دکتر علی بیکیان- متخصص آسیب شناسی بالینی و تشریحی

بررسی آزمایشگاهی عفونت های میکروبی روده

میکروارگانیزم‌ها (ویروس‌ها، باکتری‌ها، انگل‌ها و...) باعث عفونت در روده‌ی کوچک می‌شوند. نشانه آن دفع مدفوع به صورت اسهال حجیم و آبکی است. بیشتر نیازی به خوردن آنتی‌بیوتیک ندارد و خود بخود بهبود می یابد. اما در عفونت روده‌ی بزرگ، تب مهمترین علامت است. در این نوع عفونت، اسهال حجیم و زیاد نیست؛ ولی ممکن است به صورت خونی باشد. مصرف آنتی بیوتیک در عفونت روده بزرگ الزامی است و باید مدفوع بیمار مورد آزمایش قرار گیرد تا با مصرف آنتی بیوتیک، میکروب‌هایی که به جدار روده بزرگ هجوم آورده‌اند از بین بروند. در عفونت روده بزرگ، بر خلاف روده کوچک، بدن حجم زیادی از آب را دفع نمی‌کند. بنابراین، لزومی برای جبران این آب از دست رفته وجود ندارد و نوشیدن مایعات فراوان ضرورتی ندارد. نوشیدن آب آشامیدنی ناسالم، عدم رعایت بهداشت فردی و خوردن مواد غذایی آلوده باعث بروز عفونت روده می‌شود. نشانه های یاد شده در بالا به طور معمول پس از ۷۲ ساعت خود را نشان می‌دهند. این بیماری در افرادی که بیماری زمینه‌ای دارند (همانند کودکان شیرخوار و افراد مسن) خطرناک است و باید هرچه زودتر درمان شود.

انواع نمونه برای بررسی میکروبی عفونت روده ای

۱- نمونه مدفوع تازه

- برای بررسی میکروبی باید نمونه را در مرحله حاد بیماری اسهالی تهیه کرد.
- مدفوع در ظرف مناسب تمیز، خشک و بدون مواد ضدعفونی کننده دارای دهانه پهن، یا فنجان پلاستیکی دارای درپوش پیچ دار محکم جمع آوری کند.
- ۲۰ تا ۴۰ گرم از مدفوع با قوام نرمال یا به اندازه ۵ تا قاشق سوپخوری از اسهال آبکی برای یک بررسی معمولی کافی خواهد بود.
- مصرف برخی از داروها پیش از گرد آوری نمونه مدفوع می تواند در تشخیص میکروارگانیسم ها اختلال ایجاد نماید، از میان این داروها می توان به تتراسایکلین ها،سولفونامیدها، عوامل ضد تک یاخته ای، ضد یبوست ها،آنتی اسیدها، روغن کرچک، هیدروکسید منیزیم، سولفات باریوم، ترکیبات بیسموت کائولن، املاح هیپرتونیک و غیره اشاره کرد، که نباید در ۱ تا ۲ هفته پیش از بررسی نمونه مدفوع مصرف شوند.
- تمام نمونه ها باید به طور کامل با مشخصات بیمار مثل نام، سن، جنسیت و اطلاعات مربوط به گردآوری نمونه برچسب زده شوند.
- باید نمونه ها را در جای سرد نگهداری کرد.
- از خشک شدن نمونه ها جلوگیری کنید.
- از آلودگی نمونه ها با ادرار یا اجسام آلوده جلوگیری نمایید.
- بررسی های چندگانه مدفوع باید براساس محتمل بودن وجود آن نوع عفونت انجام شود.
- نمونه های مدفوع نباید از تشتک های نامناسب دارای مواد ضدعفونی کننده جمع آوری شوند.

۲- سوآب های رکتال

فقط موقعی تهیه می شود که امکان تهیه نمونه مدفوع وجود نداشته باشد. نمونه باید با استفاده از یک سوآب پنبه ای تهیه شود. سوآب باید بمدت ۱۰ ثانیه در داخل رکتوم قرار داده شود،باید مراقب بود که از آلودگی نمونه با باکتری های پوست اطراف مقعد پرهیز شود.

۳- روش نوار چسب

این روش برای تشخیص تخم های اکسیور کاربرد دارد. این تخم ها می توانند از طریق چسبیدن به یک نوار اسکاچ یا نوار چسب شفاف به دور نشیمنگاه جمع آوری شوند. بعد از جمع آوری تخم ها، نوار باید به صورت طولی در روی یک لام میکروسکوپی چسبانده شده و مورد بررسی قرار گیرد.

انتقال نمونه

نمونه باید در عرض ۳۰ دقیقه از زمان دفع مدفوع به آزمایشگاه رسیده باشد، زیرا ارگانیسم های متحرک مانند

ویبریوها و تروفوزوئیت های آنتاموبا هیستولیتیکا حساس به حرارت بوده و از بین می روند یا بعد از سپری شدن زمان مذکور غیرقابل تشخیص خواهند بود.

محیط های کشت انتقالی مثل Cary-Blair می تواند برای انتقال Salmonella،Shigella و Yersinia مورد استفاده واقع شود.

وقتی که مشکوک به بیماری وبا باشیم باید حدود ۱ میلی لیتر از نمونه را داخل لوله حاوی ۱۰ میلی لیتر محیط کشت آب پپتونه قلیایی قرار دهیم که به عنوان محیط کشت غنی کننده عمل کرده و همان کارایی محیطهای انتقالی را دارا است.

در مورد وجود کرمها یا قطعات کرم نواری در نمونه باید به یک ظرف حاوی سالین فیزیولوژیک انتقال داده شده و برای تشخیص به آزمایشگاه ارسال شود.

بررسی ماکروسکوپی نمونه مدفوع

نکات مهمی که باید مورد توجه قرار گیرند عبارتند از:

- **قوام نمونه**

نرمال یا(بی شکل)، نرم(شل یا آبکی). کیست ها بیشتر در نمونه های با قوام نرمال دیده می شوند، ولی تروفوزوئیت ها در مدفوع آبکی یافت می شوند.

- **وجود خون، مخاط یا چرک**

وجود کرم هایی مثل اکسیور، آسکاریس و قطعات کرم های نواری مانند گونه های تنیا

- **رنگ مدفوع (سفید، زرد، قهوه ای یا سیاه)**

مدفوع طبیعی دارای رنگ قهوه ای و دارای قوام نرمال است. مدفوع نوزاد به رنگ زرد- سبز و دارای قوام نیمه شل است.

بررسی باکتریولوژی در نمونه مدفوع

- **روش متیلن بلو**

تکه کوچکی از نمونه مدفوع یا سواب رکتال همراه با یک تکه کوچک از مخاط را در یک قطره از محلول ۰/۰۵ درصد آبی متیلن در روی یک لام تمیز قرار دهید و آن را از نظر وجود سلول های التهابی به صورت زیر مورد بررسی قرار دهید:

✔ تجمع سلول های چرکی بیشتر از ۵۰ عدد در یک میدان میکروسکوپی با قدرت بالا همراه با ماکروفاژها و اریتروسیت ها می توانند نشانگر شیگلوز باشند.

✔ وجود تعداد کمتری از سلول های چرکی زیر ۲۰عدد در میدان میکروسکوپی با قدرت بالا در سالمونلوزیس و عفونت های ناشی از اشریشیا کولی مهاجم دیده می شود.

✔ وجود لکوسیت به تعداد کم شاید زیر۵عدد در میدان میکروسکوپی با قدرت بالا نشانگر وجود ویبریوکلرا، EPEC، ETEC و ویروس های عامل اسهال است.

لام مرطوب

لام مرطوب ساده ترین روش بررسی یک سوسپانسیون باکتریایی برای دیدن باکتری های متحرک است. یک قطره از سوسپانسیون را در روی یک لام تمیز قرار دهید روی آن را با لامل پوشانده و حرکت باکتری ها را در زیر میکروسکوپ با استفاده از عدسی های ×۱۰ و ×۴۰ بررسی کنید. از بسته شدن دریچه دیافراگم کندانسور برای ایجاد یک تمایز بهتر اطمینان حاصل نمایید.

تهیه قطره معلق

یک قطره از سوسپانسیون را روی یک لامل قرار داده و آن را برگردانده و روی یک لام توگود قرار داده و ارگانیسم های متحرک را بررسی می کنیم.

اسمیر فوشین قلیایی

پس از گسترش یک لایه نازکی از نمونه روی لام،آن را با فوشین قلیایی رنگ آمیزی م کرده و آن را زیر میکروسکوپ با عدسی روغنی بررسی می بینیم. این روش یک روش حساس برای تشخیص اولیه احتمالی گونه های کمپیلوباکتر است. کامپیلوباکتر به شکل باکتری کوچک، نازک و مارپیچی و یا به شکلS دیده می شود.

کشت نمونه مدفوع

- **انواع محیط های کشت**

MacConkey's Agar

یک محیط کشت غیر انتخابی مفید برای کشت های همگانی است. یکی از برتری های آن ایجاد کلنی های دارای رنگ صورتی برای باکتری های لاکتوز مثبت و کلنی های بی رنگ برای باکتری های لاکتوز منفی است. این محیط بازدارنده ی رشد بیشتر باکتری های گرم مثبت است، و نیز خزندگی پروتئوس را مهار می کند که این پدیده ممکن است باعث مشکلاتی در کشت های مخلوط شود.. سالمونلا، شیگلا و ویبریو به علت عدم تخمیر لاکتوز

کلنی های بیرنگ روی این محیط ایجاد می کنند. اشرشیا کولی و سایر باکتری های تخمیر کننده لاکتوز کلنی های صورتی رنگ روی این محیط ایجاد می کنند.

محیط سالمونلا-شیگلا (SS Agar)

محیطی انتخابی برای باکتری های گرم منفی است. تخمیر کننده های لاکتوز (صورتی/ قرمز) را از غیر تخمیر کننده ها (بی رنگ) متمایز می کند، تولید H2S هم با رسوب سیاه قابل تشخیص است.

Hektoen enteric (HE)

محیطی انتخابی است برای باکتری های گرم منفی. تخمیر کننده های لاکتوز دارای کلنی های زرد-نارنجی اند. کلنی های آبی یا سبز مشخص کننده عدم تخمیر لاکتوز است. تولید SH2 هم می تواند رنگ سیاه ایجاد کند.

XLD agar

این محیط کشت انتخابی برای جداسازی سالمونلا و به خصوص شیگلا از نمونه های مدفوع پیشنهاد شده است. شیگلا کلنی های صورتی قرمز ایجاد می کند زیرا قادر به تخمیر گزیلوز و لاکتوز نیست. سالمونلا به علت تولید سولفید هیدروژن کلنی های صورتی قرمز با مرکز سیاه ایجاد می کند.

TCBS agar

محیط بسیار مناسب و انتخابی برای جداسازی اولیه ویبریو کلرا می باشد. غنی سازی قبلی باکتری در آب پپتونه قلیایی توصیه شده است، مگر اینکه نمونه حاوی تعداد زیادی از باکتری های ویبریو در مرحله حاد بیماری باشد. در روی این محیط ویبریوکلرا به علت تخمیر لاکتوز کلنی های بزرگ زرد رنگ ایجاد می کند.

Sorbitol MacConkey's agar

این محیط به جای لاکتوز حاوی سوربیتول است. E.coli O157H7 به علت عدم تخمیر سوربیتول کلنی های بیرنگ روی این محیط ایجاد می کند در حالی که اکثر سویه های اشرشیا کولی و سایر انتروباکتریاسه ها سوربیتول را تخمیر کرده و کلنی های صورتی رنگ ایجاد می کنند.

بررسی مدفوع از نظر انگل ها

- **لام مرطوب با سرم فیزیولوژی**

در این روش، تروفوزوئیت ها، کیست ها، اووسیست ها، تخم ها و لاروهای کرم ها را می توان دید. برای تهیه نمونه مرطوب، مقدار کمی از نمونه را برداشته و روی لام در سرم فیزیولوژی حل کرده و در زیر میکروسکوپ قرار دهید. در حالت ایده آل ، دو اسمیر را می توان در یک اسلاید تهیه کرد که یکی از آنها را می توان با ید آغشته کرد.

- **لام مرطوب با ید**

برای رنگ آمیزی گلیکوژن و هسته های کیست ها بکار می رود. یک کیست در یک لام مرطوب دارای محلول ید بهتر تشخیص داده می شود ولی حرکت تروفوزوئیت ها در محلول ید متوقف می شود.

روش های تغلیظ نمونه مدفوع

اگر تعداد انگل ها در نمونه کم باشد در بررسی لام مرطوب ممکن است نتوانیم آنها را تشخیص دهیم، لذا نیاز به تغلیظ نمونه می باشد. تخم ها، کیست ها و لاروها بعد از مرحله تغلیظ قابل تشخیص خواهند بود درحالیکه تروفوزوئیت ها در طی عمل تغلیظ تخریب می شوند.

روش تغلیظ به دو صورت زیر قابل انجام است:

- **روش های رسوب سازی**

در اینجا تخم ها و کیست ها در ته لوله قرار می گیرند.

- **روش های شناورسازی**

در اینجا تخم ها و کیست ها به علت شیب وزن مخصوص در سطح لوله قرار می گیرند.

عیب اصلی روش رسوب سازی آن است که بررسی رسوب اغلب در نتیجه باقی ماندن مواد مدفوعی مشکل بوده که ممکن است مانع مشاهده انگل ها شود. عیب عمده روش شناورسازی آن است که همه تخم‌ها یا کیست ها در سطح شناور نمی مانند.

دو روش تغلیظ مورد استفاده روتین تکنیک فرمل– اتر و محلول نمک اشباع است.

تکنیک رسوب سازی با استفاده از فرمل- اتر

مراحل انجام روش

● نصف یک قاشق سوپ خوری از مدفوع را در ۱۰ میلی لیتر آب در یک ظرف اضافه کرده و کاملاً مخلوط می کنیم.

● دو لایه گاز را در یک قیف قرار داده و محتویات ظرف را صاف کرده و به یک لوله سانتریفیوژ ۱۵ میلی لیتری منتقل می کنیم.

● لوله را به مدت ۲ دقیقه در ۵۰۰ دور سانتریفوژ می کنیم.

● قسمت رویی را دور ریخته و رسوب را دوباره در ۱۰ میلی لیتر از سرم فیزیولوژی مخلوط می کنیم. لوله را به مدت ۲ دقیقه در ۵۰۰ دور سانتریفیوژ کرده و قسمت رویی را دور می ریزیم.

● رسوب را در ۷ میلی لیتر فرمالدئید ۱۰ درصد که از افزودن یک قسمت از فرمالین ۴۰ درصد به ۳ قسمت از سرم فیزیولوژی حاصل می شود به حالت سوسپانسیون درمی آوریم.

● ۳ میلی لیتر اتر یا اتیل استات به سوسپانسیون اضافه می کنیم. لوله را با درپوش بسته و بشدت تکان می دهیم تا مخلوط شود. درپوش را برداشته و لوله را به مدت ۲ دقیقه در ۵۰۰ دور سانتریفوژ ی کنیم.

● لوله را در حالت ایستاده قرار می دهیم. چهار لایه در لوله قابل مشاهده است؛ لایه بالایی از اتر تشکیل شده است، لایه دوم یک طبقه از مواد زائد، سومین لایه، یک لایه شفاف و حاوی فرمالین و لایه چهارم حاوی رسوب است.

● طبقه حاوی مواد زائد را از قسمت خارج لوله به کمک یک میله شیشه ای جدا کنید و مایع را دور بریزید. فقط مقدار کمی از لایه فرمالین برای به حالت سوسپانسیون در آوردن رسوب باقی می ماند.

● با یک پیپت رسوب را برداشته و در یک قطره محلول ید حل کرده و در زیر میکروسکوپ بررسی می کنیم.

تکنیک شناورسازی با نمک اشباع شده

یک میلی لیتر از مدفوع را در یک ظرف دارای انتهای مسطح و قطر کمتر از ۱/۵ اینچ و دارای گنجایش ۱۵ الی ۲۰ میلی لیتر قرار دهید.

چند قطره از محلول نمکی اشباع شده اضافه کرده و تکان دهید تا کاملاً مخلوط شوند.

محلول نمک بیشتری اضافه کنید تا تقریباً پر شود و به طور مداوم محلول را تکان دهید.

هر نوع جسم زائد را که در بالا شناور می ماند بردارید.

ظرف را در روی یک سطح تراز شده قرار دهید. پرکردن نهایی را با استفاده از یک قطر ه چکان ادامه دهید.

یک لام شیشه ای ۲ در ۳ اینچ به دقت در قسمت بالای ظرف قرار داده شود طوری که مرکز آن در تماس با مایع قرار گیرد.

اسمیر تهیه شده برای جلوگیری از ریختن نمونه به آرامی وارونه شده و بعد از گذاشتن یک لامل روی آن در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار می گیرد.

روش های رنگ آمیزی

رنگ آمیزی اسید فاست تغییر یافته با استفاده از اسید سولفوریک۱درصد به عنوان رنگبر، یک روش ساده و موثر برای تشخیص انگل های کوکسیدیایی در نمونه مدفوع است زیرا در لام های مرطوب تهیه شده رنگ آمیزی نشده، کیست های کریپتوسپوریدیم پاروم به سختی قابل تمایز از مخمرها و سایر ساختارهای کروی کوچک موجود در مدفوع است.