون چسبانده‌شود.
— برای انتقال به آزمایشگاه میکروب‌شناسی، محیط کشت خون را در ظرف‌های مخصوص حمل‌ونقل قراردهید.
— پس از اتمام کار دستکش‌ها را درآورده و در ظرف‌های قابل اتوکلاو بیندازید.
— بعد از درآوردن دستکش‌ها، بلافاصله دست‌ها را با آب و صابون بشویید.

— درصورت فرورفتن سوزن به دست یا هر حادثهٔ دیگر که به زخمی‌شدن پوست منجرشود، زخم را با آب و صابون شسته و با کمی فشار به خارج‌شدن خون کمک‌کنید. هر نوع آلودگی دست یا هر نقطه از بدن با خون، یا زخمی‌شدن پوست را به سوپروایزر یا پزشک اطلاع‌دهید.

عوامل مؤثر در بهبود جداسازی میکروارگانیزم‌ها از خون

عوامل زیر حساسیت محیط‌های کشت خون را تحت تأثیر قرارمی‌دهند:

— زمان خون‌گیری
— تعداد کشت‌های خون(از هر بیمار)،
— حجم خون جمع‌آوری‌شده،
— روش خنثی‌سازی عوامل ضدمیکروبی در خون.

از آن‌جا که جمع‌آوری مقادیر زیاد خون از کودکان مشکل است به‌طور معمول ۱–۳ml خون کافی است. این مقدار خون در ۲۰ml محیط کشت خون رقیق‌می‌شود(۱:۱۰ تا ۱:۲۰). حجم خون جمع‌آوری‌شده از افراد بالغ به‌میزان ۵–۱۰ml است که در ۵۰ml از محیط کشت خون رقیق‌می‌شود(۱:۵ تا ۱:۱۰).

محیط‌های کشت خون ساخته‌شده از TSB[1] یا برین هارت اینفیوژن(BHI) امکان رشد هموفیلوس *آنفلوانزه* را فراهم‌می‌کند.

خنثی‌سازی ویژگی‌های باکتریسیدال خون و آنتی‌بیوتیک‌های احتمالی با مهارکننده‌های شیمیایی نظیر ۳٪–۰/۰۲۵٪ SPS(سدیم پولی‌آنتول سولفونات) به محیط کشت و نیز رقیق‌سازی خون صورت‌می‌گیرد. SPS فعالیت‌هایی نظیر ضدفاگوسیتی، ضدانعقاد، ضدکمپلمانی و ضدلیزوزومی دارد. اگر این ماده در مقادیر خیلی بالا استفاده‌شود، اثر مهارکننده‌ای در رشد میکروب‌ها خواهدداشت.

1. Trypticase Soy Broth

بعـد از جمـع‌آوری، خـون بایـد ظرف ۱ دقیقـه بـه محیـط کشت خون تلقیح‌شود. تـأخیر بیش از این موجب لخته‌شدن خون در سرنگ خواهدشد؛ زیرا برای گرفتن خون از رگ بیمار از مادهٔ ضدانعقاد استفاده‌نمی‌شود. اگر بطری کشت خون حاوی دیافراگم است، باید قبل از سوراخ‌کردن، آن را با الکل ۷۰ و سپس بتادین ضدعفونی کرده و بعد از خشک‌شدن عمل تلقیح انجام‌شود. بطری را چندبار تکان‌دهید. سرنگ و سرسوزن را بدون قراردادن درپوش آن در ظرف‌هـای مخصـوص بیندازید. درصـورت لـزوم دیـافراگم را دوباره تمیزکنیـد. بـرچسب حاوی مشخصـات بیمـار، تـاریخ و سـاعت جمع‌آوری خـون را روی بطـری بچسبانید.

مـحیط کشت تلقیح‌شـده بـلافاصله بـه آزمـایـشگاه منتقل‌شـده در اتـو ۳۵°C قـرار داده‌شـود.

کشت مجـدد

شیشه‌های کشت خون را ظرف ۲۴-۶ ساعت(صرف نظر از وجود علائم رشد) کـشت داده(Blind Sub Culture) و سپس تا ۷ روز هر روز بررسی‌کنید. هر نـوع کـدورت یا لیز گلبول‌های قرمز ممکن‌است نشانگر رشد میکـروبـی بـاشـد و بـه‌طورحتم باید بـلافاصله کشت مجدد انجام‌شـود.

توجه داشته‌باشید که ممکن‌است علی‌رغم عدم وجـود کدورت، رشد میکروبی وجود داشته‌بـاشد. بنابـراین ضـروری است در فواصل ۲۴-۶ ساعت اولیه بعد از تلقیح، رأس ۴۸ ساعت و نیز در روز هفتم، کشت مجدد انجام‌شود.

درضمن به‌خاطر داشته‌باشیـد که لازم است قبـل از انجـام کشت مجـدد شیشهٔ کشت خون را چند بار تکان‌دهیـد.

جهت برداشت خـون از محیط کشت، درپوش محیط کشت را با الکل و سپس بتادین ضدعفونی‌کرده و مقدار کمی(۰/۵ml) از خـون را کشیده و بـه محیط آگار منتقل‌کنیـد.

به‌طور معمول، از هر دو محیط آگار خون‌دار و آگار شکلاته استفاده‌می‌شود. درصورت استفاده از یک محیط، بهتر است محیط، آگار شکلاته باشـد؛ زیرا این محیط فاکتورهای رشد ضروری جهت رشد *همـوفیلوس آنفلوانزه* را دارد درحالی که آگار خون‌دار فاقد فاکتورهـای ذکرشده است، بعد از انجام عمل تلقیـح و پخش قطرهٔ خون در سطح آگار، پلیت‌هـا را مـدت ۴۸ ساعـت در انکوباتور CO_2 قرارمی‌دهیم. درصورت وجود رشد در این پلیت‌ها، دیگر به نگه‌داری محیط‌های کشت خون نیاز نیست.

بررسی ظاهر کلنی‌ها

نایسریا منتژیتیدیس روی محیط آگار خون‌دار به‌خوبی رشدمی‌کند درحالی که *همـوفیلوس آنفلوانزه* فاقد این خصوصیت است. هر دو باکتـری ذکـرشده روی محیط آگار شکلاته تا حدودی کلنی‌هایی یک شکل دارند. ولی باید توجه‌داشت که از کلنی‌های *همـوفیلوس آنفلوانزه* بوی اندول به مشام می‌رسد. کلنی‌هـای همـوفیلوس بزرگ، پهن، مات و بی‌رنگ یـا خـاکستـری هستنـد. همولیز یا تغییر رنگ محیط مشاهده‌نمی‌شود. (شکل شمارهٔ ۷)

کلنی‌های جوان *نایسریا منتژیتیدیس* گرد، صاف، مرطوب و براق و محدب هستند. بعضی کلنی‌ها به یکدیـگر متصل‌بـوده و رنگ آنها خاکستری است. علی‌رغم ایـن پیگمان مشاهده‌نمی‌شود. کـلنی‌های کهنه‌تـر رنگ خاکستری کدرتری دارند و محیط زمینه را تیره‌رنگ می‌کنند.

کلنی‌های مجزا بعد از ۱۸ ساعت قطری معادل ۱mm و بعد از گذشت چند روز قطری حدود ۴mm پیدامی‌کنند(شکل شمارهٔ ۸). *استـرپتوکک پنومونیه*، کلنی‌هایی کوچک، خـاکستری، مرطوب(گاهی موکوئید)، آبکی با حاشیـه‌ای از همولیـز α روی آگار خون‌دار و نیز آگار شکلاته دارد. (شکل شمارهٔ ۹)

کلنی‌های جـوان پنـومـوکک بـرآمده و تـا حـدودی شبیـه کـلنی‌هـای *استرپتوکک ویـریـدانس* هستنـد.

کلنی‌های برآمده با گذشت زمان پهن‌شده و مرکز آنها حالت فرورفته پیدامی‌کند. استفاده از ذره‌بین دستی در افتراق کلنی‌های پنوموکک از *استرپتوکک ویریدانس* کمک‌کننده است.

درنهایت می‌توان باتوجه به ویژگی‌های رشد باکتری روی محیط‌های آگار خون‌دار و آگار شکلاته و نیز با درنظر گرفتن ویژگی‌های مورفولوژیک ازطریق مشاهدهٔ میکروسکوپی تشخیص احتمالی را مطرح‌کرد. (شکل‌های شمارهٔ ۱۰ و ۱۱)

۱. شناسایی نایسریا منتژیتیدیس

بعد از رشد کلنی‌ها(شکل شمارهٔ ۱۲) و اطمینان از خلوص آنها به کمک رنگ‌آمیزی گرم، انجام آزمایش‌های زیر برای اطمینان از هویت باکتری توصیه‌می‌شود. لازم به‌ذکر است جهت دستیابی به نتایج قابل اعتماد، استفاده از کلنی‌های تازه ضروری است.

آزمایش اکسیداز به روش کواکس

آزمایش اکسیداز نشان‌دهندهٔ وجود آنزیم سیتوکروم اکسیداز است. این آنزیم به‌عنوان آخرین حلقه در زنجیرهٔ تنفسی هوازی باعث انتقال الکترون به اکسیژن می‌شود. ترامتیل پارافنیلن‌دی‌آمین دی‌هیدروکلراید ماده‌ای است که در حضور اکسیژن و آنزیم سیتوکروم اکسیداز به‌عنوان پذیرندهٔ مصنوعی اکسیژن اکسیدشده و به اندوفنل بلو تبدیل می‌شود که با رنگ آبی تیره مشخص خواهدشد.

تهیهٔ معرف اکسیداز

برای جلوگیری از فساد معرف اکسیداز(ترامتیل ـ p ـ فنیلن‌دی‌آمین دی‌هیدروکلراید) لازم است این ماده در ظرفی با درپوش محکم و داخل ظرف دیگری حاوی مادهٔ جاذب رطوبت در محلی خنک و تاریک قرارگیرد.

از پودر معرف، محلولی ۱٪ در آب مقطر آماده‌کنید. ۱۰ml از محلول را در مقادیر ۱ml تقسیم‌کرده و در سرمای ۲۰°C– در فریزر نگه‌داری‌کنید. در موقع مصرف، یک ویال ۱ml را از فریزر خارج‌کرده، پس از ذوب‌شدن به تعداد مورد نیاز، کاغذ فیلتر را به معرف آغشته‌کرده در پلیت تمیز قراردهید.

توجه: به‌دلیل ایجاد تحریک، از تماس معرف اکسیداز با پوست و چشم خودداری‌نمایید. درصورت تماس اتفاقی، پوست و یا چشم را با مقادیر زیادی آب به‌مدت حداقل ۱۵ دقیقه شستشودهید.

روش انجام آزمایش

با استفاده از لوپ پلاتینی، پلاستیکی یا انتهای بدون پنبهٔ یک سواب چوبی، مقداری از کلنی را روی کاغذ فیلتر حاوی معرف بمالید(شکل شمارهٔ ۱۳). به‌دلیل امکان ایجاد نتایج مثبت کاذب از لوپ جنس دیگر استفاده‌نکنید.

تفسیر نتایج

نتیجهٔ مثبت به شکل ظهور رنگ ارغوانی به‌مدت ۱۰ ثانیه قابل مشاهده خواهدبود. واکنش‌های تأخیری احتمال تشخیص *نایسریا منتژیتیدیس* را کاهش‌می‌دهند. توجه داشته‌باشید این آزمایش به‌طور کامل به *نایسریا منتژیتیدیس* اختصاص ندارد و ممکن‌است سایر اعضای جنس نایسریا و نیز باکتری‌هایی از گونه‌های دیگر نیز در این آزمایش واکنش مثبت داشته‌باشند.

شناسایی گروه‌های سرمی نایسریا منتژیتیدیس

براساس پلی‌ساکاریدهای کپسولی، ۱۳ گروه سرمی شناسایی شده‌است:
A, B, C, D, H, I, K, L, W135, X, Y, Z ,’ (29 E).

شایع‌ترین گروه‌های سرمی مشاهده‌شده در سراسر دنیا A، B، C، W135 و Y هستند. گروه سرمی A و بعد از آن C، شایع‌ترین انواع در اپیدمی‌های آفریقا و آسیا هستند.

روش انجام آزمایش

یک عـدد لام را بـا استفـاده از الکل به‌طور کامل تمیزمی‌کنیم. لام را به سه قسمت تقسیم‌کرده مقدار ۱۰µL از سرم فیزیولوژی حاوی فرمالین ۰/۵٪(برای کشتن باکتری‌ها و کاهش خطر احتمالی سرایت به کارکنان آزمایشگاه) روی هر قسمت از لام قرارداده، مقداری از کلنی میکروبی را به‌وسیلهٔ لوپ برداشته و سوسپانسیونی با غلظت متوسط در سرم فیزیولوژی فـوق درست‌می‌کنیم.

تـوجه: فرمـالین مـاده‌ای سرطان‌زا است و بایـد در نگه‌داری و استفاده از آن دقت کافی بـه‌عمل آیـد.

درصورت عدم استفاده از سـرم فیزیـولوژی حـاوی فـرمـالین می‌تـوان مراحل انجام آزمایش را در زیر هـود بیولوژیک نـوع ۲ انجام‌داد.

در کنار هر سوسپانسیون میکروبی یک قطره از آنتی‌سرم موردنظر(اغلب ۲ آنتی‌سرم) و یـک قطـره سرم فیزیولوژی بدون فرمالین قرارداده، سپس هر آنتی‌سرم را با سوسپـانسیون مجاور مخلوط‌می‌کنیم و ضمـن چرخانـدن لام بـه‌مـدت ۲-۱ دقیقه، آن را در زیـر نـور کـافی(چـراغ مطالعه) روی زمینـهٔ تیـره مشـاهده‌می‌کنیـم.

در نـواحی آفریقـا و آسیا، آزمایـش بـا آنـتی‌سـرم‌هـای A و C و سـرم فیزیولوژی(برای بررسی وجود اتـوآگلوتیناسیون) جهت شنـاسـایی و تعیین هویت اکثر سویه‌ها کافی خواهدبود. درصورت عدم واکنش با آنتی‌سرم‌های A و C، از آنتی‌سرم‌های Y، W135 و B استفاده‌کنیـد.

بررسی نتایج

آگلوتینـاسیـون فقط بایـد در مخلـوط آنتـی‌سـرم و سـوسپانسیون میکروبی دیـده‌شـود و مشـاهـدهٔ آن در مخلوط سـرم فیـزیـولـوژی و سـوسپانسیون میکروبـی، دلالت بـر اتوآگلوتیناسیـون دارد. (شکل شمارهٔ ۱۴)

آگلوتیناسیون با تعدادی از آنتی‌سرم‌ها در غیـاب آگلـوتیناسیون در سرم فیـزیولوژی، دلالت بر خشن بودن نوع کلنی‌ها دارد. درصورت عـدم وجود هر نـوع آگلوتیناسیـون بـا آنتی‌سـرم‌هـا و سـرم فیزیولوژی سـویـه غیرقابل گروه‌بندی اعلام خواهدشد. اگر از کلنی‌هـای جوان و تازه استفاده‌شود، این نتیجه به‌نـدرت مشاهده‌می‌شـود.

آنتی‌سـرم و سـرم فـیزیـولـوژی را بـعد از مـصـرف در سرمای ۴°C در یخچال نگـه‌داری‌کنیـد.

مصرف کربـوهیدرات‌ها توسط نایسریـا مننژیتیدیس

این آزمایش برای تأیـید تشخیص *نـایسریا مننژیتیدیس* بـه‌کار می‌رود. برای این منظـور از غلظت ۱٪ قندهـای گلـوکـز، مالتـوز، لاکتـوز و سوکروز در سیستین تریپتیکیس آگـار(CTA)[1] استفـاده‌شـود.

اعضـای جنس نـایسریـا قندهـا را به روش تخمیـر استفاده‌نکرده، بلکه ازطریق اکسیداسیون مورد استفاده قـرارمی‌دهنـد. *نایسریا مننژیتیدیس* گلوکز و مالتـوز را مصـرف‌می‌کنـد درحـالی کـه لاکتوز و سوکروز دست‌نخـورده باقی‌می‌مانند. مـعرف فنل رِد مـوجـود در محیط، درصـورت مصرف قنـد و تولید اسیـد و ایجاد pH معادل ۶/۸ یـا کمتر، زردرنگ خـواهدشـد.

روش انجام آزمایش

- بـا استفاده از یک آنس استریل‌شده، مقدار انـدکی از کلنی را از محیط آگار خون‌دار یا آگـار شکلاته ۲۴-۱۸ ساعته برداشته و در محیط‌های حاوی قند تلقیح‌می‌کنیم بـه‌طوری کـه ۱۰mm فوقانی محیط کشت را دربرگیرد. این عمل در هـر لوله بایـد چنـد مرتبه انجام‌شود(تلقیح در نواحی مختلف محیط کشت).

1. Cystine Trypticase Agar

- قبل از تلقیح به محیط کربوهیدراته، آنس را روی شعله کاملاً بسوزانید تا از انتقال یک نوع کربوهیدرات به محیط کربوهیدراتهٔ دیگر جلوگیری‌شود.
- درپوش لوله‌ها را به‌طور کامل بسته و در انکوباتور ۳۵°C(بدون CO_2) قراردهید. قبل از ثبت نتیجهٔ منفی حداقل به‌مدت ۷۲ ساعت محیط‌های کربوهیدراته را در انکوباتور نگه‌داری‌نمایید.

بررسی نتایج

علائم و نشانه‌هایی نظیر مشاهدهٔ رنگ زرد و کدورت واضح در قسمت فوقانی محیط، نشانگر رشد باکتری و تولید اسید و دلیل بر مثبت‌بودن واکنش است(شکل شمارهٔ ۱۵). اگرچه ممکن‌است نتیجهٔ مثبت واکنش ظرف ۲٤ ساعت ظاهرشود، ولی قبل از گذشت ۷۲ ساعت نباید به تفسیر قطعی نتایج منفی اقدام‌کرد.

جدول شمارهٔ ٤. مصرف کربوهیدرات توسط گونه‌های مختلف نایسریا و موراکسلا کاتارالیس

گونه‌ها	تولید اسید از:			
	گلوکز	مالتوز	لاکتوز	سوکروز
نایسریا منتژیتیدیس	+	+	–	–
نایسریا گونوره‌آ	+	–	–	–
نایسریا سیکا	+	+	–	+
نایسریا لاکتامیکا	+	+	+	–
موراکسلا کاتارالیس	–	–	–	–

۲. شناسایی استرپتوکوکوس پنومونیه(پنوموکک)

کلنی‌های پنوموکک کوچک، خاکستری، موکوئید(بلغمی) است که توسط هاله‌ای از همولیز آلفا، به رنگ سبز احاطه‌شده و روی هر دو محیط آگار خون‌دار و شکلاته مشاهده‌می‌شوند.

جهت افتراق کلنی‌های پنوموکک از *استرپتوکک ویریدانس* می‌توان از

ذره‌بین دستی استفاده‌کرد. هر دو باکتری در کلنی‌های تازه **نمایی برجسته دارند**. بعد از گذشت ٤۸-۲٤ ساعت مرکز کلنی‌های پنوموکک فرورفته می‌شود درحالی که کلنی‌های *استرپتوکک ویریدانس* نمای برجسته خود را حفظ‌می‌کنند.

افتراق این دو سویه از یکدیگر به‌وسیلهٔ آزمایش‌های حساسیت به دیسک اپتوچین و انحلال در صفرا انجام‌می‌شود(شکل شمارهٔ ۱٦). برای دستیابی به نتایج مطلوب توصیه‌می‌شود پلیت‌ها در انکوباتور CO_2 نگه‌داری‌شود.

تعیین حساسیت به اپتوچین

تشخیص احتمالی پنوموکک ازطریق تعیین حساسیت باکتری به دیسک اپتوچین به‌دست می‌آید.

روش انجام آزمایش

مقداری(۳ تا ٤ کلنی) از کلنی‌های α همولیتیک را به‌وسیلهٔ لوپ استریل برداشته و روی محیط آگار خون‌دار به‌صورت متراکم کشت‌می‌دهیم. یک دیسک اپتوچین با قطر ٦mm، حاوی ۵µg اتیل‌هیدروکوپرئین هیدروکلراید را در قسمت متراکم کشت باکتری قرارمی‌دهیم. پلیت را در انکوباتور حاوی CO_2 یا جار محتوی شمع در حرارت ۳۵°C به‌مدت ۲٤-۱۸ ساعت نگه‌داری‌کنید.

بررسی نتایج

سویه‌های با همولیز α که منطقه عدم رشد آنها بزرگتر از ۱٤mm است، پنوموکک محسوب‌می‌شوند. (شکل شمارهٔ ۱۷)

سویه‌های بدون منطقهٔ عدم رشد *استرپتوکک ویریدانس* هستند.

سویه‌هایی که منطقهٔ عدم رشد بین ۱۳mm-۹ دارند، باید تحت آزمایش حلالیت در صفرا قرارگیرند. (شکل شمارهٔ ۱٦)

آزمایش حلالیت در صفرا

از کلنی‌های تازه(۲٤ ساعته)، سوسپانسیونی در ۰/۵ml سرم فیزیولوژی استریل تهیه‌کرده و سپس کدورت آن را با استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند بسنجید. سوسپانسیون تهیه‌شده را به مقادیر مساوی بین ۲ لوله آزمایش تقسیم‌کنید(هر یک ۰/۲۵ml).

به‌همین میزان(۰/۲۵ml) سرم فیزیولوژی در یک لوله و سدیم دی‌اکسی‌کولات ۲٪ در لولهٔ دیگر بریزید و به‌آرامی مخلوط‌کنید. لوله‌ها را به‌مدت ۲ ساعت در حرارت ۳۷°C–۳۵ انکوبه‌کنید.

لوله‌ها را به‌طور متناوب جهت بررسی لیز سلولی(که باید در لولهٔ حاوی سدیم دی‌اکسی‌کولات ظاهرشود) مشاهده‌کنید. شفاف‌شدن لوله یا به عبارت دیگر ازبین رفتن کدورت، تشخیص را مسجل‌می‌کند. (شکل شمارهٔ ۱۸)

برای انجام این آزمایش براساس روش جایگزین، می‌توان از سدیم دی‌اکسی‌کولات ۱۰٪ استفاده‌کرد. در این آزمایش با قراردادن یک قطره از محلول فوق روی کلنی موردنظر در پلیت و نگه‌داری پلیت در دمای اتاق یا حرارت ۳۵°C به‌مدت ۱۵ دقیقه تا زمان خشک‌شدن معرف، حلالیت باکتری در صفرا بررسی‌می‌شود.

دراین حالت کلنی‌های پنوموکک ناپدیدشده و یا نمایی تخت پیدا خواهندکرد درحالی که کلنی‌های استرپتوکک‌های مقاوم به صفرا دست‌نخورده باقی‌می‌مانند. بدیهی است استفاده از پلیت حاوی کلنی‌های تازه و جوان ضروری است.

تفسیر نتایج

به‌طور کلی صحیح‌ترین روش تشخیص پنوموکک براساس آزمایش‌های حساسیت به دیسک اپتوچین و حلالیت در صفرا(شکل شمارهٔ ۱٦) به روش زیر است:

— سویه‌ای با منطقهٔ ممانعت از رشد ۱٤mm یا زیادتر پنوموکک است.

— سویه‌ای که منطقه واضح اما کوچکتر از ۱٤mm داشته، ولی محلول در صفرا باشد نیز پنوموکک است.

— سویه‌ای که منطقهٔ کوچک(۱۳mm–۹) داشته و در صفرا نیز محلول نیستند، پنوموکک محسوب‌نمی‌شوند.

— سویه‌ای بدون منطقهٔ ممانعت از رشد، پنوموکک محسوب‌نمی‌شوند.

۳. شناسایی هموفیلوس آنفلوانزه

ازنظر مورفولوژی این باکتری، باسیل یا کوکوباسیل گرم منفی کوچکی است که برای رشد به فاکتورهای X و V نیاز دارد و فقط روی محیط آگار شکلاته رشدمی‌کند(شکل شمارهٔ ۱۹). درصورت عدم انجام واکسیناسیون، تمام موارد منتژیت ناشی از *هموفیلوس آنفلوانزه* توسط سروتایپ b ایجادمی‌شود.

تشخیص نیاز باکتری موردنظر به فاکتورهای X و V برای تأیید هویت *هموفیلوس آنفلوانزه* یا سایر گونه‌های هموفیلوس ضروری است.

شناسایی سروتایپ‌های هموفیلوس آنفلوانزه

انجام این آزمایش مشابه مراحل مربوط به *نایسریا منتژیتیدیس* است. سویه‌های مشکوک به Hib(*هموفیلوس آنفلوانزهٔ* تایپ b)، باید با آنتی‌سرم‌های Hib، همچنین یک آنتی‌سرم جهت یکی دیگر از گروه‌های سرمی و نیز سرم فیزیولوژی آزمایش‌شوند.

واکنش مثبت و قوی با آنتی‌سرم b و عدم واکنش با آنتی‌سرم گروه دیگر و نیز سرم فیزیولوژی، تشخیص احتمالی Hib را مطرح‌می‌کند. اگر سویهٔ موردنظر با آنتی‌سرم b واکنشی نشان‌نداد، آنتی‌سرم پلی‌والان را آزمایش‌کنید. اگر نتیجهٔ این آزمایش مثبت بود، جهت تعیین سروتایپ باید از آنتی‌سرم‌های دیگر(a، c، d، e و f) استفاده‌کنید.

اگر ایـن واکنـش(آنتی‌سرم پلی‌والان) منفی باشد، احتمالاً سویهٔ موردنظر قابل تایپ‌بندی نخواهدبود(Nontypable).

روش انجام آزمایش

- با استفاده از ۱۰µl سرم فیزیولوژی فرمالین‌دار(۰/۵٪) و کلنی‌های تازه رشدکرده بر روی آگار شکلاته، سوسپانسیون شیری‌رنگی درست‌کنید.
- برای انجام واکنش آگلوتیناسیون، مقدار ۵µl(یک لوپ) از سوسپانسیون را به لامی که توسط الکل اتیلیک پاک شده‌است منتقل‌کنید. این کار را در سه ناحیهٔ لام انجام‌دهید. به هر ناحیه به‌ترتیب مقادیر مساوی از آنتی‌سرم Hib، آنتی‌سرم دیگر(از سایر گروه‌ها) و سرم فیزیولوژی اضافه‌کنید.
- سوسپانسیون‌ها را با قطرات ذکرشده مدت ۱ دقیقـه به‌آرامی مخلوط‌کنید.

تفسیر نتایج

فـقط واکنش‌های آگـلوتیناسیـون قـوی را مثبـت درنظر بگیرید. در یک واکنش مثبـت قـوی، تمام سلول‌های باکتری به یکدیگر خواهندچسبید و مایع زمینه‌ای سوسپانسیون شفاف خواهدشد. وقتی سـویـه‌ای بـا بـیش از یک آنـتی‌سرم واکنش نشان‌دهد، نتیجه غیـرقابـل قـبول خـواهدبـود و بایـد به یک آزمایشگاه رفرانس ارسال‌شود.

آزمایش بررسی نیاز به فاکتورهای X و V

هموفیلوس آنفلوانزه ارگانیزمی سخت‌رشد است که جهت رشد بـه محیطی حـاوی فاکتورهای X و V نیازدارد. این ارگانیزم به‌دلیل آزادشدن «همین» در زمـان حـرارت‌دادن خـون بـرای تهیـهٔ محیط آگار شکلاته، روی این محیط رشـدمی‌کنـد. NAD[1] بـه شکـل ایـزوویتـالکس مـوجود است که بـه محیط اضافه‌می‌شـود. *هموفیلوس آنفلوانزه* نیـز بـر پـایـهٔ نیاز به فاکتورهای X و V تشخیص داده‌می‌شود.

1. Nicotineamide Adenin Dinucleotide

جدول شمارهٔ ۵. شناسایی گونه‌های هموفیلوس براساس نیازهای رشد.

گونـه‌هـا	نیاز به فاکتورهـای X و V		وجود همولیز β روی آگار خـون‌دار
	X	V	
هموفیلوس آنفلوانزه	+	+	-
هموفیلوس پاراآنفلوانزه	-	+	-
هموفیلوس همولیتیکوس	+	+	+
هموفیلوس پاراهمولیتیکوس	-	+	+
هموفیلوس آفروفیلوس	+	-	-
هموفیلوس پارافروفیلوس *	-	+	-

* *هموفیلوس پارافروفیلوس* اورنی‌تین منفی است درحالی که *هموفیلوس پاراآنفلوانزه* مثبت است.

روش انجام آزمایش

از پلیت حـاوی کلنی‌های تازه، سوسپانسیون غلیظی از باکتری از یک محیط مایع مـناسب(TSB یـا آب پپتونه) درست‌کنیـد. هنگـام بـرداشت کلنی‌هـا دقت‌کنید تـا از انتقال حتی مقادیر ناچیـز آگار به محیط مایع جلوگیری‌شود؛ زیـرا ممکن‌است مقادیـر انـدک آگـار نیـز نتـایج آزمایش را متأثر ساخته و تشخیص نـادرست داده‌شـود.

به‌وسیلهٔ یک سواب استریل از این سوسپانسیون بـرداشتـه و بـه محیط TSA[1] منتقل‌می‌کنیم؛ بـه‌اندازه‌ای کـه نیمی از پلیت کشت داده‌شـود. بعـد از خشک‌شـدن محل تلقیح سوسپانسیون، دیسک‌های حاوی فاکتورهای X، V و XV را در محل قـرارمی‌دهیم.

بررسی نتایج

هموفیلوس آنفلوانـزه فقط در محدودهٔ اطـراف دیسک‌هـای حـاوی هـر دو فاکتور X و V(XV) رشدمی‌کند. (شکل شمارهٔ ۲۰)

1. Tryptic Soy Agar

پلیت‌های شناسایی هموفیلوس

این روش برای تشخیص هموفیلوس روش گران‌تری است که براساس نیاز سویه‌های مختلف به فاکتور X و V می‌باشد.

محیط آگار به پلیت‌های چهارخانه‌ای تقسیم‌می‌شود که یکی از خانه‌ها حاوی «همین» (فاکتور X)، خانهٔ بعدی شامل NAD(فاکتور V)، سومین خانه محتوی هر دو فاکتور X و V و آخرین خانه حاوی آگار خون‌دار(۵٪ خون اسب) است که برای تفکیک *هموفیلوس هموليتيكوس* از *هموفیلوس آنفلوانزه* استفاده‌می‌شود.

روش انجام آزمایش

- سوسپانسیونی معادل ۵٪ مک‌فارلند از کلنی‌های تازهٔ باکتری در TSB آماده‌کنید. این پلیت را با سوسپانسیون باکتری تلقیح‌کنید. برای تلقیح از یک عدد لوپ استریل استفاده‌کرده و در فواصل کشت هر خانه، لوپ را با شعله استریل‌کنید(تا از انتقال فاکتورها به خانه‌های مجاور جلوگیری‌شود). عمل تلقیح را از خانهٔ حاوی فاکتور V شروع‌کرده و با خانهٔ حاوی آگار خون‌دار خاتمه‌دهید. برای مشاهدهٔ همولیز خفیف، آگار خون‌دار را با لوپ سوراخ‌کنید.
- این محیط را بعد از تلقیح مدت ۲۴–۱۸ ساعت در حرارت ۳۵°C در انکوباتور CO_2 یا جار محتوی شمع قراردهید.

بررسی نتایج

بعد از تلقیح، خانهٔ حاوی آگار خون‌دار را به لحاظ وجود همولیز و سایر خانه‌ها را ازنظر رشد باکتری درحضور فاکتورهای X و V بررسی‌کنید.

نگه‌داری و انتقال نایسریا منتژیتیدیس، استرپتوکوکوس پنومونیه و هموفیلوس آنفلوانزه

جهت تأیید تشخیص و تعیین حساسیت دارویی باکتری جداشده از بیمار مبتلا به منتژیت لازم است سویهٔ باکتری تحت شرایط مناسب نگه‌داری و به آزمایشگاه مرجع کشوری ارسال‌شود.

باکتری‌های یادشده شکننده بوده و رعایت احتیاط‌های لازم در نگه‌داری و حمل‌ونقل آنها ضروری است.

نگه‌داری باکتری‌ها

۱. نگه‌داری کوتاه‌مدت

بهترین روش جهت نگه‌داری کوتاه‌مدت(یک هفته یا کمتر) پنوموکک و *هموفیلوس آنفلوانزه*، تلقیح کلنی‌ها به لوله‌های درپیچ‌دار حاوی آگار شکلاته شیب‌دار، انکوباسیون ۲۴–۱۸ ساعته در ۳۵°C و پس از آن نگه‌داری لوله‌ها در برودت ۴°C یخچال است. این باکتری‌ها در محیط مایع عمر کوتاهی دارند و روی پلیت‌های آگار(اولیه) فقط مدت ۴–۳ روز زنده‌می‌مانند. برای نگه‌داری *نایسریا منتژیتیدیس* می‌توان از لوله‌های درپیچ‌دار استفاده‌کرد که در لوله‌ها باید در مدت نگه‌داری آنها شل باشد.

درصورت اضافه‌کردن لایهٔ نازکی از TSB به لوله، می‌توان عمر باکتری‌ها را تا ۱۴ روز افزایش‌داد. لولهٔ حاوی *نایسریا منتژیتیدیس* را در یخچال نگذارید.

۲. نگه‌داری بلندمدت

نگه‌داری بلندمدت را می‌توان ازطریق لیوفیلیزاسیون یا منجمدکردن به بهترین وجه انجام‌داد. از این میان لیوفیلیزاسیون پذیرفته‌ترین شیوه برای نگه‌داری است؛ زیرا در این شرایط می‌توان باکتری را به‌مدت طولانی در برودت ۴°C نگه‌داری‌کرد تا در هنگام نقل‌وانتقال آسیب نبیند.

به‌این دلیل که لیوفیلیزاسیون نیاز به تجهیزات خاص و گران‌قیمت داشته که آن هم فقط در بعضی مراکز نظیر مرکز تحقیقات آزمایشگاه‌های رفرانس ایران انجام‌می‌شود، از ذکر جزئیات کار خودداری کرده و فقط روش انجمادسازی شرح داده‌می‌شود.

نگه‌داری به روش انجماد

۱. *هموفیلوس آنفلوانزه* را روی محیط آگار شکلاته و پنوموکک و منتگوکک را روی محیط آگار خون‌دار و آگار شکلاته کشت دهید. سپس آنها را مدت ۲۰–۱۸ ساعت در حرارت ۳۵°C و انکوباتور CO_2دار یا جار محتوی شمع قراردهید. بعد از رشد باکتری را از لحاظ خلوص بررسی‌کنید.

۲. تمام کلنی‌های رشدیافته را به کمک سواب استریل جمع‌آوری‌کنید.

۳. سواب فوق را در لولهٔ درپیچ‌دار به‌حجم ۲ml مقاوم به انجماد که حاوی ۱ml خون دفیبرینهٔ استریل است تلقیح‌کرده به‌آرامی تکان‌دهید تا کلنی‌ها آزادشوند. برای این کار به‌طورحتم باید از خون گوسفند، اسب یا خرگوش استفاده‌کرد. **خون انسان قبول نیست.**

از TSB به‌همراه گلیسرول ۲۰٪–۱۵٪ می‌توان به‌عنوان محیط‌های جایگزین استفاده‌کرد. لوله‌های مورد استفاده باید در برابر انجماد مقاوم باشند.

— قبل از بیرون آوردن سواب از لولهٔ حاوی خون دفیبرینه یا TSB گلیسرول‌دار، سواب را به‌خوبی به دیوارهٔ لولهٔ فشاردهید تا خون یا TSB اضافی آن خارج‌شود.

— سواب را در مایع ضدعفونی‌کننده بیندازید.

— درصورت امکان هرچه سریع‌تر این سوسپانسیون میکروبی را در مخلوط الکل ۹۵٪ و یخ خشک منجمدکنید.

— لوله‌ها را به فریزر نیتروژنی ۱۲۰°C– یا فریزر ۷۰°C– منتقل‌کنید. درصورت استفاده از فریزر ۲۰°C– باید توجه‌داشت که درصدی از باکتری‌ها کشته‌شده و ازبین خواهندرفت.

انتقال محیط‌های کشت

سویه‌های لیوفیلیزه و لوله‌های حاوی آگار شکلاتهٔ شیب‌دار بدون نیاز به یخچال قابل انتقال است. هر ویال یا لوله قبل از قرارگرفتن در جعبهٔ فلزی حاوی مادهٔ جاذب مخصوص حمل‌ونقل باید به‌خوبی با پارافیلم پیچانده‌شده و در پاکت مناسب گذاشته‌شود. سپس جعبهٔ فلزی را در یک جعبهٔ پستی مناسب قرارداده و با نوشتن آدرس گیرنده، برچسبی اخطاردهنده روی آن چسبانده‌شود. سویه‌های منجمد قبل از ارسال باید در لولهٔ درپیچ‌دار حاوی آگار شکلاتهٔ شیب‌دار دوباره کشت داده‌شده و ۲۴–۱۸ ساعت انکوبه‌شود. سپس طبق روش گفته‌شده جهت انتقال بسته‌بندی گردد. *هموفیلوس آنفلوانزه*، پنوموکک و منتگوکک حداقل یک هفته در این شرایط زنده‌می‌مانند.

کنترل کیفیت محیط‌ها و معرف‌ها

جهت اطمینان از صحت واکنش‌ها و درنتیجه تشخیص صحیح، لازم است تمام محیط‌های کشت، معرف‌ها، کربوهیدرات‌ها و فاکتورهای X و V توسط سویه‌های باکتریایی استاندارد ارزیابی‌شوند.

روش‌های کنترل کیفیت باید روی محیط‌های کشت مغذی، نگه‌دارنده و اختصاصی انجام‌شود. درصورت نگه‌داری این محیط‌ها در شرایط استاندارد(طبق توصیهٔ شرکت سازنده)، فقط یک بار در زمان بازکردن هر بسته محیط کشت کفایت‌می‌کند.

انجام آزمایش‌های کنترل کیفی

جهت اطمینان از کیفیت محیط‌های کشت مغذی اعم از آگار خون‌دار، شکلاته و TSA، لازم است از کلنی‌های تازهٔ سویه‌های استاندارد(مطابق جدول صفحهٔ بعد) سوسپانسیون میکروبی در سرم فیزیولوژی، مطابق با نیم مک‌فارلند ساخته، سپس ۱۰µl از سوسپانسیون را به ۱ml سرم فیزیولوژی افزوده و مخلوط‌کنیم. سپس به میزان ۱۰µl از سوسپانسیون اخیر برداشته و در محیط کشت موردنظر کشت‌می‌دهیم. بعد از گذشت ۲٤ ساعت تعداد 10^3 تا 10^4 کلنی قابل شمارش خواهدبود.

لازم به‌ذکر است، برای کنترل محیط‌های حاوی قند، معرف اکسیداز، تست‌های اپتوچین و حلالیت در صفرا از سویه‌های استاندارد مطابق با جدول استفاده‌شود. محیط‌های حاوی قند(کربوهیدرات) باید یک‌بار در ابتدای مصرف هر بسته کنترل‌شوند.

معرف اکسیداز در هربار انجام آزمایش روی باکتری جداشده هم‌زمان توسط باکتری استاندارد نیز کنترل‌شود.

جدول شمارهٔ ۶. سویه‌های استاندارد لازم جهت آزمایش‌های تضمین کیفیت محیط‌ها و معرف‌ها

محیط	سویهٔ استاندارد	شمارهٔ ATCC	نتایج مورد انتظار
محیط پایه بلاد آگار	استرپتوکک پنومونیه	۶۰۳۵	رشد، همولیز α
	استرپتوکک پیوژن	۱۹۶۱۵	رشد، همولیز β
	استافیلوکک ارئوس	۲۵۹۲۳	رشد
	اشریشیا کلی	۲۵۹۲۲	رشد
بلاد آگار با استفاده از تریپتیک سوی آگار	استرپتوکک پنومونیه	۶۳۰۵	رشد همولیز α
	استرپتوکک پیوژن	۱۹۶۱۵	رشد، همولیز β
	استافیلوکک ارئوس	۲۵۹۲۳	رشد
	اشریشیا کلی	۲۵۹۲۲	رشد
تریپتیک سوی آگار و یا براث بدون خون	استرپتوکک پیوژن	۱۹۶۱۵	رشد
	اشریشیا کلی	۲۵۹۲۲	رشد
بطری کشت خون	سودوموناس آئروژنوزا	۲۷۸۵۳	رشد
	استرپتوکک پنومونیه	۶۳۰۵	رشد
	هموفیلوس آنفلوانزه	۱۰۲۱۱	رشد
آگار شکلاته	نایسریا گونوره‌آ	٤۳۰۶۹	رشد
	هموفیلوس آنفلوانزه	۱۰۲۱۱	رشد
گلوکز	نایسریا گونوره‌آ	٤۳۰۶۹	زرد
	موراکسلا کاتارالیس	۲۵۲٤۰	بدون رنگ، قرمز پررنگ
لاکتوز	نایسریا لاکتامیکا	۲۳۹۷۱	زرد
	نایسریا گونوره‌آ	٤۳۰۶۹	بدون رنگ، قرمز پررنگ
مالتوز	نایسریا منتژیتیدیس	۱۳۰۹۰	زرد
	نایسریا گونوره‌آ	٤۳۰۶۹	بدون رنگ، قرمز پررنگ
سوکروز	نایسریا سیکا	۹۹۱۳	زرد
	نایسریا گونوره‌آ	٤۳۰۶۹	بدون رنگ، قرمز پررنگ
آزمایش اکسیداز	سودوموناس آئروژنوزا	۲۷۸۵۳	ارغوانی
	E.coli	۲۵۹۲۲	بدون رنگ
اپتوچین و حلالیت در صفرا	استرپتوکک پنومونیه	٤۹۶۱۹	حساس به اپتوچین، در صفرا حل‌می‌شود
نیاز به فاکتور X و V	هموفیلوس آنفلوانزه	٤۹۲٤۷	نیاز به هر دو فاکتور

ضمیمه

طرز تهیهٔ محیط‌ها و معرف‌ها

۱. محیط‌های مایع و جامد(حاوی آگار) مورد استفاده در روش‌های متداول آزمایشگاهی

- محیط‌های حاوی آگار در پلیت‌هایی با ابعاد ۱۵×۱۰۰mm و به حجم ۱۵–۲۰ml برای هر پلیت تقسیم‌می‌شوند.
- بعد از ریختن محیط درون پلیت‌ها، آنها را چند ساعت در دمای اتاق قراردهید تا از جمع‌شدن رطوبت در درپوش پلیت جلوگیری‌شود.
- پلیت‌ها را مجدداً در کیسه‌های پلاستیکی مخصوص نگه‌داری آنها قرارداده و در کیسه‌ها را به‌خوبی بسته و در شرایطی که قسمت حاوی محیط کشت به‌سمت بالا است، در یخچال با برودت ۴°C نگه‌داری‌کنید.

محیط‌های HIA[1] و TSA

این محیط‌ها در زمرهٔ محیط‌هایی هستند که به‌طور معمول با افزودن خون یا بدون آن برای جداسازی و کشت بسیاری از میکروارگانیزم‌ها و نیز برای نشان‌دادن نیاز به فاکتورهای X و V در هموفیلوس *آنفلوانزه* استفاده‌می‌شوند.

محیط‌های TSA و HIA به رنگ زرد کاهی یا طلایی هستند.

هر محیط HIA یا TSA پس از ساخت(و یا چنانچه آمادهٔ مصرف خریداری شود) باید به‌وسیلهٔ سویهٔ هموفیلوس *آنفلوانزه* استاندارد و با فاکتورهای X و V کنترل‌شود. دراین حالت پس از کشت محیط با باکتری استاندارد و قراردادن دیسک‌های حاوی X و V و یا دیسک حاوی هر دو فاکتور XV، هموفیلوس *آنفلوانزه* در فاصلهٔ بین دو دیسک X و V یا در اطراف دیسک XV رشدمی‌کند.

1. Heart Infusion Agar

محیط‌ها برطبق دستور کارخانهٔ سازنده که روی برچسب قوطی محیط وجوددارد و برحسب حجمی که نیاز است، در ارلن تهیه‌می‌شود. در هنگام تهیه دقت‌شود که محیط کاملاً حل‌شده به‌طوری که پودر حل‌نشده‌ای در جدار ارلن قبل از اتوکلاوکردن وجود نداشته‌باشد. محیط آماده‌شده در دمای ۱۲۱°C به‌مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو می‌شود.

محیط‌های تهیه‌شده پس از اتوکلاو هنگامی که دمای آنها به ۵۰°C رسید، در پلیت‌هایی به ابعاد ۱۵×۱۰۰mm تقسیم و پس از جامدشدن جهت جلوگیری از جمع‌شدن رطوبت در سطح آنها، مدتی در دمای اتاق قرار داده‌می‌شوند. سپس در کیسه‌های پلاستیکی مخصوص نگه‌داری پلیت قرار داده‌شده و تا هنگام مصرف در یخچال ۴°C نگه‌داری‌می‌شوند.

محیط بلاد آگار ۵٪ خون گوسفند BAP[1]

محیط بلاد آگار با استفاده از TSA که به آن ۵٪ خون گوسفند اضافه‌می‌شود تهیه‌شده و به‌طور معمول به‌عنوان یک محیط آگار خون‌دار استفاده‌می‌شود. این محیط برای تجدید کشت *استرپتوکوکوس پنومونیه* و حساسیت به دیسک آپتوچین به‌کار می‌رود.

رنگ محیط بلاد آگار باید قرمز روشن باشد. اگر رنگ آن تیره شد، نشان‌دهندهٔ آن است که محیط آگار هنگام اضافه‌کردن خون دمای بالایی داشته‌است. دراین حالت چنین محیطی قابل استفاده نبوده و باید مجدداً تهیه‌شود. هر بار که محیط بلاد آگار تهیه و یا به شکل آمادهٔ مصرف خریداری می‌شود، باید با *استرپتوکوکوس پنومونیه* برای مشاهدهٔ ویژگی‌های رشد و فعالیت همولیتیک آزمایش‌شود.

کلنی‌های *استرپتوکوکوس پنومونیه* کوچک، خاکستری تا خاکستری متمایل به سبز بوده و در اطراف آن هالهٔ سبز واضحی وجوددارد. (شکل شمارهٔ ۹)

1. Blood Agar plate

برای تهیهٔ این محیط نیز برطبق دستورالعمل کارخانهٔ سازنده عمل‌می‌شود. ۲۰g از پودر محیط کشت در ۵۰۰ml آب مقطر در یک ارلن ۱ لیتری به کمک حرارت حل‌شده و سپس در ۱۲۱°C به‌مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو می‌شود. پس از اتمام اتوکلاو هنگامی که محیط تهیه‌شده تا دمای ۵۰°C خنک شد، ۵٪ خون دفیبرینهٔ استریل گوسفند به آن اضافه‌می‌شود(۲۵ml خون گوسفند به ۵۰۰ml آگار). چنانچه مقادیر متفاوتی از محیط تهیه‌می‌شود، همواره باید میزان خون اضافه‌شده ۵٪ باشد(برای مثال برای یک لیتر محیط کشت ۵۰ml خون اضافه‌می‌شود). سپس محیط تهیه‌شده به میزان ۲۰ml در پلیت‌های ۱۰۰mm تقسیم‌شده و پس از جامد و خشک‌شدن سطح محیط، در کیسه‌های پلاستیکی مخصوص نگه‌داری پلیت‌ها قرار داده‌شده و در یخچال ۴°C نگه‌داری می‌شوند.

محیط بلاد آگار خون خرگوش با استفاده از محیط هارت اینفیوژن آگار HIA[1]

این محیط که جهت مشاهدهٔ فعالیت همولیتیک گونه‌های هموفیلوس استفاده‌می‌شود باید به رنگ قرمز روشن مشابه محیط بلاد آگاری که به‌طور معمول به‌کار می‌رود باشد(BAP).

اگر محیط به رنگ قرمز تیره باشد نباید به‌کار برده‌شود. از خون اسب نیز می‌توان به جای خون خرگوش در تهیهٔ این محیط استفاده‌کرد.

برای کنترل کیفی این محیط از *هموفیلوس همولیتیکوس* جهت بررسی ویژگی‌های رشد و فعالیت همولیتیک استفاده‌می‌شود.

دراین حالت باکتری باید به‌خوبی رشدکرده و همولیز کامل گلبول‌های قرمز به شکل هالهٔ شفافی در اطراف کلنی‌ها مشاهده‌شود. برای تهیهٔ این محیط نیز از دستورالعمل کارخانهٔ سازنده(روی برچسب قوطی) پیروی کرده و با ساخت حجم موردنیاز، به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۱°C اتوکلاو می‌شود.

1. Heart infusion rabbit blood agar plate

پس از سردشدن محیط تا دمای ۵۰°C(محیط را می‌توان در بن‌ماری ۵۰°C قرارداد). با افزودن ۵٪ خون استریل دفیبرینهٔ خرگوش(۵ml برای ۱۰۰ml محیط)، محیط تهیه‌شده در پلیت‌هایی به ابعاد ۱۰۰mm تقسیم‌می‌شود. بعد از جامدشدن محیط و خشک‌شدن رطوبت سطحی، در کیسه‌های پلاستیکی مخصوص نگه‌داری پلیت‌ها قرار داده‌شده و در یخچال با برودت ۴°C نگه‌داری می‌شود.

محیط بلاد آگار خون اسب با استفاده از محیط پایهٔ بلاد آگار

این محیط کاملاً مغذی بوده و برای جداسازی اولیهٔ *هموفیلوس آنفلوانزه* و همچنین تشخیص فعالیت همولیتیک *هموفیلوس همولیتیکوس* و سایر باکتری‌ها استفاده‌می‌شود. کنترل کیفی این محیط همانند محیط بلاد آگار خون خرگوش با HIA است.

این محیط نیز برطبق دستورالعمل کارخانهٔ سازنده تهیه و در حرارت ۱۲۱°C به‌مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شده و سپس در بن‌ماری تا دمای ۵۰°C خنک‌می‌شود. پس از افزودن خون اسب(۵ml برای ۱۰۰ml محیط) و مخلوط‌کردن آن، در پلیت‌هایی با اندازهٔ ۱۰۰mm تقسیم‌می‌شود. پس از جامدشدن محیط و خنک‌شدن رطوبت سطحی، در کیسه‌های پلاستیکی مخصوص نگه‌داری پلیت‌ها قرار داده‌شده و در یخچال با برودت ۴°C نگه‌داری می‌شود.

محیط تریپتیکیس سوی براث(TSB)

محیط TSB برای تهیهٔ سوسپانسیون *هموفیلوس آنفلوانزه* و جهت انجام آزمایش‌های تشخیصی نیاز به فاکتورهای X و V استفاده‌می‌شود. به‌علاوه محیط‌های هارت اینفیوژن براث(HIB)، نرمال سالین و یا فسفات بافر سالین(PBS)[1] نیز ممکن‌است به جای TSB استفاده‌شوند.

به‌دلیل عدم رشد *هموفیلوس آنفلوانزه* در محیط TSB، این محیط صرفاً جهت تهیهٔ سوسپانسیون باکتری فوق برای انجام آزمایش‌های تشخیصی نیاز به

1. Phosphat Buffer Saline

فاکتورهای X و V استفاده‌می‌شود. جهت بررسی ویژگی‌های افتراقی باکتری‌های مولد منتژیت لازم است سوسپانسیونی از کشت تازه آنها در محیط TSB تهیه‌کرده بعد از یک شب انکوباسیون در دمای ۳۵°C، درصورت رشد و ایجاد کدورت، روی آگار خون‌دار کشت داده‌شوند.

محیط TSB برطبق دستورالعمل روی قوطی محیط کشت تهیه‌شده، سپس به‌میزان 5ml در لوله‌هایی با ابعاد ۱۵×۱۲۵mm تقسیم‌شده و در دمای ۱۲۱°C به‌مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو می‌شود. پس از خنک‌شدن در یخچال در برودت ٤°C نگه‌داری می‌شود.

محیط کشت خون مایع

هر سری جدید از محیط کشت خون تهیه و یا آمادهٔ خریداری‌شده باید ازنظر امکان رشد *نایسریا منتژیتیدیس*، *استرپتوکوکوس پنومونیه* و *هموفیلوس آنفلوانزه* آزمایش‌شود. برای این‌منظور ۱-۲ml از خون استریل انسان یا خرگوش و اسب را به ۳ بطری کشت خون تلقیح‌کرده و سپس از کشت تازه هر یک از ۳ باکتری موردنظر، در ۳ بطری کشت خون به‌طور جداگانه تلقیح‌می‌شود. برای این منظور از کشت‌های فوق سوسپانسیونی در ۱-۲ml محیط مایع تهیه‌کرده و به ۳ بطری کشت خون تلقیح و در ۳۵°C به‌مدت ۷ روز نگه‌داری‌می‌شود. سپس بطری‌ها ازنظر وجود علائم رشد بررسی‌شده و از آنها، ١٤ و ٤٨ ساعت پس از تلقیح کشت تهیه‌می‌شود.

محیط TSB به‌عنوان محیط کشت خون طبق دستور کارخانهٔ سازنده تهیه‌می‌شود. افزودن ۰/۲۵g SPS برای یک لیتر از محیط به جداسازی *هموفیلوس آنفلوانزه* کمک‌می‌کند.

حجم بطری کشت خون برای کودکان ۲۰ml و برای بزرگسالان ۵۰ml است و باید حجم محیط مایع، حداقل $\frac{۲}{۳}$ حجم کل بطری باشد. لازم است بطری کشت خون مایع درپوش پلاستیکی و درپیچ داشته‌باشد.

بطری‌های کشت خون پس از تهیه و استریل‌شدن به‌مدت ۱۵ دقیقه در حرارت ۱۲۱°C اتوکلاو و در دمای اتاق نگه‌داری‌می‌شوند.

۲. محیط‌های اختصاصی

محیط شکلات آگار CAP

محیط شکلات آگار با افزودن فاکتورهای رشد، نیازمندی‌های اختصاصی مورد لزوم برای جداسازی ارگانیزم‌های سخت‌رشد مانند *هموفیلوس آنفلوانزه* و *نایسریا منتژیتیدیس* را به‌خصوص هنگامی که در انکوباتور حاوی ۵٪ CO_2 قرارداده می‌شوند فراهم‌می‌کند. در محیط شکلات آگار اختصاصی غلظت آگار کاهش داده‌شده و این امر باعث افزایش رطوبت محیط کشت می‌شود.

محیط شکلات آگار حاوی فاکتورهای رشد، به‌خوبی رشد *نایسریا منتژیتیدیس*، *هموفیلوس آنفلوانزه* و *استرپتوکوکوس پنومونیه* را امکان‌پذیر می‌کند.

اگر محیط شکلات آگار در لوله‌های درپیچ‌دار به ابعاد ۱۶×۱۲۵mm به‌صورت سطح شیب‌دار تقسیم‌شود، محیط انتقالی و همچنین نگه‌دارنده کوتاه‌مدت برای این باکتری‌ها خواهدبود. تمام محیط‌های شکلات آگاری که تهیه‌شده و یا به‌صورت آماده خریداری می‌شوند، باید با باکتری‌هایی که در بالا ذکرشد(*نایسریا منتژیتیدیس*، *هموفیلوس آنفلوانزه* و *استرپتوکوکوس پنومونیه*) کنترل کیفی شوند.

رنگ محیط شکلات آگار باید قهوه‌ای تا قهوه‌ای-قرمز باشد. *نایسریا منتژیتیدیس* و *هموفیلوس آنفلوانزه* کلنی‌های خاکستری داشته و بعد از ٢٤ ساعت به‌صورت لایه‌ای براق روی سطح شیب‌دار و بدون ایجاد هرگونه تغییر رنگی در محیط رشدمی‌کنند. کلنی‌های *استرپتوکوکوس پنومونیه* کوچک، خاکستری تا خاکستری-سبز است و رنگ سبز واضح و مشخصی روی محیط به‌وجود می‌آورد. اگر هر سه باکتری ذکرشده یا حتی یکی

از آنها نتواند روی محیط شکلات آگار رشد کند، محیط قابل استفاده نخواهدبود. اگر *هموفیلوس آنفلوانزه* رشدنکرد نشان‌دهندهٔ آن است که محیط فاقد ایزوویتالکس و یا مادهٔ مشابه آن است.

محیط شکلات آگار با استفاده از پایهٔ TSA و فاکتورهای رشد

اگر محیط TSA به‌عنوان محیط پایه استفاده‌شود، آن را به شکل دو برابر (Double strength) یعنی به‌میزان ۲۰g در ۲۵۰ml آب مقطر تهیه‌کرده، پس از اتوکلاوکردن محیط را تا دمای ۵۰°C خنک‌کنید(می‌توان از دماسنج برای اطمینان از خنک‌شدن محیط استفاده‌کرد). محلول ۲٪ هموگلوبین(5g هموگلوبین در ۲۵۰ml آب مقطر) را نیز تهیه‌کرده، آن را در ۵–۶ml آب مقطر حل‌کرده تا به شکل خمیر درآید. سپس بقیهٔ آب مقطر را اضافه‌کرده، پس از اتوکلاوکردن در ۵۰°C خنک‌کنید. محلول هموگلوبین را به محیط TSA افزوده و آن را در دمای ۵۰°C گرم نگه‌دارید.

اگر محلول هموگلوبین در دسترس نباشد، می‌توان از ۵٪ خون دفیبرینهٔ گوسفند، خرگوش، خوکچه و اسب استفاده‌کرد. در این مورد محیط TSA به‌میزان ۲۰g در ۵۰۰ml آب مقطر تهیه‌می‌شود. **هرگز نباید از خون انسان استفاده‌شود.**

بعد از اتوکلاوکردن محیط TSA و خنک‌شدن آن تا ۵۰°C خون را اضافه‌کرده و پس از مخلوط‌کردن، آن را در بن‌ماری با دمای ۸۰°C به‌مدت ۱۵ دقیقه قرارداده تا به رنگ شکلاتی درآید، سپس محیط را در ۵۰°C خنک‌کنید.

می‌توان پس از افزودن محلول هموگلوبین و یا خون دفیبرینه‌شده، هنگامی که دمای محیط ۵۰°C است، محلول ۱٪ ایزوویتالکس یا ویتوکس را اضافه و آن را به‌آرامی مخلوط‌کرده تا از تولید حباب‌های هوا

جلوگیری‌شود. محیط‌ها را به‌میزان ۱۵–۲۰ml در پلیت‌های به قطر ۱۰۰mm تقسیم‌کنید.

طرز تهیهٔ محیط شکلات آگار با استفاده از محیط GC(محیط مخصوص گنوکک) و افزودن فاکتورهای رشد

۷/۲g از محیط GC را در ۱۰۰ml آب مقطر حل‌کنید. با تکان‌دادن مکرر آن را به‌خوبی حل‌کرده و یک دقیقه بجوشانید تا پودر کامل حل‌شود. بعد از اتوکلاوکردن در ۱۲۱°C به‌مدت ۱۵دقیقه، آن را تا دمای ۵۰°C خنک‌کنید. ۲g هموگلوبین را با ۵–۱۰ml آب مقطر مخلوط‌کرده تا خمیری‌شکل شود. سپس به‌تدریج بقیهٔ آب مقطر را اضافه‌کرده تا محلول هوموژن شود. در طی اضافه‌کردن آب مقطر محلول باید مکرر هم زده‌شود. پس از اتوکلاوکردن در دمای ۱۲۱°C به‌مدت ۱۵ دقیقه، آن را تا ۵۰°C خنک‌کنید. می‌توان از محلول ۲۰٪ هموگلوبین استریل آماده‌شده استفاده‌کرد. دراین حالت ۱۰۰ml از آن را تا دمای ۵۰°C گرم کنید.

فاکتورهای رشد(ایزوویتالکس و یا ویتوکس) که به‌صورت ویال‌های لیوفیلیزه هستند، در شرایط استریل ۱۰ml محیط کشت مایع(حلال) به آن اضافه‌کرده و کاملاً مخلوط‌کنید تا از حل‌شدن آن مطمئن شوید. این محلول باید فوراً استفاده‌شود و یا در یخچال ۴°C در طی دو هفته مصرف‌شود.

۱۰۰ml از محلول هموگلوبین را در شرایط استریل به ۱۰۰ml محیط پایهٔ GC اضافه‌کرده و ۲ml از ایزوویتالکس و یا ۴ml از محلول ویتوکس را به آن افزوده، پس از مخلوط‌کردن و با رعایت عدم تولید حباب در آگار، به میزان ۱۵–۲۰ml در پلیت‌های استریل به‌قطر ۱۰۰mm تقسیم‌کنید. محیط‌ها پس از سردشدن تا چند ساعت در دمای اتاق قرارگیرند، سپس در کیسهٔ پلاستیکی مخصوص نگه‌داری پلیت‌ها قرار داده‌شده و در یخچال ۴°C نگه‌داری‌شوند.

طرز تهیهٔ محیط نیمه‌جامد با افزودن ۱٪ کربوهیدرات CTA

برطبق دستورالعمل کارخانهٔ سازنده ۲۸g از محیط CTA ساخت کمپانی BBL و یا ۲۹/۵g از محیط دیفکو در ۹۰۰ml آب مقطر حل‌می‌شود. بعد از مخلوط‌کردن آن با حرکات مداوم جهت حل‌کردن پودر، به‌مدت ۱ دقیقه محیط جوشانده‌می‌شود. پس از اتوکلاوکردن در ۱۲۱°C به‌مدت ۱۵ دقیقه و خنک‌شدن محیط تا دمای ۵۰°C، محلول ۱۰٪ گلوکز به آن اضافه‌شود. برای تهیهٔ محلول ۱۰٪ گلوکز، ۱۰g گلوکز در ۱۰۰ml آب مقطر حل‌شده سپس با استفاده از فیلتر ۰/۲۲ میکرون استریل‌شود. در شرایط استریل ۱۰۰ml از محلول ۱۰٪ گلوکز به ۹۰۰ml از محیط CTA اضافه‌شود تا غلظت نهایی ۱٪ گلوکز به‌دست آید. سپس ۷ml از محیط در لوله‌های درپیچ‌دار به ابعاد ۱۲۵ml×۱۶ تقسیم‌شده و در یخچال نگه‌داری می‌شود. سایر کربوهیدرات‌ها از قبیل مالتوز، لاکتوز و سوکروز نیز مانند گلوکز تهیه‌می‌شوند.

طرز تهیهٔ محیط لوینتال جهت جداسازی گونه‌های هموفیلوس

محلول A: محلول ذخیرهٔ لوینتال

۳۷g از محیط مایع BHI[1] را در ۴۵۰ml آب مقطر عاری از اندوتوکسین به‌خوبی مخلوط‌کرده و جهت حل‌شدن پودر تا رسیدن به نقطهٔ جوش حرارت‌دهید. هنگامی که محیط گرم است ۵۰ml از خون دفیبرینهٔ خرگوش را به آن اضافه‌کنید. پس از سردشدن محیط، آن را ازطریق گاز و یا فیلترهای پشم‌شیشه فیلتر کنید. محیط را در ۱۲۰۰۰rpm به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفوژکنید. پس از استریل‌کردن به‌وسیلهٔ فیلتر در حجم ۱۰۰µl آن را تقسیم و نگه‌داری‌کنید.

محلول B: آگار

۷/۵g آگار به ۵۰۰ml آب مقطر عاری از آندوتوکسین اضافه‌کرده و آن را

1. Brain-Heart Infusion broth

به‌وسیلهٔ حرارت حل‌کرده، سپس در دمای ۱۲۱°C به‌مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو کنید. محیط آگار نهایی که شامل ۵۰۰ml از محلول استریل‌شده لوینتال و ۵۰۰ml از محیط آگار استریل شده‌است را در ۵۰°C خنک‌کرده و در شرایط استریل در پلیت‌ها تقسیم‌کنید.

۳. محیط‌های انتقال‌دهنده و ذخیره‌سازی باکتری‌ها

محیط T-I

محیط T-I یک محیط بی‌فازیک است که برای کشت اولیهٔ *نایسریا منتژیتدیس*، *استرپتوکوکوس پنومونیه* و *هموفیلوس آنفلوانزه* از نمونه‌های مایع نخاع و خون به‌کار می‌رود. این محیط علاوه‌بر آنکه یک محیط انتقال‌دهنده است، ممکن‌است محیط رشد این باکتری‌ها نیز محسوب‌شود.

معرف‌های متفرقه

محلول‌های رنگ‌آمیزی گرم(روش اصلاح‌شده Hucker)

اگسالات آمونیوم ـ کریستال ویوله.

- محلول کریستال ویوله ۲g، اتانول ۹۵٪ ۲۰ml(کریستال ویوله را در الکل حل‌کنید).
- محلول اگسالات آمونیوم ۰/۸g، آب مقطر ۸۰ml.

این دو محلول را مخلوط‌کرده و یک شب نگه‌دارید. قبل از استفاده آن را با فیلتر کاغذی صاف‌کنید.

- محلول ید.

ید کریستال ۱g، یدور پتاسیم ۲g، آب مقطر ۳۰۰ml.

این مواد را آسیاب کرده(یا در هاون بسایید)، سپس آب مقطر را به آن بیفزایید تا به شکل محلول درآید.

محلول باید در شیشه‌های تیره‌رنگ دور از نور نگه‌داری شود.

- محلول رنگ‌بر الکل(۹۵°) و استون هم حجم.

رنگ زمینه:

— سافرانین.

محلول ذخیره: سافرانین ۲/۵g، الکل ۹۵٪ ۱۰۰ml.

محلول کاری: محلول سافرانین ذخیره ۱۰ml، آب مقطر ۹۰ml.

— محلول کربول فوشین روش ذیل‌نیلسن.

کربول فوشین رنگ زمینهٔ مناسب‌تری نسب به سافرانین ایجادمی‌کند.

فوشین بازیک ۰/۳g، اتانول ۹۵٪ ۱۰ml، فنل کریستال ذوب‌شده 5ml، آب مقطر 95ml.

فوشین را در الکل حل‌کرده، محلول فنل ۵٪ را اضافه‌نمایید و بگذارید یک شب بماند. سپس به‌وسیلهٔ فیلتر کاغذی آن را صاف‌کنید. این محلول جهت استفاده به میزان $\frac{۱}{۱۰}$ رقیق‌می‌شود. رنگ زمینه می‌تواند با محلول آبی ۰/۳ یا ۰/۵ فوشین بازیک نیز تهیه‌شود.

استاندارد کدورت مک‌فارلند

استاندارد مک‌فارلند ترکیبی از دو محلول در نسبت‌های متفاوت است که حاصل آن تولید محلول کدورت سولفات باریم است.

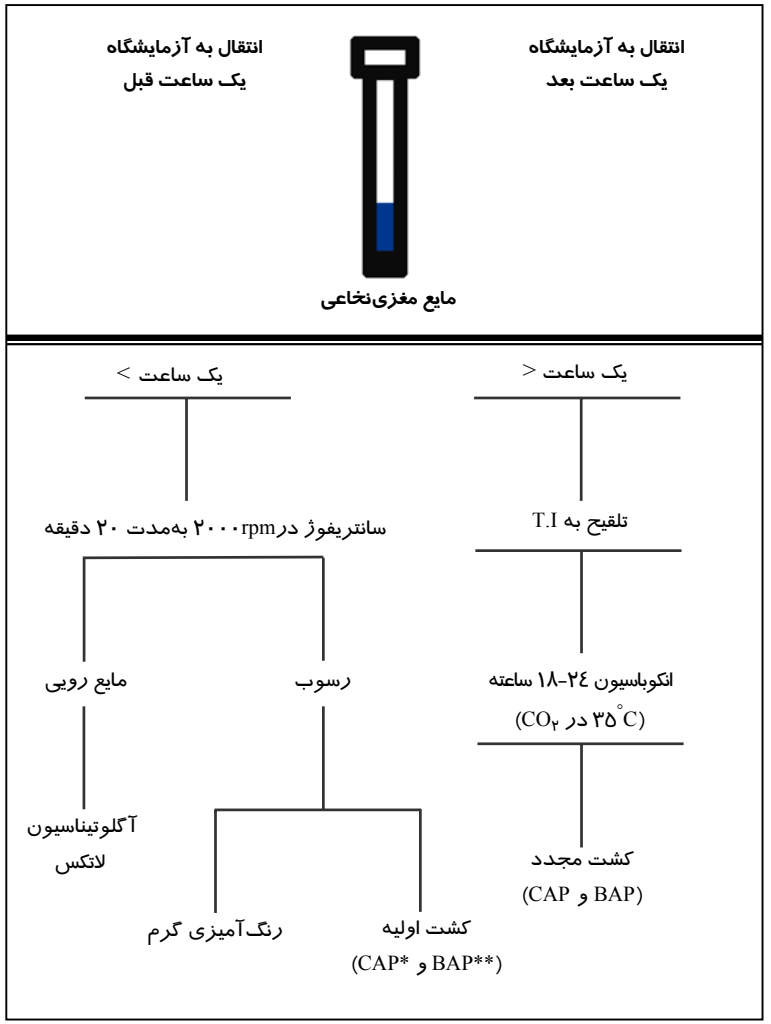
برای تهیهٔ آن از محلول ۱٪ کلرور باریم بدون آب و محلول ۱٪ اسید سولفوریک استفاده‌می‌شود.

استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند شامل ۰/۰۵ml از محلول کلرور باریم ۱٪ و ۹/۹۵ml اسید سولفوریک ۱٪ است درحالی که استاندارد ۱ مک‌فارلند از مخلوط‌کردن ۰/۱ml کلرور باریم ۱٪ و ۹/۹ml اسید سولفوریک ۱٪ به‌دست می‌آید.

استاندارد مک‌فارلند در لولهٔ آزمایش تقسیم‌شده و در دمای اتاق و در تاریکی نگه‌داری‌می‌شود. در هنگام کار سوسپانسیون باکتری باید در حجمی

برابر با حجم استاندارد مک‌فارلند تهیه‌شود. از استاندارد مک‌فارلند علاوه‌بر تعیین حساسیت دارویی در آزمایش انحلال در املاح صفرایی *هموفیلوس آنفلوانزه* و پلیت‌های تشخیصی هموفیلوس نیز استفاده‌می‌شود.

استاندارد مک‌فارلند هر ٦ ماه یک بار باید مجدد ساخته‌شود. محلول استاندارد مک‌فارلند به مرور زمان به‌صورت رسوب و یا توده درآمده و لازم است که قبل از استفاده با شدت تکان داده‌شود. سطح مایع رویی لوله باید علامت زده‌شود و باید قبل از مصرف مطمئن‌شویم که سطح مایع در اثر تبخیر تغییر نکرده‌است، دراین حالت باید محلول استاندارد دیگری تهیه‌شود.



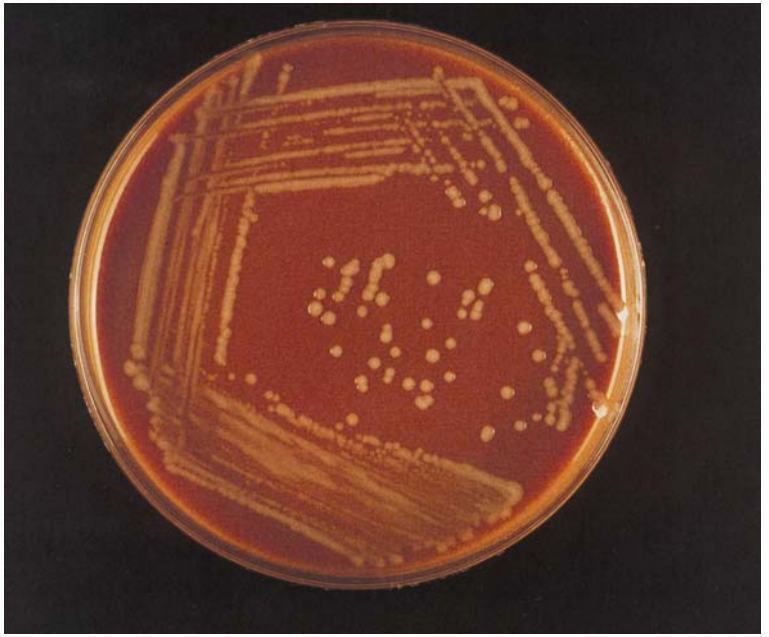
شکل شمارهٔ ۱: مراحل آماده‌سازی CSF برای آزمایش.

* Chocolate Agar Plate
** Blood Agar Plate

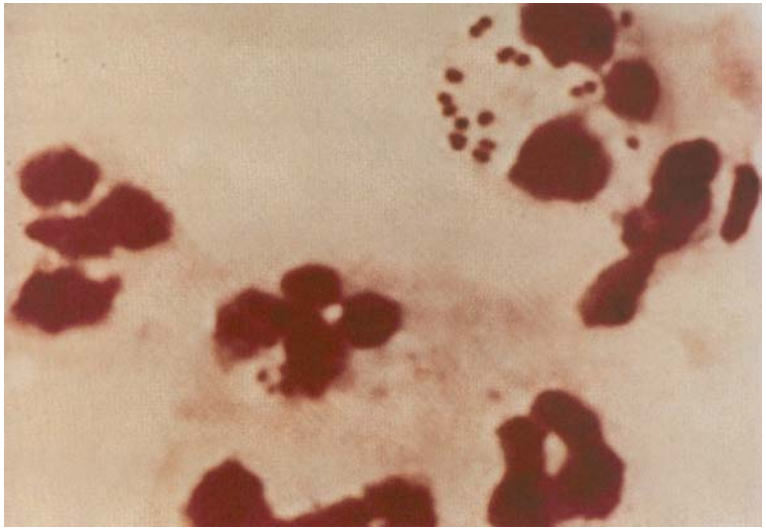
شکل شمارهٔ ۲: محیط ترانس ایزولیت.

شکل شمارهٔ ۳: *نایسریا منتژیتیدیس*- کشت صحیح و رشد مناسب روی محیط آگار خون‌دار.

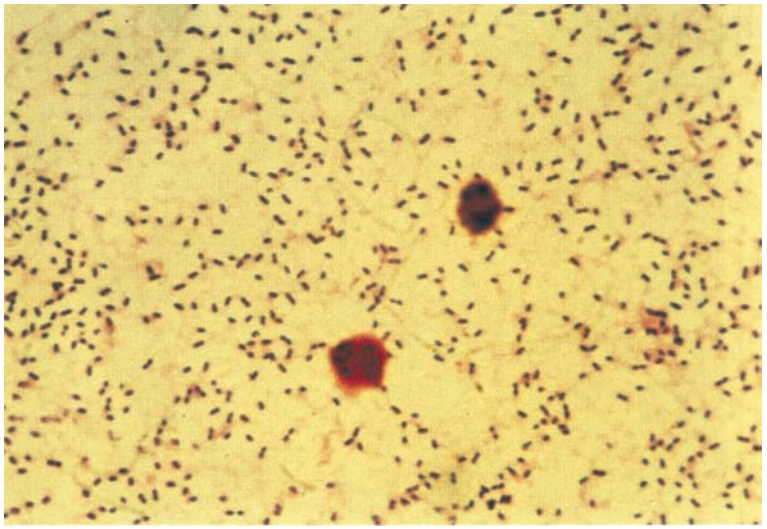
شکل شمارهٔ ٤: *استرپتوکوکوس پنومونیه*- کشت صحیح و رشد مناسب روی محیط آگار خون‌دار.



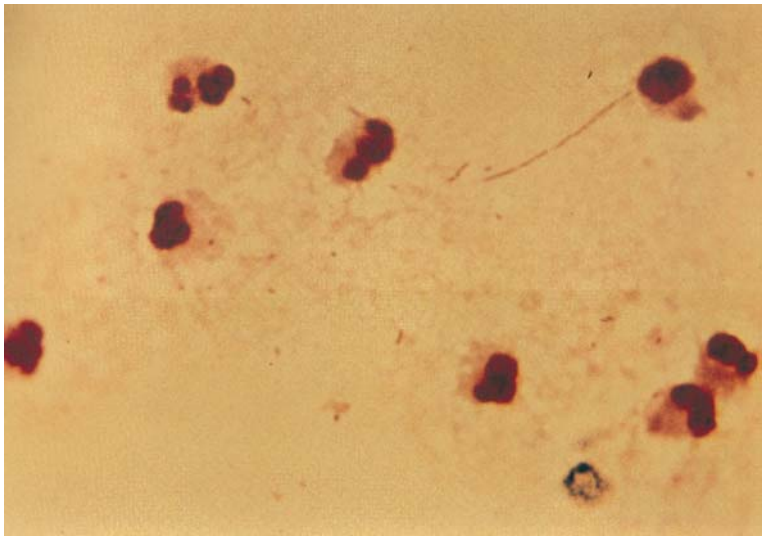
شکل شمارهٔ ۵: *هموفیلوس آنفلوانزه*- کشت صحیح و رشد مناسب روی محیط آگار خون‌دار.



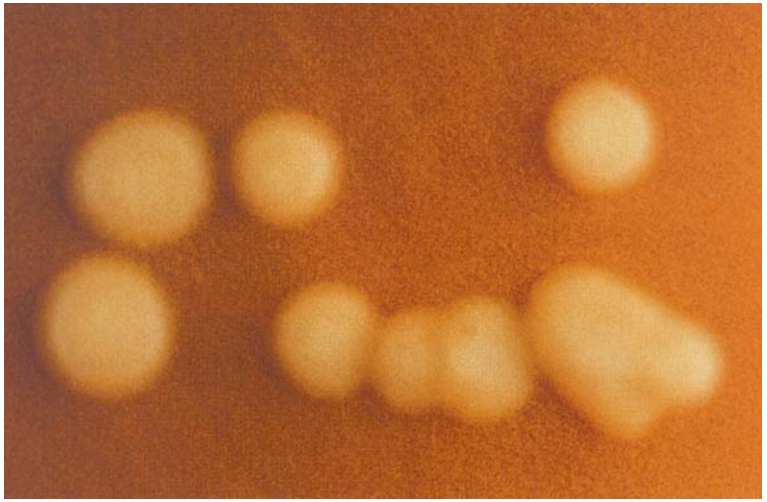
شکل شمارهٔ ۶ـالف: رنگ‌آمیزی گرم CSF- *نایسریا منتژیتیدیس*: دیپلوکک گرم منفی داخل سلولی.



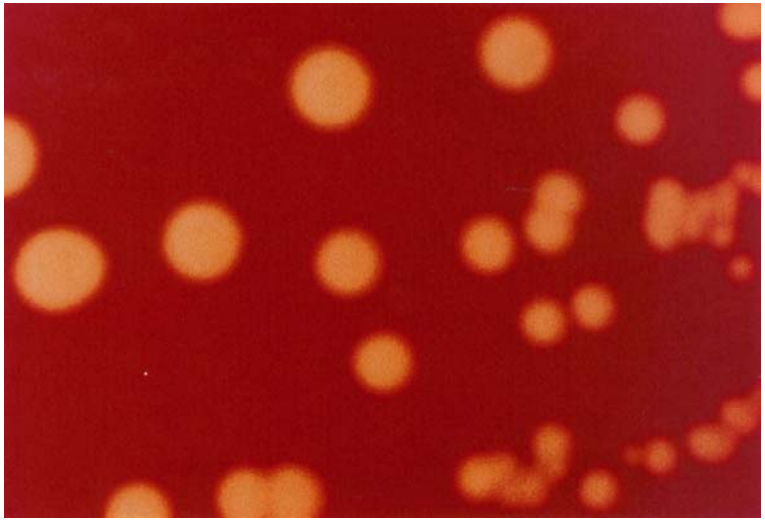
شکل شمارهٔ ۶ـب: رنگ‌آمیزی گرم CSF- *استرپتوکوکوس پنومونیه*: دیپلوکوک گرم مثبت. این شکل متعلق به اسمیر CSF بیماری است که مقادیر فوق‌العاده زیادی از باکتری در آن وجوددارد.



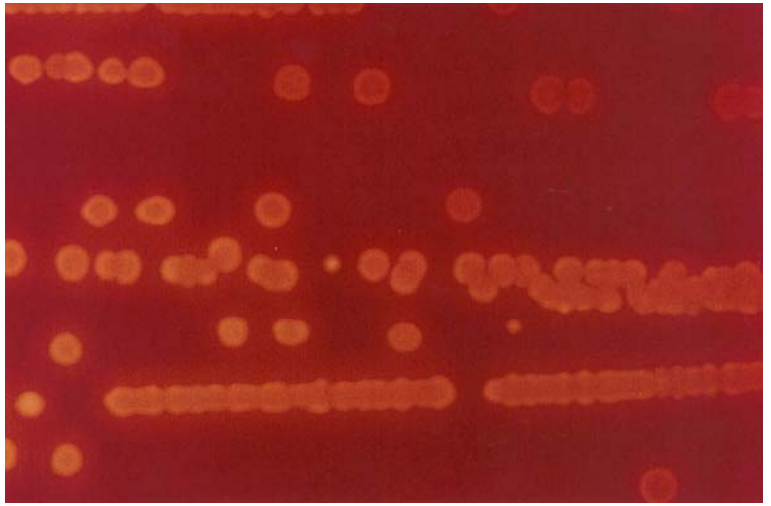
شکل شمارهٔ ۶ـج: رنگ‌آمیزی گرم CSF- *هموفیلوس آنفلوانزه*: کوکوباسیل گرم منفی چندشکلی(پلئومورفیک).



شکل شمارهٔ ۷: محیط آگار شکلاته، *هموفیلوس آنفلوآنزه* با کلنی‌های بی‌رنگ ـ خاکستری مات، بدون تغییر رنگ در محیط.



شکل شمارهٔ ۸: *نایسریا مننژیتیدیس* بعد از انکوباسیون ۲۴-۱۸ ساعته روی محیط آگار خون‌دار: کلنی‌های محدب، گرد، مرطوب و براق.

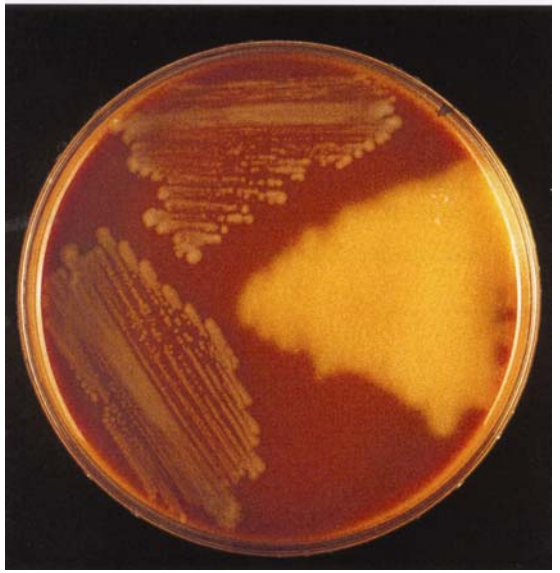


شکل شمارهٔ ۹: *استرپتوکوکوس پنومونیه* روی محیط آگار خون‌دار: کلنی‌های کوچک خاکستری با قوام موکوئید و هالهٔ سبز همولیز آلفا در اطراف آنها.

شناسایی احتمالی	رنگ‌آمیزی گرم	رشد روی BAP	رشد روی CAP (گوسفند)
	دیپلوکک گرم منفی	+	+
	دیپلوکک گرم مثبت	+	+
	کوکوباسیل چندشکلی گرم منفی	–	+

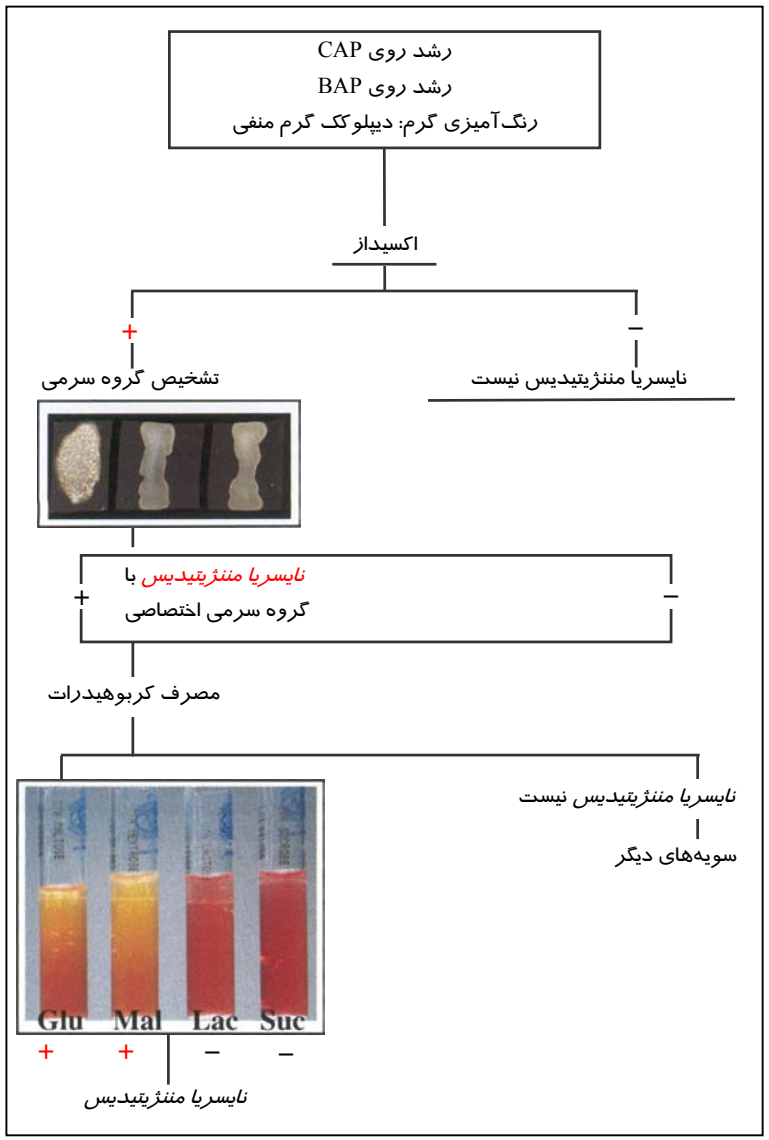
شکل شمارهٔ ۱۰: شناسایی احتمالی *نایسریا منتژیتیدیس*، *استرپتوکوکوس پنومونیه* و *هموفیلوس آنفلوانزه*.

(الف) رشد روی محیط آگار خون‌دار.

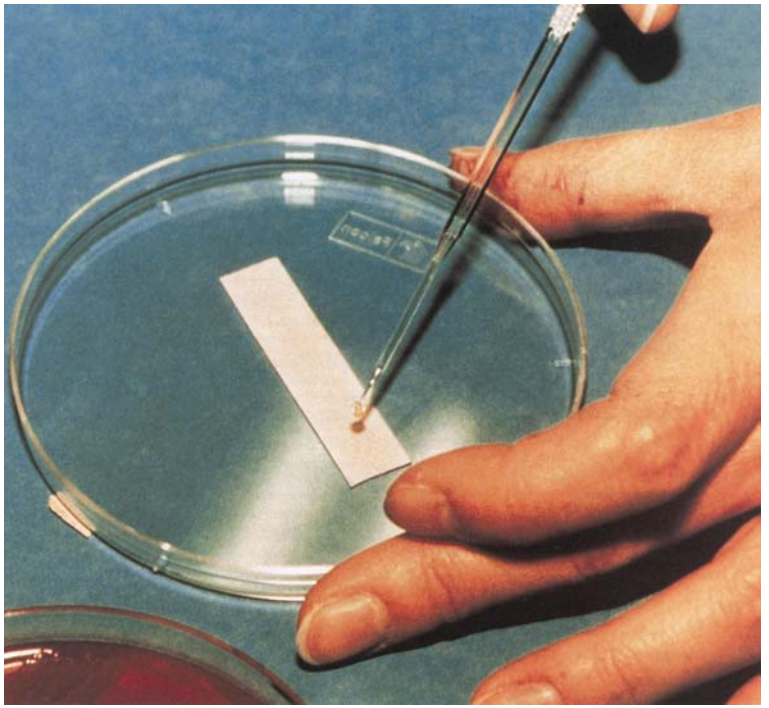


(ب) رشد روی محیط آگار شکلاته.

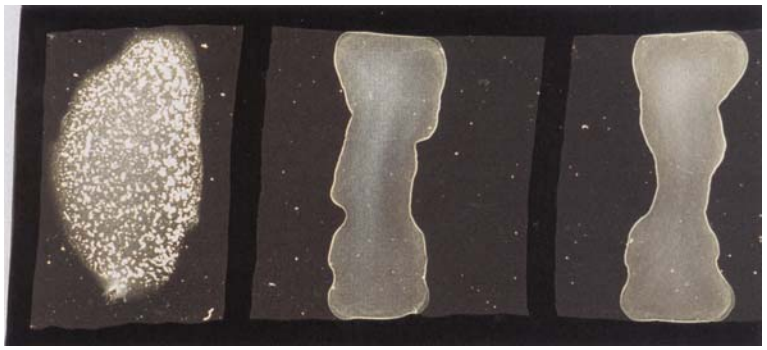
شکل شمارهٔ ۱۱: *نایسریا منتژیتیدیس*(چپ)، *استرپتوکوکوس پنومونیه*(راست) و *هموفیلوس آنفلوانزه*(بالا): هریک از از پلیت‌ها.



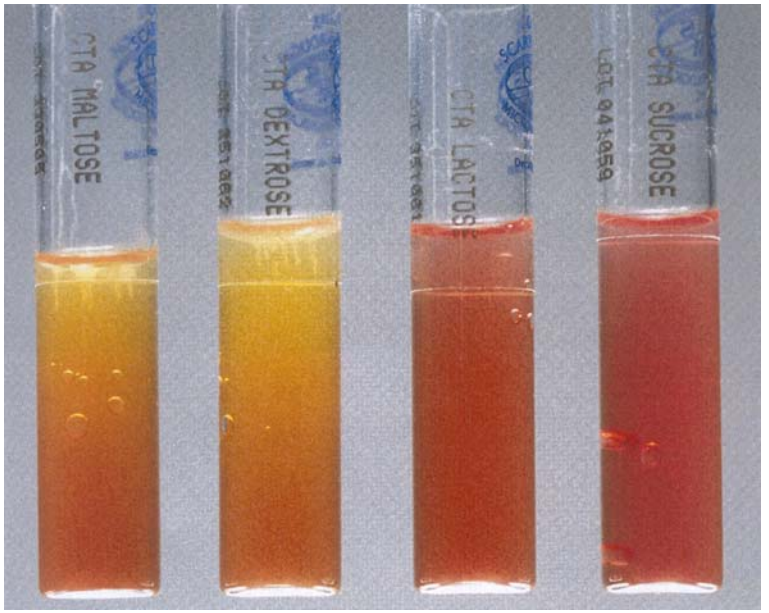
شکل شمارهٔ ۱۲: شناسایی *نایسریا منتژیتیدیس*.



شکل شمارهٔ ۱۳: آزمایش اکسیداز به روش کواکس ـ واکنش مثبت.



شکل شمارهٔ ۱٤: آگلوتیناسیون با شفاف‌شدن مایع زمینه زمانی اتفاق‌می‌افتد که باکتری با آنتی‌سرم هومولوگ مواجه‌شود(چپ). واکنش منفی زمانی رخ‌می‌دهد که باکتری با آنتی‌سرم هترولوگ مخلوط‌شود(وسط) و مخلوط باکتری با سرم فیزیولوژی(راست) که همچنان کدر و یکنواخت می‌ماند.



شکل شمارهٔ ۱۵: واکنش‌های قندی سیستین تریپتیکیس آگار جهت افتراق *نایسریا منتژیتیدیس* از سایر نایسریاها. تولید اسید(زردرنگ) نشان‌دهندهٔ مصرف اکسیداتیو قندهای دکستروز و مالتوز و عدم مصرف قندهای لاکتوز و سوکروز است.

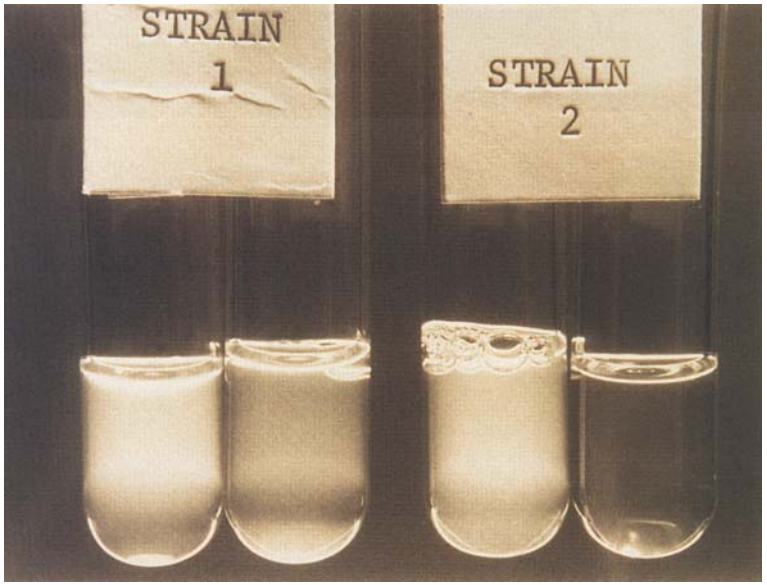
رشد روی CAP
رشد روی BAP
رنگ‌آمیزی گرم: دیپلوکک گرم مثبت

تعیین حساسیت نسبت به اپتوچین
و
آزمایش تعیین حلالیت در برابر صفرا

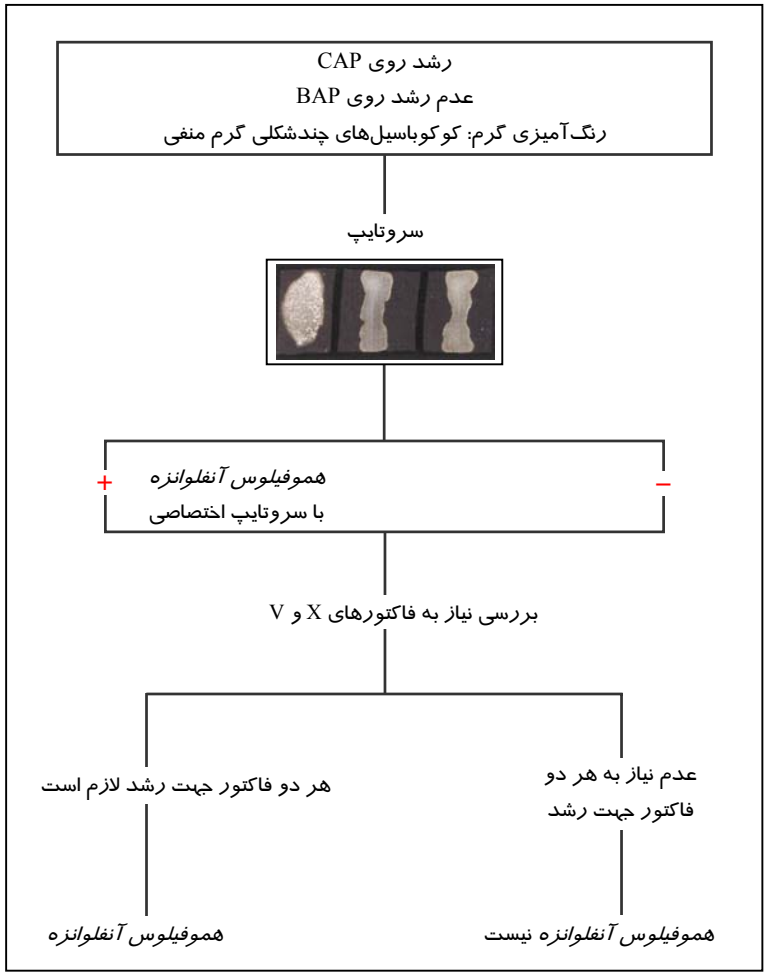
تفسیر نتایج	تعیین حلالیت در برابر صفرا	تعیین حساسیت نسبت به اپتوچین (mm)
استرپتوکوکوس پنومونیه	+	*۱۴< هالهٔ عدم رشد
استرپتوکوکوس پنومونیه	+	۸ < هالهٔ عدم رشد < ۱۴
استرپتوکوکوس پنومونیه نیست	−	۸ > هالهٔ عدم رشد < ۱۴
استرپتوکوکوس پنومونیه نیست	−	صفر= هالهٔ عدم رشد

شکل شمارهٔ ۱۶: شناسایی *استرپتوکوکوس پنومونیه*.

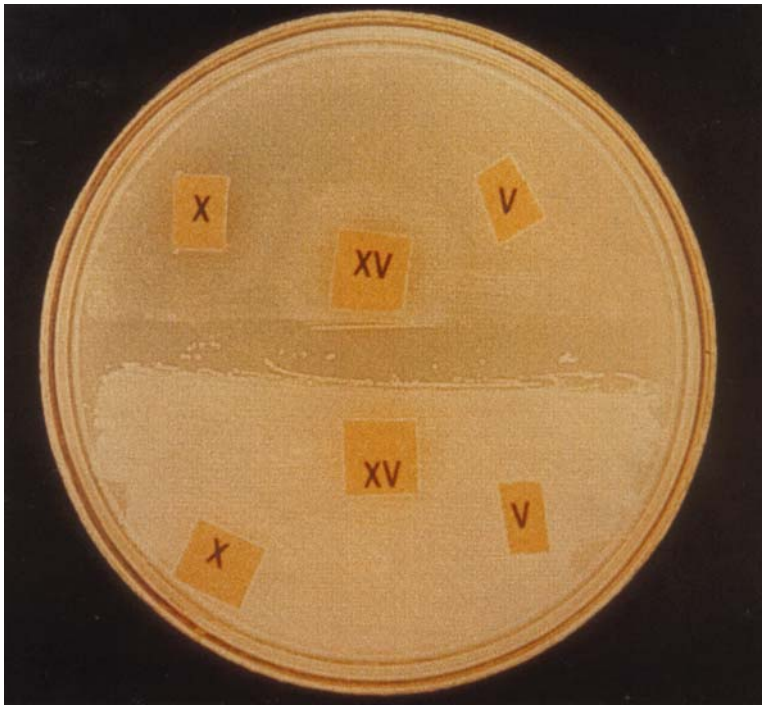
شکل شمارهٔ ۱۷: آزمایش تعیین حساسیت نسبت به اپتوچین جهت شناسایی *استرپتوکوکوس پنومونیه*.
سویهٔ فوقانی مقاوم به اپتوچین است(سایر استرپتوکک‌ها).
سویهٔ میانی و تحتانی حساس به اپتوچین است(پنوموکک).



شکل شمارهٔ ۱۸: آزمایش حلالیت در صفرا برای ۲ سویهٔ باکتریایی مختلف.
اولین لوله از چپ: لولهٔ کنترل دومین لوله از چپ: سویهٔ باکتری
سومین لوله از چپ: لولهٔ کنترل چهارمین لوله از چپ: سویهٔ باکتری
بـه دلیل کدورت لولهٔ دوم از چپ(با وجود کاهش مختصر در آن)، این سویه پنوموکک محسوب نمی‌شود.
لولهٔ چهارم از چپ در مقایسه با لولهٔ سوم(کنترل) کاملاً شفاف شده‌است، این سویه پنوموکک است.



شکل شمارهٔ ۱۹: شناسایی *هموفیلوس آنفلوانزه*.



شـکل شمارهٔ ۲۰: بررسی نیاز به فاکتورهای رشد. *هموفیلوس آنفلوانزه* فقط در اطراف دیسک حاوی هر دو فاکتور X و V رشدمی‌کند.

References

1. Elmer W. Koneman; Stephen D. Allen; William M. Janda; Paul C. Schreckenberger; Washington C. Winn; *Jr Color Atlas and Text book of Diagnostic Microbiology*; fifth Edition, 1997.
2. World Health Organization; *Laboratory methods for the Diagnosis of meningitis CDS/ CSR/ EDC/ 99.7*.
3. Sprasinger-SK; D-Lorezo; *MS(eds)- Urinanalysis and Body fluids. f.a;* Davis Company; Philadelphia; Fourth Edition; 2001.
4. *NCCLS-Quality Assurance for commercially prepared Microbiological Culture Media*; Second Edition; Approved standard-M22-A2-Vol 16 No.16 replaces M.22-A Vol. 10 No.14; December 1996.