

روش‌های آزمایشگاهی در تشخیص مننژیت

نویسندگان به ترتیب حروف الفبا:

دکتر حمیدرضا امیرمقدمی

کارشناس مسئول امور آزمایشگاه‌های معاونت بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی زنجان

دکتر فریناز راشدمرندی

رئیس آزمایشگاه میکروبیولوژی مرکز تحقیقات آزمایشگاه‌های رفانس 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 اداره کل امور آزمایشگاه‌ها

دکتر سعید مهدوی

کارشناس مسئول اداره امور آزمایشگاه‌های دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

به اهتمام: ناهید پدرام

زیر نظر:

دکتر محمدمهدی گویا

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

مرکز نشر
میرا

روش‌های آزمایشگاهی در تشخیص مننژیت / 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، ۱۳۸۴.
۸۸ ص. مصور.

ISBN: 964-359-139-5

فهرست‌نویسی براساس اطلاعات فیپا.

۱. مننژیت. الف. حمیدرضا، امیرمقدمی. ب. پدرام، ناهید. ج. ایران. وزارت بهداشت،
درمان و آموزش پزشکی، مرکز مدیریت بیماری‌ها.

۶۱۶/۸۲

RC۳۷۶/۳۹

۸۴-۴۰۸۳۳

کتابخانه ملی ایران

مرکز نشر
میرا

تلفن: ۸۸۵۵۳۴۲۹ و ۸۸۵۵۳۴۰۳

دورنگار: ۸۸۷۱۳۶۵۳

مرکز مدیریت بیماری‌ها

روش‌های آزمایشگاهی در تشخیص مننژیت

نویسندگان: حمیدرضا امیرمقدمی، فریناز راشدمرندی، سعید صباغی، افشین صفایی،

فرشته عسگری، هما فروهش تهرانی، محمدجواد کاویانی، سعید مهدوی

به اهتمام ناهید پدرام

زیر نظر: دکتر محمدمهدی گویا

خدمات چاپ و نشر: مرکز نشر صدا

ویراستار ادبی: مه‌ری تقی‌پور

صفحه‌آرایی: محمود عباس‌نژاد

اجرای طرح جلد: الهه سبزی‌پوشان

نوبت چاپ: اول (۱۳۸۴)

شمارگان: ۴۰۰۰ نسخه

شابک: ۹۶۴-۳۵۹-۱۳۹-۵ ISBN: 964-359-139-5

«حق چاپ برای مرکز مدیریت بیماری‌ها محفوظ است.»

سرآغاز

مرکز مدیریت بیماری‌ها که مسئولیت تدوین راهنماهای علمی- عملیاتی کشور را به عهده دارد، در راستای وظایف سنگین خود در جهت تأمین، حفظ و ارتقای سطح سلامت جامعه، ناگزیر است از سیستم‌های مراقبت اپیدمیولوژیک، پیشگیری اپیدمیولوژیک، گزارش‌دهی، همه‌گیرشناسی، آموزش، مشاوره و پروفیلاکسی‌های گوناگون بهره‌گیرد. این مرکز در مسیر حرکت خود، به عشق و فداکاری انسان‌های علاقه‌مند به علم و دانش اساتید دلسوز، به خرد و اندیشه عارفانه محققان خاموش و پرکار و به عمل هنرمندانه عوامل بی‌تکلف و تلاش کارشناسان زبده همواره وابسته است.

مجموعه حاضر تحت عنوان **روش‌های آزمایشگاهی در تشخیص مننژیت** با توجه به نیاز مبرم این مرکز در ارتقای توانمندی آزمایشگاه‌های کشور در تشخیص عوامل بیماری مننژیت توسط صاحب‌نظران مراکز مختلف دانشگاهی و پژوهشی و با استفاده از منابع مورد تأیید سازمان جهانی بهداشت تهیه شده‌است. تلاش براین بوده که بر جنبه‌های کاربردی تکیه‌شود، به گونه‌ای که هر کارشناس و کاردان آزمایشگاه فارغ از مباحث نظری که در کتاب‌های دیگر در دسترس است بتواند مراحل انجام آزمایش را به صورت مدون در اختیار داشته‌باشد.

مرکز مدیریت بیماری‌ها از نقطه‌نظرها، پیشنهادها و انتقادهای تمام صاحب‌نظران و دست‌اندرکاران آموزشی، پژوهشی و اجرایی امور بهداشتی‌درمانی استقبال می‌کند؛ بنابراین خواهشمند است این مرکز را در جهت بهبود کیفی متون عملی و پژوهشی یاری فرمایید.

«دکتر محمد مهدی گویا»

رئیس مرکز مدیریت بیماری‌ها

فهرست مطالب

صفحه	عنوان	صفحه	عنوان
۲۴	ب) اندازه گیری قند CSF	۹	پیش گفتار
۲۵	ج) اندازه گیری سطح لاکتات CSF	۱۱	مقدمه
۲۵	۳-۴- آزمایش های سرولوژی CSF	۱۳	تعریف
۲۵	الف) آزمایش CRP	۱۳	مایع مغزی نخاعی
۲۵	ب) آزمایش آگلوتیناسیون لاتکس	۱۳	۱. ثبت اطلاعات
۲۶	آزمایش های باکتری شناسی	۱۳	۱-۱- فرم درخواست انجام آزمایش های CSF / خون
۲۶	۱. مایع مغزی نخاعی (لوله شماره ۲)	۱۴	۱-۲- اطلاعات مورد نیاز ثبت شده روی برچسب هر نمونه
۲۶	انتقال نمونه CSF	۱۴	۱-۳- اطلاعات لازم جهت پذیرش نمونه (CSF / خون) در آزمایشگاه
۲۷	نحوه استفاده از محیط T-I	۱۵	۲. نمونه گیری
۲۸	کشت از محیط انتقالی CSF (T-I)	۱۵	روش جمع آوری CSF
۲۸	کشت اولیه، کشت مجدد و تشخیص احتمالی	۱۶	۳. مراحل انجام آزمایش روی مایع مغزی نخاعی
۲۸	۱. کشت اولیه CSF	۱۶	۳-۱- بررسی فیزیکی (ظاهر - حجم)
۲۹	الف) روش رنگ آمیزی گرم برای CSF	۱۸	۳-۲- آزمایش شمارش سلولی
۳۱	ب) روش کلی انجام آزمایش های آگلوتیناسیون لاتکس	۱۸	الف) آزمایش شمارش سلولی با استفاده از لام نئوبار
۳۲	۲. خون	۲۱	ب) شمارش افتراقی گلبول های سفید CSF
۳۲	نمونه گیری و انتقال	۲۲	۳-۳- آزمایش های بیوشیمیایی CSF (لوله شماره ۱)
۳۶	بررسی ظاهر کلنی ها	۲۲	الف) اندازه گیری پروتئین CSF
۳۷	۱. شناسایی نایسریا مننژیتیدیس		
۳۷	آزمایش اکسیداز به روش کوآکس		
۳۸	شناسایی گروه های سرمی نایسریا مننژیتیدیس		
۴۰	مصرف کریویدرات ها توسط نایسریا مننژیتیدیس		
۴۱	۲. شناسایی استرپتوکوکوس پنومونیه (پنوموکک)		
۴۲	تعیین حساسیت به اپتوجین		
۴۳	آزمایش حالیت در صغرا		

صفحه	عنوان
۴۴	۳. شناسایی هموفیلوس آنفلوانزه
۴۴	شناسایی سروتایپ‌های هموفیلوس آنفلوانزه
۴۵	آزمایش بررسی نیاز به فاکتورهای X و V
۴۷	پلیت‌های شناسایی هموفیلوس
۴۸	نگهداری و انتقال نایسریا مننژیتیدیس، استرپتوکوکوس پنومونیه و هموفیلوس آنفلوانزه
۴۸	نگهداری باکتری‌ها
۴۸	۱. نگهداری کوتاه‌مدت
۴۸	۲. نگهداری بلندمدت
۵۰	کنترل کیفیت محیط‌ها و معرف‌ها
۵۱	انجام آزمایش‌های کنترل کیفی
۵۳	ضمیمه
۵۳	طرز تهیه محیط‌ها و معرف‌ها
۵۳	۱. محیط‌های مایع و جامد (حاوی آگار) مورد استفاده در روش‌های متداول آزمایشگاهی
۵۸	۲. محیط‌های اختصاصی
۶۲	۳. محیط‌های انتقال‌دهنده و ذخیره‌سازی باکتری‌ها
۶۲	معرف‌های متفرقه
۸۷	منابع

ملی سلامت، جناب آقای دکتر محمد صاحب الزمانی مدیر کل محترم اداره کس امور آزمایشگاه‌های تشخیص طبی و جناب آقای دکتر عبدالرضا استقامتی ریاست محترم اداره بیماری‌های قابل پیشگیری با واکسن 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 ۱۳۸۴

پیش‌گفتار

از عصری که ابن‌سینای بزرگ تشخیص بیماری قند را با آزمایش ادرار ممکن دانست، از زمانی که پاستور دانشمند فقید فرانسوی نظریه تولید خودبه‌خودی عوامل بیماری‌ها را به چالش کشید، از هنگامی که کخ عامل بیماری سل را کشف نمود و بر باورهای غلط پیشینیان خط بطلان کشید، از آن هنگام که آد미ان تکیه بر روش‌های علمی و تجربی را جهت تبیین حادثه‌های طبیعی بر کلی‌گویی‌های شبه فلسفی برگزیدند، آزمون و آزمایش جایگاه ویژه‌ای در علوم بشری یافت.

در علوم پزشکی نیز آزمایشگاه به‌عنوان یکی از محل‌هایی که با آزمون و سنجش و تشخیص عوامل بیماری‌ها به یاری پزشکان و دردمندان می‌آید، روزبه‌روز اهمیت بیشتری می‌یابد. به‌گونه‌ای که امروز سازمان جهانی بهداشت، آزمایشگاه‌ها را نه تنها 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 نحوه نگه‌داری و انتقال نمونه و از نظر یکسان‌سازی و روش‌مند نمودن نیاز به مجموعه‌ای داشت. مجموعه‌ای که با تکیه بر خرد جمعی افرادی که مستقیماً با تشخیص آزمایشگاهی مننژیت مواجه هستند تهیه‌شود.

این کتاب جهت استفاده کارشناسان و کاردانی تدوین شده است که در پی یک دستورالعمل استاندارد در تشخیص آزمایشگاهی مننژیت هستند. جادارد از استاد گرامی جناب آقای دکتر محمد مهدی گویا رئیس محترم مرکز مدیریت بیماری‌ها که با حمایت‌های بی‌دریغ ایشان جان تازه‌ای در کالبد آزمایشگاه‌های بهداشت و درمان کشور دمیده شد تشکر نمایم.

همچنین از جناب آقای دکتر محمد عباسی ریاست محترم آزمایشگاه

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

«دکتر عبدالرضا استقامتی»

رئیس اداره بیماری‌های قابل پیشگیری با واکسن

مقدمه

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

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 تشکیل می‌دهد اهمیت زیادی دارد.

از سوی دیگر تعیین اثربخشی برنامه واکسیناسیون علیه هموفیلوس آنفلوانزه و استرپتوکوک پنومونیه و انجام واکسیناسیون در صورت نیاز و همچنین تشخیص زودرس اپیدمی بیماری مننگوکی و مقابله 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 از جمله مواردی است که مراقبت از این بیماری را با مشکل مواجه می‌سازد. بنابراین ضمن بازنگری دستورالعمل اجرایی مراقبت از این بیماری، به‌منظور هماهنگی و ارتباط دقیق و منسجم بین آزمایشگاه و بخش‌های بهداشت

۲. نام پدر
۳. سن و جنس
۴. نام بیمارستان
۵. شماره اتاق/ شماره 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 تاریخچه بیماری
۱۰. مصرف آنتی‌بیوتیک و نوع آن در ۴۸ ساعت اخیر
۱۱. نوع نمونه (CSF / خون)
۱۲. آزمایش مورد درخواست (کشت، شمارش سلولی، بیوشیمی) (قند - پروتئین - LDH) و سرولوژی [آگلوتیناسیون لاتکس^۲ - CRP^۳].

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

نام بیمار:	
شماره اتاق:	شماره 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 نمونه دریافتی
- تاریخ و ساعت نمونه دریافتی

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

تعریف

مایع مغزی نخاعی

CSF^۱ اولین بار توسط Cotango در سال ۱۷۶۴ شناخته شد. عملکرد این مایع که در اطراف مغز و نخاع جریان دارد، تأمین مواد غذایی، دفع مواد زائد و حفاظت از سیستم اعصاب مرکزی است. مایع مغزی نخاعی از شبکه کوروئید تولید شده و مقدار تام آن در نوزادان ۶۰-۱۰ ml و در بالغین ۱۷۰-۱۴۰ ml است.

نمونه CSF یک نمونه اورژانس بوده و باید هرچه سریع‌تر آزمایش و نتایج آن گزارش شود.

- جهت انجام آزمایش مایع مغزی نخاعی و خون مراحل زیر مورد توجه قرار می‌گیرد:
۱. ثبت اطلاعات
 ۲. نمونه‌گیری
 ۳. مراحل انجام آزمایش روی مایع مغزی نخاعی

۱. ثبت اطلاعات

۱-۱- فرم درخواست انجام آزمایش‌های CSF / خون

- توصیه می‌شود اطلاعات مربوط به تمام نمونه‌های بالینی در فرمی حاوی موارد زیر ثبت شود:
۱. نام بیمار

1. Cerebrospinal Fluid

۲. نمونه‌گیری

جمع‌آوری نمونه‌های بالینی در جداسازی و تعیین هویت عوامل میکروبی مولد مننژیت بسیار حائز اهمیت است. توصیه می‌شود تا حد امکان قبل از درمان آنتی‌بیوتیکی از بیمار نمونه‌گیری شده تا از نابودی میکروارگانیزم جلوگیری شود. البته باید توجه داشت هرگز به منظور جمع‌آوری نمونه درمان بیمار به تأخیر نیفتد. مایع مغزی‌نخاعی و خون باید هرچه سریع‌تر به آزمایشگاه منتقل شده و تحت آزمایش قرار گیرند.

روش جمع‌آوری CSF

جمع‌آوری نمونه CSF روشی تهاجمی است و باید به دست افراد کارآموده و در شرایط آسپتیک انجام شود. در صورت احتمال وجود مننژیت در بیمار، CSF بهترین نمونه بالینی برای جداسازی و تعیین هویت عامل بیماری‌زا است. جمع‌آوری CSF توسط پزشک به روش LP^۱ و کاملاً آسپتیک (عاری از هرگونه آلودگی میکروبی) و فقط برای تشخیص انجام می‌شود.

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

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

1. Lumbar Puncture

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

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

نکات ضروری

- انجام آزمایش CSF در هر زمان به‌عنوان یک آزمایش اورژانس تلقی می‌شود.
- از قراردادن نمونه در یخچال، حرارت زیاد و نور شدید اجتناب شود.
- از به‌کار بردن پنبه، جهت بستن سر لوله‌ها اکیداً خودداری شود.
- برای انتقال لوله‌ها از جالوله‌ای مناسب استفاده شود.
- در صورتی که امکان آزمایش فوری نمونه در آزمایشگاه میکروب‌شناسی وجود نداشته‌باشد، از محیط ترانس‌ایزولیت (T-I)^۱ استفاده شود.
- لازم است نمونه توسط پزشک یا پرستار به آزمایشگاه منتقل شود.

۳. مراحل انجام آزمایش روی مایع مغزی‌نخاعی

۳-۱- بررسی فیزیکی (ظاهر - حجم)

- حجم: حجم CSF برحسب میلی‌لیتر گزارش می‌شود.
- ظاهر^۲: ظاهر طبیعی CSF زلال و شفاف (Clear-Crystal) است. ظاهر CSF را پس از بررسی به یکی از موارد صفحه بعد (جدول‌های شماره ۱ و ۲) توصیف کنید.

1. Trans-Isolate
2. Appearance

جدول شماره ۱. اهمیت بالینی ظاهر CSF

ظاهر	موارد	علتها
زلال - شفاف		نرمال
مه‌آلود، کدر، ابری	WBC_s^1	مننژیت
روغنی	مواد حاجب رادیوگرافیک	تزریق ماده حاجب
خونی	RBC_s^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 شماره 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
نحوه توزیع خون	در هر سه لوله به صورت یکنواخت دیده می‌شود	در لوله ۱ بیشتر است و کم‌کم در لوله‌های بعدی از بین می‌رود
تشکیل لخته	بدون تشکیل لخته	به دلیل وجود فیبرینوژن پلاسما ممکن است لخته ایجاد شود
محلول رویی زردفام	بلافاصله بعد از کشیدن مایع نخاعی وجود دارد	چون همولیز بعد از ۲ ساعت شروع می‌شود کم‌کم زردفام می‌شود

1. White Blood Cell
2. Red Blood Cell

اهمیت بالینی ظاهر CSF

توجه داشته باشید که ممکن است تا ۲۰۰ عدد WBC و تا ۴۰۰ عدد RBC در هر میکرولیتر، ظاهر طبیعی CSF را تغییر ندهد، بنابراین باید همه نمونه‌ها به‌طور میکروسکوپی بررسی شوند.

۳-۲. آزمایش شمارش سلولی

اساس آزمایش، شمارش و شناسایی گلبول‌های سفید و قرمز در CSF است. برای انجام شمارش سلولی لوله مربوط ابتدا باید به آرامی مخلوط شود.

شمارش سلولی باید به سرعت انجام شود؛ زیرا طی مدت ۲ ساعت، ۴۰٪ لکوسیت‌ها از بین می‌روند. در صورتی که نمونه‌ها به سرعت آزمایش نشوند، باید نمونه مربوط به آزمایش‌های سلولی در یخچال با درجه حرارت $4^{\circ}C$ نگهداری شود.

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 فیزیولوژی - مارکانو

روش انجام آزمایش

برای انجام شمارش سلولی ابتدا باید محتوی لوله را به آرامی مخلوط کنیم. یک قطره CSF را بین لام و لامل گذاشته و زیر میکروسکوپ با درشت‌نمایی $40\times$ بررسی می‌نماییم. در صورتی 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 به هیچ وجه از سل کانتر استفاده نشود و باتوجه به فرمول داده شده تعداد سلول‌ها مطابق شمای زیر شمارش می‌شود:

W		W
	R R	
	R R	
W		W

چنانچه نمونه برای شمارش گلبول‌های سفید رقیق نشده باشد، تعداد کل سلول‌های شمارش شده در ۴ مربع WBC که با علامت W مشخص شده در ۲/۵ ضرب و عدد نهایی به عنوان تعداد کل گلبول‌های سفید در میلی‌متر مکعب CSF گزارش شود و در صورت رقیق شدن، شمارش WBC طبق فرمول زیر محاسبه می‌شود:

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

در صورتی که تعداد زیاد RBC در شمارش WBC اختلال به وجود آورد، طبق روش زیر عمل کنید.

روش تخریب RBC در صورت خونی بودن CSF

۱. بعد از مخلوط کردن لوله، چهار قطره از CSF را برداشته و در لوله دیگری می‌ریزیم.
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 صبر می‌کنیم.
۴. بعد از تخلیه کامل محتویات پیپت پاستور در لوله، آنها را مخلوط می‌نماییم.
۵. مجدداً محتویات لوله را با پیپت پاستور کشیده قطره اول را دور می‌ریزیم و مابقی را با هموسیتومتر می‌خوانیم.
۶. تعداد WBC را شمارش می‌کنیم.

اگر جهت شمارش گلبول‌های قرمز عمل رقیق‌سازی انجام نگرفت، تعداد کل گلبول‌های قرمز شمارش شده در ۵ مربع مربوط به RBC که با علامت R مشخص شده در ۵۰ ضرب شده و عدد نهایی به عنوان تعداد کل گلبول‌های قرمز در میلی‌متر مکعب CSF گزارش شود. در صورت انجام رقت، شمارش RBC طبق فرمول بالا انجام شود.

☞ توجه: حجم خوانش در یک مربع W (شمارش گلبول سفید) برابر با طول × عرض × ارتفاع به ترتیب ۱ × ۱ × ۱/۱۰ = ۱/۱۰ خواهد بود.

☞ توجه: حجم خوانش در یک مربع R (شمارش گلبول قرمز) برابر با طول × عرض × ارتفاع به ترتیب ۱/۵ × ۱/۵ × ۱/۱۰ = ۱/۲۵۰ خواهد بود.

تصحیح تعداد گلبول‌های سفید مایع مغزی نخاعی در نمونه‌های خونی (Bloody)

زمانی که CSF به خون آغشته باشد، می‌توان تعداد گلبول‌های سفید را از طریق فرمول زیر اصلاح نمود، لازم است ابتدا تعداد WBC و RBC خون محیطی تعیین شود.

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

گلبول سفید اضافه شده به CSF - گلبول سفید شمارش شده CSF = گلبول سفید واقعی CSF

اگر RBC و WBC خون طبیعی باشد، می‌توان به ازای هر ۷۰۰ عدد RBC موجود در CSF، یک سلول از لکوسیت‌های CSF حذف کرد.

مقادیر مرجع برای گلبول‌های سفید CSF

تعداد WBC در افراد بالغ ۵-۰ سلول در میکرولیتر و در نوزادان ۳۰-۰ سلول در میکرولیتر است.

ب) شمارش افتراقی گلبول‌های سفید CSF

به دلیل عدم دقت لازم در تشخیص و افتراق سلولی، از انجام شمارش افتراقی توسط لام نئوبار خودداری شود.

برای حصول اطمینان از مشاهده حداکثر تعداد سلول‌ها، نمونه باید قبل از تهیه 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 لوله شماره ۳ را به مدت ۱۰-۵ دقیقه در ۲۰۰۰ rpm سانتریفوژ کنید.
- مایع رویی را برای آزمایش‌های دیگر جدا کرده و نگه‌دارید و رسوب را با حجم کمی از این مایع مخلوط کنید.
- یک قطره از رسوب را روی لام قرارداده و بعد از پخش و خشک کردن در حرارت آزمایشگاه، با استفاده از رنگ رایت رنگ‌آمیزی کنید.
- با استفاده از عدسی $\times 100$ میکروسکوپ نوری و کانتردیف گلبول‌های سفید را شمارش افتراقی کنید.

باید همان دقتی را که درخصوص شمارش افتراقی WBC خون داریم در این‌جا نیز داشته باشیم. در CSF، سلول‌های شبکه کوروئید-اپاندیم (سلول‌های داخلی بطن‌ها) و سلول‌های بدخیم ممکن است دیده شوند که در مورد اول طبیعی است. در صورت وجود سلول‌های به هم چسبیده با نامنظمی هسته یا هستک‌های پررنگ با یک پاتولوژیست مشورت کنید.

۳-۳. آزمایش‌های بیوشیمیایی CSF (لوله شماره ۱)

چون CSF در واقع ناشی از فیلتراسیون خون و ترشح فعال به داخل بطن‌ها است، ترکیبات آن مشابه پلاسما نیست و تغییر در نفوذپذیری سد خونی مغزی (BBB)^۱ 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 تری کلرو استیک اسید انجام می‌شود. در روش اول بیشتر آلبومین رسوب داده می‌شود تا گلوبولین. در روش دوم آلبومین و گلوبولین به یک نسبت رسوب می‌کنند، 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 استفاده شود.

در روش‌های یادشده، پروتئین تمام اندازه‌گیری می‌شود و در صورت درخواست تعیین اجزای تشکیل‌دهنده لازم است از روش‌های نفلومتری یا ایمنوالکترو فورزیز استفاده شود.

وسایل و مواد مصرفی:

۱. فتومتر یا اسپکتروفتومتر

۲. محلول اسید سولفوسالی سیلیک ۳٪ یا TCA ۱۰٪

۳. سمپلر

۴. لوله آزمایش

۵. کاغذ شطرنجی جهت رسم منحنی استاندارد

انجام آزمایش CSF با استفاده از رفراکتومتر و یا کیت‌های اندازه‌گیری پروتئین خون به دلیل مقادیر کم پروتئین در CSF بی‌ارزش است.

جدول شماره ۳. روش انجام آزمایش پروتئین مایع مغزی نخاعی به روش اسید سولفوسالی 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

* تهیه محلول سرم کنترل: برای این کار می‌توان از سرم کنترل‌های تجاری به نسبت ۱/۱۰۰ رقیق شده با آب مقطر استفاده کرد.

** تهیه محلول استاندارد: جهت تهیه محلول استاندارد، می‌توان از استاندارد کیت آلبومین یا پروتئین سرم استفاده کرد. 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) رقیق کرد.

پس از ۱۰ دقیقه، انکوباسیون در درجه حرارت اتاق، در طول موج ۶۲۰ نانومتر خوانده شده و با استفاده از فرمول زیر محاسبه می‌شود:

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

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

مقادیر مرجع پروتئین مایع مغزی نخاعی:

۷۵-۲۵mg/dl = نوزاد (یک ماه) - ۱ روز

۷۲-۲۰mg/dl = ۲-۳ ماه

۱۵-۲۰mg/dl = ۴-۶ ماه

۴۵-۱۰mg/dl = ۸ سال - ۷ ماه

۴۵mg/dl < = بزرگسال

ب) اندازه‌گیری قند CSF

وسایل و مواد مصرفی:

۱. لوله 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 انجام می‌شود. باتوجه به اینکه میزان گلوکز CSF، در فرد سالم معمولاً ۶۰٪ مقدار سرم یا پلاسما است، نتایج باید با سطح پلاسمایی گلوکز مقایسه شود. بنابراین جهت مقایسه قند خون و قند CSF، لازم است نیم‌ساعت قبل از نمونه‌گیری CSF، خون بیمار جهت تعیین مقدار گلوکز گرفته‌شود تا فرصت تبادل بین خون و CSF وجود داشته‌باشد.

به‌علت انجام سریع فرآیند گلیکولیز در CSF، اندازه‌گیری قند آن باید به‌سرعت انجام شود.

باید به این نکته توجه‌داشت که 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 مننژیت باکتریایی یا قارچی نسبت به کاهش گلوکز حساس‌تر و قابل اعتمادتر است. این مقدار قبل از درمان بالابوده و با درمان موفقیت‌آمیز کاهش می‌یابد، بنابراین می‌توان جهت ارزیابی درمان استفاده شود.

چون RBC حاوی مقدار زیادی لاکتات است، در CSF‌های زردفام ناشی از همولیز RBC، مقدار لاکتات به صورت کاذب بالا می‌رود. جهت اندازه‌گیری سطح لاکتات در CSF می‌توان از روش‌های استاندارد انجام آن روی سرم یا پلاسما استفاده کرد.

۳-۴. آزمایش‌های سرولوژی CSF

الف) آزمایش CRP

آزمایش CRP روی CSF، یکی از راه‌های افتراق مننژیت 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 استفاده کرد. اگر بلافاصله پس از دریافت نمونه قادر به انجام روش آگلوتیناسیون لاتکس نباشید، می‌توان نمونه را در حرارت $2-8^{\circ}\text{C}$ برای چند ساعت یا در برودت 20°C - برای زمان بیشتری نگه‌داری کرد. جزئیات روش فوق در قسمت میکروبی‌شناسی توضیح داده خواهد شد.

آزمایش‌های باکتری‌شناسی

هر چند میکروارگانیزم‌های متعددی عامل مننژیت عفونی هستند، ولی شایع‌ترین میکروارگانیزم‌های عامل این بیماری استرپتوکوک پنومونیه، هموفیلوس آنفلوانزه و نایسریا مننژیتیدیس است. بنابراین در این بخش به تشخیص آزمایشگاهی این عوامل در مایع نخاعی و خون پرداخته می‌شود.

۱. مایع مغزی نخاعی (لوله شماره ۲)

انتقال نمونه CSF

شایع‌ترین میکروارگانیزم‌های عامل مننژیت استرپتوکوک پنومونیه، هموفیلوس آنفلوانزه و نایسریا مننژیتیدیس هستند که ارگانیزم‌های بسیار سخت‌رشد و شکننده‌ای می‌باشند. بنابراین اگر مایع مغزی نخاعی هرچه سریع‌تر آزمایش شود با احتمال زیادتری از آن جدا خواهند شد.

نمونه CSF باید به محض جمع‌آوری به آزمایشگاه میکروبی‌شناسی منتقل شده و ظرف یک ساعت پس از نمونه‌گیری آزمایش شود (شکل شماره ۱). از قراردادن نمونه CSF در معرض نور خورشید، گرما و سرمای زیاد خودداری کنید.

اگر احتمال می‌دهید بیمار مبتلا به مننژیت مننژوککی باشد و چند ساعت تأخیر در انجام آزمایش اجتناب‌ناپذیر است، درپوش لوله محتوی CSF را شل کرده و آن را در حرارت 35°C و در شرایط $5\% \text{CO}_2$ (جار محتوی شمع) نگه‌داری کنید. این کار احتمال زنده ماندن باکتری در نمونه را افزایش می‌دهد. اگر انتقال نمونه به آزمایشگاه همان روز مقدور نباشد، نمونه CSF را باید در شرایط استریل به محیط T-I منتقل و در طول شب در انکوباتور 35°C نگه‌داری کرد.

محیط T-I محیطی بی‌فازیک است که برای کشت اولیه مننگوکک و سایر عوامل مننژیت باکتریال از CSF و خون به کار می‌رود (شکل ۲). این محیط به عنوان محیطی مغذی، نگه‌دارنده و نیز برای انتقال استفاده می‌شود.

نحوه استفاده از محیط T-I

۱. محیط کشت T-I را در انکوباتور $35-37^{\circ}\text{C}$ گرم کرده یا مدتی در حرارت اتاق (25°C) نگه‌داری کنید.
 ۲. سرپوش پلاستیکی سرلوله حاوی T-I را ابتدا با الکل و سپس با بتادین ضدعفونی کرده و صبر کنید تا خشک شود.
 ۳. ۱ ml از CSF را به داخل محیط T-I تلقیح کنید.
 ۴. بقیه CSF را در سرنگ و در حرارت اتاق نگه‌داشته و رنگ‌آمیزی گرم انجام دهید. از قراردادن نمونه در یخچال خودداری کنید.
 ۵. لوله T-I را به مدت ۲۰-۱۸ ساعت در حرارت 35°C قرار دهید.
 ۶. برچسب حاوی مشخصات بیمار، تاریخ و ساعت جمع‌آوری نمونه را روی لوله T-I بچسبانید.
- می‌توان محیط T-I را در حرارت 35°C تا هفت روز نگه‌داری کرد. بهتر است جهت تهویه محیط T-I، به محض تلقیح یا بعد از گذشت ۲۴ ساعت، با استفاده از سوزن استریل (مخصوص تزریقات زیرجلدی مانند سرنگ انسولین) شرایط تهویه محیط کشت را فراهم کنیم. در این صورت امکان حیات و رشد عوامل بیماری‌زا راحت‌تر فراهم می‌شود. اگر انتقال نمونه به آزمایشگاه با تأخیر باشد، لوله T-I تهویه شده را می‌توان به مدت طولانی در حرارت اتاق ($30-25^{\circ}\text{C}$) نگه‌داری کرد. قبل از ارسال نمونه سوزن تهویه را جدا کنید. لازم است در حین تلقیح نمونه به محیط یا کشیدن نمونه از محیط برای جلوگیری از آلودگی محیط کشت شرایط استریل رعایت شود.

کشت از محیط انتقالی CSF (T-I)

پس از گذشت ۲۴ ساعت انکوباسیون با استفاده از سرنگ، مقدار ۰/۱ ml از مایع موجود در لوله T-I را به محیط کشت‌های آگار خون‌دار و آگار شکلاته منتقل و آن را پخش کرده و مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور 35°C حاوی CO_2 قرار می‌دهیم.

جهت اطمینان از خلوص کلنی‌ها، اسمیر تهیه کرده و رنگ‌آمیزی گرم انجام دهید. اگر بعد از گذشت ۴۸ ساعت رشدی مشاهده نشد، در روز سوم و سپس هفتم از محیط T-I، روی محیط‌های یادشده کشت مجددی تهیه کنید.

کشت اولیه، کشت مجدد و تشخیص احتمالی

۱. کشت اولیه CSF

۱. به محض دریافت CSF در آزمایشگاه میکروب‌شناسی نمونه را مدت ۱۵ دقیقه در 2000rpm سانتریفوژ کنید.
۲. مایع رویی را با پیپت پاستور کشیده و آن را جهت جستجوی آنتی‌ژن‌های باکتریایی با روش آگلوتیناسیون لاتکس نگاه دارید.
۳. لوله حاوی رسوب را به خوبی تکان داده یا ورتکس کنید.
۴. برای کشت و رنگ‌آمیزی گرم از ۲-۱ قطره رسوب استفاده کنید.

توجه: اگر کمتر از ۱ ml CSF در دسترس است، بدون سانتریفوژ به طور مستقیم برای کشت و رنگ‌آمیزی گرم از آن استفاده کنید.

بهترین محیط جهت جداسازی استرپتوکوک پنومونیه آگار خون‌دار محتوی ۵٪ خون گوسفند یا اسب است. خون انسان جانشین مناسبی نیست. مناسب‌ترین محیط برای جداسازی هموفیلوس آنفلوانزه محیط شکلات آگار مغذی شده با «همین»^۱ و فاکتور رشدی نظیر ایزوویتالکس، ساپلمنت B

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

در صورت عدم دسترسی به فاکتورهای رشد ذکر شده می‌توان از تلقیح هم‌زمان استافیلوکوک ارئوس روی پلیت آگار خون‌داری که به آن CSF تلقیح شده است استفاده کرد.

در صورت تلقیح استافیلوکوک ارئوس، کلنی‌های اقماری هموفیلوس در اطراف محل تلقیح استافیلوکوک ظاهر خواهند شد.

نایسریا مننژیتیدیس مانند استرپتوکوک پنومونیه روی هر دو محیط آگار خون‌دار و شکلات آگار رشد می‌کند. اگر فقط امکان استفاده از یک نوع محیط کشت وجود دارد، بهترین انتخاب محیط شکلات آگار است؛ زیرا هر سه عامل بیماری‌زا روی آن رشد می‌کنند.

روش صحیح کشت جهت دستیابی به کلنی‌های مجزا از هر یک از باکتری‌های فوق، در شکل‌های شماره ۳، ۴ و ۵ نشان داده شده است.

پلیت‌های آگار بعد از تلقیح در انکوباتور حاوی CO_2 ۵٪ یا جبار محتوی شمع قرار داده می‌شود. بهتر است هم‌زمان با تلقیح پلیت‌ها از یک عدد محیط مایع برین هارت اینفیوژن (BHI)^۱ برای کشت نمونه باکتریایی استفاده شود تا در زمان بروز هر نوع مشکل در روند جداسازی یا شناسایی باکتری، دسترسی به باکتری زنده امکان‌پذیر باشد.

در صورت استفاده از محیط T-I بعد از ۲۴ ساعت، با استفاده از سرنگ و سوزن استریل مقدار ۱۰۰ μL از سوسپانسیون T-I را به داخل محیط آگار خون‌دار و محیط شکلات آگار تلقیح کرده 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،

امکان تشخیص احتمالی مننژیت باکتریایی با عوامل یادشده را فراهم می‌کند. به گونه‌ای که نتایج مثبت هر کدام از این روش‌ها، حتی در حالت عدم رشد باکتری در محیط‌های کشت ممکن است نشانگر بروز عفونت در CSF باشد.

رنگ‌آمیزی گرم

وسایل مورد نیاز

- اسلاید نو و تمیز
- لُوپ یا پیت پاستور استریل
- جهت ساخت محلول‌های رنگ گرم به قسمت ضمیمه مراجعه شود.

تأیید می‌شود از کیت‌های آماده مصرف رنگ‌آمیزی گرم استفاده نشود.

روش کار

- مایع مغزی‌نخاعی را مدت ۱۵ دقیقه در ۱۵۰۰ g سانتریفوژ کنید.
- یک عدد لام را با الکل تمیز کرده و خشک کنید. سپس با قراردادن ۱-۲ قطره از رسوب مایع فوق، بدون پخش کردن قطره‌ها گستره تهیه کنید. از قراردادن قطره‌های خیلی زیاد روی لام خودداری کنید.
- لام را تا خشک شدن کامل ترجیحاً در زیر هود بیولوژیک قرار دهید تا وقتی لام به‌طور کامل خشک نشده از حرارت دادن آن خودداری کنید.
- گستره موردنظر را ۳ مرتبه روی شعله حرکت دهید تا ثابت شود. به جای استفاده از روش شعله می‌توان از متانول ۱۰۰٪-۹۵٪ جهت ثابت کردن آن استفاده کرد.
- کریستال ویوله را روی لام ریخته و ۱ دقیقه صبر کنید.
- به آرامی آب‌کشی کرده و آب اضافی را سرازیر کنید.
- محلول ید را روی لام ریخته و ۱ دقیقه صبر کنید.

۸. به آرامی آب‌کشی کرده و آب اضافی را سرازیر کنید.

۹. توسط الکل استن عمل رنگ‌بری را در سریع‌ترین زمان ممکن انجام دهید.

۱۰. سافرانین را روی لام ریخته و ۳۰ ثانیه صبر کنید.

۱۱. لام را به آرامی آب‌کشی کرده و بگذارید خشک شود.

۱۲. لام رنگ‌شده را توسط میکروسکوپ نوری و با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ بررسی کنید.

نایسریا مننژیتیدیس به شکل دیپلوک‌های گرم منفی مشابه دانه قهوه در داخل و یا خارج از لکوسیت‌های چند هسته‌ای مشاهده می‌شود. (شکل شماره ۶-الف)

استرپتوکوک پنومونیه دیپلوک گرم مثبتی است که گاهی به شکل زنجیره‌های کوتاه دیده می‌شود. (شکل شماره ۶-ب)

هموفیلوس آنفلوانزه به شکل باسیل یا کوکوباسیل‌های گرم منفی چندشکلی و کوچک با آرایش و قرارگیری تصادفی مشاهده می‌شود. (شکل شماره ۶-ج)

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 به سرعت مایع رویی CSF را آزمایش کنید. در صورت عدم امکان انجام این کار، می‌توان نمونه را به مدت چند ساعت در حرارت 4°C تا 2°C در یخچال قرار داده و یا به مدت طولانی‌تر در سرمای 20°C در فریزر نگهداری کرد.

معرف‌ها را بعد از انجام آزمایش مجدداً در یخچال قرار دهید تا از فاسد شدن آنها جلوگیری شود. در غیر این صورت نتایج آزمایش قابل اعتماد نخواهد بود. سوسپانسیون لاتکس را هرگز منجمد نکنید.

روش انجام آزمایش

— مایع رویی CSF را به مدت ۵ دقیقه در بن‌ماری جوش قرار دهید.

— سوسپانسیون لاتکس را به آرامی تکان دهید تا یکنواخت شود.

— یک قطره از هر یک از سوسپانسیون‌های لاتکس را روی یک اسلاید تمیز بچکانید.

— $50-30\ \mu\text{L}$ از CSF را به هریک از قطره‌های سوسپانسیون اضافه کنید.

— لام را به مدت ۱۰-۲ دقیقه با دست و در صورت وجود روتاتور در $100\ \text{rpm}$ بچرخانید.

خواندن نتایج

در زیر نور کافی و بدون استفاده از ذره‌بین بررسی کنید.

نتیجه مثبت: کلامپینگ قابل مشاهده ذرات لاتکس ظرف ۲ دقیقه ظاهری شود.

نتیجه منفی: سوسپانسیون در این حالت به صورت هوموزن (یکنواخت) و شیری باقی می‌ماند.

۲. خون

برای تشخیص مننژیت باکتریایی، در صورت 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 وجود دارد. عوامل ویروسی بیشترین خطر را دارند و ممکن است حتی به عفونت‌های کشنده منجر شوند. از این میان می‌توان به ویروس‌های مولد هپاتیت و HIV اشاره کرد. برای کاهش خطر انتقال این عفونت‌ها توصیه می‌شود از دستکش لاتکس غیر قابل نفوذ به مایعات استفاده شود.

روش تهیه نمونه خون برای کشت:

۱. ابتدا محل رگ قبل از ضدعفونی مشخص شود.
۲. سطح پوست به صورت دایره‌ای در حدود ۵cm با الکل ۷۰٪ تمیز شده و در هوا خشک شود.
۳. از مرکز دایره با Povidone-iodine (بتادین) کاملاً ضدعفونی شده و حداقل ۱ دقیقه زمان گرفته شود.
۴. پس از انجام خون‌گیری بدون تعویض سرسوزن، خون به بطری کشت خون تلقیح شود.
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 جمع‌آوری شده از بیمار باید به سرعت به محیط کشت خون تلقیح شود تا از لخته شدن آن در سرنگ جلوگیری گردد. باید سرنگ و سرسوزن را در ظرف مخصوص (Safety box) که قابلیت اتوکلاو شدن دارد قرار داده، از هر نوع تلاش برای گذاشتن درپوش روی سرسوزن جداً خودداری شود.
- برچسب حاوی مشخصات بیمار به سطح شیشه کشت خون چسبانده شود.
- برای انتقال به آزمایشگاه میکروبی‌شناسی، محیط کشت خون را در ظرف‌های مخصوص حمل و نقل قرار دهید.
- 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.

— در صورت فرورفتن سوزن به دست یا هر حادثه دیگر که به زخمی شدن پوست منجر شود، زخم را با آب و صابون شسته و با کمی فشار به خارج شدن خون کمک کنید. هر نوع آلودگی دست یا هر نقطه از بدن با خون، یا زخمی شدن پوست را به سوپروایزر یا پزشک اطلاع دهید.

عوامل مؤثر در بهبود جداسازی میکروارگانیزم‌ها از خون

عوامل زیر حساسیت محیط‌های کشت خون را تحت تأثیر قرار می‌دهند:

- زمان خون‌گیری
 - تعداد کشت‌های خون (از هر بیمار)،
 - حجم خون جمع‌آوری شده،
 - روش خنثی‌سازی عوامل ضد میکروبی 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 رقیق می‌شود (۱:۱۰ تا ۱:۲۰). حجم خون جمع‌آوری شده از افراد بالغ به میزان ۱۰-۵ml است که در ۵۰ml از محیط کشت خون رقیق می‌شود (۱:۵ تا ۱:۱۰). محیط‌های کشت خون ساخته شده از TSB^۱ یا برین هارت اینفیوژن (BHI) امکان رشد هموفیلوس آنفلوانزه را فراهم می‌کند.
- خنثی‌سازی ویژگی‌های باکتریسیدهال خون و آنتی‌بیوتیک‌های احتمالی با مهارکننده‌های شیمیایی نظیر ۳٪-۰/۰۲۵٪ SPS (سدیم پولی‌آنتول سولفونات) به محیط کشت و نیز رقیق‌سازی خون صورت می‌گیرد. SPS فعالیت‌هایی نظیر ضدفاگوسیتی، ضدانعقاد، ضدکمپلمانی و ضدلیزوزومی دارد. اگر این ماده در مقادیر خیلی بالا استفاده شود، اثر مهارکننده‌ای در رشد میکروب‌ها خواهد داشت.

1. Trypticase Soy Broth

بعد از جمع‌آوری، خون باید ظرف ۱ دقیقه به محیط کشت خون تلقیح شود. تأخیر بیش از این موجب لخته‌شدن خون در سرنگ خواهد شد؛ زیرا برای گرفتن خون از رگ بیمار از ماده ضدانعقاد استفاده نمی‌شود. اگر بطری کشت خون حاوی دیافراگم است، باید قبل از سوراخ کردن، آن را با الکل ۷۰ و سپس بتادین ضدعفونی کرده و بعد از خشک شدن عمل تلقیح انجام شود. بطری را چندبار تکان دهید. سرنگ و سرسوزن را بدون قراردادن درپوش آن در ظرف‌های مخصوص بیندازید. در صورت لزوم دیافراگم را دوباره تمیز کنید. برچسب حاوی مشخصات بیمار، تاریخ و ساعت جمع‌آوری خون را روی بطری بچسبانید.

محیط کشت تلقیح شده بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شده در 35°C قرار داده شود.

کشت مجدد

شیشه‌های کشت خون را ظرف ۲۴-۶ ساعت (صرف نظر از وجود علائم رشد) کشت داده (Blind Sub Culture) و سپس تا ۷ روز هر روز بررسی کنید. هر نوع کدورت یا لیز گلبول‌های قرمز ممکن است نشانگر رشد میکروبی باشد و به‌طور حتم باید بلافاصله کشت مجدد انجام شود.

توجه داشته باشید که ممکن است علی‌رغم عدم وجود کدورت، رشد میکروبی وجود داشته باشد. بنابراین ضروری است در فواصل ۲۴-۶ ساعت اولیه بعد از تلقیح، رأس ۴۸ ساعت و نیز در روز هفتم، کشت مجدد انجام شود. در ضمن به‌خاطر داشته باشید که لازم است قبل از انجام کشت مجدد شیشه کشت خون را چند بار تکان دهید.

جهت برداشت خون از محیط کشت، درپوش محیط کشت را با الکل و سپس بتادین ضدعفونی کرده و مقدار کمی (۵/۰ ml) از خون را کشیده و به محیط آگار منتقل کنید.

به‌طور معمول، از هر دو محیط آگار خون‌دار و آگار شکلاته استفاده می‌شود. در صورت استفاده از یک محیط، بهتر است محیط، آگار شکلاته باشد؛ زیرا این محیط فاکتورهای رشد ضروری جهت رشد هموفیلوس آنفلوانزه را دارد در حالی که آگار خون‌دار فاقد فاکتورهای ذکر شده است، بعد از انجام عمل تلقیح و پخش قطره خون در سطح آگار، پلیت‌ها را مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور CO_2 قرار می‌دهیم. در صورت وجود رشد در این پلیت‌ها، دیگر به نگرانی محیط‌های کشت خون نیاز نیست.

بررسی ظاهر کلنی‌ها

نایسریا منتزیتیدیس روی محیط آگار خون‌دار به‌خوبی رشد می‌کند در حالی که هموفیلوس آنفلوانزه فاقد این خصوصیت است. هر دو باکتری ذکر شده روی محیط آگار شکلاته تا حدودی کلنی‌هایی یک شکل دارند. ولی باید توجه داشت که از کلنی‌های هموفیلوس آنفلوانزه بوی اندول به مشام می‌رسد. کلنی‌های هموفیلوس بزرگ، پهن، مات و بی‌رنگ یا خاکستری هستند. همولیز یا تغییر رنگ محیط مشاهده نمی‌شود. (شکل شماره ۷)

کلنی‌های جوان نایسریا منتزیتیدیس گرد، صاف، مرطوب و براق و محدب هستند. بعضی کلنی‌ها به یکدیگر متصل بوده و رنگ آنها خاکستری است. علی‌رغم این پیگمان مشاهده نمی‌شود. کلنی‌های کهنه‌تر رنگ خاکستری کدرتری دارند و محیط زمینه را تیره‌رنگ می‌کنند.

کلنی‌های مجزا بعد از ۱۸ ساعت قطری معادل ۱ mm و بعد از گذشت چند روز قطری حدود ۴ mm پیدامی‌کنند (شکل شماره ۸). استرپتوکوک پنومونیه، کلنی‌هایی کوچک، خاکستری، مرطوب (گاهی موکونید)، آبکی با حاشیه‌ای از همولیز α روی آگار خون‌دار و نیز آگار شکلاته دارد. (شکل شماره ۹)

کلنی‌های جوان پنوموکوک برآمده و تا حدودی شبیه کلنی‌های استرپتوکوک ویریدانس هستند.

کلنی‌های برآمده با گذشت زمان پهن شده و مرکز آنها حالت فرورفته پیدامی‌کند. استفاده از ذره‌بین دستی در افتراق کلنی‌های پنوموکک از استرپتوکوک ویریدانس کمک‌کننده است.

در نهایت می‌توان باتوجه به ویژگی‌های رشد باکتری روی محیط‌های آگار خون‌دار و آگار شکلاته و نیز با در نظر گرفتن ویژگی‌های مورفولوژیک از طریق مشاهده میکروسکوپی تشخیص احتمالی را مطرح کرد. (شکل‌های شماره ۱۰ و ۱۱)

۱. شناسایی نایسریا منتزیتیدیس

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

آزمایش اکسیداز به روش کواکس

آزمایش اکسیداز نشان‌دهنده وجود آنزیم سیتوکروم اکسیداز است. این آنزیم به‌عنوان آخرین حلقه در زنجیره تنفسی هوازی باعث انتقال الکترون به اکسیژن می‌شود. تترامیل پارافینیل‌دی‌آمین دی‌هیدروکلراید ماده‌ای است که در حضور اکسیژن و آنزیم سیتوکروم اکسیداز به‌عنوان پذیرنده مصنوعی اکسیژن اکسید شده و به اندوفنل بلو تبدیل می‌شود که با رنگ آبی تیره مشخص خواهد شد.

تهیه معرف اکسیداز

برای جلوگیری از فساد معرف اکسیداز (تترامیل - p - فنیل‌دی‌آمین دی‌هیدروکلراید) لازم است این ماده در ظرفی با درپوش محکم و داخل ظرف دیگری حاوی ماده جاذب رطوبت در محلی خنک و تاریک قرار گیرد.

از پودر معرف، محلولی ۱٪ در آب مقطر آماده کنید. ۱۰ ml از محلول را در مقادیر ۱ ml تقسیم کرده و در سرمای 20°C - در فریزر نگه‌داری کنید. در موقع مصرف، یک ویال ۱ ml را از فریزر خارج کرده، پس از ذوب شدن به تعداد مورد نیاز، کاغذ فیلتر را به معرف آغشته کرده در پلیت تمیز قرار دهید.

توجه: به دلیل ایجاد تحریک، از تماس معرف اکسیداز با پوست و چشم خودداری نمایید. در صورت تماس اتفاقی، پوست و با چشم را با مقادیر زیادی آب به مدت حداقل ۱۵ دقیقه شستشو دهید.

روش انجام آزمایش

با استفاده از لوپ پلاتینی، پلاستیکی یا انتهای بدون پنبه یک سواب چوبی، مقداری از کلنی را روی کاغذ فیلتر حاوی معرف بمالید (شکل شماره ۱۳). به دلیل امکان ایجاد نتایج مثبت کاذب از لوپ جنس دیگر استفاده نکنید.

تفسیر نتایج

نتیجه مثبت به شکل ظهور رنگ ارغوانی به مدت ۱۰ ثانیه قابل مشاهده خواهد بود. واکنش‌های تأخیری احتمال تشخیص نایسریا منتزیتیدیس را کاهش می‌دهند. توجه داشته باشید این آزمایش به‌طور کامل به نایسریا منتزیتیدیس اختصاص ندارد و ممکن است سایر اعضای جنس نایسریا و نیز باکتری‌هایی از گونه‌های دیگر نیز در این آزمایش واکنش مثبت داشته باشند.

شناسایی گروه‌های سرمی نایسریا منتزیتیدیس

بر اساس پلی ساکاریدهای کپسولی، ۱۳ گروه سرمی شناسایی شده است: A, B, C, D, H, I, K, L, W135, X, Y, Z, ' (29 E).

شایع‌ترین گروه‌های سرمی مشاهده شده 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 عدد لام را با استفاده از الکل به‌طور کامل تمیزی کنیم. لام را به سه قسمت تقسیم کرده مقدار ۱۰۰µL از سرم فیزیولوژی حاوی فرمالین ۰/۵٪ (برای کشتن باکتری‌ها و کاهش خطر احتمالی سرایت به کارکنان آزمایشگاه) روی هر قسمت از لام قرار داده، مقداری از کلنی میکروبی را به‌وسیله لوب برداشته و سوسپانسیونی با غلظت متوسط در سرم فیزیولوژی فوق درست می‌کنیم.

توجه: فرمالین ماده‌ای سرطان‌زا است و باید در نگهداری و استفاده از آن دقت کافی به‌عمل آید.

در صورت عدم استفاده از سرم فیزیولوژی حاوی فرمالین می‌توان مراحل انجام آزمایش را در زیر هود بیولوژیک نوع ۲ انجام داد.

در کنار هر سوسپانسیون میکروبی یک قطره از آنتی‌سرم موردنظر (اغلب ۲ آنتی‌سرم) و یک قطره سرم فیزیولوژی بدون فرمالین قرار داده، سپس هر آنتی‌سرم را با سوسپانسیون مجاور مخلوط می‌کنیم و ضمن چرخاندن لام به‌مدت ۲-۱ دقیقه، آن را در زیر نور کافی (چراغ مطالعه) روی زمینه تیره مشاهده می‌کنیم.

در نواحی آفریقا و آسیا، آزمایش با آنتی‌سرم‌های A و C و سرم فیزیولوژی (برای بررسی وجود اتوآگلوتیناسیون) جهت شناسایی و تعیین هویت اکثر سویه‌ها کافی خواهد بود. در صورت عدم واکنش با آنتی‌سرم‌های A و C، از آنتی‌سرم‌های Y، W135 و B استفاده کنید.

بررسی نتایج

آگلوتیناسیون فقط باید در مخلوط آنتی‌سرم و سوسپانسیون میکروبی دیده‌شود و مشاهده آن در مخلوط سرم فیزیولوژی و سوسپانسیون میکروبی، دلالت بر اتوآگلوتیناسیون دارد. (شکل شماره ۱۴)

آگلوتیناسیون با تعدادی از آنتی‌سرم‌ها در غیاب آگلوتیناسیون در سرم فیزیولوژی، دلالت بر خشن بودن نوع کلنی‌ها دارد. در صورت عدم وجود هر نوع آگلوتیناسیون با آنتی‌سرم‌ها و سرم فیزیولوژی سویه غیرقابل گروه‌بندی اعلام خواهد شد. اگر از کلنی‌های جوان و تازه استفاده‌شود، این نتیجه به‌ندرت مشاهده می‌شود.

آنتی‌سرم و سرم فیزیولوژی را بعد از مصرف در سرمای ۴°C در یخچال نگه‌داری کنید.

مصرف کربوهیدرات‌ها توسط نایسریا منتزیتیدیس

این آزمایش برای تأیید تشخیص نایسریا منتزیتیدیس به‌کار می‌رود. برای این منظور از غلظت ۱٪ قندهای گلوکز، مالتوز، لاکتوز و سوکروز در سیستمین تریپتیکس آگار (CTA)^۱ استفاده‌شود.

اعضای جنس نایسریا قندها را به روش تخمیر استفاده‌نکرده، بلکه از طریق اکسیداسیون مورد استفاده قرار می‌دهند. نایسریا منتزیتیدیس گلوکز و مالتوز را مصرف می‌کند درحالی‌که لاکتوز و سوکروز دست‌نخورده باقی می‌مانند. معرف فنل رد موجود در محیط، در صورت مصرف قند و تولید اسید و ایجاد pH معادل ۶/۸ یا کمتر، زردرنگ خواهد شد.

روش انجام آزمایش

— با استفاده از یک آنس استریل‌شده، مقدار اندکی از کلنی را از محیط آگار خون‌دار یا آگار شکلاته ۲۴-۱۸ ساعته برداشته و در محیط‌های حاوی قند تلقیح می‌کنیم به‌طوری‌که ۱۰mm فوقانی محیط کشت را دربرگیرد. این عمل در هر لوله باید چند 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 کربوهیدراته دیگر جلوگیری شود.
- درپوش لوله‌ها را به‌طور کامل بسته و در انکوباتور 35°C (بدون CO_2) قرار دهید. قبل از ثبت نتیجه منفی حداقل به مدت ۷۲ ساعت محیط‌های کربوهیدراته را در انکوباتور نگاه‌داری نمایید.

بررسی نتایج

علائم و نشانه‌هایی نظیر مشاهده رنگ زرد و کدورت واضح در قسمت فوقانی محیط، نشانگر رشد باکتری و تولید اسید و دلیل بر مثبت بودن واکنش است (شکل شماره ۱۵). اگرچه ممکن است نتیجه مثبت واکنش ظرف ۲۴ ساعت ظاهر شود، ولی قبل از گذشت ۷۲ ساعت نباید به تفسیر قطعی نتایج منفی اقدام کرد.

جدول شماره ۴. مصرف کربوهیدرات توسط گونه‌های مختلف نایسریا و موراکسلا کاتارالیس

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

۲. شناسایی استرپتوکوکوس پنومونیه (پنوموکوک)

کلنی‌های پنوموکوک کوچک، خاکستری، موکوئید (بلغمی) است که توسط هاله‌ای از همولیز آلفا، به رنگ سبز احاطه شده و روی هر دو محیط آگار خون‌دار و شکلاته مشاهده می‌شوند.

جهت افتراق کلنی‌های پنوموکوک از استرپتوکوک ویریدانس می‌توان از

ذره‌بین دستی استفاده کرد. هر دو باکتری در کلنی‌های تازه نمایشی برجسته دارند. بعد از گذشت ۲۴-۴۸ ساعت مرکز کلنی‌های پنوموکوک فرورفته می‌شود درحالی که کلنی‌های استرپتوکوک ویریدانس نمای برجسته خود را حفظ می‌کنند.

افتراق این دو سویه از یکدیگر به وسیله آزمایش‌های حساسیت به دیسک اپتوچین و انحلال در صفر انجام می‌شود (شکل شماره ۱۶). برای دستیابی به نتایج مطلوب توصیه می‌شود پلیت‌ها در انکوباتور CO_2 نگاه‌داری شود.

تعیین حساسیت به اپتوچین

تشخیص احتمالی پنوموکوک از طریق تعیین حساسیت باکتری به دیسک اپتوچین به دست می‌آید.

روش انجام آزمایش

مقداری (۳ تا ۴ کلنی) از کلنی‌های α همولیتیک را به وسیله لوپ استریل برداشته و روی محیط آگار خون‌دار به صورت متراکم کشت می‌دهیم. یک دیسک اپتوچین با قطر ۶mm، حاوی $5\mu\text{g}$ اتیل‌هیدروکوپرئین هیدروکلراید را در قسمت متراکم کشت باکتری قرار می‌دهیم. پلیت را در انکوباتور حاوی CO_2 یا جار محتوی شمع در حرارت 35°C به مدت ۲۴-۱۸ ساعت نگاه‌داری کنید.

بررسی نتایج

سویه‌های با همولیز α که منطقه عدم رشد آنها بزرگتر از ۱۴mm است، پنوموکوک محسوب می‌شوند. (شکل شماره ۱۷)

سویه‌های بدون منطقه عدم رشد استرپتوکوک ویریدانس هستند. سویه‌هایی که منطقه عدم رشد بین ۹-۱۳mm دارند، باید تحت آزمایش حلالیت در صفر قرار گیرند. (شکل شماره ۱۶)

آزمایش حالیت در صفرا

از کلنی‌های تازه (۲۴ ساعته)، سوسپانسیون 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 تقسیم کنید (هر یک ۰/۲۵ml).

به‌همین میزان (۰/۲۵ml) سرم فیزیولوژی در یک لوله و سدیم دی‌اکسی‌کولات ۰/۲٪ در لوله دیگر بریزید و به‌آرامی مخلوط کنید. لوله‌ها را به‌مدت ۲ ساعت در حرارت $35-37^{\circ}\text{C}$ انکوبه کنید.

لوله‌ها را به‌طور متناوب جهت بررسی لیز سلولی (که باید در لوله حاوی سدیم دی‌اکسی‌کولات ظاهر شود) مشاهده کنید. شفاف‌شدن لوله یا به عبارت دیگر از بین رفتن کدورت، تشخیص را مسجل می‌کند. (شکل شماره ۱۸)

برای انجام این آزمایش براساس روش جایگزین، می‌توان از سدیم دی‌اکسی‌کولات ۱۰٪ استفاده کرد. در این آزمایش با قراردادن یک قطره از محلول فوق روی کلنی موردنظر در پلیت و نگه‌داری پلیت در دمای اتاق یا حرارت 35°C به‌مدت ۱۵ دقیقه تا زمان خشک‌شدن معرف، حالیت باکتری در صفرا بررسی می‌شود.

در این حالت کلنی‌های پنوموкок ناپدیدشده و یا نمایی تخت پیدا خواهند کرد درحالی‌که کلنی‌های استرپتوکوک‌های مقاوم به صفرا دست‌نخورده باقی می‌مانند. بدیهی است استفاده از پلیت حاوی کلنی‌های تازه و جوان ضروری است.

تفسیر نتایج

به‌طور کلی صحیح‌ترین روش تشخیص پنوموкок براساس آزمایش‌های حساسیت به دیسک اپتوچین و حالیت در صفرا (شکل شماره ۱۶) به روش زیر است:

— سویه‌ای با منطقه ممانعت از رشد ۱۴mm یا زیادتر پنوموкок است.

— سویه‌ای که منطقه واضح اما کوچکتر از ۱۴mm داشته، ولی محلول در صفرا باشد نیز پنوموкок است.

— سویه‌ای که منطقه کوچک (۱۳-۹mm) داشته و در صفرا نیز محلول نیستند، پنوموкок محسوب نمی‌شوند.

— سویه‌ای بدون منطقه ممانعت از رشد، پنوموкок محسوب نمی‌شوند.

۳. شناسایی هموفیلوس آنفلوانزه

از نظر 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 رشد می‌کند (شکل شماره ۱۹). در صورت عدم انجام واکنش‌های تمام موارد مننژیت ناشی از هموفیلوس آنفلوانزه توسط سروتایپ b ایجاد می‌شود.

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 مننژیتیدیس است. سویه‌های مشکوک به Hib (هموفیلوس آنفلوانزه تایپ b)، باید با آنتی‌سرم‌های Hib، همچنین یک آنتی‌سرم جهت یکی دیگر از گروه‌های سرمی و نیز سرم فیزیولوژی آزمایش شوند.

واکنش مثبت و قوی با آنتی‌سرم b و عدم واکنش با آنتی‌سرم گروه دیگر و نیز سرم فیزیولوژی، تشخیص احتمالی Hib را مطرح می‌کند. اگر سویه موردنظر با آنتی‌سرم b واکنشی نشان‌نداد، آنتی‌سرم پلی‌والان را آزمایش کنید. اگر نتیجه این آزمایش مثبت بود، جهت تعیین سروتایپ باید از آنتی‌سرم‌های دیگر (a, c, d, e, f) استفاده کنید.

اگر این واکنش (آنتی سرم پلی‌والان) منفی باشد، احتمالاً سویه مورد نظر قابل تایپ‌بندی نخواهد بود (Nontypable).

روش انجام آزمایش

- با استفاده از ۱۰ μl سرم فیزیولوژی فرمالین‌دار (۰/۵٪) و کلنی‌های تازه رشد کرده بر روی آگار شکلاته، سوسپانسیون شیری رنگی درست کنید.
- برای انجام واکنش آگلوتیناسیون، مقدار ۵ μl (یک لوپ) از سوسپانسیون را به لامی که توسط الکل اتیلیک پاک شده است منتقل کنید. این کار را در سه ناحیه لام انجام دهید. به هر ناحیه به ترتیب مقادیر مساوی از آنتی سرم Hib، آنتی سرم دیگر (از سایر گروه‌ها) و سرم فیزیولوژی اضافه کنید.
- سوسپانسیون‌ها را با قطرات ذکر شده مدت ۱ دقیقه به آرامی مخلوط کنید.

تفسیر نتایج

فقط واکنش‌های آگلوتیناسیون قوی را مثبت در نظر بگیرید. در یک واکنش مثبت قوی، تمام سلول‌های باکتری به یکدیگر خواهند چسبید و مایع زمینه‌ای سوسپانسیون شفاف خواهد شد. وقتی سویه‌ای با بیش از یک آنتی سرم واکنش نشان دهد، نتیجه غیرقابل قبول خواهد بود و باید به یک آزمایشگاه رفرانس ارسال شود.

آزمایش بررسی نیاز به فاکتورهای X و V

هموفیلوس آنفلوانزه ارگانیزمی سخت‌رشد است که جهت رشد به محیطی حاوی فاکتورهای X و V نیاز دارد. این ارگانیزم به دلیل آزاد شدن «همین» در زمان حرارت دادن خون برای تهیه محیط آگار شکلاته، روی این محیط رشد می‌کند. NAD¹ به شکل ایزوویتالکس موجود است که به محیط اضافه می‌شود. هموفیلوس آنفلوانزه نیز بر پایه نیاز به فاکتورهای X و V تشخیص داده می‌شود.

جدول شماره ۵. شناسایی گونه‌های هموفیلوس بر اساس نیازهای رشد.

وجود همولیز β روی آگار خون‌دار	نیاز به فاکتورهای X و V		گونه‌ها
	V	X	
-	+	+	هموفیلوس آنفلوانزه
-	+	-	هموفیلوس پارآنفلوانزه
+	+	+	هموفیلوس همولیتیکوس
+	+	-	هموفیلوس پاراهمولیتیکوس
-	-	+	هموفیلوس آفروفیلوس
-	+	-	هموفیلوس پارافروفیلوس*

* هموفیلوس پارافروفیلوس اورنی‌تین منفی است در حالی که هموفیلوس پارآنفلوانزه مثبت است.

روش انجام آزمایش

از پلیت حاوی کلنی‌های تازه، سوسپانسیون غلیظی از باکتری از یک محیط مایع مناسب (TSB یا آب پیتونه) درست کنید. هنگام برداشت کلنی‌ها دقت کنید تا از انتقال حتی مقادیر ناچیز آگار به محیط مایع جلوگیری شود؛ زیرا ممکن است مقادیر اندک آگار نیز نتایج آزمایش را متأثر ساخته و تشخیص نادرست داده شود.

به وسیله یک سواب استریل از این سوسپانسیون برداشته و به محیط TSA¹ منتقل می‌کنیم؛ به اندازه‌ای که نیمی از پلیت کشت داده شود. بعد از خشک شدن محل تلقیح سوسپانسیون، دیسک‌های حاوی فاکتورهای X، V و XV را در محل قرار می‌دهیم.

بررسی نتایج

هموفیلوس آنفلوانزه فقط در محدوده اطراف دیسک‌های حاوی هر دو فاکتور X و V (XV) رشد می‌کند. (شکل شماره ۲۰)

1. Tryptic Soy Agar

1. Nicotinamide Adenin Dinucleotide

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 تقسیم می‌شود که یکی از خانه‌ها حاوی «همین» (فاکتور X)، خانه 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 همولیتیکوس از هموفیلوس آنفلوانزه استفاده می‌شود.

روش انجام آزمایش

— سوسپانسیونی معادل ۵٪ مک‌فارلند از کلنی‌های تازه باکتری در TSB آماده کنید. این پلیت را با سوسپانسیون باکتری تلقیح کنید. برای تلقیح از یک عدد لوپ استریل استفاده کرده و در فواصل کشت هر خانه، لوپ را با شعله استریل کنید (تا از انتقال فاکتورها به خانه‌های مجاور جلوگیری شود). عمل تلقیح را از خانه حاوی فاکتور V شروع کرده و با خانه حاوی آگار خون‌دار خاتمه دهید. برای مشاهده همولیز خفیف، آگار خون‌دار را با لوپ سوراخ کنید.

— این محیط را بعد از تلقیح مدت ۱۸-۲۴ ساعت در حرارت 35°C در انکوباتور CO_2 یا جار محتوی شمع قرار دهید.

بررسی نتایج

بعد از تلقیح، خانه حاوی آگار خون‌دار را به لحاظ وجود همولیز و سایر خانه‌ها را از نظر رشد باکتری در حضور فاکتورهای X و V بررسی کنید.

نگهداری و انتقال نایسریا مننژیتیدیس، استرپتوکوکوس پنومونیه و هموفیلوس آنفلوانزه

جهت تأیید تشخیص و تعیین حساسیت دارویی باکتری جدا شده از بیمار مبتلا به مننژیت لازم است سویه باکتری تحت شرایط مناسب نگهداری و به آزمایشگاه مرجع کشوری ارسال شود. باکتری‌های یاد شده شکننده بوده و رعایت احتیاط‌های لازم در نگهداری و حمل و نقل 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 ۱۸-۲۴ ساعته در 35°C و پس از آن نگهداری لوله‌ها در برودت 4°C یخچال است. این باکتری‌ها در محیط مایع عمر کوتاهی دارند و روی پلیت‌های آگار (اولیه) فقط مدت ۳-۴ روز زنده می‌مانند. برای نگهداری نایسریا مننژیتیدیس می‌توان از لوله‌های درپیچ‌دار استفاده کرد که در لوله‌ها باید در مدت نگهداری آنها شل باشد.

در صورت اضافه کردن لایه نازکی از TSB به لوله، می‌توان عمر باکتری‌ها را تا ۱۴ روز افزایش داد. لوله حاوی نایسریا مننژیتیدیس را در یخچال نگذارید.

۲. نگهداری بلندمدت

نگهداری بلندمدت را می‌توان از طریق لیوفیلیزاسیون یا منجمد کردن به بهترین وجه انجام داد. از این میان لیوفیلیزاسیون پذیرفته‌ترین شیوه برای نگهداری است؛ زیرا در این شرایط می‌توان باکتری را به مدت طولانی در برودت 4°C نگهداری کرد تا در هنگام نقل و انتقال آسیب نبیند.

به این دلیل که لیوفیلیزاسیون نیاز به تجهیزات خاص و گران قیمت داشته که آن هم فقط در بعضی مراکز نظیر مرکز تحقیقات آزمایشگاه‌های رفرانس ایران انجام می‌شود، از ذکر جزئیات کار خودداری کرده و فقط روش انجمادسازی شرح داده می‌شود.

نگهداری به روش انجماد

۱. هموفیلوس آنفلوانزه را روی محیط آگار شکلاته و پنوموکک و مننگوکک را روی محیط آگار خون‌دار و آگار شکلاته کشت دهید. سپس آنها را مدت ۲۰-۱۸ ساعت در حرارت 35°C و انکوباتور CO_2 دار یا جار محتوی شمع قرار دهید. بعد از رشد باکتری را از لحاظ خلوص بررسی کنید.
 ۲. تمام کلنی‌های رشد یافته را به کمک سواب استریل جمع‌آوری کنید.
 ۳. سواب فوق را در لوله در پیچ‌دار به حجم ۲ ml مقاوم به انجماد که حاوی ۱ ml خون دفیبرینه استریل است تلقیح کرده به آرامی تکان دهید تا کلنی‌ها آزاد شوند. برای این کار به طور حتم باید از خون گوسفند، اسب یا خرگوش استفاده کرد. خون انسان قبول نیست.
- از TSB به همراه گلیسرول ۲۰٪-۱۵٪ می‌توان به عنوان محیط‌های جایگزین استفاده کرد. لوله‌های مورد استفاده باید در برابر انجماد مقاوم باشند.

— قبل از بیرون آوردن سواب از لوله حاوی خون دفیبرینه یا TSB گلیسرول‌دار، سواب را به خوبی به دیواره لوله فشار دهید تا خون یا TSB اضافی آن خارج شود.

— سواب را در مایع ضد عفونی کننده بیندازید.

- در صورت امکان هرچه سریع‌تر این سوسپانسیون میکروبی را در مخلوط الکل ۹۵٪ و یخ خشک منجمد کنید.
- لوله‌ها را به فریزر نیتروژنی 120°C - یا فریزر 70°C - منتقل کنید. در صورت استفاده از فریزر 20°C - باید توجه داشت که درصدی از باکتری‌ها کشته شده و از بین خواهند رفت.

انتقال محیط‌های کشت

سویه‌های لیوفیلیزه و لوله‌های حاوی آگار شکلاته شیب‌دار بدون نیاز به یخچال قابل انتقال است. هر ویال یا لوله قبل از قرار گرفتن در جعبه فلزی حاوی ماده جاذب مخصوص حمل و نقل باید به خوبی با پارافیلیم پیچانده شده و در پاکت مناسب گذاشته شود. سپس جعبه فلزی را در یک جعبه پستی مناسب قرار داده و با نوشتن آدرس گیرنده، برچسبی اخطار دهنده روی آن چسبانده شود. سویه‌های منجمد قبل از ارسال باید در لوله در پیچ‌دار حاوی آگار شکلاته شیب‌دار دوباره کشت داده شده و ۲۴-۱۸ ساعت انکوبه شود. سپس طبق روش گفته شده جهت انتقال بسته بندی گردد. هموفیلوس آنفلوانزه، پنوموکک و مننگوکک حداقل یک هفته در این شرایط زنده می‌مانند.

کنترل کیفیت محیط‌ها و معرف‌ها

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

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

نتایج مورد انتظار	شماره ATCC	سویه استاندارد	محیط
رشد، همولیز α	۶۰۳۵	استرپتوکوک پنومونیه	محیط پایه بلاد آگار
رشد، همولیز β	۱۹۶۱۵	استرپتوکوک پیوژن	
رشد	۲۵۹۲۳	استافیلوکوک ارئوس	
رشد	۲۵۹۲۲	اشرشیا کلی	
رشد، همولیز α	۶۳۰۵	استرپتوکوک پنومونیه	بلاد آگار با استفاده از تریپتیک سوی آگار
رشد، همولیز β	۱۹۶۱۵	استرپتوکوک پیوژن	
رشد	۲۵۹۲۳	استافیلوکوک ارئوس	
رشد	۲۵۹۲۲	اشرشیا کلی	
رشد	۱۹۶۱۵	استرپتوکوک پیوژن	تریپتیک سوی آگار و یا براث بدون خون
رشد	۲۵۹۲۲	اشرشیا کلی	
رشد	۲۷۸۵۳	سودوموناس آئروژنوزا	بطری کشت خون
رشد	۶۳۰۵	استرپتوکوک پنومونیه	
رشد	۱۰۲۱۱	هموفیلوس آنفلوانزه	
رشد	۴۳۰۶۹	نایسریا گونوره آ	آگار شکلانه
رشد	۱۰۲۱۱	هموفیلوس آنفلوانزه	
زرد	۴۳۰۶۹	نایسریا گونوره آ	گلوکز
بدون رنگ، قرمز پررنگ	۲۵۲۴۰	موراکسلا کاتارالیس	
زرد	۲۳۹۷۱	نایسریا لاکتامیکا	لاکتوز
بدون رنگ، قرمز پررنگ	۴۳۰۶۹	نایسریا گونوره آ	
زرد	۱۳۰۹۰	نایسریا منتزیتیدیس	مالتوز
بدون رنگ، قرمز پررنگ	۴۳۰۶۹	نایسریا گونوره آ	
زرد	۹۹۱۳	نایسریا سیکا	سوکروز
بدون رنگ، قرمز پررنگ	۴۳۰۶۹	نایسریا گونوره آ	
ارغوانی	۲۷۸۵۳	سودوموناس آئروژنوزا	آزمایش اکسیداز
بدون رنگ	۲۵۹۲۲	E.coli	
حساس به اپتوچین، در صفرا حل می‌شود	۴۹۶۱۹	استرپتوکوک پنومونیه	اپتوچین و حلالیت در صفرا
نیاز به فاکتور X و V	۴۹۲۴۷	هموفیلوس آنفلوانزه	

روش‌های کنترل کیفیت باید روی محیط‌های کشت مغذی، نگه‌دارنده و اختصاصی انجام شود. در صورت نگهداری این محیط‌ها در شرایط استاندارد (طبق توصیه شرکت سازنده)، فقط یک بار در زمان بازکردن هر بسته محیط کشت کفایت می‌کند.

انجام آزمایش‌های کنترل کیفی

جهت اطمینان از کیفیت محیط‌های کشت مغذی اعم از آگار خون‌دار، شکلاته و TSA، لازم است از کلنی‌های تازه سویه‌های استاندارد (مطابق جدول صفحه بعد) سوسپانسیون میکروبی در سرم فیزیولوژی، مطابق با نیم مک‌فارلند ساخته، سپس ۱۰۰ μ l از سوسپانسیون را به ۱ ml سرم فیزیولوژی افزوده و مخلوط کنیم. سپس به میزان ۱۰۰ μ l از سوسپانسیون اخیر برداشته و در محیط کشت مورد نظر کشت می‌دهیم. بعد از گذشت ۲۴ ساعت تعداد $۱۰^۳$ تا $۱۰^۴$ کلنی قابل شمارش خواهد بود.

لازم به ذکر است، برای کنترل محیط‌های حاوی قند، معرف اکسیداز، تست‌های اپتوچین و حلالیت در صفرا از سویه‌های استاندارد مطابق با جدول استفاده شود. محیط‌های حاوی قند (کربوهیدرات) باید یک بار در ابتدای مصرف هر بسته کنترل شوند.

معرف اکسیداز در هر بار انجام آزمایش روی باکتری جدا شده هم‌زمان توسط باکتری استاندارد نیز کنترل شود.

ضمیمه

طرز تهیه محیط‌ها و معرف‌ها

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

- محیط‌های حاوی آگار در پلیت‌هایی با ابعاد $15 \times 100 \text{ mm}$ و به حجم $15-20 \text{ ml}$ برای هر پلیت تقسیم می‌شوند.
- بعد از ریختن محیط درون پلیت‌ها، آنها را چند ساعت در دمای اتاق قرار دهید تا از جمع شدن رطوبت در درپوش پلیت جلوگیری شود.
- پلیت‌ها را مجدداً در کیسه‌های پلاستیکی مخصوص نگهداری آنها قرارداده و در کیسه‌ها را به خوبی بسته و در شرایطی که قسمت حاوی محیط کشت به سمت بالا است، در یخچال با برودت 4°C نگهداری کنید.

محیط‌های HIA^۱ و TSA

این محیط‌ها در زمره محیط‌هایی هستند که به طور معمول با افزودن خون یا بدون آن برای جداسازی و کشت بسیاری از میکروارگانیسم‌ها و نیز برای نشان دادن نیاز به فاکتورهای X و V در هموفیلوس آنفلوانزه استفاده می‌شوند. محیط‌های TSA و HIA به رنگ زرد کاهی یا طلایی هستند. هر محیط HIA یا TSA پس از ساخت (و یا چنانچه آماده مصرف خریداری شود) باید به وسیله سویه هموفیلوس آنفلوانزه استاندارد و با فاکتورهای X و V کنترل شود. در این 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 فاصله بین دو دیسک X و V یا در اطراف دیسک XV رشد می‌کند.

محیط‌ها بر طبق دستور کارخانه سازنده که روی برچسب قوطی محیط وجود دارد و بر حسب حجمی که نیاز است، در ارلن تهیه می‌شود. در هنگام تهیه دقت شود که محیط کاملاً حل شده به طوری که پودر حل نشده‌ای در جدار ارلن قبل از اتوکلاو کردن وجود نداشته باشد. محیط آماده شده در دمای 121°C به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو می‌شود.

محیط‌های تهیه شده پس از اتوکلاو هنگامی که دمای آنها به 50°C رسید، در پلیت‌هایی به ابعاد $15 \times 100 \text{ mm}$ تقسیم و پس از جامد شدن جهت جلوگیری از جمع شدن رطوبت در سطح آنها، مدتی در دمای اتاق قرار داده می‌شوند. سپس در کیسه‌های پلاستیکی مخصوص نگهداری پلیت قرار داده شده و تا هنگام مصرف در یخچال 4°C نگهداری می‌شوند.

محیط بلاد آگار ۵٪ خون گوسفند BAP^۱

محیط بلاد آگار با استفاده از TSA که به آن ۵٪ خون گوسفند اضافه می‌شود تهیه شده و به طور معمول به عنوان یک محیط آگار خون‌دار استفاده می‌شود. این محیط برای تجدید کشت/ستریپتوکوکوس پنومونیه و حساسیت به دیسک آپتوچین به کار می‌رود.

رنگ محیط بلاد آگار باید قرمز روشن باشد. اگر رنگ آن تیره شد، نشان‌دهنده آن است که محیط آگار هنگام اضافه کردن خون دمای بالایی داشته است. در این حالت چنین محیطی قابل استفاده نبوده و باید مجدداً تهیه شود. هر بار که محیط بلاد آگار تهیه و یا به شکل آماده مصرف خریداری می‌شود، باید با/ستریپتوکوکوس پنومونیه برای مشاهده ویژگی‌های رشد و فعالیت همولیتیک آزمایش شود.

کلنی‌های/ستریپتوکوکوس پنومونیه کوچک، خاکستری تا خاکستری متمایل به سبز بوده و در اطراف آن هاله سبز واضحی وجود دارد. (شکل شماره ۹)

برای تهیه این محیط نیز برطبق دستورالعمل کارخانه سازنده عمل می‌شود. ۲۰g از پودر محیط کشت در ۵۰۰ml آب مقطر در یک ارلن ۱ لیتری به کمک حرارت حل شده و سپس در 121°C به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو می‌شود. پس از اتمام اتوکلاو هنگامی که محیط تهیه شده تا دمای 50°C خنک شد، ۵٪ خون دفیبرینه استریل گوسفند به آن اضافه می‌شود (۲۵ml خون گوسفند به ۵۰۰ml آگار). چنانچه مقادیر متفاوتی از محیط تهیه می‌شود، همواره باید میزان خون اضافه شده ۵٪ باشد (برای مثال برای یک لیتر محیط کشت ۵۰ml خون اضافه می‌شود). سپس محیط تهیه شده به میزان ۲۰ml در پلیت‌های ۱۰۰mm تقسیم شده و پس از جامد و خشک شدن سطح محیط، در کیسه‌های پلاستیکی مخصوص نگهداری پلیت‌ها قرار داده شده و در یخچال 4°C نگهداری می‌شوند.

محیط بلاد آگار خون خرگوش با استفاده از محیط هارت اینفیوژن آگار HIA^۱

این محیط که جهت مشاهده فعالیت همولیتیک گونه‌های هموفیلوس استفاده می‌شود باید به رنگ قرمز روشن مشابه محیط بلاد آگاری که به طور معمول به کار می‌رود باشد (BAP).

اگر محیط به رنگ قرمز تیره باشد نباید به کار برده شود. از خون اسب نیز می‌توان به جای خون خرگوش در تهیه این محیط استفاده کرد.

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

در این حالت باکتری باید به خوبی رشد کرده و همولیز کامل گلبول‌های قرمز به شکل هاله شفاف در اطراف کلنی‌ها مشاهده شود. برای تهیه این محیط نیز از دستورالعمل کارخانه سازنده (روی برجسب قوطی) پیروی کرده و با ساخت حجم مورد نیاز، به مدت ۲۰ دقیقه در 121°C اتوکلاو می‌شود.

1. Heart infusion rabbit blood agar plate

پس از سرد شدن محیط تا دمای 50°C (محیط را می‌توان در بن ماری 50°C قرارداد). با افزودن ۵٪ خون استریل دفیبرینه خرگوش (۵ml برای ۱۰۰ml محیط)، محیط تهیه شده در پلیت‌هایی به ابعاد ۱۰۰mm تقسیم می‌شود. بعد از جامد شدن محیط و خشک شدن رطوبت سطحی، در کیسه‌های پلاستیکی مخصوص نگهداری پلیت‌ها قرار داده شده و در یخچال با برودت 4°C نگهداری می‌شود.

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

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

این محیط نیز برطبق دستورالعمل کارخانه سازنده تهیه و در حرارت 121°C به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شده و سپس در بن ماری تا دمای 50°C خنک می‌شود. پس از افزودن خون اسب (۵ml برای ۱۰۰ml محیط) و مخلوط کردن آن، در پلیت‌هایی با اندازه ۱۰۰mm تقسیم می‌شود. پس از جامد شدن محیط و خشک شدن رطوبت سطحی، در کیسه‌های پلاستیکی مخصوص نگهداری پلیت‌ها قرار داده شده و در یخچال با برودت 4°C نگهداری می‌شود.

محیط تریپتیکس سوی براث (TSB)

محیط TSB برای تهیه سوسپانسیون هموفیلوس آنفلوانزه و جهت انجام آزمایش‌های تشخیصی نیاز به فاکتورهای X و V استفاده می‌شود. به علاوه محیط‌های هارت اینفیوژن براث (HIB)، نرمال سالین و یا فسفات بافر سالین (PBS)^۱ نیز ممکن است به جای TSB استفاده شوند.

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

1. Phosphat Buffer Saline

فاکتورهای X و V استفاده می‌شود. جهت بررسی ویژگی‌های افتراقی باکتری‌های مولد مننژیت لازم است سوسپانسیون از کشت تازه آنها در محیط TSB تهیه‌شده بعد از یک شب انکوباسیون در دمای 35°C ، در صورت رشد و ایجاد کدورت، روی آگار خون‌دار کشت داده شوند. محیط TSB برطبق دستورالعمل روی قوطی محیط کشت تهیه‌شده، سپس به میزان ۵ml در لوله‌هایی با ابعاد $15 \times 125\text{mm}$ تقسیم‌شده و در دمای 121°C به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو می‌شود. پس از خنک‌شدن در یخچال در برودت 4°C نگهداری می‌شود.

محیط کشت خون مایع

هر سری جدید از محیط کشت خون تهیه و یا آماده خریداری شده باید از نظر امکان رشد *نایسریا مننژیتیدیس*، *استرپتوکوکوس پنومونیه* و *هموفیلوس آنفلوانزه* آزمایش شود. برای این منظور ۱-۲ml از خون استریل انسان یا خرگوش و اسب را به ۳ بطری کشت خون تلقیح کرده و سپس از کشت تازه هر یک از ۳ باکتری موردنظر، در ۳ بطری کشت خون به‌طور جداگانه تلقیح می‌شود. برای این منظور از کشت‌های فوق سوسپانسیون در ۱-۲ml محیط مایع تهیه‌شده و به ۳ بطری کشت خون تلقیح و در 35°C به مدت ۷ روز نگهداری می‌شود. سپس بطری‌ها از نظر وجود علائم رشد بررسی شده و از آنها، ۱۴ و ۴۸ ساعت پس از تلقیح کشت تهیه می‌شود.

محیط TSB به‌عنوان محیط کشت خون طبق دستور کارخانه سازنده تهیه می‌شود. افزودن 0.25g SPS برای یک لیتر از محیط به جداسازی *هموفیلوس آنفلوانزه* کمک می‌کند.

حجم بطری کشت خون برای کودکان ۲۰ml و برای بزرگسالان ۵۰ml است و باید حجم محیط مایع، حداقل $\frac{1}{3}$ حجم کل بطری باشد. لازم است بطری کشت خون مایع در پوش پلاستیکی و در پیچ داشته‌باشد.

بطری‌های کشت خون پس از تهیه و استریل‌شدن به مدت ۱۵ دقیقه در حرارت 121°C اتوکلاو و در دمای اتاق نگهداری می‌شوند.

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 مننژیتیدیس* را به‌خصوص هنگامی که در انکوباتور حاوی $5\% \text{CO}_2$ قرار داده می‌شوند فراهم می‌کند. 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 مننژیتیدیس*، *هموفیلوس آنفلوانزه* و *استرپتوکوکوس پنومونیه* را امکان‌پذیر می‌کند.

اگر محیط شکلات آگار در لوله‌های در پیچ‌دار به ابعاد $16 \times 125\text{mm}$ به‌صورت سطح شیب‌دار تقسیم‌شود، محیط انتقالی و همچنین نگه‌دارنده کوتاه‌مدت برای این باکتری‌ها خواهد بود. تمام محیط‌های شکلات آگاری که تهیه‌شده و یا به‌صورت آماده خریداری می‌شوند، باید با باکتری‌هایی که در بالا ذکر شد (*نایسریا مننژیتیدیس*، *هموفیلوس آنفلوانزه* و *استرپتوکوکوس پنومونیه*) کنترل کیفی شوند.

رنگ محیط شکلات آگار باید قهوه‌ای تا قهوه‌ای-قرمز باشد. *نایسریا مننژیتیدیس* و *هموفیلوس آنفلوانزه* کلنی‌های خاکستری داشته و بعد از ۲۴ ساعت به‌صورت لایه‌ای براق روی سطح شیب‌دار و بدون ایجاد هرگونه تغییر رنگی در محیط رشد می‌کنند. کلنی‌های *استرپتوکوکوس پنومونیه* کوچک، خاکستری تا خاکستری-سبز است و رنگ سبز واضح و مشخصی روی محیط به‌وجود می‌آورد. اگر هر سه باکتری ذکر شده یا حتی یکی

از آنها نتواند روی محیط شکلات آگار رشد کند، محیط قابل استفاده نخواهد بود. اگر هموفیلوس آنفلوانزه رشد نکرد نشان‌دهنده آن است که محیط فاقد ایزوویتالکس و یا ماده مشابه آن است.

محیط شکلات آگار با استفاده از پایه TSA و فاکتورهای رشد

اگر محیط TSA به‌عنوان محیط پایه استفاده شود، آن را به شکل دو برابر (Double strength) یعنی به میزان ۲۰g در ۲۵۰ml آب مقطر تهیه کرده، پس از اتوکلاو کردن محیط را تا دمای ۵۰°C خنک کنید (می‌توان از دماسنج برای اطمینان از خنک شدن محیط استفاده کرد). محلول ۲٪ هموگلوبین (۵g هموگلوبین در ۲۵۰ml آب مقطر) را نیز تهیه کرده، آن را در ۶-۵ml آب مقطر حل کرده تا به شکل خمیر درآید. سپس بقیه آب مقطر را اضافه کرده، پس از اتوکلاو کردن در ۵۰°C خنک کنید. محلول هموگلوبین را به محیط TSA افزوده و آن را در دمای ۵۰°C گرم نگه دارید.

اگر محلول هموگلوبین در دسترس نباشد، می‌توان از ۵٪ خون دفیبرینه گوسفند، خرگوش، خوکچه و اسب استفاده کرد. در این مورد محیط TSA به میزان ۲۰g در ۵۰۰ml آب مقطر تهیه می‌شود. هرگز نباید از خون انسان استفاده شود.

بعد از اتوکلاو کردن محیط TSA و خنک شدن آن تا ۵۰°C خون را اضافه کرده و پس از مخلوط کردن، آن را در بن‌ماری با دمای ۸۰°C به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده تا به رنگ شکلاتی درآید، سپس محیط را در ۵۰°C خنک کنید.

می‌توان پس از افزودن محلول هموگلوبین و یا خون دفیبرینه شده، هنگامی که دمای محیط ۵۰°C است، محلول ۱٪ ایزوویتالکس یا ویتوکس را اضافه و آن را به آرامی مخلوط کرده تا از تولید حباب‌های هوا

جلوگیری شود. محیط‌ها را به میزان ۲۰-۱۵ml در پلیت‌های به قطر ۱۰۰mm تقسیم کنید.

طرز تهیه 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 حل کنید. با تکان دادن مکرر آن را به خوبی حل کرده و یک دقیقه بجوشانید تا پودر کامل حل شود. بعد از اتوکلاو کردن در ۱۲۱°C به مدت ۱۵ دقیقه، آن را تا دمای ۵۰°C خنک کنید. ۲g هموگلوبین را با ۱۰-۵ml آب مقطر مخلوط کرده تا خمیری شکل شود. سپس به تدریج بقیه آب مقطر را اضافه کرده تا محلول هوموژن شود. در طی اضافه کردن آب مقطر محلول باید مکرر هم زده شود. پس از اتوکلاو کردن در دمای ۱۲۱°C به مدت ۱۵ دقیقه، آن را تا ۵۰°C خنک کنید. می‌توان از محلول ۲۰٪ هموگلوبین استریل آماده شده استفاده کرد. در این حالت ۱۰۰ml از آن را تا دمای ۵۰°C گرم کنید.

فاکتورهای رشد (ایزوویتالکس و یا ویتوکس) که به صورت ویال‌های لیوفیلیزه هستند، در شرایط استریل ۱۰ml محیط کشت مایع (حلال) به آن اضافه کرده و کاملاً مخلوط کنید تا از حل شدن آن مطمئن شوید. این محلول باید فوراً استفاده شود و یا در یخچال ۴°C در طی دو هفته مصرف شود.

۱۰۰ml از محلول هموگلوبین را در شرایط استریل به ۱۰۰ml محیط پایه GC اضافه کرده و ۲ml از ایزوویتالکس و یا ۴ml از محلول ویتوکس را به آن افزوده، پس از مخلوط کردن و با رعایت عدم تولید حباب در آگار، به میزان ۲۰-۱۵ml در پلیت‌های استریل به قطر ۱۰۰mm تقسیم کنید. محیط‌ها پس از سرد شدن تا چند ساعت در دمای اتاق قرار گیرند، سپس در کیسه پلاستیکی مخصوص نگه‌داری پلیت‌ها قرار داده شده و در یخچال ۴°C نگه‌داری شوند.

طرز تهیه محیط نیمه جامد با افزودن ۱٪ کربوهیدرات CTA

برطبق دستورالعمل کارخانه سازنده ۲۸g از محیط CTA ساخت کمپانی BBL و یا ۲۹/۵g از محیط دیفکو در ۹۰۰ml آب مقطر حل می‌شود. بعد از مخلوط کردن آن با حرکات مداوم جهت حل کردن پودر، به مدت ۱ دقیقه محیط جوشانده می‌شود. پس از اتوکلاو کردن در ۱۲۱°C به مدت ۱۵ دقیقه و خنک شدن محیط تا دمای ۵۰°C، محلول ۱۰٪ گلوکز به آن اضافه شود. برای تهیه محلول ۱۰٪ گلوکز، ۱۰g گلوکز در ۱۰۰ml آب مقطر حل شده سپس با استفاده از فیلتر ۰/۲۲ میکرون استریل شود. در شرایط استریل ۱۰۰ml از محلول ۱۰٪ گلوکز به ۹۰۰ml از محیط CTA اضافه شود تا غلظت نهایی ۱٪ گلوکز به دست آید. سپس ۷ml از محیط در لوله‌های در پیچ دار به ابعاد ۱۶×۱۲۵ml تقسیم شده و در یخچال نگهداری می‌شود. سایر کربوهیدرات‌ها از قبیل مالتوز، لاکتوز و سوکروز نیز مانند گلوکز تهیه می‌شوند.

طرز تهیه محیط لوینتال جهت جداسازی گونه‌های هموفیلوس**محلول A: محلول ذخیره لوینتال**

۳۷g از محیط مایع BHI^۱ را در ۴۵۰ml آب مقطر عاری از اندوتوکسین به خوبی مخلوط کرده و جهت حل شدن پودر تا رسیدن به نقطه جوش حرارت دهید. هنگامی که محیط گرم است ۵۰ml از خون دفیبرینه خرگوش را به آن اضافه کنید. پس از سرد شدن محیط، آن را از طریق گاز و یا فیلترهای پشم شیشه فیلتر کنید. محیط را در ۱۲۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ کنید. پس از استریل کردن به وسیله فیلتر در حجم ۱۰۰μl آن را تقسیم و نگهداری کنید.

محلول B: آگار

۷/۵g آگار به ۵۰۰ml آب مقطر عاری از اندوتوکسین اضافه کرده و آن را

به وسیله حرارت حل کرده، سپس در دمای ۱۲۱°C به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو کنید. محیط آگار نهایی که شامل ۵۰۰ml از محلول استریل شده لوینتال و ۵۰۰ml از محیط آگار استریل شده است را در ۵۰°C خنک کرده و در شرایط استریل در پلیت‌ها تقسیم کنید.

۳. محیط‌های انتقال دهنده و ذخیره سازی باکتری‌ها**محیط T-I**

محیط T-I یک محیط بی‌فازیک است که برای کشت اولیه نایسریا مننژیتیدیس، استرپتوکوکوس پنومونیه و هموفیلوس آنفلوانزه از نمونه‌های مایع نخاع و خون به کار می‌رود. این محیط علاوه بر آن که یک محیط انتقال دهنده است، ممکن است محیط رشد این باکتری‌ها نیز محسوب شود.

معرف‌های متفرقه**محلول‌های رنگ آمیزی گرم (روش اصلاح شده Hucker)**

اگسالات آمونیوم- کریستال ویوله.

— محلول کریستال ویوله ۲g، اتانول ۹۵٪ ۲۰ml (کریستال ویوله را در الکل حل کنید).

— محلول اگسالات آمونیوم ۰/۸g، آب مقطر ۸۰ml.

این دو محلول را مخلوط کرده و یک شب نگاه دارید. قبل از استفاده آن را با فیلتر کاغذی صاف کنید.

— 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 در آید.

محلول باید در شیشه‌های تیره رنگ دور از نور نگهداری شود.

— محلول رنگ بر الکل (۹۵°) و استون هم حجم.

1. Brain-Heart Infusion broth

رنگ زمینه:

— سافرانین.

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

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

— محلول کربول فوشین روش ذیل نیلسن.

کربول فوشین رنگ زمینه مناسب تری نسب به سافرانین ایجاد می‌کند.

فوشین بازیگ ۰/۳g، اتانول ۹۵٪/۱۰۰ml، فنل کریستال ذوب‌شده ۵ml،

آب مقطر ۹۵ml.

فوشین را در الکل حل کرده، محلول فنل ۵٪ را اضافه‌نمایید و بگذارید

یک شب بماند. سپس به وسیله فیلتر کاغذی آن را صاف کنید. این محلول

جهت استفاده به میزان $\frac{1}{4}$ رقیق می‌شود. رنگ زمینه می‌تواند با محلول آبی

۰/۳ یا ۰/۵ فوشین بازیگ نیز تهیه شود.

استاندارد کدورت مک‌فارلند

استاندارد مک‌فارلند ترکیبی از دو محلول در نسبت‌های متفاوت است که

حاصل آن تولید محلول کدورت سولفات باریم است.

برای تهیه آن از محلول ۱٪ کلرور باریم بدون آب و محلول ۱٪ اسید

سولفوریک استفاده می‌شود.

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

مخلوط کردن ۰/۱ml کلرور باریم ۱٪ و ۹/۹ml اسید سولفوریک ۱٪

به دست می‌آید.

استاندارد مک‌فارلند در لوله آزمایش تقسیم شده و در دمای اتاق و در

تاریکی نگه‌داری می‌شود. در هنگام کار سوسپانسیون باکتری باید در حجمی

برابر با حجم استاندارد مک‌فارلند تهیه شود. از استاندارد مک‌فارلند

علاوه بر تعیین حساسیت دارویی در آزمایش انحلال در املاح صفراوی

هموفیلوس آنفلوانزه و پلیت‌های تشخیصی هموفیلوس نیز استفاده می‌شود.

استاندارد مک‌فارلند هر ۶ ماه یک بار باید مجدد ساخته شود. محلول

استاندارد مک‌فارلند به مرور زمان به صورت رسوب و یا توده درآمده و

لازم است که قبل از استفاده با شدت تکان داده شود. سطح مایع رویی

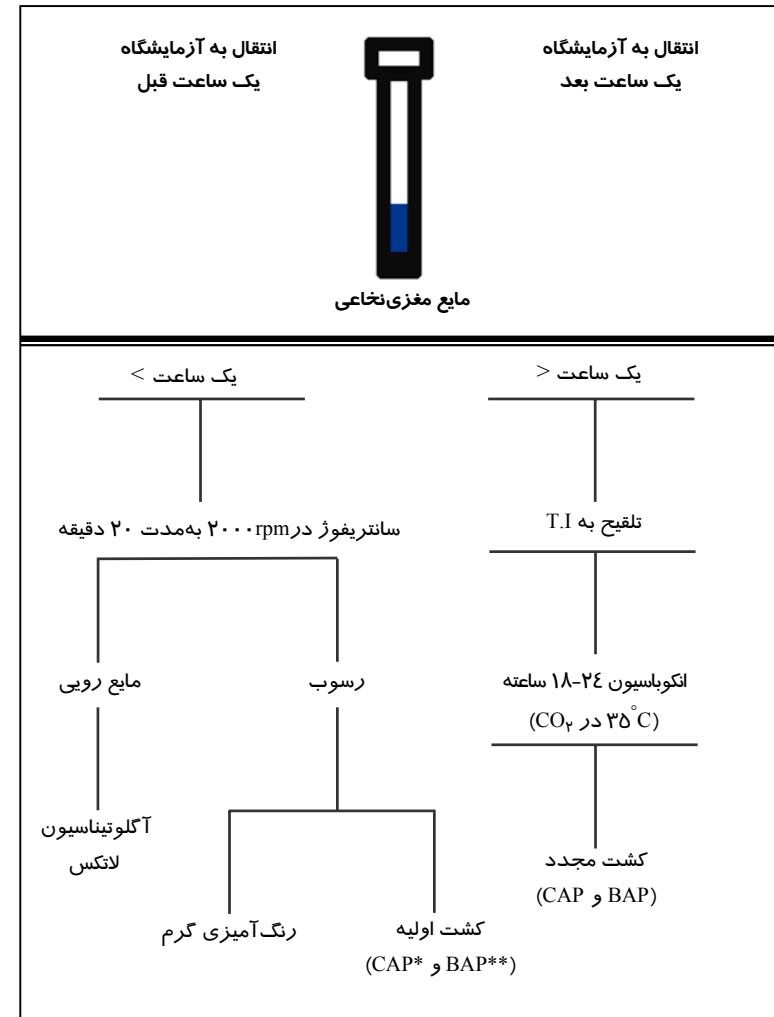
لوله باید علامت زده شود و باید قبل از مصرف مطمئن شویم که سطح

مایع در اثر تبخیر تغییر نکرده است، دراین حالت باید محلول استاندارد

دیگری تهیه شود.



شکل شماره ۲: محیط ترانس ایزولیت.



شکل شماره ۱: مراحل آماده‌سازی CSF برای آزمایش.

* Chocolate Agar Plate

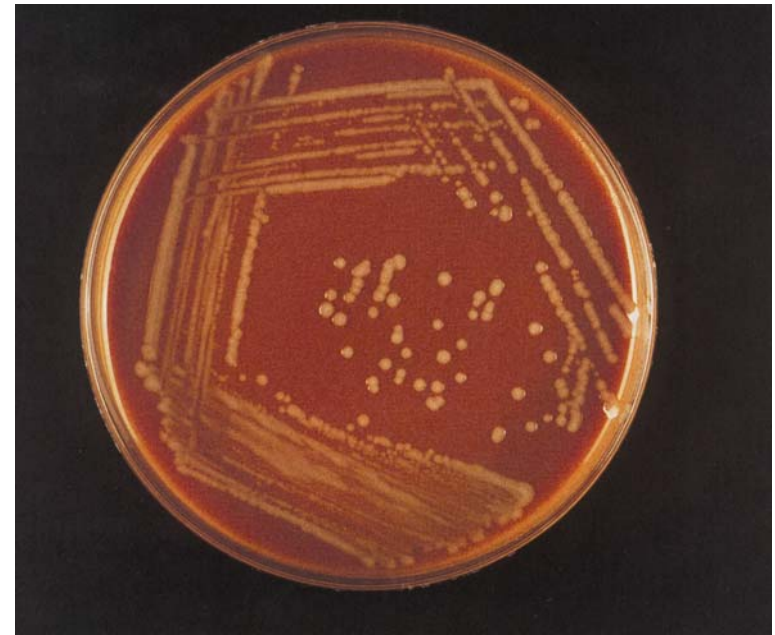
** Blood Agar Plate



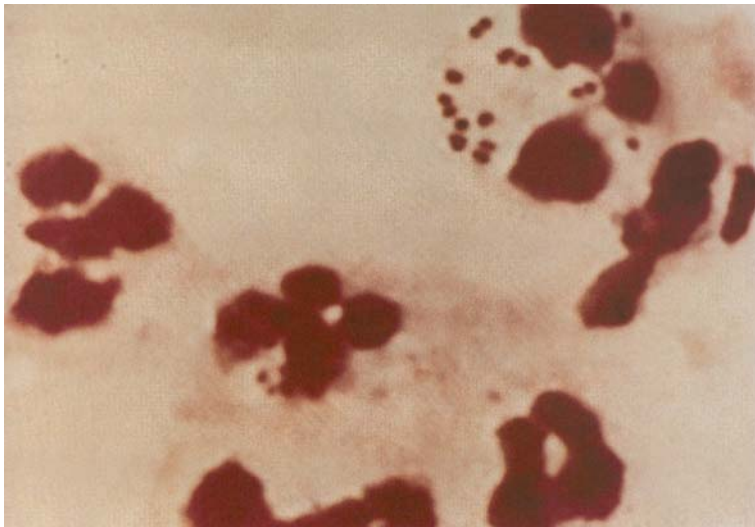
شکل شماره ۳: نایسریا منتزیتیدیس - کشت صحیح و رشد مناسب روی محیط آگار خون‌دار.



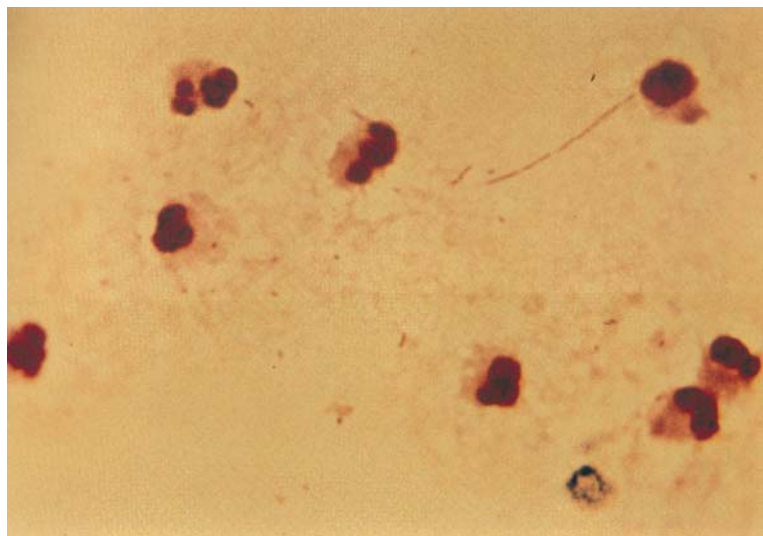
شکل شماره ۴: استرپتوکوکوس پنومونیه - کشت صحیح و رشد مناسب روی محیط آگار خون‌دار.



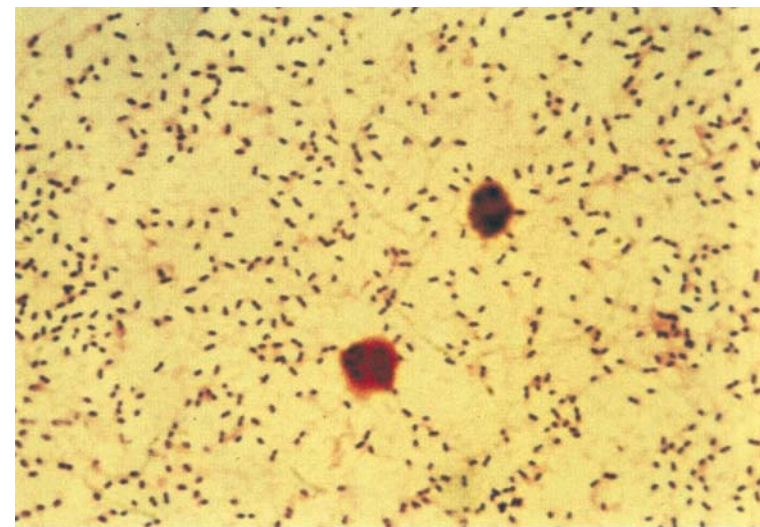
شکل شماره ۵: هموفیلوس آنفلوانزه - کشت صحیح و رشد مناسب روی محیط آگار خون‌دار.



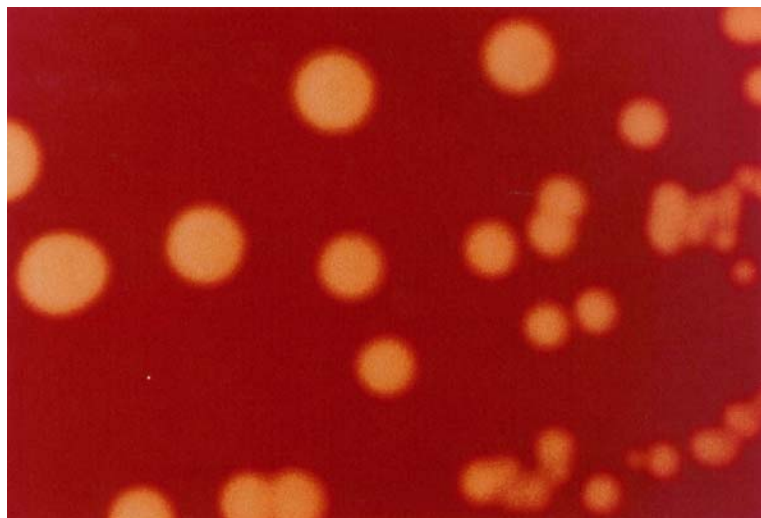
شکل شماره ۶-الف: رنگ آمیزی گرم CSF- نایسریا مننژیتیدیس: دیپلوکوک گرم منفی داخل سلولی.



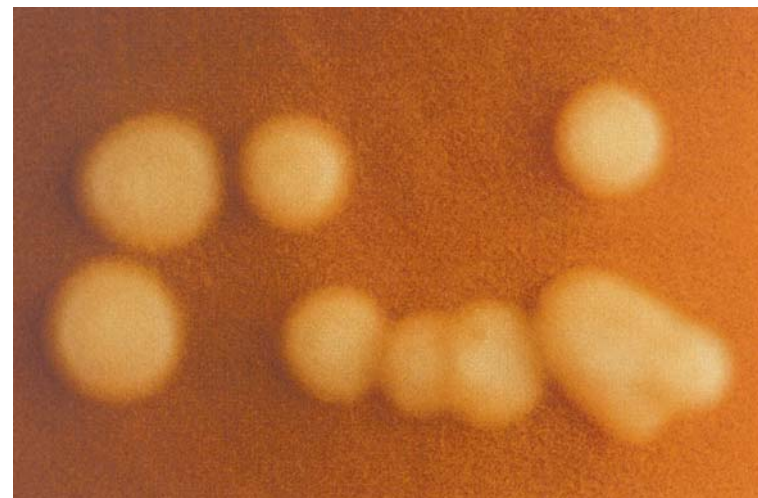
شکل شماره ۶-ج: رنگ آمیزی گرم CSF - هموفیلوس آنفلوانزاه: کوکوباسیل گرم منفی چندشکلی (پلئومورفیک).



شکل شماره ۶-ب: رنگ آمیزی گرم CSF - استرپتوکوکوس پنومونیه: دیپلوکوک گرم مثبت. این شکل متعلق به اسمیر CSF بیماری است که مقادیر فوق‌العاده زیادی از باکتری در آن وجود دارد.



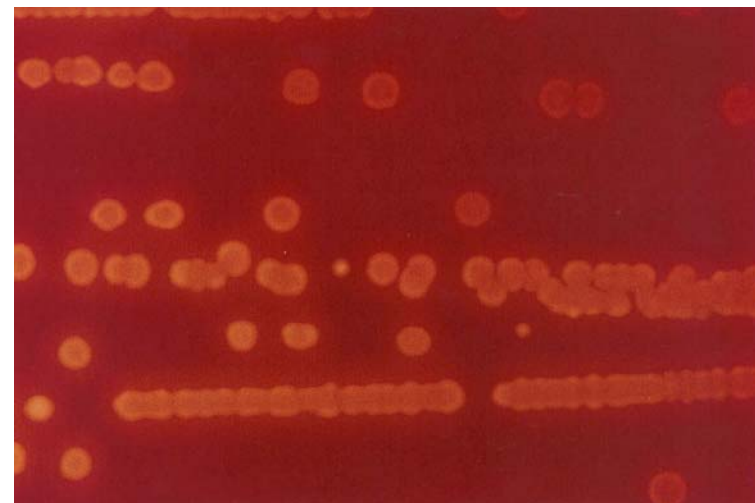
شکل شماره ۸: *نایسریا مننژیتیدیس* بعد از انکوباسیون ۲۴-۱۸ ساعته روی محیط آگار خون‌دار: کلنی‌های محدب، گرد، مرطوب و براق.



شکل شماره ۷: محیط آگار شکلاته، هموفیلوس آنفلوآنزه با کلنی‌های بی‌رنگ - خاکستری مات، بدون تغییر رنگ در محیط.

رشد روی CAP BAP (گوسفند)		رنگ آمیزی گرم	شناسایی احتمالی
+	+	دیلوکک گرم منفی	
+	+	دیلوکک گرم مثبت	
+	-	کوکوباسیل چندشکلی گرم منفی	

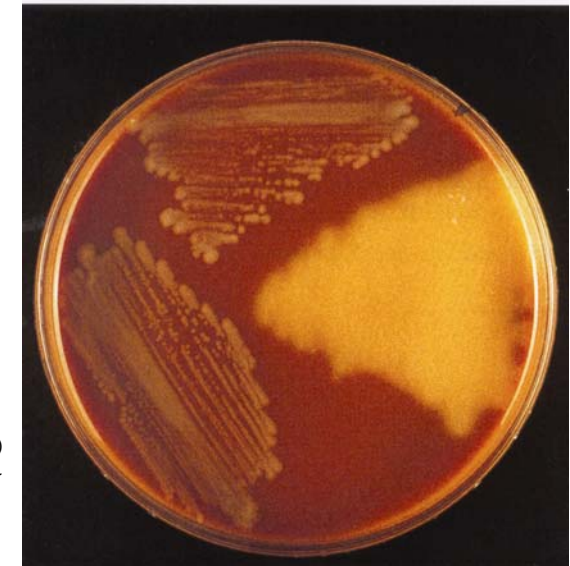
شکل شماره ۱۰: شناسایی احتمالی *نایسریا منتزیتیدیس*، *استرپتوکوکوس پنومونیه* و *هموفیلوس آنفلوانزه*.



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

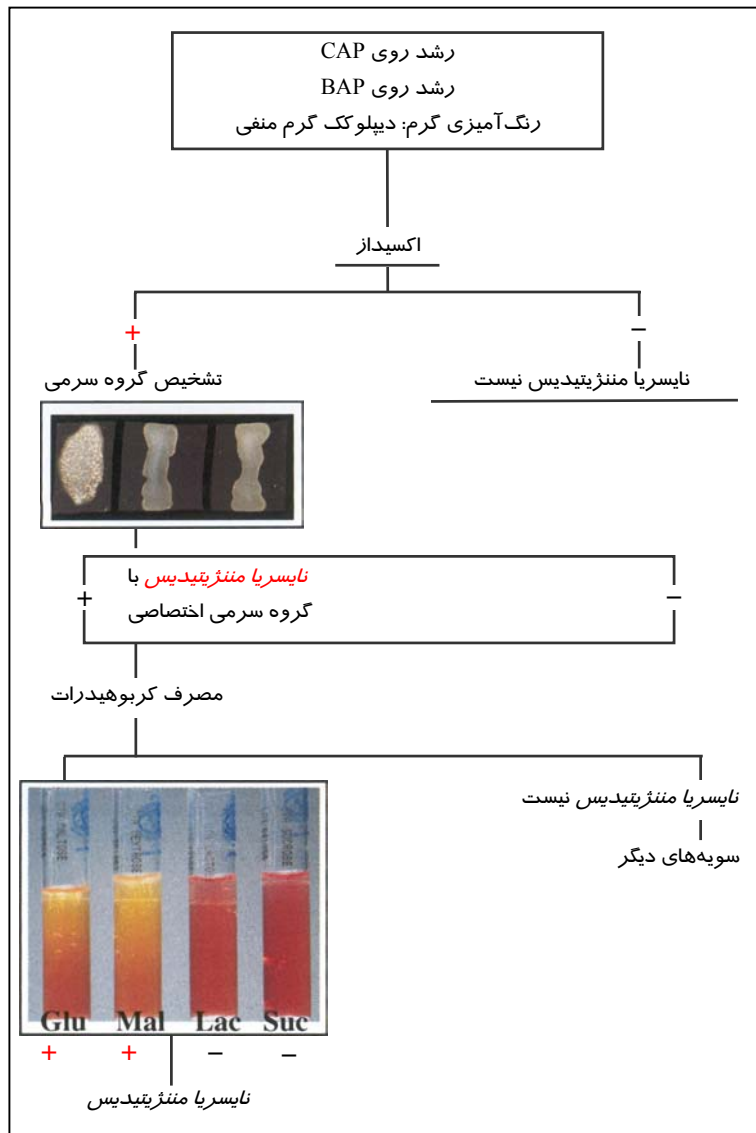


(الف) رشد روی محیط آگار خون‌دار.



(ب) رشد روی محیط آگار شکلاته.

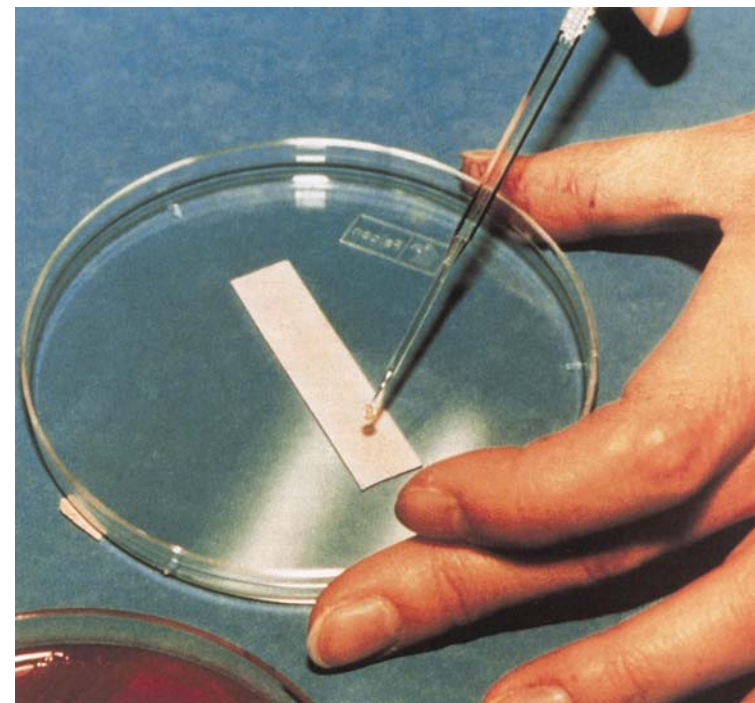
شکل شماره ۱۱: نایسریا منتزیتیدیس (چپ)، استرپتوکوکوس پنومونیه (راست) و هموفیلوس آنفلوانزه (بالا): هر یک از از پلیت‌ها.



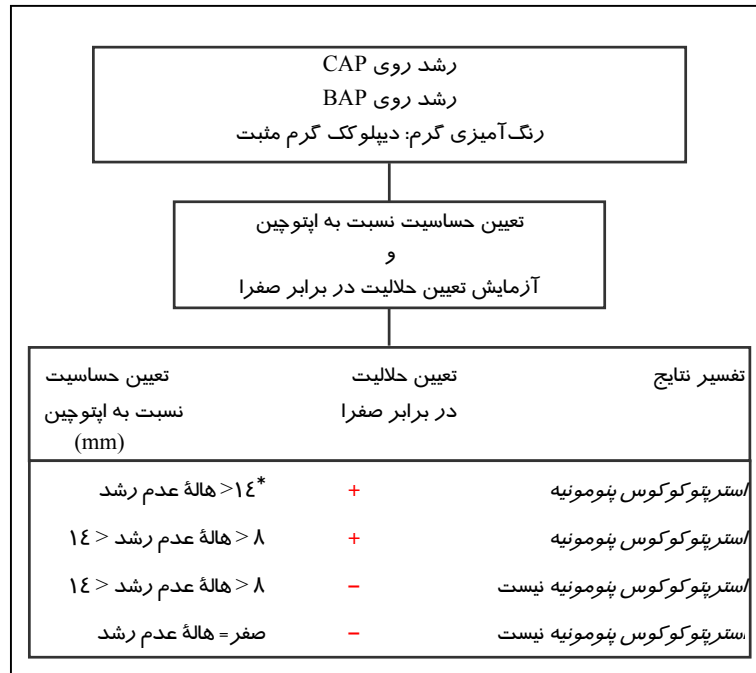
شکل شماره ۱۲: شناسایی نایسریا منتزیتیدیس.



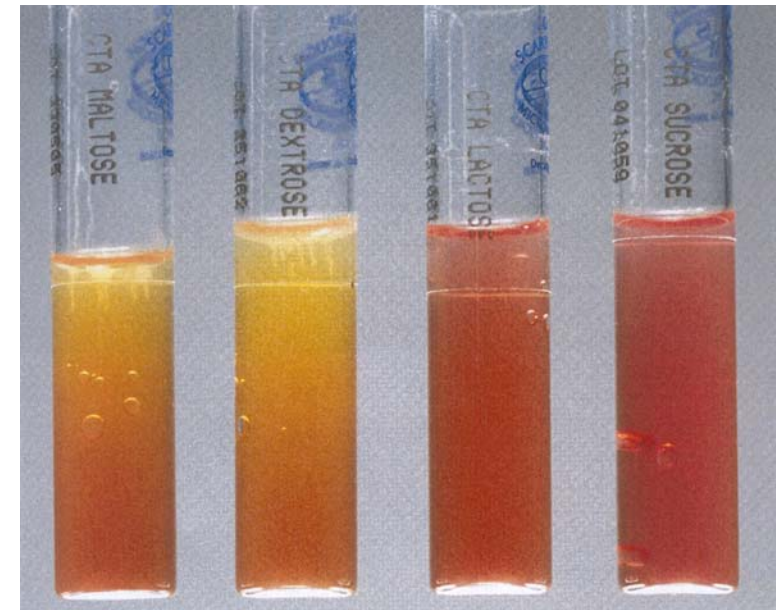
شکل شماره ۱۴: آگلوتیناسیون با شفاف‌شدن مایع زمینه زمانی اتفاق می‌افتد که باکتری با آنتی‌سرم هومولوگ مواجه شود (چپ). واکنش منفی زمانی رخ می‌دهد که باکتری با آنتی‌سرم هتروولوگ مخلوط شود (وسط) و مخلوط باکتری با سرم فیزیولوژی (راست) که همچنان کدر و پکنواخت می‌ماند.



شکل شماره ۱۳: آزمایش اکسیداز به روش کوآکس-واکنش مثبت.



شکل شماره ۱۶: شناسایی استرپتوکوکوس پنومونیه.



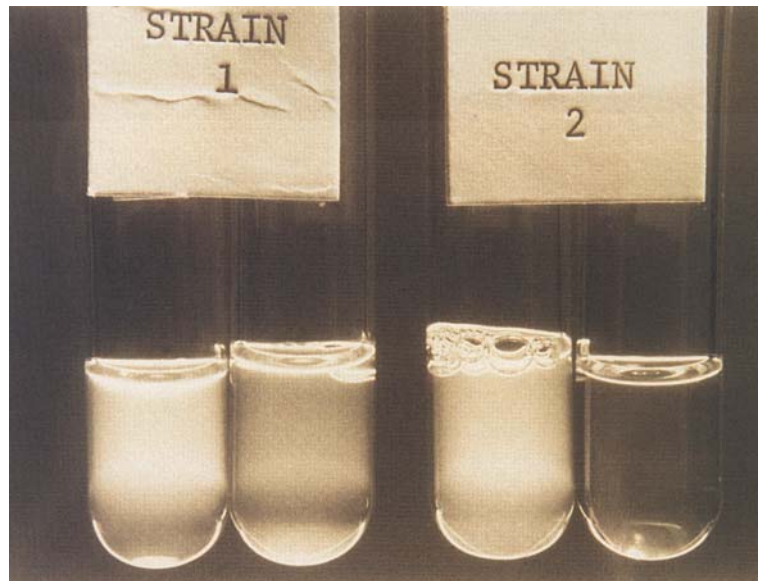
شکل شماره ۱۵: واکنش‌های قندی سیستمین تریپتیکس آگار جهت افتراق نایسریا منتزیتیدیس از سایر نایسریاها. تولید اسید (زرد رنگ) نشان‌دهنده مصرف اکسیداتیو قندهای دکستروز و مالتوز و عدم مصرف قندهای لاکتوز و سوکروز است.



شکل شماره ۱۷: آزمایش تعیین حساسیت نسبت به اپتوجین جهت شناسایی استرپتوکوکوس پنومونیه.

سویه فوقانی مقاوم به اپتوجین است (سایر استرپتوکوک‌ها).

سویه میانی و تحتانی حساس به اپتوجین است (پنوموکک).



شکل شماره ۱۸: آزمایش حلالیت در صفرا برای ۲ سویه باکتریایی مختلف.

اولین لوله از چپ: لوله کنترل دومین لوله از چپ: سویه باکتری

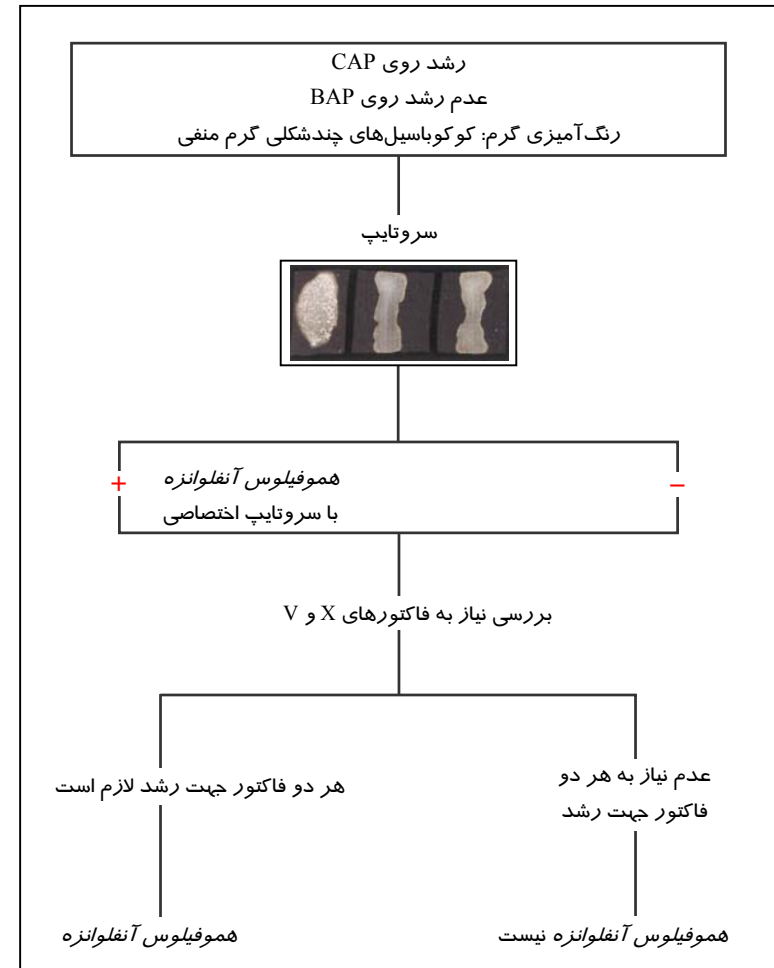
سومین لوله از چپ: لوله کنترل چهارمین لوله از چپ: سویه باکتری

به دلیل کدورت لوله دوم از چپ (با وجود کاهش مختصر در آن)، این

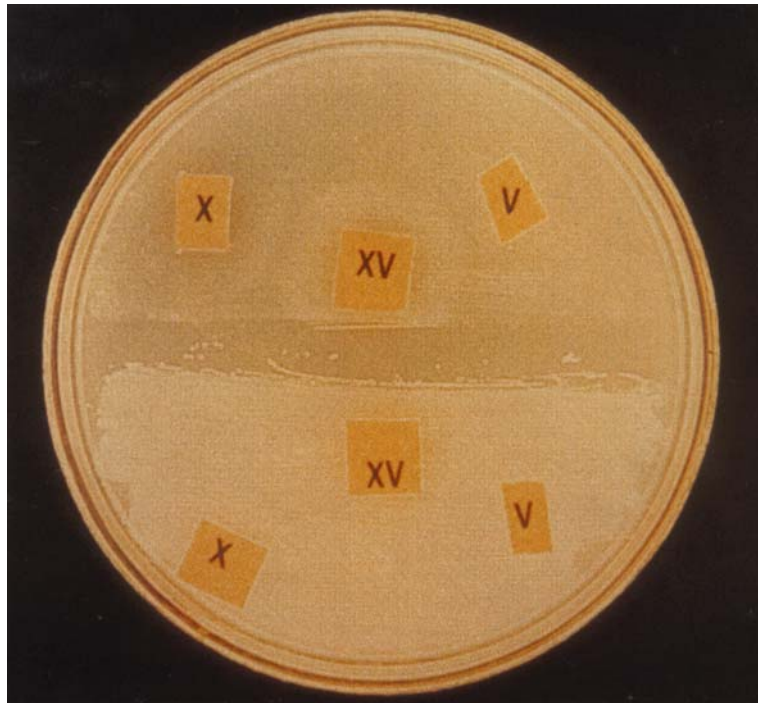
سویه پنوموکک محسوب نمی‌شود.

لوله چهارم از چپ در مقایسه با لوله سوم (کنترل) کاملاً شفاف شده است،

این سویه پنوموکک است.



شکل شماره ۱۹: شناسایی هموفیلوس آنفلوانزه.



شکل شماره ۲۰: بررسی نیاز به فاکتورهای رشد. هموفیلوس آنفلوانزه فقط در اطراف دیسک حاوی هر دو فاکتور X و V رشد می‌کند.

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)- Urinalysis 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.