بسته آموزشی

کنترل کیفی و تشخیص بیماری های میکروبی

تهیه و تدوین :

دکتر مهدی پارسائی

جانشین سرپرست شبکه آزمایشگاهی بهداشت

فروردین ۱۴۰۳

بسم الله علیم

بسته آموزشی

تشخیص واهمیت بیماری های میکروبی

این مجموعه در راستای کنترل کیفی و تشخیص بیماری های میکروبی درآزمایشگاه، در شبکه آزمایشگاهی بهداشت با مشارکت وهمکاری افراد زیر تهیه و تدوین گردیده است :

۱. دکتر مهدی پارسائی - پست سازمانی : جانشین سرپرست شبکه آزمایشگاهی بهداشت
۲. مهدی حسن زاده (کارشناس ارشد آزمایشگاه - پست سازمانی : مدیر برنامه ریزی و کنترل کیفیت در شبکه آزمایشگاهی بهداشت
۳. رضا باقری (کارشناس آزمایشگاه - پست سازمانی : کارشناس آزمایشگاه شبکه آزمایشگاهی بهداشت

با قدردانی از همکاری صمیمانه کارشناسان آزمایشگاه های تابعه معاونت بهداشت استان آذربایجان شرقی

تاریخ تهیه بسته آموزشی : فروردین ماه سال ۱۴۰۳

گروه های هدف:

تکنسین آزمایشگاه - کاردان آزمایشگاه - کارشناس آزمایشگاه، کارشناس ارشد آزمایشگاه، دکترای تخصصی (PhD) رشته های مرتبط علوم آزمایشگاهی

اهداف آموزشی:

هدف کلی:

افزایش دانش وآگاهی پرسنل آزمایشگاه های بهداشتی در مورد کنترل کیفی و تشخیص بیماری های میکروبی درآزمایشگاه می باشد.

روش و نحوه اجرای آموزش:

با توجه به اینکه هدف این مجموعه آموزشی افزایش دانش و آگاهی کارکنان در مورد کنترل کیفی و تشخیص بیماری های میکروبی در آزمایشگاه می باشد، بنابراین می تواند جهت ارائه بهتر مطالب به روش حضوری درقالب کارگاه آموزشی وعملی ارائه شود و یا جهت پوشش تعداد بیشتری از آموزش گیرندگان بصورت غیرحضوری و در قالب کتابخوانی انجام گیرد.

مدت دوره آموزشی : ۳۰ ساعت

ارزشیابی :

در پایان دوره بمنظور ارزیابی میزان حصول موفقیت ودستیابی به اهداف آموزشی و بررسی آگاهی، نگرش وعملکرد آموزش گیرندگان و بهبود مستمر فرآیند، یک ارزشیابی از شرکت کنندگان بصورت تستهای چهارگزینه ای بعمل خواهدآمد.

مقدمه :

دنیایی که در آن زندگی می‌کنیم، گاه و بی‌گاه شاهد چالشی جدید در عرصه سلامت انسان‌هاست. برخی از بیماری‌ها به دلیل طبیعت واگیردار خود، در مقاطع زمانی متفاوت و گاه غیرقابل پیش‌بینی، جمعی از افراد جامعه را به صورت گروهی مبتلا کرده و موجب خسارت‌های جانی و مالی قابل توجهی می‌شوند. این‌گونه وقایع بهداشتی را اصطلاحاً اپیدمی یا همه‌گیری می‌نامند.

بیماری‌هایی چون آبله، طاعون، سرخک و آنفلوآنزا موارد متعددی از اپیدمی‌های وحشتناک را در جامعه بشری از خود به یادگار گذاشته‌اند.

هرچند ارتقای سطح زندگی و ابداع واکسن برای بسیاری از بیماری‌ها در جهان معاصر، خطر اپیدمی بسیاری از این بیماری‌ها را کاهش داده یا به کلی از بین برده است، اما هنوز در مواردی، برخی بیماری‌ها به ویژه در ماه‌های گرم سال از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌شود؛ چرا که بسیاری از میکروب‌ها و ویروس‌ها در فصول گرم و مرطوب سال فعالیت بیشتری دارند و از این رو در روزهای فصل گرم، شاهد ابتلای مردم به انواع بیماری‌های خطرناک و در عین حال شایع هستیم.

بیماری اسهال عامل مهم مرگ و میر کودکان در کشورهای در حال توسعه می باشد . تخمین زده می شود که سالانه 4 تا 6 میلیون کودک بر اثر بیماری های اسهال ، جان خود را از دست می دهند . اگرچه در برخی موارد بیماری اسهال حاد ، بدون هیچ گونه درمانی خود به خود بهبود می یابد ولی در بسیاری از موارد درمان ضرورت دارد.

اسهال از شایع ترین علائم کلینیکی عفونت قسمت های تحتانی دستگاه گوارش است . سازمان بهداشت جهانی (WHO) اسهال را به صورت دفع مدفوع آبکی یا شل حداقل سه مرتبه در یک دوره ۲۴ ساعته تعریف کرده است.

اسهال را می توان به دو دسته حاد و مزمن تقسیم بندی کرد . اسهال حاد شدیدترین نوع اسهال بوده و توسط بسیاری از عوامل عفونی: ویروسی (روتاویروس) ، باکتریایی (اشریشیا کلی ، کمپیلوباکتر ، سالمونلا، شیگلا ، یرسینیا، ویبریوکلر ا، باکتروئیدس فراژیلیس و ...)، انگلی(ژیاردیا و انتاموبا هیستولیتیکا) به وجود می آید و از عوامل اصلی مرگ ومیر در کودکان محسوب می شود . روتاویروس ها و اشریشیاکلی های مولداسهال ، از عمده ترین عوامل ایجادکننده اسهال می باشند.

امروزه با مجهز شدن آزمایشگاه ها حدود ۷۰ تا ۸۰ درصد عوامل اتیولوژیک اسهال قابل شناسایی بوده و با بهبود امکانات بهداشتی ومراقبتی و همچنین تشخیص به هنگام همه گیری ها روبه کاهش می باشد.

در این میان بیشترین توجه برروی روش های تشخیصی ای می باشد که نسبتا ساده ، ارزان و دقیق باشند . روش های بسیاری پیشنهاد شده است تا هر آزمایشگاه با توجه به امکانات موجود خود بهترین را انتخاب کند . این نکته که اکثر آزمایشگاه ها در فراهم کردن محیط های کشت ، مواد و دستگاه های تشخیصی با مشکل مواجه هستند لزوم تهیه محیط ها و مواد معادل آن را ضروری می سازد.

مهم‌ترین علت شیوع عفونت‌های روده‌ای به ویژه در فصل تابستان استفاده از مواد غذایی مانده، حرارت ندادن کافی غذاهای سرد شده، مصرف زرده تخم‌مرغ نیم‌پز و مصرف بستنی‌ها و آب‌های

آلوده است. از آنجا که بیماری‌های شایع در ماه‌های گرم سال اغلب هنگام مسافرت و در مکان‌های تفریحی و گردشی بروز می‌کنند، لذا بهتر است غذاها در منزل تهیه گردند یا از رستوران‌ها و اغذیه‌فروشی‌های معتبر خریداری شوند.

غذا باید به طور کامل بپزد و از مصرف غذاهای نیم‌پز همانند بیفتک ،کباب و... خودداری شود. ضمن این که حتی‌المقدور سعی شود غذا بلافاصله پس از تهیه، مصرف شده و از استفاده ی مجدد در وعده‌های غذایی دیگر پرهیز شود. در غیر این صورت غذای باقی‌مانده در یخچال نگهداری شود و در صورت استفاده مجدد حتماً غذای مصرفی در دمای بالای ۶۰ درجه گرم شود.

جوشاندن آب از مهم‌ترین راهها برای از بین بردن باکتری‌ها و انگل‌ها است و تصریح شده که آب آلوده یکی از مهم‌ترین راه‌های ابتلا به بیماری اسهال در افراد به ویژه کودکان است.

مسمومیت‌های غذایی

اغلب متخصصان، شایع‌ترین بیماری‌های فصل گرما را مسمومیت‌های غذایی و در پی آن اسهال و استفراغ می‌دانند. به گفته کارشناسان، این بیماری اغلب کودکان زیر ۵ سال را گرفتار می‌کند.

بر اساس پژوهش‌های به عمل آمده، هر کودک زیر ۵ سال، به طور تقریبی سه بار در سال به بیماری اسهال مبتلا می‌شود که این آمار در برخی مناطق، ۹ بار در سال است.

این پژوهش ها همچنین نشان می‌دهد کودکان زیر ۵ سال، ۱۵ درصد روزهای زندگی خود را با بیماری اسهال می‌گذرانند و همچنان ۸۰ درصد مرگ و میر کودکان زیر ۲ سال ناشی از اسهال است.

این آمارها به خوبی گویای اهمیت و ضرورت جلوگیری از بیماری‌های شایع فصل تابستان به ویژه اسهال در کودکان زیر ۵ سال است.

اهمیت درمان اسهال از آن روست که باعث از دست رفتن آب بدن و الکترولیت‌ها، بروز سوءتغذیه و در نهایت بیماری‌های عفونی در کودکان می‌شود و آنان را مستعد ابتلا به انواع عفونت‌ها می‌کند

خوشبختانه این بیماری در سال‌های اخیر از طریق مصرف محلول خوراکی او. آر. اس کنترل شده و میزان مرگ و میر کودکان به حداقل رسیده است.

در اسهال حاد که بین ۷ تا ۱۴ روز به طول می‌انجامد، در هر بار مقدار زیادی آب از بدن بیمار دفع شده و مدفوع فرم آبکی دارد، ولی در اسهال مزمن مدفوع کمتر آبکی بوده و خون و بلغم دارد. ضمن این که عامل اسهال حاد، ویروس‌ها و در برخی موارد باکتری‌ها هستند، حال آن که عامل اسهال مزمن، باکتری‌هایی چون آمیب و انگل هستند.

وقتی سطح سواد عمومی بالا می‌رود و مردم نکات آموزشی را مطالعه می‌کنند و پیام‌های بهداشتی به آن‌ها منتقل می‌شود، شاخص‌های بهداشتی ارتقا می‌یابد و بیماری‌های روده‌ای قابل کنترل‌تر می‌شوند.

بیماری‌های عفونی روده از جمله وبا، اسهال خونی، بیماری‌های انگلی و حصبه از مهم‌ترین بیماری‌هایی هستند که طی سال‌های گذشته باعث مرگ و میر بسیاری در کشورمان شدند.

مهم‌ترین راه انتقال این بیماری‌ها، عدم رعایت بهداشت فردی و نشستن دست‌ها قبل از غذا است. مردم تصور می‌کنند که آب چاه، برکه، رودخانه‌ها و چشمه‌ها که ظاهر شفافی دارند، برای

نوشیدن مناسب هستند، در حالی که این آب‌ها دارای انواع انگل هستند و خوردن آن‌ها باعث بیماری‌های روده‌ای می‌شود که ممکن است چندین سال علائمی نشان ندهند.

گندزدایی آب در محل مصرف از راه‌های پیشگیری از وباست، به طوری که با استفاده از کلر به موازات تهیه و تدارک مخازن مطمئن می‌توان از آب آشامیدنی سالم استفاده کرد.

گندزدایی آب، یک فرآیند از عملیات تصفیه است که در نتیجه آن باکتری‌های موجود در آب از بین می‌روند. یک فرد می‌تواند با داشتن حداقل یک لیتر آب برای آشامیدن و دو لیتر برای تهیه غذا و مصرف ضروری شستشو در روز، زنده بماند.

سبزیجات و میوه های خام باید به دقت شسته و ضدعفونی شوند، در غیر این صورت باعث ابتلا به بیماری‌های روده‌ای می‌گردند. گاهی اوقات می‌بینیم افراد کاهو را بدون این که خوب ضدعفونی کنند، مصرف می‌کنند و این باعث ایجاد بیماری کیست هیداتیک می‌شود.

بیماری‌های فصلی هر ساله آسیب‌های فراوانی را به جامعه وارد می‌سازند، در حالی که در اکثر موارد می‌توان با احتیاط‌ها و پیشگیری‌های ساده، جلوی بروز بسیاری از این بیماری‌ها را گرفت.

به گفته کارشناسان، اسهال و استفراغ حتی در کشورهای توسعه‌یافته هم، پنجمین علت مرگ و میر به شمار می‌رود. در این زمینه متخصصان نسبت به مصرف خودسرانه آنتی‌بیوتیک‌ها و داروهای ضد اسهال به ویژه در کودکان هشدار می‌دهند .

انواع اسهال

افزایش تعداد دفعات و تغییر قوام مدفوع نسبت به حالت همیشگی فرد، یک تعریف کلی از اسهال است. اسهال حاد در فصل گرم سال شایع هستند .

اسهال کمتر از ۱۴ روز جزو اسهال‌های حاد محسوب می‌شوند. در صورتی که اسهال بین ۱۴ روز تا یک ماه به طول بینجامد به عنوان اسهال پایدار و بیش از 30روز به عنوان اسهال مزمن در نظر گرفته می‌شود.

اسهال مزمن

علل بروز اسهال مزمن موارد زیر هستند:

سندرم روده تحریک پذیر (IBS)، بیماری التهابی روده(IBD) ، بیماری کرون (Crohns)و کولون زخمی (ulcerative colitis) بیماری‌هایی هستند که موجب التهاب روده کوچک و بزرگ و بروز اسهال مزمن می‌شوند. معدودی از بیماری‌های عفونی نیز می‌توانند موجب اسهال مزمن گردند، مثل ایدز.

رشد بیش از حد باکتری ها در روده کوچک، سرطان روده بزرگ (کولون)، بیماری‌های غدد مترشحه داخلی مثل پرکاری تیروئید و استفاده نادرست و زیاد از مواد و داروهای ملین نیز از دیگر علل بروز اسهال مزمن هستند.

اسهال حاد

عوامل عفونی و غیر عفونی از عوامل بروز اسهال حاد هستند .آلرژی نسبت به برخی غذاها از عوامل غیرعفونی اسهال حاد به شمار می‌رود که بدون دخالت عوامل میکروبی بروز می‌کند. همچنین شروع یک بیماری اسهالی با التهاب روده ممکن است با اسهال حاد همراه باشد .

برخی بیماری‌های داخلی مانند پرکاری تیروئید، حساسیت به برخی داروها و حتی مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها ممکن است علائم اسهال حاد را ظاهر کنند .

اسهال عفونی حاد در فصل گرما نسبت به نوع غیر عفونی آن شایع‌تر است. عوامل باکتریایی، ویروسی و انگلی از علل ایجاد اسهال عفونی حاد هستند.

اسهال باکتریایی

ضعف عمومی بدن همراه با دل‌درد، استفراغ و افزایش تعداد دفعات اجابت مزاج از علائم کلی اسهال باکتریایی است. همچنین ممکن است مدفوع با خون همراه باشد .

بیشترین تعداد اسهال باکتریایی ناشی از گونه های پاتوژن انتروباکتریاسه ها می باشد.

خانواده انتروباکتریاسه بزرگترین و ناهمگون ترین مجموعه باسیل های گرم منفی هستند که از لحاظ بالینی اهمیت دارند در مجموع۳۲ جنس و بیش از ۱۳۰ گونه از این خانواده توصیف شده اند .جنس های این خانواده بر اساس خصوصیات بیوشیمیایی، ساختار آنتی ژنیک و ترادف یابی اسیدهای نوکلئیک طبقه بندی شده اند .این باکتری ها باعث ایجاد بیماری های مختلفی در انسان می شوند.

برخی از ارگانیسم ها ما نند سالمونلا تیفی و گونه های شیگلا همیشه مرتبط با بیماری هستند ولی برخی دیگر مانند اشریشیا کلی،کلبسیلا ، پروتئوس و ... به عنوان فلور طبیعی روده بوده و با ایجاد شدن شرایطی مانند کسب ژن های بیماری زا از طریق پلاسمید وباکتریوفاژ، به هم خوردگی فلور میکروبی، جابه جایی فلور میکروبی و ... قدرت بیماری زایی را به دست آورده و سبب ایجاد عفونت های فرصت طلب می شوند.

روش جمع آوری نمونه مدفوع

محیط انتقال

محیط انتقال کری بلر برای نگهداری و انتقال سالمونلا، شیگلا، اشریشیاکلی، ویبریوکلرا، ویبریو پارا همولیتیکوس و یرسینیا انتروکولیتیکا بسیار مورد استفاده قرار می گیرد. این محیط باید قبل از استفاده و بعد از تلقیح نمونه به آن در مثبت چهار درجه سانتیگراد نگهداری شود. (چنانچه محیط تازه تهیه شده باشد باید قبل از استفاده ۱ تا ۲ ساعت خنک شده باشد و در یخچال نگهداری گردد.) این محیط انتقالی پس از آماده سازی حداکثر ۱۸ ماه قابل استفاده است، به شرطی که ، حجم آن کاهش پیدا نکرده و هیچگونه علائم آلودگی و تغییر رنگ مشاهده نشود.

نمونه گیری

بهتر است نمونه گیری مدفوع، در مراحل اولیه بیماری حداکثر ظرف ۲ تا ۳ روز که عامل بیماری زا به تعداد بیشتری در مدفوع وجود دارد و قبل از درمان آنتی بیوتیکی انجام شود. اصلا نمونه مدفوع (در صورت قوام دار بودن حداقل ۵ گرم و یا در صورت کاملا آبکی بودن معادل ۵ (^{cc} نسبت به سوآب برتری دارد و حداقل دو نمونه سوآب مقعدی یا سوآب از مدفوع تازه برای هر بیمار جمع آوری و در محیط انتقال کری بلر تلقیح شود .

توجه :به هنگام بروز طغیان حداقل بررسی ۱۰ نمونه بیمار باید صورت پذیرد .

در برخی شرایط سوآب کاربرد بیشتری دارد. به عنوان مثال اگر سریعاً به نمونه مدفوع نیاز باشد و انتقال سریع نمونه به آزمایشگاه با مشکلی همراه گردد، می توان سوآب از مدفوع را تهیه و به

سرعت به آزمایشگاه انتقال داد. سوآب مقعدی برای نمونه برداری پاتوژن هایی مانند شیگلا مناسب است. در اینگونه نمونه برداری ها، انجام صحیح روش بسیار مهم است .

الف) تهیه نمونه مدفوع و سوآب مدفوع :

-برای نمونه مدفوع، از یک ظرف تمیز با اندازه و در مناسب استفاده نمایید .

-در صورت عدم دسترسی به ظروف یکبار مصرف، حتماً از ظرف تمیز استفاده کنید .

-هنگامی که نمونه به آزمایشگاه می‌رسد لازم است به سرعت آزمایش بر روی آن انجام شود.

(بیشتر از دو ساعت از زمان نمونه‌گیری نگذشته باشد)

-اگر ناچار به نگهداری نمونه‌ها بیش از دو ساعت هستید، سوآبی را درون نمونه مدفوع قرار داده و پس از حرکت چرخشی، آن را در یک محیط انتقالی تلقیح کنید .

-اگر مدفوع حالت مخاطی دارد سعی کنید نمونه را همراه مخاط در محیط ترانسپورت تلقیح نمایید .

ب) سوآب مقعدی :

برای نمونه‌گیری از سوآب پنبه‌ای سالم استفاده کنید و دقت کنید که پنبه سر آن کنده نشده باشد. ابتدا سوآب را با فروکردن در محیط ترانسپورت استریل مرطوب کرده و سپس به اندازه ۲/۵ تا ۳/۵ سانتی‌متر داخل اسفنکتر رکتوم نموده و بچرخانید و بیرون بکشید. با توجه به تغییر رنگ پنبه‌ی سر سوآب، مطمئن شوید سوآب به مدفوع آغشته است. تعداد سوآب مورد نیاز بستگی به تعداد عوامل پاتوژن مورد مطالعه دارد معمولاًحداقل ۲ سوآب باید تلقیح شود. در

موارد نمونه‌گیری اسهال‌های ناشی از باکتری‌های مهاجم مانند شیگلا به هنگام تهیه سوآب مقعدی، ساییدن سوآب به مخاط انتهایی روده جهت جمع‌آوری نمونه بسیار پر اهمیت است .

ج) تلقیح به محیط انتقال :

در صورتی که ناچار به تلقیح نمونه پس از دو ساعت شدید لازم است نمونه‌ها را در یخچال و یا در محیط‌های انتقالی جهت بقاء بیشتر قرار دهید. محیط انتقالی تلقیح شده نیز باید در سرما نگهداری شود. زیرا این شرایط برای پاتوژن‌هایی مانند شیگلا و کامپیلوباکتر بسیار مهم است. البته بیشتر عوامل پاتوژن باستثناء این دو ارگانیسم، قابلیت زنده ماندن برای مدتی در محیط انتقالی، در دمای محیط را دارند (حداکثر یک هفته). هنگامی که نمونه‌ها در محیط انتقالی قرار داده شده و نیاز به نگهداری آنها برای مدت بیشتری است، لازم است آنها را در یخچال یا فریزر نگهداری کنید .

برای تلقیح نمونه به محیط انتقالی کری‌بلر :

- سوآب مدفوع یا مقعدی را به ته لوله حاوی محیط وارد کنید .

-پس از قراردادن سوآب در لوله، قسمت چوبی بیرون از لوله را بشکنید .

-در لوله را کاملاً ببندید .

-نمونه‌ها را داخل یخچال نگهداری کنید و اگر امکان گذاردن در یخچال وجود ندارد، محیط انتقال حاوی سوآب را در مکانی خنک و دور از نور جهت پایین نگاه داشتن دما قرار دهید .

توجه :محیط انتقال حاوی سوآب مدفوع یا مقعد را می توان حداکثر ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای یخچال مثبت چهار درجه سانتیگراد نگهداری نمود. در صورت عدم انتقال نمونه ظرف مدت تعیین شده به آزمایشگاه ، آنها را ترجیحاً در فریزر منفی ۲۰ درجه سانتی گراد و یا در صورت عدم دسترسی در فریزرهای خانگی (حدود منفی ۱۵ تا منفی ۱۸ درجه سانتی گراد می باشند) قرار دهید .

انتقال نمونه

به دقت لوله های حاوی نمونه را بپوشانید و سپس در جعبه ای که به هنگام ارسال شکسته نشود، بسته بندی کنید. در صورت ارسال با پست مقررات بین المللی را در نظر بگیرید. از دو بسته بندی استفاده نمایید: بسته درونی (غیر قابل نفوذ) و بسته بیرونی که از شکستن لوله ها جلوگیری می نماید. بر روی هر لوله ، اطلاعات مربوط به هر بیمار را ثبت کنید.

جهت انتقال امن و ایمن نمونه های زیستی باید از ظرف های سه لایه استاندارد که در اختیار آزمایشگاه های بهداشتی و گروه مبارزه با بیماری ها قرار دارد استفاده کنید.

ارسال نمونه درون هر ظرف دیگری بغیر از ظرف فوق موجب ایجاد خطر انتقال عوامل عفونی به صورت ناخواسته در جامعه افراد سالم شده و چه بسا ممکن است موجب ایجاد طغیان شود.

لذا جهت جلوگیری از نشت عوامل میکروبی در جامعه و همچنین افراد سالم از نظر وجود تابلو علامت بیماری های عفونی، لازم است شرایط و استاندارد انتقال امن و ایمن نمونه های زیستی توسط کارکنان کلیه آزمایشگاه ها رعایت شود.

دستور العمل انتقال امن و ایمن نمونه های زیستی توسط اداره کل آزمایشگاه مرجع سلامت تدوین و بازنگری می شود.

لذا لازم است از آخرین دستور عمل تهیه شود توسط اداره کل آزمایشگاه مرجع سلامت استفاده شود. این فرآیند ها به تفضیل در جزوه پیش رو آورده شده است.

استفاده و بکارگیری روش های کنترل کیفی موجب کسب نتایج دقیق و قابل اطمینان از عملکرد بخش میکروب شناسی می باشد.

لازم به ذکر است کنترل کیفی برای آزمایشگاه هزینه نیست بلکه ابزاری برای کاهش هزینه است چراکه با کاستن از تکرار انجام آزمایش و یا نمونه گیری، کاهش هزینه در مصرف کیت و ملزومات مصرفی آزمایشگاه ایجاد می گردد.

آزمایشگاه مرجع سلامت	دستورالعمل مدیریت نمونه در آزمایشگاه های پزشکی	صفحه 1 از 26

مدیریت نمونه در آزمایشگاه های پزشکی

نتایج آزمایش‌ها تحت تاثیر متغیرهای گوناگونی است که شناسایی آن‌ها و به دنبال آن استاندارد نمودن روش‌های آزمایشگاهی جهت تفسیر و استفاده بهینه از داده‌های آزمایشگاهی ضروری است. این متغیرها شامل مراحل قبل از، حین و پس از آزمایش می‌باشند. در سال‌های اخیر با توجه به تأکید بر اجرای روش‌های کنترل کیفی در کلیه بخش‌های آزمایشگاه در مرحله حین آزمایش و به‌دنبال آن برگزاری دوره‌های آموزشی در این خصوص، خطاهای حین آزمایش به حداقل رسیده است و لذا تأثیر متغیرهای قبل و بعد از آزمایش بسیار پررنگ شده است.

با توجه به اهمیت متغیرهای قبل از آزمایش در اینجا سعی شده است مجموعه‌ای از دستورالعمل‌های کاربردی در خصوص مدیریت نمونه بیان گردد که این موارد شامل: نحوه جمع‌آوری انواع نمونه‌های بالینی، شامل خون و سایر مایعات بدن، آماده‌سازی نمونه، جابجایی و نقل و انتقال نمونه، شرایط نگه‌داری و موارد رد نمونه می‌باشد.

بدیهی است رعایت موارد ذکر شده در این مجموعه، در به حداقل رساندن عواملی که می‌تواند نتایج آزمایش را تحت تأثیر قرار دهد، کمک شایانی خواهد نمود.

کیفیت نتایج آزمایش‌هایی که در آزمایشگاه انجام می‌شود، هم ارزش نمونه‌هایی است که مورد آزمایش قرار می‌گیرند.

مدیریت نمونه‌های آزمایشگاهی به‌عنوان بخشی از فرآیند قبل و پس از انجام آزمایش تأثیر به‌سزایی در تشخیص، پیگیری و درمان بیماران داشته و در حوزه‌های زیر قابل بحث می‌باشد:

- نقش کلیدی در صحت تشخیص آزمایشگاهی
- تأثیر در روند مراقبت از بیمار
- تأثیر در تصمیم‌گیری بالینی پزشک
- تأثیر در مدت زمان بستری شدن بیمار در بیمارستان و به‌دنبال آن، هزینه‌های بستری و آزمایشگاه
- تأثیر برکارآیی آزمایشگاه

اثرات ناشی از نمونه های نامناسب وعدم صحت نتیج آزمایش بر روی این نمونه ها:

- تاخیر در گزارش نتایج آزمایش ها
- نمونه گیری های غیر ضروری
- کاهش رضایت مندی مراجعین
- افزایش هزینه بیمار، آزمایشگاه و بیمارستان
- تشخیص ها و درمان غلط، طولانی شدن مدت بستری
- آسیب و احتمال مرگ

مدیریت نمونه‌های آزمایشگاهی در فرآیند قبل از انجام آزمایش:

درخواست آزمایش، شناسایی بیمار، نحوه جمع‌آوری انواع نمونه‌های کلینیکی، آماده‌سازی نمونه، جابه‌جایی و نقل انتقال نمونه، معیارهای رد نمونه، شرایط نگه‌داری و ارجاع نمونه

در فرآیند بعد از انجام آزمایش، نگه‌داری نمونه پس از انجام آزمایش و امحاء نمونه را شامل می‌شود. هر یک از این مراحل فوق‌الذکر نیاز به مدیریت داشته، سیاست آزمایشگاه باید در این خصوص تعریف گردد.

آزمایشگاه مرجع سلامت	دستورالعمل مدیریت نمونه در آزمایشگاه های پزشکی	صفحه 2 از 26

◆ **فرآیند قبل از آزمایش**

• **درخواست آزمایش / شناسایی بیمار**

درخواست آزمایش باید از نظر قابلیت پذیرش و انجام بررسی شود. هر آزمایشگاه باید فهرست آزمایش‌های قابل انجام خود را تهیه و در اختیار مسئول پذیرش قرار دهد. همچنین باید از هویت بیمار قبل از پذیرش، اطمینان حاصل گردد و انطباق مشخصات برگه درخواست آزمایش با مشخصات بیمار صورت گیرد.

• **نحوه جمع‌آوری انواع نمونه‌های کلینیکی**

هر آزمایشگاه با توجه به دامنه فعالیت خود باید دستورالعمل نحوه جمع‌آوری نمونه‌های کلینیکی را تهیه و در اختیار کارکنان آزمایشگاه قرار دهد. این دستورالعمل شامل موارد زیر می‌باشد:

•• نحوه اطمینان از هویت بیمار

•• شرایط مربوط به آماده‌سازی بیمار قبل از نمونه‌گیری

•• نمونه موردنیاز در خصوص انواع آزمایش‌ها

•• ظروف جمع‌آوری نمونه، نوع ضد انعقاد، حجم نمونه

•• مشخصات برچسب نمونه، همچنین برچسب‌گذاری باید به نحوی باشد که امکان ردیابی نمونه به سهولت امکان-پذیر باشد.

•• شرایط نگه‌داری نمونه قبل از انجام آزمایش

➢ **ردیابی نمونه**

اطلاعات زیر جهت ردیابی کامل نمونه در آزمایشگاه مورد نیاز است که به صورت دستی یا نرم‌افزاری باید ثبت شود:

•• شماره آزمایش

•• نام و نام خانوادگی بیمار

•• زمان نمونه گیری: روز – ساعت – دقیقه

•• نوع نمونه

•• آزمایش‌های انجام شده

•• نام پزشک

•• بخش موقعیت بیمار: بخش – کلینیک ...

•• نتایج آزمایش‌ها

•• تاریخ و ساعت جواب آزمایش

➢ **ذخیره‌سازی نمونه**

تدوین سیاست آزمایشگاه در مورد ذخیره سازی نمونه شامل موارد زیر است:

•• تعیین نمونه هایی که باید نگه داری شوند.

•• مدت زمان نگه داری

•• محل نگه داری

•• شرایط مناسبی که نمونه باید در آن نگه داری شود (درجه حرارت مناسب)

•• کنترل مرتب نمونه ها از نظر تعداد موارد یخ زدن/ آب کردن (Freeze/thaw) نمونه

•• چیدمان منظم نمونه ها در محل مورد نگه داری (یخچال) مثلا بر اساس شماره پذیرش یا روز پذیرش نمونه ها

•• برنامه زمان بندی جهت کنترل دوره ای نمونه ها

•• برقرار نمودن روشی جهت ردیابی نمونه

** برای تسریع در عمل خشک شدن می‌توان از پنکه استفاده نمود (نباید از شعله یا منابع دیگر حرارتی استفاده شود).
** در مناطقی که رطوبت بالا است استفاده از گرمخانه ۳۵°C جهت خشک نمودن لام‌ها پیشنهاد می‌گردد.

ادرار

نمونه ادرار برای بررسی‌های شیمیایی، سلول‌شناسی و میکروب‌شناسی مورد استفاده قرار می‌گیرد. نحوه نمونه‌گیری و ظروف جمع‌آوری ادرار از عوامل مهم در کیفیت نمونه می‌باشد.

نمونه ادرار باید در ظرف تمیز دهان گشاد با قطر حداقل ۱۰سانتی‌متر، با اندازه مناسب و غیر قابل نشت، جمع‌آوری گردد. بهتر است ظرف جمع‌آوری ادرار یک‌بار مصرف بوده و درغیر این‌صورت عاری از هرگونه آلودگی با مواد شوینده باشد. قابل ذکر است که نمونه ادرار نباید به مدفوع آلوده باشد.

جهت کشت ادرار ظرف نمونه باید حتما استریل باشد. برای نمونه‌گیری از نوزادان و اطفال باید از کیسه‌های ادراری استفاده شود.

جهت بررسی‌های معمول و میکروبیولوژیک نمونه ادرار باید حداکثر تا دو ساعت پس از جمع‌آوری (در دمای اتاق) مورد بررسی قرار گیرد. پس از این مدت ترکیبات شیمیایی ادرار تغییر کرده و عناصر تشکیل دهنده آن شروع به تخریب می‌کنند. سیلندرها، گلبول‌های قرمز و گلبول‌های سفید در نمونه‌های با وزن مخصوص پایین و PH قلیایی بسیار مستعد لیز هستند.

هنگامی که ارزیابی سلولی سدیمان ادراری مدنظر است باید مراحل آماده‌سازی ادرار هرچه سریع‌تر صورت گیرد. جهت تهیه رسوب ادرار باید نمونه در ظروف دربوش‌دار به مدت ۵ دقیقه در ۴۰۰g سانتریفیوژ گردد.

در بررسی‌های میکروبیولوژیک در صورتی‌که نتوان نمونه را به سرعت به آزمایشگاه منتقل نمود و آزمایش کرد می‌توان آن را به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۸°C-۲ نگه‌داری کرده و یا می‌توان از نگه‌دارنده‌های باکتریواستاتیک نیز استفاده نمود.

ظرف محتوی نمونه باید به‌درستی برچسب‌گذاری شود، اطلاعات مورد نیاز شامل: نام بیمار، زمان نمونه‌گیری، نام نگه‌دارنده، در موارد خاص ذکر نوع نمونه (کاتتر .....) می‌باشد. هم‌چنین در صورتی‌که نمونه از محل دیگری ارسال گردد باید نحوه نگه‌داری و زمان دریافت نیز ذکر گردد.

حداقل حجم مورد نیاز جهت بررسی‌های معمول کمی و کیفی ادرار به‌طور متوسط ۱۲ میلی‌لیتر است، البته در اطفال و نوزادان ممکن است حجم کمتر نیز مورد بررسی قرار گیرد، ولی باید حتما در برگه گزارش ذکر گردد.

- **انواع مختلف جمع‌آوری ادرار و موارد استفاده آن**

۱- ادرار اتفاقی جهت بررسی شیمیایی کیفی و نیمه کمی

۲- اولین ادرار صبحگاهی (ادرار ۸ ساعته) جهت بررسی اجزای سلولی، سیلندر و کست

۳- دومین ادرار صبحگاهی (۷-۱۰صبح) جهت بررسی‌های کمی

۴- ادرار با زمان مشخص مثلا ادرار ۲۴ ساعته جهت بررسی‌های کمی

۵- ادرار تمیز (ادرار میانی، کاتتر و سوپراپوبیک)

- **ادرار اتفاقی**

این نمونه جهت آزمون غربالگری روزمره مورد استفاده قرار می‌گیرد و در هر موقع از روز قابل جمع‌آوری می‌باشد، ولی زمان نمونه‌گیری باید روی ظرف درج گردد. بهتر است قبل از جمع‌آوری ادرار فرد چند ساعت ادرار خود را تخلیه نکرده باشد. برای این منظور اولین ادرار صبحگاهی به‌دلیل غلظت مناسب و PH پایین مناسب‌تر است.

- **ادرار صبح‌گاهی (ادرار ۸ ساعته)**

این نمونه معمولا در اول صبح پس از بیدار شدن فرد جمع‌آوری می‌گردد.
این نمونه جهت بررسی پروتئین‌اوری اورتواستاتیک مناسب است. ابتدا شب قبل از خواب ادرار تخلیه شده و نمونه صبح پس از بیدار شدن فرد جمع‌آوری می‌گردد. در صورت تخلیه ادرار در طول شب، باید در ظرف جمع‌آوری نمونه ریخته شود.

- **ادرار زمان‌دار**

این نمونه در یک زمان مشخص در طول شبانه روز تهیه می‌گردد، مثلا نمونه ناشتا، دو ساعت پس از غذا یا بلافاصله پس از ماساژ پروستات

- **ادرار ۲۴ ساعته**

به‌دلیل تغییرات دوره‌ای ترشح مواد در ادرار، در بعضی مواقع نیاز است که ادرار ۲۴ ساعته جمع‌آوری گردد. به‌عنوان نمونه می‌توان از کاتکول آمین‌ها، ۱۷هیدروکسی استروئید و الکترولیت‌ها نام برد که پایین‌ترین غلظت آن‌ها در صبح و بالاترین غلظت این ترکیبات در ظهر یا کمی پس از آن می‌باشد.

•• جمع آوری نمونه: ظرف نمونه باید پلاستیکی و دهان گشاد به گنجایش تقریبی ۳ لیتر باشد.
جهت جمع‌آوری نمونه ادرار ۲۴ ساعته ابتدا اولین ادرار صبحگاهی دور ریخته شده و در طی ۲۴ ساعت بعدی ادرار در ظرف نمونه‌گیری جمع‌آوری می‌شود به‌طوری که آخرین نمونه جمع‌آوری شده، اولین نمونه صبحگاهی روز بعد (در همان ساعت اولین نمونه تخلیه شده روز قبل) باشد.
بر روی برچسب روی ظرف محتوی نمونه علاوه بر نام و نام خانوادگی باید تاریخ، ساعت شروع و پایان نمونه‌گیری نیز یادداشت گردد و در صورت استفاده از ماده نگه‌دارنده درج نام ماده نیز ضروری است.
در طول مدت جمع‌آوری، ظرف نمونه باید در یخچال یا درون یخ نگه‌داری شود.
ممکن است جهت ادرار ۲۴ ساعته از مواد نگه‌دارنده استفاده گردد که با توجه به خطر زیستی این مواد، باید هشدارهای لازم به بیمار داده شود.

- **ادرار تمیز**

جهت بررسی‌های باکتری‌شناسی از نمونه ادرار تمیز استفاده می‌شود.

•• نحوه جمع‌آوری نمونه

بیمار ابتدا دست‌های خود را با آب و صابون شسته و سپس ناحیه تناسلی خود را با پنبه آغشته به آب و صابون تمیز می‌نماید، بخش اول ادرار را دور ریخته و بخش میانی ادرار را با رعایت شرایط استریل در درون ظرف جمع‌آوری ادرار می‌ریزد و سپس بقیه ادرار را دور می‌ریزد.

•• ادرار تهیه شده توسط کاتتر و فوق عانه (سوپراپوبیک) نیز از روش‌هایی هستند که جهت جمع‌آوری ادرار استریل در مواقع خاص و با درخواست پزشک تهیه می‌شوند.

•• جهت نمونه‌گیری از نوزادان و اطفال باید از کیسه جمع‌آوری ادرار استفاده نمود. در صورتی‌که بیمار در خواست کشت ادرار نیز داشته باشد، باید نواحی شرمگاهی و پرینه‌ال قبل از وصل کردن کیسه ادرار با آب و صابون شسته شود. قابل ذکر است که کیسه ادرار باید هر ۱۵ دقیقه کنترل شده و پس از جمع‌آوری، ادرار باید در ظرف دیگری نگه‌داری شود.

• **مواد نگه‌دارنده ادرار**

مواد نگه‌دارنده جهت نگه‌داری ادرار بیش از ۲ ساعت، بررسی ترکیبات ناپایدار در ادرار و پایداری نمونه جهت مطالعات میکروبیولوژیک کاربرد دارد.

نگه‌دارنده‌های رایج اسید استیک، اسید بوریک و اسید کلریدریک ۶ نرمال می‌باشند. این ترکیبات توکسیک بوده و دارای خطر زیستی می‌باشند. هم‌چنین به‌دلیل امکان پاشیده شدن ادرار به هنگام تخلیه در ظرف، بهتر است ابتدا نمونه در ظرف دیگری جمع‌آوری شده و سپس به ظرف اصلی حاوی ماده نگه‌دارنده منتقل گردد.

➢ **نگه‌داری و انتقال نمونه**

- ➢ جهت انتقال نمونه باید درب ظرف کاملا محکم باشد تا امکان نشت نمونه به خارج از ظرف و محیط اطراف به حداقل برسد (در صورت امکان جهت انتقال می‌توان ظرف نمونه را درون ظرفی دیگری قرارداد).
- ➢ نمونه ادرار باید در سریع‌ترین زمان ممکن به آزمایشگاه منتقل شده و حداکثر در ظرف ۲ ساعت در دمای اتاق بررسی گردد. در غیر این‌صورت باید نمونه پس از جمع‌آوری در یخچال نگه‌داری شود (دمای ۸°C-۲).
- ➢ در بررسی‌های میکروبیولوژیک در صورتی‌که نتوان نمونه را به آزمایشگاه منتقل نمود و مورد بررسی قرارداد تمهیدات زیر باید صورت گیرد:
- ➢ •• نمونه را می‌توان به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۸°C-۲ تا قبل از کشت نگه‌داری نمود.
- ➢ •• می‌توان قسمتی از نمونه ادرار را جهت بررسی‌های بیوشیمیایی در ظرف دیگری که حاوی نگه‌دارنده باکتریو استاتیک است، نگه‌داری نمود.

مدفوع

- ➢ مدفوع نمونه مناسبی جهت تشخیص عوامل پاتوژن مولد اسهال باکتریایی، ویروسی و انگلی است. نمونه‌گیری در زمان مناسب (عوامل ویروسی تا ۴۸ ساعت و عوامل باکتریایی تا ۴ روز از زمان شروع اسهال)، نحوه انتقال نمونه و شرایط بیمار در هنگام نمونه‌گیری از عواملی هستند که رعایت آن‌ها در شناسایی عامل پاتوژن بسیار کمک‌کننده است. جهت جمع‌آوری نمونه مدفوع باید مواردی را در نظر داشت که به برخی از آن‌ها در زیر اشاره می‌گردد:
- ➢ •• بیمار نباید از ۱۵ روز قبل از نمونه‌گیری آنتی‌بیوتیک (نظیر تتراسایکلین و سولفاتامید)، داروهای ضد تک‌تاخته، بیسموت، سولفات باریم، ترکیبات کائولین، روغن کرچک، هیدروکسید منیزیم یا هرگونه داروی ملین مصرف کرده باشد.
- ➢ •• تعداد دفعات نمونه‌گیری بر اساس درخواست پزشک می‌باشد.
- ➢ •• در صورت مشکوک بودن به عوامل باکتریایی سه نمونه در فاصله سه روز و در خصوص عوامل انگلی ۳ نمونه که در طول ۱۰ روز جمع‌آوری شده مناسب است.
- ➢ •• نباید در یک روز بیش از یک نوبت نمونه از بیمار گرفته شود.
- ➢ •• نمونه‌گیری در بیمارانی که بیش از سه روز بستری شده‌اند توصیه نمی‌شود.
- ➢ •• در نوزادان و اطفال می‌توان از سواپ رکتال در محیط انتقالی استفاده نمود ولی این کار معمولا برای تشخیص ویروس‌ها و عوامل انگلی پیشنهاد نمی‌شود.

• **نمونه‌گیری جهت عوامل باکتریایی مولد اسهال**

* **نمونه مدفوع:** حداقل ۵ گرم مدفوع باید در ظرف در پیچ‌دار تمیز، عاری از مواد ضدعفونی‌کننده و یا شوینده جمع‌آوری گردد.

* **سواب مقعدی:** سواب را با فروبردن در محیط انتقالی سترون، مرطوب کرده به اندازه ۲-۳ سانتی‌متر در داخل اسفنگتر رکتوم فرو برده و بچرخانید. سواب را بیرون کشیده پس از اطمینان از آغشتگی به مدفوع، سریعا به داخل محیط انتقال (کری بلر) فرو برید. سپس لوله‌های انتقال را در یخچال یا یخدان قرار دهید.
در موارد اسهال ناشی از باکتری‌های مهاجم مانند شیگلا، ساییدن سواب به مخاط انتهایی روده جهت جمع‌آوری نمونه بسیار مهم است.

* **سواب مدفوع:** در صورت لزوم به نگه‌داری نمونه مدفوع بیش از ۲ ساعت، مقدار اندکی از مدفوع و هرگونه بلغم یا تکه‌های مخاط پوششی روده را با فروکردن سواب سر پنبه‌ای یا سر پلی‌استری به‌درون مدفوع سریعا به لوله حاوی محیط انتقالی تلقیح کنید و در یخچال یا یخدان قرار دهید.

• **محیط‌های انتقالی**

•• **کری بلر:** این محیط برای انتقال بسیاری از عوامل بیماری‌زا کاربرد دارد. این محیط نیمه جامد بوده، حمل و نقل آن آسان و پس از تهیه تا یکسال در دمای اتاق قابل نگه‌داری است (به شرطی که حجم آن کاهش نیافته، علایم آلودگی و تغییر رنگ در آن مشاهده نگردد).

•• **آب پپتونه قلیایی (Alkalane Peptone Water=APW):** این محیط را می‌توان را برای انتقال ویبریو استفاده نمود ولی این محیط نسبت به کری بلر برتری ندارد و فقط در صورت عدم دسترسی به محیط کری بلر باید مورد استفاده قرار گیرد (در صورتی که کشت بیش از ۶ ساعت از زمان نمونه‌گیری به تعویق بیافتد نباید از این محیط استفاده گردد). محیط فوق در دمای ۴°C تا ۶ ماه قابل نگه‌داری است.

•• **سالین گلیسرول بافره (Buffered Glycerol Saline=BGS):** این محیط برای شیگلا مورد استفاده قرار می‌گیرد و برای انتقال ویبریو مناسب نمی‌باشد. این محیط مایع بوده، لذا در حمل آن باید دقت شود. هم‌چنین تا ۱ ماه پس از تهیه قابل استفاده است.

• **نگه‌داری:**

•• نمونه‌های مدفوع حداکثر تا ۲ ساعت در یخچال قابل نگه‌داری است. نمونه‌هایی را که نمی‌توان به فاصله ۲ ساعت از نمونه‌گیری کشت داد، باید در محیط انتقالی قرار داده و سریعا در یخچال نگه‌داری نمود.

•• محیط انتقالی حاوی سواب مدفوع یا مقعد را می‌توان حداکثر ۷۲-۴۸ ساعت در دمای ۴°C نگه‌داری کرد. در غیر این‌صورت این محیط می‌بایست ترجیحا در دمای (۷۰°C-) و یا در صورت عدم دسترسی، در دمای (۲۰°C-) قرار داد (یا حداقل در فریزرهای خانگی نگه‌داری شود).

•• نمونه‌های مدفوع که از بیماران مبتلا به وبا گرفته می‌شود و در محیط انتقالی قرار می‌گیرد نیازی به نگه‌داری در دمای یخچال ندارند، مگر آن که نمونه‌ها در معرض دمای بالا (بیش از ۴۰°C) قرار داشته باشند.

• **نمونه‌گیری جهت عوامل انگلی**

➢ **جمع‌آوری نمونه**

•• برای انجام این آزمایش حداقل ۵ گرم مدفوع در ظرف دهان گشاد در پیچ‌دار تمیز و خشک مورد نیاز است (در صورت آبکی بودن مدفوع معادل ۵ سی‌سی).

•• در صورتی که نتوان فاصله زمانی مناسب بین جمع‌آوری نمونه تا انجام آزمایش را رعایت نمود باید نمونه در ماده نگه‌دارنده جمع‌آوری شود (یک قسمت مدفوع و سه قسمت ماده نگه‌دارنده فرمالین ۱۰٪).

•• باید توجه داشت که بررسی خصوصیات ظاهری نمونه در نمونه تازه صورت می گیرد.

•• نمونه مدفوع نباید با گرد و خاک، آب و ادرار آلوده گردد، زیرا آلودگی اتفاقی با خاک و آب ممکن است باعث آلودگی نمونه با ارگانیسم‌های دارای زندگی آزاد شود. ادرار نیز سبب تخریب تروفوزوئیت‌ها می‌شود. ترجیحا نباید نمونه از کاسه توالت جمع‌آوری گردد.

•• چون مرحله تروفوزوئیت تک یاخته خیلی زود از بین می‌رود، ثبت تاریخ و ساعت نمونه‌گیری ضروری است.

➢ **نگه‌داری**

•• نمونه باید هر چه سریع‌تر به آزمایشگاه ارسال گردد. در صورت تاخیر بیش از ۲ ساعت، نمونه در محل خنک (ترجیحا در یخچال) نگه‌داری شود.

توجه: جهت آزمایش‌های شیمیایی (مانند خون در مدفوع) به ۵۰ گرم مدفوع نیاز می‌باشد.

مایع مغزی نخاعی Cerebro-Spinal Fluid (CSF)

جمع‌آوری مایع مغزی نخاعی توسط پزشک و به روش پونکسیون نخاعی (Lumber Puncture=LP) و به صورت کاملا استریل انجام می‌گیرد.

معمولا مایع جهت آزمون‌های شیمیایی، میکروبیولوژیک و آنالیز سلولی در ۳ تا ۴ لوله جمع آوری می‌شود.

جهت آزمون‌های باکتری‌شناسی نمونه باید در لوله دربوش‌دار و استریل جمع‌آوری گردد. لوله‌ها بر اساس ترتیب جمع‌آوری برچسب‌گذاری می‌شوند (لوله شماره ۱ جهت آزمایش‌های بیوشیمیایی، لوله شماره ۲ جهت آزمایش‌های میکروب‌شناسی، لوله شماره ۳ جهت بررسی سلولی).

جهت جمع‌آوری نمونه نیازی به ماده ضد انعقاد نمی‌باشد زیرا مایع مغزی نخاعی لخته نمی‌شود، مگر آن که نمونه-گیری همراه با صدمه باشد (نمونه‌گیری تروماتیک).

الزامات مورد نیاز جهت تهیه نمونه مایع مغزی نخاعی در جدول ۱-۳ بیان شده است.

جدول ۱-۳: الزامات مورد نیاز جهت تهیه نمونه مایع مغزی – نخاعی

نوع بررسی	ضد انعقاد	حجم مورد نیاز	ملاحظات
آزمون بیوشیمیایی (پروتئین، قند...)	-	۳-۵	لوله شماره ۱ در صورت نمونه گیری تروماتیک شمارش سلولی نیز از لوله شماره ۱صورت می‌گیرد.
کشت و رنگ‌آمیزی گرم	-	۳-۵	لوله شماره ۲
شمارش سلولی و تشخیص افتراقی	-	۳-۵	لوله شماره ۳یا ۴
سایر بررسی‌ها (سیتولوژی)	-	۳-۵	لوله شماره ۴

نمونه باید در اسرع وقت به آزمایشگاه ارسال گردد. دژنراسیون سلولی در طی یک ساعت اتفاق می‌افتد، لذا حداکثر زمان گردش کاری نباید بیش از ۱ ساعت به طول انجامد. نقل و انتقال نمونه در دمای اتاق صورت می‌گیرد. جهت آزمون‌های باکتریولوژیک نباید نمونه در یخچال نگه‌داری شود. از قرار دادن نمونه در معرض نور خورشید و گرما باید خودداری نمود. در صورت نیاز به حمل نمونه تا مسافت دور، استفاده از یخدان ضروری است. در این صورت نمونه تا ۳ ساعت پایدار می‌باشد. جهت نگه‌داری طولانی مدت، نمونه ابتدا سانتریفیوژ شده پس از جداسازی سلول‌ها، مایع-روبی در ظرف درپوش‌دار شیشه‌ای یا پلی‌پروپیلن در دمای (۷۰°C-) قابل نگه‌داری است.
جهت مطالعات سیتولوژیک رسوب CSF باید بلافاصله پس از جمع‌آوری به‌وسیله سانتریفیوژ مخصوص (۲۰ دقیقه در ۱۸۰g) تهیه و به آزمایشگاه ارسال شود.

مایع سروز

مایعات سروزی نظیر مایع جنب و صفاقی را می‌توان در یک لوله جمع‌آوری و سپس در محل نمونه‌گیری یا آزمایشگاه به لوله‌های مختلف و با حجم‌های کمتر تقسیم نمود. قابل ذکر است که نمونه قبل از تقسیم و شمارش سلولی باید کاملا مخلوط گردد. EDTA ضد انعقاد پیشنهادی در خصوص شمارش و افتراق سلولی است.
جهت شمارش و افتراق سلولی، نمونه‌ها تا ۲۴ ساعت در دمای ۶°C-۲ قابل نگه‌داری هستند. در خصوص بررسی-های میکروبی نمونه باید در ظرف استریل جمع‌آوری گردد.
جهت بررسی سیتولوژی ممکن است نمونه در حجم‌های متفاوت به آزمایشگاه ارسال گردد (۱۰۰-۱۵میلی-لیتر) ولی حجم پیشنهادی ۵۰ میلی‌لیتر است و نیاز به استفاده از لوله‌های استریل و ماده ضد انعقاد نیز نمی‌باشد. البته می‌توان از هپارین و EDTA هم استفاده کرد.
الزامات مورد نیاز جهت تهیه و آزمایش بر روی مایع سروز در جدول ۲-۳ بیان شده است.

جدول ۲-۳: الزامات مورد نیاز جهت تهیه و آزمایش بر روی مایع سروز

نوع بررسی	ضد انعقاد	حجم مورد نیاز (میلی لیتر)
اندازه‌گیری پروتئین توتال، لاکتات دهیدروژناز، گلوکز و آمیلاز	هپارین یا بدون ضد انعقاد	۵-۸
کشت و رنگ‌آمیزی گرم	سدیم پلی سولفانات (SPS) یا بدون ضد انعقاد یا ضدانعقاد بدون اثر باکتریوسیدی و باکتریواستاتیکی	۸-۱۰
شمارش سلولی (گلبول قرمز وسفید) و تشخیص افتراقی	EDTA	۸-۱۰
کشت باکتری اسید فست	SPS یا بدون ضد انعقاد یا ضد انعقاد بدون اثر باکتریوسیدی و باکتریواستاتیکی	۱۵-۵۰
رنگ آمیزی PAP- بلوک سلولی	بدون ضدانعقاد، هپارین یا EDTA	۱۵-۵۰

مایعات سروزی باید در اسرع وقت و در دمای اتاق به آزمایشگاه منتقل شوند.
بررسی‌های سیتولوژی نیز باید هر چه سریع‌تر صورت گیرند، و در صورت نیاز می‌توان نمونه را در دمای ۴°C و بدون ماده تثبیت کننده تا چند روز نگه‌داری نمود.

مایع سینوویال

حجم نمونه جهت بررسی‌های آزمایشگاهی بسته به اندازه مفصل و نوع مایع تجمع یافته در مفصل متفاوت است. معمولا حجم ۵-۳ میلی‌لیتر ایده‌ال است. در مفاصل کوچک ممکن است این مقدار نمونه قابل تهیه نباشد، لذا حجم کمتر نیز قابل قبول است. قابل ذکر است که نمونه قبل از بررسی‌های آزمایشگاهی باید به‌خوبی مخلوط گردد. در بعضی از مراجع ذکر شده که ضد انعقاد لیتیم هپارین و EDTA به‌دلیل ایجاد کریستال در نمونه و امکان اشتباه با کریستال‌های پاتولوژیک، نباید مورد استفاده قرار گیرد. نقل و انتقال نمونه باید در دمای اتاق صورت گیرد. الزامات مورد نیاز جهت تهیه نمونه مایع سینوویال در جدول ۳-۳ بیان شده است.

جدول ۳-۳: الزامات مورد نیاز جهت تهیه نمونه مایع سینوویال

نوع بررسی	ضد انعقاد	حجم موردنیاز (میلی‌لیتر)	ملاحظات
شمارش سلولی و تشخیص افتراقی، کریستال‌ها الکلوزیون‌ها	هپارین -EDTA	۳-۵	بر روی حجم کمتر (چندین قطره) نیز قابل انجام است
گلوکز پروتئین	فلوراید یا بدون ضد انعقاد بدون ضد انعقاد	۳-۵ ۳-۵	ترجیحا ۸ ساعت ناشتایی
CH50	بدون ضد انعقاد	۳-۵	در صورت عدم انجام سریع آزمایش نمونه منجمد گردد.
C3,C4	بدون ضد انعقاد یا EDTA		نیاز به ۱ میلی‌لیتر نمونه است.
کشت	SPS بدون ضدانعقاد یا ضد انعقاد بدون الزباکتریوسیدی و باکتریواستاتیکی	۳-۵	نیاز به لوله استریل است.

نمونه‌های دستگاه تنفسی

بهترین زمان جمع‌آوری نمونه در اکثر عفونت‌های تنفسی در طول ۳ روز اول ایجاد علایم بیماری می‌باشد. نمونه‌ها بسته به محل عفونت، از قسمت فوقانی و تحتانی دستگاه تنفسی جمع‌آوری می‌شوند. عوامل بیماری‌زای دستگاه تنفسی فوقانی (ویروسی و باکتریایی) در نمونه‌های گرفته شده از قسمت نازوفارنژیال گلو و عوامل بیماری‌زای دستگاه تنفسی تحتانی در نمونه خلط قابل بررسی هستند. کشت ارگانیسم‌هایی نظیر لژیونلا مشکل است لذا بهتر است که تشخیص بر اساس شناسایی آنتی‌ژن‌های جدا شده از ادرار باشد. در صورت شک به التهاب حاد اپیگلوت، نمونه‌گیری از گلو یا فارنژیال نباید صورت گیرد زیرا استفاده از این شیوه ممکن است سبب انسداد شدید تنفسی شود. معمولا التهاب اپیگلوت به‌وسیله رادیوگرافی گردن تایید می‌گردد ولی عوامل اتیولوژیک ایجاد کننده آن ممکن است از کشت خون هم جدا گردند.

- **دستگاه تنفسی فوقانی**

**** نمونه‌برداری از گلو و لوزه‌ها**

از بیمار خواسته می‌شود تا دهان خود را باز نماید و با آبسلانگ زبان وی را به پایین فشار داده، برای مشاهده نواحی ملتهب و اگزودا از چراغ قوه استفاده می‌شود. سواب استریل داکرونی یا آلژینات کلسیم را چندین بار بر روی نواحی

ملتهب و اگزودای حلق می‌کشیم. باید توجه شودکه سواپ با سطح داخلی حفره دهانی تماس پیدا نکند. چنانچه سواپ در طی ۲-۱ساعت پس از نمونه‌گیری مورد آزمایش قرار نگیرد در یک لوله استریل درپوش‌دار حاوی محیط انتقالی باکتریایی یا ویروسی قرار داده می‌شود (انتهای سواپ که با دست در تماس بوده باید شکسته شود و درپوش در جای خود قرار گیرد).

جهت تهیه گسترش مستقیم با سواپ استریل دیگری به روش ذکر شده نمونه‌گیری صورت می‌گیرد.

•• نمونه‌برداری از انتهای بینی و نازوفارنکس

به‌وسیله یک سواپ انعطاف‌پذیر استریل وارد سوراخ بینی شده و از نازوفارنکس نمونه تهیه گردد. سر بیمار باید کمی به عقب برده شود. در افراد بالغ سواپ را حدود ۵-۶ سانتی‌متر وارد بینی کرده تا مطمئن شوید که سواپ وارد ناحیه خلفی فارنکس شده است. در همان وضعیت سواپ را چند ثانیه نگه‌داشته و سپس به آرامی بچرخانید. از هر سوراخ بینی دو سواپ گرفته می‌شود که یکی جهت گسترش مستقیم و دیگری جهت کشت استفاده می‌گردد.

➢ آسپیراسیون نازوفارنکس

این روش در کودکان و نوزادان از سواپ راحت‌تر و کارآمدتر است. با کاتتر سیلیکون ترشحات را آسپیره نمایید.

• دستگاه تنفسی تحتانی

➢ روش جمع‌آوری خلط

یک نمونه خلط مناسب حاوی مواد ترشحی حاصل از ریه‌ها پس از سرفه عمیق است (نمونه حاوی آب دهان، ترشحات حلق و بینی مناسب نمی‌باشد).

•• زمان نمونه‌گیری

به‌دلیل این‌که تعداد باسیل سل دفع شده در زمان‌های مختلف متفاوت می‌باشد، آزمایش یک نمونه خلط برای تشخیص کفایت نمی‌کند و حتما باید سه نمونه تهیه گردد. برای تهیه نمونه بیمار باید ناشتا باشد. در خصوص تعداد نمونه جمع‌آوری شده جهت سایر عوامل باکتریایی یک نمونه کفایت می‌کند ولی درصورت شک به‌وجود عوامل قارچی و عفونت مایکوباکتریوم سه نمونه جداگانه صبحگاهی مناسب می‌باشد.

نمونه اول: در اولین مراجعه بیمار به واحد درمانی تهیه می‌گردد و ظرف جهت نمونه‌گیری دوم نیز تحویل داده می‌شود.

نمونه دوم: خلط صبحگاهی که بیمار قبل از برخاستن از جای خود و به‌صورت ناشتا در منزل تهیه می‌نماید.

نمونه سوم: خلط صبحگاهی که همزمان با مراجعه بیمار برای تحویل نمونه دوم از بیمار گرفته می‌شود.

نمونه باید در ظرف دهان گشاد از جنس پلاستیک قابل سوختن شفاف و محکم با قطر حدود ۷-۵ سانتی‌متر جمع‌آوری گردد (نمونه داخل آن از نظر مقدار و کیفیت قابل رویت بوده و هم‌چنین به‌راحتی سوزانده و معدوم گردد). جهت جلوگیری از نشت خلط از داخل ظرف به بیرون، باید از ظرف در پیچ‌دار استفاده نمود. در صورت عدم دسترسی به ظرف پلاستیکی با مشخصات فوق می‌توان از ظروف شیشه‌ای دهان گشاد در پیچ‌دار استفاده نمود (با رعایت اصول استریلیزاسیون).

➢ نحوه نمونه‌گیری

بیمار صبح ناشتا در فضای باز ابتدا یک نفس عمیق کشیده و با سرفه‌های عمیق خلط را درون ظرف (در حالی که ظرف نزدیک لب‌های بیمار قرار دارد) تخلیه می‌کند. سپس درب آن را بسته و در کیسه نایلونی قرار می‌دهد. بهتر است حجم خلط بین ۵-۳ میلی‌لیتر باشد.

در صورتی که بیمار نتواند با سرفه کردن برای انجام آزمایش، نمونه خلط بدهد باید به روش زیر عمل شود:

بیمار روی تخت معاینه طوری بخوابد که صورت او رو به پایین بوده و سر او پایین‌تر از سینه قرار گیرد. سپس پس از دم عمیق نفس خود را نگه‌داشته با یک بازدم محکم خلط را خارج کند. این عمل باید تا تهیه نمونه کافی از خلط ادامه یابد.

- نگه‌داری: باید نمونه هر چه سریع‌تر به آزمایشگاه ارسال گردد. در غیر این‌صورت در محل خنک (ترجیحا در یخچال) نگه‌داری شود.

•• همه نمونه‌های تنفسی به جز خلط، باید در محیط کشت انتقالی مناسب باکتری‌ها/ ویروس‌ها منتقل گردند.

••نمونه‌های باکتریایی تا مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط و ویروس‌ها در محیط انتقالی مناسب در دمای ۸°C-۴ قابل انتقال می‌باشند.

جمع‌آوری نمونه چشم

سواب‌ها و گسترش‌های قرنیه و ملتحمه نمونه‌های معمول جهت تشخیص کونژکتیویت حاد ناشی از عوامل باکتریایی و ویروسی می‌باشند. تمام نمونه‌های گرفته شده از ترشحات قرنیه و ملتحمه باید از نظر این‌که از چشم چپ یا راست تهیه شده، برچسب‌گذاری گردند. جهت جمع‌آوری این نمونه‌ها باید شرایط استریل رعایت گردد. قبل از نمونه‌برداری بیمار نباید دارو یا قطره‌ای استفاده کرده باشد. قابل ذکر است که نمونه‌برداری از تراشه‌های قرنیه باید توسط پزشک متخصص چشم صورت گیرد.

روش جمع‌آوری سواب‌های ملتحمه

مراحل جمع‌آوری سواب‌های ملتحمه به شرح زیر است:

۱- پوست اطراف چشم را با یک ماده ضد عفونی‌کننده ملایم تمیز کنید.

۲- سواب استریل آلژینات کلسیم یا نخی را در سرم استریل مرطوب کرده و به‌طور دورانی بر روی ملتحمه بمالید.

۳- سواب را در لوله در پیچ‌دار حاوی محیط انتقالی مناسب قرار دهید.

۴- بر روی لوله مذکور علاوه بر نام بیمار، نوع نمونه و زمان جمع‌آوری نمونه نیز ذکر گردد.

۵- از سواب ملتحمه نیز دو گسترش بر روی یک لام تهیه می‌گردد. این کار بهتر است در محل نمونه‌برداری صورت گیرد. جهت شناسایی کلامیدیا مهم است که گسترش‌ها در محل نمونه‌برداری و قبل از انتقال تهیه شود. گسترش‌ها برچسب‌گذاری شده و نباید در دمای یخچال نگه‌داری شده یا منجمد گردند.

• نقل و انتقال نمونه

نمونه جهت شناسایی باکتری‌های پاتوژن در دمای محیط، در محیط انتقالی مناسب انتقال داده می‌شوند.

نمونه جهت شناسایی ویروس‌های پاتوژن در دمای ۸°C-۲ در محیط انتقالی مناسب انتقال داده می‌شوند.

گسترش‌های تهیه شده در هوا خشک شده و در دمای محیط در جعبه لام منتقل می‌شوند.

تهیه نمونه جهت کشت خون

ضروری است دقت بیشتری جهت ضد عفونی‌کردن محل نمونه‌گیری صورت گیرد. ابتدا موضع با الکل ۷۰٪ تمیز شده سپس با محلول povidne-iodine ۱۰-۱٪ (یا کلرهگزیدین گلوکونات) ضد عفونی شده و پس از خشک شدن موضع مجددا جهت حذف ید و کلرهگزیدین با الکل تمیز می‌گردد. کلرهگزیدین گلوکونات جهت نوزادان دو ماهه و بزرگ‌تر و هم‌چنین بزرگسالان دارای حساسیت نسبت به ید پیشنهاد می‌گردد. به‌دنبال خون‌گیری

باید خون در عرض ۱ دقیقه به محیط کشت تلقیح شود. درب شیشه‌های کشت خون نیز باید قبل از تلقیح با الکل ۷۰٪ و سپس با محلول povidne-iodine ۱۰-۱٪ (بتادین) ضدعفونی گردد.
محیط کشت تلقیح شده را چندین بار تکان داده، بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شده و در انکوباتور ۳۵°C قرار داده شود.

- **حجم خون مورد نیاز**

•• کودکان: حجم ۳-۱ میلی‌لیتر ختون کافی می‌باشد. این مقدار خون در ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت خون رقیق می‌گردد.

•• بزرگسالان: حجم خون جمع‌آوری شده به میزان ۱۰-۵ میلی‌لیتر است که در ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت خون رقیق می‌گردد.

- **روش خنثی‌سازی عوامل ضد میکروبی در خون**

با اضافه نمودن مهار کننده‌های شیمیایی نظیر سدیم پلی آنتول سولفانات (SPS) ۰/۰۵٪-۰/۰۲۵٪ به محیط کشت و رقیق‌سازی خون، ویژگی‌های باکتریسیدال خون و آنتی بیوتیک‌های احتمالی خنثی می‌گردد. قابل ذکر است که سدیم پلی آنتول سولفانات (SPS) فعالیت‌های ضد فاگوسیتی، ضد کمپلمانی، ضد انعقادی و ضد لیزوزمی دارد و اگر این ماده در مقادیر خیلی بالا استفاده شود، اثر مهارکنندگی در رشد میکروب‌ها خواهد داشت.

- **کشت مجدد**

شیشه‌های کشت خون را ظرف ۲۴-۶ ساعت (صرف نظر از وجود علایم رشد) کشت مجدد داده و سپس تا هفت 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.
قابل ذکر است که ممکن است علی‌رغم عدم وجود کدورت، رشد میکروبی وجود داشته باشد، لذا ضروری است در فواصل ۲۴-۶ ساعت اولیه بعد از تلقیح، راس ۴۸ ساعت و نیز در روز هفتم نیز کشت مجدد صورت گیرد.

•• قبل از انجام کشت مجدد شیشه کشت خون باید چند بار تکان داده شود.

•• جهت برداشت خون از محیط کشت، درپوش محیط کشت را با الکل و بتادین ضد عفونی کرده و حدود ۰/۵ میلی‌لیتر از نمونه را به محیط آگار انتخاب شده منتقل کنید.

نمونه‌برداری از مجاری ادراری تناسلی مردان

با دو سواب استریل از ترشحات چرکی نمونه‌برداری کنید. یکی از سواب‌ها جهت تهیه گسترش و دیگری جهت کشت مورد استفاده قرار می‌گیرد. در صورتی‌که ترشحی مشهود نباشد با سواب نازک به اندازه ۳-۲ سانتی‌متر درون مجرا وارد شده و قبل از بیرون آوردن در مجرا چرخانده شود.
در صورتی‌که آزمایش با تاخیر انجام گیرد، سواب باید در محیط انتقالی نگه‌داری شود.

نمونه‌برداری از دهانه رحم- ترشحات واژن

جهت نمونه‌گیری ابتدا سرویکس با کمک اسپیکولوم که با آب گرم مرطوب شده مشاهده می‌شود (بدون استفاده از مواد Lubricant). قبل از نمونه‌گیری باید تمامی ترشحات از دهانه خارجی رحم پاک شود. با یک سواب استریل تا حدود ۳-۲ سانتی‌متر درون دهانه رحم وارد شده و چند ثانیه در محل چرخانده شود تا ترشحات جذب سواب گردد سپس بدون تماس با سطح واژن سواب باید خارج شده و در لوله درپوش‌دار استریل قرار گیرد. سواب باید فورا در

محیط کشت مناسب کشت داده شود و یا به کمک محیط انتقالی به آزمایشگاه ارسال گردد. جهت تهیه گسترش مستقیم با سواپ استریل دیگری به روش ذکر شده نمونه‌گیری صورت می‌گیرد.

ترشحات واژن با استفاده از اسپیکولوم (بدون استفاده از مواد Lubricant) و سواپ استریل از فورنیکس خلفی گرفته می‌شود. نمونه با سه سواپ گرفته می‌شود، یکی را جهت تهیه گسترش مرطوب در لوله درپوش‌دار محتوی سرم فیزیولوژی استریل قرار داده و دو تای دیگر جهت کشت و تهیه گسترش مستقیم مورد استفاده قرار می‌گیرند.

در صورت مشکوک بودن به نایسریا نمونه پس از تهیه سریعا در دمای اتاق به آزمایشگاه ارسال می‌شود.

سواب‌های آلژینات کلسیم و بعضی سواب‌های پنبه‌ای مهار کننده نایسریا بوده، لذا بهتر است از سواب داکرون یا ریون استفاده شود.

جمع‌آوری نمونه جهت ضایعات پوستی

در اکثر ضایعات پوستی تشخیص ممکن است بر اساس مشاهده ظاهری و تاریخچه‌ی بیماری بدون جمع‌آوری نمونه‌های تشخیصی صورت گیرد. در مشاهده ظاهری ضایعه، نکات مهمی از قبیل نوع ضایعه پوستی (اریتماتوس، ماکولار، پاپولار، ماکولوپاپولار، وزیکولار، بولوس، پتشیال، پورپوریک و غیره) و نحوه پراکندگی آناتومیک ضایعه (مرکزی، محیطی منتشر و غیره) باید در نظر گرفته شود. در مواردی با تشخیص نامعلوم، غیرمعمول و نادر ممکن جمع‌آوری نمونه از راش‌ها یا ضایعات پوستی نیاز باشد. در موارد راش‌های وزیکولار، نمونه‌ها جهت بررسی میکروسکوپی و کشت نمونه مستقیما از وزیکول‌ها تهیه می‌گردد. در خصوص سایر ضایعات اگزانتوماتو (ماکولار یا پاپولار) ممکن است تشخیص بیشتر بر پایه سایر روش‌ها، نظیر کشت خون و سرولوژی صورت گیرد.

در موارد مشکوک به آنتراکس پوستی یا ضایعات خیارکی ممکن است نمونه‌ها از زخم‌های پوستی و هم‌چنین نمونه برای کشت خون تهیه شود.

- **روش جمع‌آوری**

◦ **راش‌های وزیکولو - پوستولار (جهت تشخیص عفونت‌های ویروسی)**

زخم یا وزیکول تازه و رسیده را با اتانول ۷۰٪ تمیز نمایید.

وزیکول: سرنگ توبرکولین با سوزن ۲۷-۲۶ را در حالی که سر سوزن آن به سمت بالا قرار دارد، در پایه وزیکول وارد کنید.

مایع را آسپیره نموده و سریعا و با دقت به داخل ظرف حاوی ۲-۱ میلی‌لیتر محیط انتقال ویروسی تخلیه نمایید (یک‌بار سرنگ را با محیط انتقالی شست‌وشو دهید).

زخم: پوسته زخم را بالا آورده و به کمک سواب استریل داکرونی بر روی پایه زخم بمالید (سواب آلژینات کلسیم نباید استفاده شود). سپس سواب به سرعت در ظرف حاوی محیط انتقال قرار گیرد.

تهیه گسترش: پایه زخم به کمک اسکالپل یا کورت تراشیده شده و سوسپانسیونی از ضایعات در دو تا سه قطره از محیط انتقالی تهیه نمایید. از سوسپانسیون فوق دو تا سه قطره بر روی لام بگذارید. پس از خشک شدن در هوا در استون سرد فیکس نمایید.

◦ **نمونه کبره**

•• به وسیله لانست و فورسپس یک‌بار مصرف، کبره‌ها را از محل خودش جدا نمایید.

•• ۱۰-۵ لایه کبره را برداشته و در ظرف پلاستیکی در پیچ‌دار قرار دهید.

•• اگر مشکوک به آنتراکس جلدی هستید، مایع وزیکولی زیر محل زخم نمونه تشخیصی بهتری نسبت به تکه‌های زخم می‌باشد.

- آسپیراسیون آبسه‌ها

•• آسپیراسیون آبسه فقط باید توسط پزشک صورت گیرد.

•• پوست روی آبسه/ خیارک بوسیله ایزو پروپیل الکل ۷۰٪ ضد عفونی شده و مایع به وسیله آسپیراسیون توسط سرنگ استریل جمع آوری می گردد.

•• نمونه را به‌طریق آسپتیک به لوله استریل حاوی محیط انتقالی منتقل کنید.

- **انتقال نمونه**

نمونه‌ها جهت بررسی باکتریولوژیک باید در محیط استوارت یا آمیس و سواپ‌های مشکوک به عوامل ویروسی در محیط انتقالی ویروس منتقل گردد.

در صورتی که نتوان نمونه‌ها را تا مدت ۲ ساعت بررسی نمود، نمونه‌های باکتریایی به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط قابل نگه‌داری هستند. نمونه‌ها جهت جداسازی عوامل ویروسی در محیط انتقالی مناسب در دمای ۸°C-۴ قابل نگه‌داری بوده و در اسرع وقت باید به آزمایشگاه منتقل گردد.

نگه‌دارنده‌ها، ضد انعقادها و مواد افزودنی

مواد نگه‌دارنده جهت نمونه‌های خون، ادرار، مغز استخوان، مدفوع و مایعات بدن استفاده می‌گردند.

- **ضد انعقادهای رایج جهت نمونه خون**

ضد انعقادهای رایج مورد استفاده جهت نمونه خون شامل موارد زیر می‌باشند:

•• اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA)، سیترات سدیم، هپارین، سدیم پلی سولفانات (SPS)، فلوراید سدیم و اسید سیترات دکستروز (ACD) می‌باشد.

اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) که به اشکال نمک‌های سدیم و پتاسیم و لیتیم موجود است. مورد استفاده آن در بخش‌های خون‌شناسی، بیوشیمی و بانک خون می‌باشد. جهت شمارش سلول‌های خونی و تشخیص افتراقی نمک پتاسیک آن توصیه می‌گردد.

•• سیترات سدیم جهت آزمون‌های انعقادی و سرعت رسوب گلبولی کاربرد دارد.

•• هپارین به فرم نمک‌های لیتیم و سدیم در اندازه‌گیری بسیاری از پارامترهای خون و بررسی‌های ایمونولوژیک به همراه آزمون مقاومت گلبولی کاربرد دارد.

•• فلوراید سدیم جهت اندازه‌گیری گلوکز کاربرد دارد.

•• سدیم پلی سولفانات به‌عنوان ضد انعقاد جهت شیشه‌های کشت خون استفاده می‌گردد.

•• اسید سیترات دکستروز به‌عنوان ماده ضد انعقاد در کیسه‌های خون در انتقال خون کاربرد دارد.

- **نگه‌دارنده‌ها در خصوص نمونه‌های ادرار و مدفوع**

انواع نگه‌دارنده‌ها در خصوص نمونه‌های ادرار و مدفوع به شرح زیر می‌باشد:

•• جهت کشت ادرار و شمارش کلنی اسید بوریک مناسب می‌باشد. با استفاده از نگه‌دارنده نمونه ادرار تا ۲۴ ساعت در دمای اتاق جهت بررسی باکتریولوژیک قابل نگه‌داری است.

•• نمونه مدفوع جهت کشت عوامل باکتریایی را در صورتی که نتوان سریعا به آزمایشگاه ارسال نمود تا ۲ ساعت در دمای ۴°C قابل نگه‌داری است، در غیر این‌صورت نمونه‌ها را می‌توان در محیط‌های نگه‌دارنده و انتقالی نظیر استوارت، آمیس و کری‌بلر منتقل نمود. در بعضی مواقع می‌توان با اضافه نمودن زغال به محیط استوارت و آمیس

اسیدهای چرب موجود در سواپ‌های پنبه‌ای، که بازدارنده ارگانیسم‌های سخت رشد نظیر نایسریا گونوره و بوردتلا پرتوسیس می‌باشند را جذب نمود.

•• مدفوع از نظر توکسین کلستریدیوم دیفیسیل باید بدون مواد نگه‌دارنده جمع‌آوری گردد و این نمونه تا ۴۸ ساعت در دمای ۴°C قابل نگه‌داری است. در صورت تاخیر بیشتر، نمونه باید در دمای ۷۰°C- نگه‌داری گردد.

•• نگه‌دارنده مناسب جهت تخم انگل، تروفوزیت وکیست تک یاخته فرمالین ۱۰٪، پولی وینیل الکل و سدیم استات فرمالین (Sodium Acetate Formalin = SAF) است.

• مواد ضد انعقاد در بررسی‌های میکروبیولوژی

جهت جلوگیری از ایجاد لخته در نمونه‌های خون، مغز استخوان و مایع سینوویال از مواد ضد انعقاد استفاده می‌شود. باند شدن میکروارگانیسم‌ها به لخته، شناسایی آن‌ها را مشکل می‌سازد، لذا استفاده از ضد انعقاد ضروری است. انتخاب نوع و غلظت ضد انعقاد به‌دلیل اثر ضد میکروبی بعضی از آن‌ها از اهمیت زیادی برخوردار است.

•• سدیم پلی آنتول سولفات (SPS) معمول‌ترین ضد انعقاد مورد استفاده جهت نمونه‌های میکروبی می‌باشد. غلظت مورد استفاده نباید بیشتر از ۰/۰۲۵ (وزنی/حجمی) باشد. گونه‌های نایسریا و بعضی باکتری‌های بی‌هوازی به غلظت‌های بالای سدیم پلی آنتول سولفات (SPS) حساس هستند. نسبت نمونه به ضد انعقاد سدیم پلی آنتول سولفات بسیار مهم است، لذا لازم است حجم‌های متفاوت از ضد انعقاد در لوله با سایز بزرگ (جهت نمونه بزرگسال) و کوچک (جهت نمونه اطفال) و هم‌چنین جهت مقادیر کم ارگانیسم در نمونه‌های مغز استخوان و مایع سینوویال موجود باشد.

•• هپارین دیگر ماده ضد انعقاد متداول می‌باشد و اغلب جهت کشت ویروسی و جداسازی گونه مایکوباکتریوم از خون مورد استفاده قرار می‌گیرد. البته هپارین مهارکننده رشد باکتری‌های گرم مثبت و قارچ هاست.

سیترات سدیم و EDTA جهت نمونه‌های میکروبیولوژیک نباید مورد استفاده قرار گیرد.

نگه‌داری نمونه

در صورتی‌که نتوان نمونه‌ها را در اسرع وقت پس از دریافت نمونه مورد بررسی قرار داد، باید آن‌ها را در شرایط مناسب نگه‌داری کرد. دماهای متفاوت مورد استفاده، دمای اتاق (۲۲°C)، دمای یخچال (۴°C)، دمای بدن (۳۷°C) و دمای فریزر (۲۰°C- یا ۷۰°C-) می‌باشند که بسته به نوع محیط انتقالی (درصورت استفاده) و عامل اتیولوژیک عفونت متفاوت است.

بعضی نمونه‌ها نظیر ادرار، مدفوع، نمونه جهت بررسی عوامل ویروسی، خلط، سواپ‌ها (به‌غیر از عوامل بی‌هوازی)، وسایل خارجی نظیر کاتتر را می‌توان در دمای ۴°C نگه‌داری نمود.

•• پاتوژن‌هایی که به سرما حساسند باید در دمای اتاق نگه‌داری شوند. این عوامل ممکن است در نمونه‌هایی که حاوی باکتری‌های بی‌هوازی بوده و هم‌چنین در اکثر مایعات استریل بدن، نمونه‌های ژنیتال، سواپ گوش و چشم نیز موجود باشند.

•• سرم جهت بررسی‌های سرولوژیک تا یک هفته در دمای ۲۰°C– قابل نگه‌داری است.

•• نگه‌داری طولانی مدت بافت‌ها یا نمونه‌ها در دمای ۷۰°C- صورت می‌گیرد.

•• مایع مغزی نخاعی در صورتی‌که سریعا مورد بررسی قرار نگیرد تا ۶ ساعت در دمای ۳۵°C قابل نگه‌داری است.

جدول ۴-۳ شرایط نگه‌داری نمونه‌های مختلف را نشان می‌دهد.

جدول ۴-۳: شرایط نگه‌داری نمونه

دمای ۴°C	دمای اتاق (۲۲-۲۶°C)
توک کاتتر (IV)	آبسه- زخم- ضایعه
مایع مغزی نخاعی جهت شناسایی ویروس	مایعات بدن
گوش خارجی	مایع مغزی نخاعی جهت شناسایی باکتری
مدفوع (بدون نگه‌دارنده)	گوش داخلی
مدفوع جهت توکسین کلستردیوم دیفیسیل تا ۳ روز (بیشتر از ۳ روز نگه‌داری در ۷۰°C-)	مدفوع (با ماده نگه‌دارنده)
خلط	تناسلی
ادرار (بدون نگه‌دارنده)	بینی- نازوفارنکس – گلو
	بافت
	ادرار (با ماده نگه‌دارنده)

موارد رد نمونه

موارد رد نمونه به شرح زیر بیان می‌گردد:

- عدم هم‌خوانی اطلاعات برگه درخواست آزمایش و برچسب روی نمونه
- استفاده از محیط انتقالی نامناسب
- جمع‌آوری نمونه در ظرفی که دارای نشت است
- نمونه ناکافی
- زمان انتقال بیش از ۲ ساعت در نمونه‌های بدون مواد نگه‌دارنده
- انتقال نمونه در دمای نامناسب
- خشک شدن نمونه
- دریافت نمونه در محلول فیکساتیو نظیر فرمالین (نمونه مدفوع مستثنی می‌باشد)
- درخواست کشت بی‌هوازی بر روی نمونه‌هایی که باکتری‌های بی‌هوازی فلور طبیعی آنهاست. (مثل واژن، دهان)
- نمونه حاصل از کاتتر فولی
- بیش از یک نمونه با یک منشا از یک مریض در همان روز (به‌غیر از موارد کشت خون)
- نمونه سواب با درخواست‌های متعدد برای ارگانیسم‌های مختلف
- نمونه خلط که در رنگ‌آمیزی گرم کمتر از ۲۵ سلول سفید و بیش از ۱۰ سلول اپی‌تلیال در بزرگ نمایی پایین داشته باشد.

در جدول ۵-۳ تحت عنوان مدیریت نمونه و راهنمای برخورد با آن به‌طور خلاصه مباحث این فصل بیان گردیده است.

عفونت ادراری و تشخیص آزمایشگاهی

عفونت سیستم ادراری (UTI) طیفی بالینی از وجود بدون نشانه باکتری در ادرار تا عفونت های شدیدکلیه و عفونت های حاصل از آن را شامل می گردد. حدود ۱۵۰ میلیون نفر در سال به UTI مبتلا می شوند.

تقسیم بندی عفونتهای مجاری ادراری:

به طورکلی برحسب محل آناتومیک درگیر،UTI به سه دسته تقسیم می شود:

اگر عفونت در ناحیهٔ کلیه باشد به آن (پیلونفریت) گفته می شود که از نوع حاد یا مزمن است.

اگر عفونت فقط در مثانه باشد به آن (سیستیت) می گویند که آن هم از نوع حاد یا مزمن است.

اگر عفونت در مجرای خروجی ادرار باشد به آن (اورتریت) می گویند و معمولاً در مردان دیده می شود .

علائم عفونتهای ادراری:

با توجه به اختلافات آناتومیک بدن زنان و مردان، در دو جنس علائم عفونت های ادراری تفاوت هایی با یکدیگر دارند.

در زنان، دستگاه تناسلی رحم و تخمدان هاست که سیستمی مستقل و کاملاً مجزا از سیستم ادراری است، درصورتی که در مردان، سیستم ادراری ـ تناسلی یک مجموعهٔ کاملاً مرتبط با هم است؛ به همین دلیل، علائم عفونت ادراری در زنان و مردان با هم تفاوت دارد. البته سوزش ادرار، تکرر ادرار، تحمل کم مثانه و ادرار خونی در هر دو جنس مشترک دیده می شود؛ درحالی که عفونت مجرای ادرار در مردان همراه با خروج ترشح چرکی از مجراست به علاوه میکروب از طریق مجرا ممکن است به پروستات و از آنجا به بیضه ها برسد و در این نواحی عفونت حاد ایجاد بکند.

از طرف دیگر، به علت کوتاه بودن طول مجرای زنان، امکان رسیدن میکروب از خارج به مثانه بسیار زیاد و به همین دلیل عفونت های ادراری در زنان ۳۰ تا ۵۰ برابر شایع تر از مردان است.

اصولاً علائم شامل دو دسته هستند: علائم ناشی از تحریک و التهاب سیستم ادراری که بر حسب محل عفونت متفاوت است، و علائم عمومی عفونت در بدن که شامل بی اشتهایی، تهوع، استفراغ و غیره است. در ضمن،

علائم در کودکان و بزرگسالان متفاوت است؛ ولی علائم مشترکی در عفونت های ادراری وجود دارد که باید همهٔ افراد به آن آگاه باشند.

۱-سوزش ادرار و تکرر ادرار که به علت تحریک مثانه در اثر عفونت و التهاب ایجاد می شود، همچنین تحمل کم مثانه که در کودکان و گاهی بزرگسالان ممکن است منجر به بی اختیاری ادراری شود.

۲-تغییر رنگ ادرار به صورت کدر یا خونی شدن ادرار،درصورتی که عفونت سطحی و سادهٔ مثانه نیز ممکن است در اثر التهاب مخاطی باعث پاره شدن مویرگ خونی شود و ادرار کاملاً قرمز و خونی بشود که با درمان عفونت بلافاصله بهبود می یابد.

۳-تب و لرز و تهوع و استفراغ که در عفونت های ادراری افراد زیر یک سال و همچنین عفونت های عمقی کلیه ها، پروستات و بیضه ها در افراد بزرگسال شایع است.

کاهش و توقف رشد در کودکان. مادران در صورت وجود چنین علامتی باید برای بررسی عفونت ادراری به پزشک مراجعه کنند.

۴-درد پهلوها که در عفونت های عمقی کلیه ها بسیار شدید و همراه با تب و لرز و تهوع و استفراغ است.

۵-اشکال در ادرار کردن و احتباس ادراری که در عفونت های مثانه و پروستات و مجرا ممکن است دیده شود.

عفونت ادراری در دوران بارداری:

به دوعلت عمده زیر بارداری احتمال ابتلا به عفونت هر یک از بخش‌های دستگاه ادراری را بالا می‌برد:

۱-مقادیر زیاد هورمون پروژسترون موجب شل شدن عضلات حالب و در نتیجه گشادتر شدن حالب می‌شود. رحم در حال رشد می‌تواند به حالب‌ها فشار وارد آورد و جریان ادرار را در داخل آنها با اختلال مواجه کرده سرعت آن را کُند سازد. رشد جنین موجب فشار روی مثانه می‌شود. در نتیجه تخلیه آن هنگام دفع کامل نخواهد بود. نتیجه نهایی این اختلالات آن خواهد بود که عبور ادرار در مسیر دستگاه ادراری بیشتر طول می‌کشد و باکتری‌ها قبل از خروج از بدن زمان بیشتری برای تکثیر در اختیار خواهند داشت.

۲-در طی حاملگی دستگاه ادراری از نظر عملکرد و ساختمان تغییرات قابل ملاحظه ای پیدا می کند که زمینه ساز عفونت بیشتر می شود. این تغییرات شامل موارد زیر می شود: افزایش خفیف اندازه کلیه، افزایش جریان خون کلیه به میزان ۴۰ درصد، گشاد شدن لگنچه های کلیه و حالب در حاملگی، کاهش حرکات حالب. این عوامل در حاملگی منجر به رکود و تجمع ادرار می شوند که خود باعث رشد بیشتر باکتری و بروز عفونت طی حاملگی می شود. قابل ذکر است علاوه بر موارد عنوان شده قند در ادرار به عنوان عامل موثر دیگری است که می تواند زمینه ساز عفونت و رشد باکتری شود.

عفونت های دستگاه ادراری در بارداری به سه صورت قابل مشاهده هستند:

۱. وجود باکتری در ادرار بدون علامت.
۲. عفونت مجاری ادراری تحتانی شامل مثانه و حالب.
۳. عفونت مجاری فوقانی یا کلیه (پیلونفریت).

از میان علل ذکر شده وجود باکتری در ادرار بدون علامت ،شایع ترین عامل عفونی در حاملگی است.

درصورتی که عفونت ادراری دردوران بارداری فعالیت کلیه ها را کم کند و اورهٔ خون را بالا ببرد ممکن است منجر به سقط جنین شود؛ ولی به طورکلی عفونت کلیه (پیلونفریت) در دوران بارداری باعث کاهش وزن جنین می شود و طبعاً نوزادی که وزنش در موقع تولد از وزن استاندارد کمتر است در معرض خطر ابتلا به بیماری های مختلف قرار می گیرد. به همین خاطر گاهی در زنان باردار دچار عفونت ادراری، پس از درمان کامل عفونت، پیشگیری از عفونت را به صورت مصرف دوز پایین آنتی بیوتیک، تا آخر زمان حاملگی ادامه می دهند. درحالی که در عفونت های سطحی ادراری خانم های غیرباردار درمان کوتاه مدت سه تا پنج روزه و حتی تجویز یک دوز واحد کافی است.

افتادگی مثانه در زنان در نوع خفیف آن تأثیر چندانی درایجادعفونت ادراری ندارد، ولی در نوع شدید که باعث تخلیه نشدن کامل مثانه شده با باقی ماندن ادرار شیوع عفونت را در زنان افزایش می دهد. در همان اولین نوبت معاینات دوران بارداری آزمایش ادرار درخواست می‌شود؛ خواه علایم عفونت ادراری وجودداشته باشد یا خیر. اگر این تست اولیه منفی باشد احتمال بروز عفونت ادراری در طول دوران بارداری پایین خواهد

بود ولی اگر فرد یکی از گروه ۵ تا ۷ درصد خانم‌هایی باشد که باکتری در ادرارشان یافت می‌شود، باید برای برطرف کردن آن از آنتی‌بیوتیک استفاده کند. اگر این نوع عفونت باکتریایی درمان نشود، احتمال بروز عفونت کلیه در دوران بارداری ۳۰ درصد است.

علائم عفونت مثانه (سیستیت) در خانم ها متفاوت است و میتواند به شکل های زیر بروز کند:

۱. درد، ناراحتی و سوزش هنگام دفع ادرار (و احتمالاً هنگام مقاربت جنسی)

۲. ناراحتی لگن یا درد قسمت تحتانی شکم (اغلب در قسمت فوقانی استخوان لگن)

۳. افزایش دفعات دفع ادرار و احساس فشار و نیاز به ادرار کردن به طور مکرر حتی زمانی که میزان ادرار در مثانه بسیار کم است

۴. ادرار بدبو، ادرار کدر

۵. وجود خون در ادرار (اغلب با چشم غیرمسلح دیده نمی شود)

البته از آنجایی که میل زیاد به دفع ادرار در دوران بارداری امری شایع محسوب می‌شود، ممکن است تشخیص قطعی سیستیت مشکل باشد، به خصوص در مواردی که علایم خفیف است.

عفونت کلیه یکی از خطرناک ترین عوارض دوران بارداری است و ممکن است به زایمان زودرس یا سایر اختلالات بیانجامد. درد کلیوی به هر علتی، مثلاً عفونت، سنگ و تومور ایجاد شود، یک درد نسبتاً دائمی است و با تغییر حالت بدن، مثلاً نشستن، بلند شدن، راه رفتن، سرپا ایستادن و کارکردن، شدت آن عوض نمی شود و معمولاً چنین دردهایی کمتر منشأ اسپاسم عضلانی هستند.

علائم انتشار عفونت به کلیه ها ضمن اینکه علائم سیستیت نیز ممکن است در عفونت کلیه دیده شود عبارتند از:

۱.تب شدید، اغلب همراه لرز و تعریق

۲.درد در قسمت تحتانی پشت یا پهلو درست زیر دنده ها که ممکن است یکطرفه یا دوطرفه باشد و احتمالاً درد شکم

۳.تهوع و استفراغ

۴.وجود چرک و خون در ادرار (ممکن است با چشم غیرمسلح دیده نشود)

عفونت ادراری در نوزادان وکودکان:

روز اول تولد تا ۲۹ روزگی را دوران نوزادی گویند. عـفـونتهای دستگاه ادراری در ۱٪ در صد نوزادان تازه متولد شده اتفاق می افتد. شیوع این عفونت در نوزادان با وزن تولد پایین بسیار بالاتر است . در جنس مذکر ۳ برابر شایعتر از جنس مونث است. از ماه دوم زندگی تا بزرگسالی عـفـونتهای دستگاه ادراری در جنس مونث شایعتر است.

نوزادان پسر ختنه نشده ،نوزادان مبتلا به ناهنجاریهای مادرزادی کلیه ومبتلایان به رفلا کس مثانه ای – حالبی درصد بالاتری از شیوع عـفـونت ادراری را دارا می باشند (رفلاکس بمعنای برگشت ادار در جهت عکس ، از مثانه به طرف حالب).

عـفـونت نوزادی ممکن است از طریق صعودی کسب گردد یعنی عـفـونت اولیه مثانه را گرفتار نموده (سیستیت) سپس سیستم حالبی لگنچه ای و کلیه (پیلونفریت) و از آنجا به گردش خون راه می یابد .

به طور کلی نکات قابل توجه در UTI عبارتنداز:

۱. در نوزادان زیر ۱ سال باکتریوری در پسرهابیشتر از دخترها دیده می شود.
۲. شیوع UTI در افراد مذکرختنه نشده ،در ۶ ماه اول تولد بیش از افراد ختنه شده می باشد.
۳. در سنین بین ۱- ۵ سالگی شیوع UTI در دخترها بیشتر از پسرها می باشد.
۴. در بچه های بزرگتراز ۵ سالاغلب موارد UTI همراه با اختلالات مادرزادی سیستم ادراری از جمله رفلاکس مثانه به حالب و انسدادمی باشد.
۵. دردوران نوجوانی شیوع UTIدر افراد مذکرثابت مانده ولی در میان افراد مونث افزایش قابل توجهی پیدا میکند

۲.اسمولالیته ،اوره،اسیدهای ارگانیک و PHادرار

۳ .وجود گلیکوپروتئین تام – هورسفال(که از چسبندگی باکتری به مجرا جلوگیری می کند)

هرگونه عاملی که با عوامل فوق تداخل کند می تواند خطرابتلا بهUTI را افزایش دهد.به عنوان مثال انسداد یا رفلاکس با برهم زدن جریان طبیعی ادرار استعداد ابتلا به UTI را افزایش می دهند . بدین ترتیب انواع انسدادهای مجرای ادراری اختلالات نرولوژیک موثربر عملکرد مجرای ادرار،دیابت ،حاملگی و اجسام خارجی (سنگ،کاتتر،استنت) همگی باعث می شوندکه باکتریها از چنگ سیستم دفاعی میزبان بگریزند.

دیگر عواملی که برروی استعداد ابتلا به UTI اثردارند شامل اجزای شیمیایی سیستم ایمنی (اینترلوکین ۸)،آنتی بادیها، عملکرد انواع سلولهای ایمنی (بویژه سلولهای B , T)، عوامل موثرروی چسبندگی باکتریها (گروههای خونی) ، فلورعادی پیشابراه و نواحی اطراف آن ،محتوای روی مایع پروستات، رفلاکس ،کهولت سن،بیماریهای عضلانی، کاتتریزاسیون و آلودگی مدفوعی پرینه در بی اختیاری مدفوعی می باشند .

با اینحال نقش سیستم ایمنی بطور کامل و دقیق در ابتلا به UTI مشخص نیست زیرا در بسیاری از موارد نقص عملکرد سلولهای B , T با افزایش ریسک عفونت همراه نیست.

عوامل پاتوژنیک مربوط به باکتری

توانایی باکتری در اتصال به مجرای ادرار عامل مهمی در بیماریزای آن به شمار می اید.بسیاری از انواع E.coliاز چنین توانایی برخوردارند. توانایی های دیگر E.coli که به بیماریزایی آن کمک میکنند.عبارتند از : مقاومت دربرابرخاصیت ضد باکتری سرم انسان، تولید همولیزین و افزایش تولید آنتیژن کپسولی K ،وجود پیلی برروی سطح سلولهای مجرای ادرار،امکان چسبیدن E.coli به سلولهای مجرا را افزایش داده و احتمال بروز UTI را تقویت میکند .پیلی نوع I بیشتر با سیستیت و پیلی نوع P بیشتر با پیلو نفریت همراه می باشد، اکثر انواع E.coli پاتولوژیک دارای هردونوع پیلی فوق می باشند.انتی ژن K به باکتری کمک میکند تا از چنگ فاگوسیتوز نوتروفیلی بگریزد.

اخیرا دیده شده که بسیاری از باکتریها مثل E.coli می توانند به سلول میزبان حمله کرده و درداخل سلول مثل عوامل پاتوژن فرصت طلب عمل کنند .عوامل نکروزان سیتوتوکسیک و پیلی نوع I به این امر کمک میکنند.این امر میتواند منجر به عفونت های راجعه یا پایدار ادراری گردد.

پاتوژن های مسبب UTI

اغلب موارد UTI درانریک گونه باکتری ایجاد می شود.شایعترین عامل مسبب UTI یعنی E.coli جزء گروه سرولوژیک Oمی باشد. پاتوژن های کمتر شایع عبارتند از : کلبسیلا،پروتئوس و اعضای خانواده آنترو باکتر.در موارد بیمارستانی UTI ، سدوموناس و انواع استافیلوکک نیز در ایجاد بیماری دخالت دارند .که اغلب انواع UTI حاصل از عفونت با استافیلوک طلایی در اثر انتشار از راه خون پدید می آیند.استرپتوکک های بتا همولیتیک گروه B در زنان باردار باعث عفونت ادراری میگردند. استافیلوکک ساپروفیتیکوس اغلب به عنوان عامل آلودگی ادراری در نظر گرفته می شود و میتواند انواع بدون عارضه UTI را در خانمهای جوان پدید آورد. در کودکان عوامل باکتریایی مسوول UTI با بزرگسالان متفاوت بوده و از نوع کلبسیلا و آنترو باکتر می باشد.

درفلورطبیعی نواحی اطراف پیشابراه افراد سالم باکتریهای بیهوازی ،لاکتو باسیل ها ،کورینه باکتریوم ها ،استرپتوکک ها (بجز انتروکک) واستافیلوکک اپیدرمیس یافت میشوند . که معمولا UTI ایجاد نکرده و آلودگی ادراری تلقی میگردند.

تشخیص آزمایشگاهی

تشخیص UTI گاهی اوقات مشکل بوده و براساس آزمایش ادرار و کشت صورت می پذیرد. نمونه ادرار را می توان از طریق کیسه (نوزادان و کودکان) و یا در حین ادرار کردن (بزرگسالان) جمع آوری نمود. اما به هر حال امکان آلودگی نمونه وجود دارد. نمونه حاصل از آسپیراسیون سوپراپوبیک معمولا آلوده نمی شود.

به طور کلی اولین قدم برای بررسی بیماران با وجود علائم ادراری آزمایش وکشت ادرار میباشد. نوع نمونه های ادرارجمع آوری شده باید midstream clean- catch urine یعنی نمونه وسط ادراروبدون ایجادآلودگی ونمونه اول صبح باشد. قبل ازجمع آوری ادرارنبایدازمحلولهای ضدعفونی کننده جهت شستشوی ناحیه اطراف پیشابراه استفاده کرد. درصورتی که درهرمیلی لیترادرارکه باشرایط خاص گرفته شده باشدبیش از۱۰۰هزارارگانیسم رشدکرده باشد تشخیص عفونت ادراری داده می شود.تشخیص میکروسکوپی باکتری درنمونه ادراردلیل محکمی به نفع عفونت بوده ولیکن عدم رویت باکتری درمطالعات میکروسکوپی ردکننده وجودعفونت نخواهدبود. معمولاتعدادکلنی بین۱۰۰-۱۰۰۰۰۰/mlباکتری درنمونه ادراری درشرایط زیرنشاندهنده عفونت ادراری است.

آزمایش ادرار U/A

بر اساس پیشنهاد NNIS توجه به علائم و همچنین نتایج آزمایش آزمایش کامل ادرار برای تفسیر و گزارش های کشت های ادرار و تشخیص عفونت ادراری ضروری است . بنابراین برای اطمینان از صحت تفسیر باید از صحیح بودن نتایج آزمایش کامل ادرار مطمئن شد. در این رابطه می توان به موارد زیر اشاره نمود

وسایل و مواد لازم

- ✓ ظرف استریل دهان گشاد ، غیر قابل نشت و با در محکم (برای تمام بیماران)
- ✓ کیسه ادرار (دخترانه و پسرانه) برای نوزادان و شیرخواران
- ✓ صابون (ترجیحا دستمال یا کاغذ آغشته به صابون مایع برای شستشو

حجم نمونه

در افراد بزرگسال حداقل 10 ml هر چند در شرایط خاص مثلا در نوزادان ممکن است کمتر از 10 ml باشد.

شرایط نگهداری و انتقال

- ✓ نمونه ادرار تهیه شده تا ۲ ساعت در دمای اتاق و تا ۲۴ ساعت در یخچال قابل نگهداری است
- ✓ افزودن اسید بوریک با غلظت ۲-۱ درصد تعداد باکتری را برای ۹۶-۴۸ ساعت در دمای محیط ثابت نگه می دارد و به ندرت روی رشد بعضی ارگانیزم ها تاثیر منفی دارد

در آزمایش ادرار می توان براساس ارزیابی استراز لوکوسیتی ،نیتریت (حاصل عملکرد باکتریهای گرم منفی برروی نیترات ادرار) ، وجود WBC و حضور باکتری به احتمال وجود UTI پی برد.

آزمایشات تکمیلی و مرتبط

- ✓ زمان و دور سانتریفوژ (2000-2500 rpm) به مدت ۵ دقیقه
- ✓ حجم ادرار سانتریفوژ شده نباید کمتر از 10 ml باشد (در صورتی که این حجم مثلا 6 ml باشد باید تعداد عناصر مشاهده شده را در عدد ۲ ضرب کرد)
- ✓ تعداد ۵ < لکوسیت در هر HPF (40X) ادرار سانتریفوژ شده به عنوان پیوری (Pyuria) تلقی می شود که معادل ۵۰ < لکوسیت در هر میلی متر مکعب است.

توجه : مقادیر طبیعی لکوسیت در ادرار زنان و مردان متفاوت است:
مردان= 0-3 / HPF
زنان = 0-5 / HPF

توجه به میزان RBC ، سلول هاي اپي تليال و سيلندرهاي ادراري ، وجود باكتري در ادرار ، وزن مخصوص و به خصوص آزمايش نيتريت اهميت دارد

آزمایش نیتریت

بیماری های ادراری مانند E.colie ، کلبسیلا ، انتروباکتر ، پروتئوس ، پسودوموناس ، استرپتوکوکوس، نیتریت مثبت هستند ، ولی استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس و انتروکوکوس نیتریت منفی هستند.

بعضی مولفان نتایج آزمایش نیتریت را در ارزیابی عفونت های بیمارستانی رضایت بخش نمی دانند.

مثبت کاذب به ندرت دیده می شود به عنوان مثال ممکن است مصرف داروی فنازوپیریدین آزمایش را مثبت کاذب کند.

منفی کاذب در این موارد دیده می شود:

۱. تعداد باکتری کمتر از 10^5 در هر میلی لیتر
۲. PH کمتر از ۵
۳. اسید آسکوربیک بالا
۴. نمونه های ادرار تصادفی یا نمونه های گرفته شده از کاتتر های ادراری
۵. کمبود نیترات در برنامه غذایی

نحوه کشت نمونه ادرار

کشت ادرار U/C

استاندارد طلایی تشخیص UTI کشت ادرار می باشد. معمولا بیش از 100000 cfu/ml به عنوان ابتلا به عفونت در نظر گرفته می شود.

درمواردزیرعلیرغم وجودعفونت تعدادکلونی های باکتری پایین می باشد:

- ✓ شروع درمان آنتی بیوتیکی قبل ازجمع آوری نمونه ادرار
- ✓ غلظت بالای اوره ادرار

- ✓ اسمولالیته بالای ادرار
- ✓ PHپایین ادرار(ادراراسیدی)

درشرایط زیرتعدادباکتریهای موجوددرادرارکاهش می یابد:

- ✓ دیورز ناشی ازمصرف مقدارزیادآب
- ✓ قبل ازجمع آوری ادرار، بیماربه تازگی ادرارکرده باشد

به حالت وجود پیوری بدون باکتری اوری پیوری استریل می گویندکه درمواردزیر دیده می شود:

۱. عفونت باباکتریهای غیرمعمول مانندکلامیدیاتراکوماتیس،اوره آپلاسمااوره لیتیکوم،مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و عفونت باقارچها
۲. سنگهای ادراری
۳. ناهنجاریهای آناتومی
۴. نفروکلسینوز
۵. ریفلاکس مثانه به حالب
۶. نفریت بینابینی
۷. بیماری پلی کیستیک کلیه

جمع آوری نمونه

نمونه می بایست تا حداکثر ۲ ساعت پس از جمع اوری بررسی شود در غیر اینصورت ممکن است دچار تغییراتی شود که عبارتند از قلیایی شدن ،رشد سریع باکتریها لیز RBC ها و قطعه قطعه شدن کست های ادراری.

- ✓ درنمونه های قسمت میانی ادرار احتمال الودگی نمونه با ترشح حاصل از دستگاه تناسلی و مسیر پیشابراه به میزان قابل توجهی کاهش می یابد ولی کامل برطرف نمی شود

- ✓ ادرارمی باشد که با اضافه کردن اسید ناپدید می شوند.
- ✓ بوی ادرار،به ندرت از لحاظ بالینی اهمیت دارد.
- ✓ عفونت ادراری همراه با PH بالاتر از ۷ شک به عفونت به پروتئوس را بر می انگیزد.
- ✓ نمونه ادرار اگر ۲ ساعت پس از مصرف غذای زیادی به مدت طولانی پس از جمع آوری بررسی شود PH قلیایی خواهد داشت.
- ✓ کست های سلول سفید،احتمال قوی پیلونفریت رامطرح می سازدولی معیارمطلق تشخیص این بیماری به شمار نمی آید
- ✓ کست های سلول اپیتلیال،به ویژه اگربه تعدادکم موجودباشند اهمیت چندانی ندارندولی در بیماری که پیوند کلیه دریافت کرده اند افزایش آنها ممکن است اولین نشانه رد حاد پیوند محسوب گردد.
- ✓ سنگهای ادراری و اجسام خارجی ازعلل دیگرپیوری محسوب میشوند .
- ✓ سنگهای استرووویت حاصل عفونت با ارگانیسم های تجزیه کننده اوره شامل پروتئوس ،سدوموناس، کلبسیلا،استافیلوکک و مایکو پلاسما می باشند.آمونیوم حاصل از فعالیت ارگانیسمهای مذکور PH ادرار را قلیایی (بالاتراز۷.۲) میکند.

عوامل در تشخیص باکتر باکتری کمک کننده می باشند:

۱-ترشح چرکی غلیظ و زردرنگ از پیشابراه تشخیص به نفع سوزاک می باشد.

۲-ترشح شفاف یا سفید از پیشابراه به نفع تریکوموناس ،مخمرها و یا عفونت کلامیدیایی می باشد.

۳- درهربیمارمبتلابه پیوری باکشت ادراراستریل،باید به وجود سل شک نمود در چنین مواردی رنگ امیزی زیل نلسون رسوب ادراری به تشخیص کمک می کند.

به طور معمول ، کشت ادرار روی محیط های آگار خون دار ، EMB یا مکانکی آگار انجام می شود. زمانی که ادرار را با استفاده از روش های جراحی یا سوپراپوبیک یا با روش های سیتوسکوپی یا ماساژ پروستات جمع

آوری نموده اند یا در مواردی که شک نسبت به ارگانیسم سخت رشد در نمونه ادرار وجود دارد ، علاوه بر محیط های فوق از شکلات آگار نیز استفاده می شود.

برای کشت ادرار می توان از لوپ کالیبره ۰/۰۱ یا ۰/۰۰۱ میلی لیتری استفاده کرد.

شمارش کلنی ها در محیط کشت ادرار

تعداد کلنی های حاصل از رشد باکتری ها در محیط کشت را می شماریم و در ضریب حجم لوپ ضرب می کنیم. نتیجه به واحد شمارش کلنی باکتری در میلی لیتر ادرار بین می شود. (CFU/ml)[1]

روش تعیین حجم لوپ

برای شمارش کلنی های بدست آمده از نمونه های کشت بالینی ادرار بویژه ادرار به منظور تشخیص عفونت لازم است از لوپ های استاندارد لا حجم معین استفاده شود آزمایشگاه می بایست همواره از لوپ های کالیبره جهت کشت نمونه های ادراری استفاده و و تعداد کلنی های موجود در هر میلی لیتر ادرار (colony Forming Unit) (CFU/ml) را گزارش نمایند.

برای بررسی حجم لوپ استفاده از روش های مانند رنگ سنجی و توزین استفاده می شود. ساده ترین روش بری بررسی حجم لوپ از روش رنگ سنجی از طریق اسپکتروفتومتر یا فتومتر به کمک مواد رنگی مانند متیلن بلو، کریستال ویوله و اوانس بلو می باشد.

ابزار و مواد مورد نیاز تعیین حجم لوپ با استفاده از ماده رنگی اوانس بلو

۱- پودر اوانس بلو این ماده به صورت تجتری در دسترس بوده و به آسانی در آب حل می شود

۲- آب مقطر

۳- لوله آزمایش

۴- پیپت یا سمپلر

۵- اسپکتروفتومتر یا فتومتر کالیبره

۶- کاغذ میلیمتری

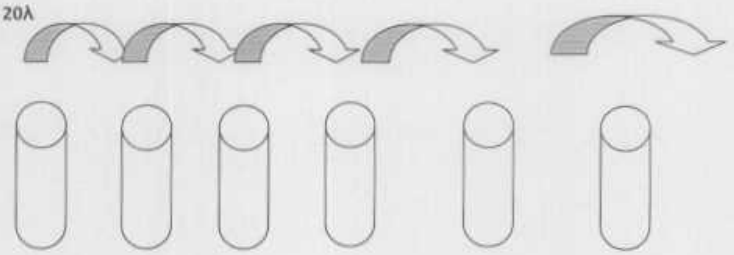
روش انجام

۱- 20mg از پودر رنگی اوانس بلو را در ۱۰ میلی لیتر آب حل نمایید. غلظت این محلول 0.2g/100 می باشد.

۲- ۶ لوله آزمایش انتخاب کرده در لوله اول 2ml و در هر یک از لوله های باقیمانده 1ml آب مقطر بریزید. ۲۰ لاندا (0.02ml) از محلول ذخیره اولیه (0.2g/100) برداشته در لوله اول ریخته و کاملا مخلوط نمایید. سپس 1ml از از لوله اول برداشته و در لوله دوم بریزید ، از لوله دوم در لوله سوم و این عمل را تا آخر ادامه دهید. در انتها 1ml از لوله ازلوله ششم برداشته و دور بریزید به این ترتیب ۶ محلول خواهید داشت که رقت نهایی بدست آمده در هریک و میزان ماده رنگی به شرح زیر خواهد بود.

لوله اول	لوله دوم	لوله سوم	لوله چهارم	لوله پنجم	لوله ششم
1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

20λ از محلول ذخیره 0.2g/10



رقت	۱/۱۰۰	۱/۲۰۰	۱/۴۰۰	۱/۸۰۰	۱/۱۶۰۰	۱/۳۲۰۰
مقدار ماده رنگی	10λ	5 λ	2.5λ	1.25λ	0.625λ	0.3125λ

۳- میزان جذب نوری (OD) در هر یک از لوله حاصله را به کمک اسپکتروفتومتر در طول موج 620 nm بدست آورید.

۴- جهت تعیین میزان لوپ مورد بررسی ، ۱۰ لوله آزمایش برداشته و در هر یک ۱ میلی لیتر آب مقطر بریزید.

۵- لوپ تحت کنترل را بصورت عمودی وارد محلول ذخیره اولیه نموده ، از محلول رنگی برداشته و در لوله های آزمایش فرو برید . این کار را ۱۰ بار تکرار و در فواصل لوپ را روی کاغذ خشک کن قرار دهید تا کاملا خشک شود. از سوزاندن لوپ خودداری نمایید.

۶- بعد از مخلوط کردن ، جذب هر یک از لوله را در 620nm قرائت نمایید.

۷- بر روی کاغذ میلی متری نموداری نمودار ترسیم نمایید که در آن ، محور افقی نشانه رقت های تهیه شده و محور عمودی نمایانگر جذب نوری هر رقت باشد.

۸- با قرار دادن جذب بدست آمده از لوپ کنترلی ، روی محور عمودی می توان ضریب رقت لوپ کنترلی را از روی محور افقی بدست آورد .

۹- جهت تعداد کلنی در هر میلی لیتر ادرار ، باید تعداد کلنی های بدست آمده از کشت را عکس ضریب رقت لوپ ، ضرب کرد. بطور مثال اگر ضریب رقت لوپ مجهول ۱/۱۰۰ و تعداد کلنی های روی پلیت ۵۰۰ عدد باشد باید ۵۰۰ را در ۱۰۰ ضرب و نتیجه را به صورت 50/000 cfu/ml گزارش نمود.

تعریف انواع سندروم های بالینی

۱. **عفونت ادراری بدون عارضه(uncomplicated UTI)** : عبارت است از عفونت دستگاه ادراری در حالی که ساختمان و عمل دستگاه ادراری سالم است. در این مورد شایع ترین بیماری زای جدا شده از کشت های ادراری E.Colie است.

۲. **عفونت ادراری پیچیده(Complicated UTI)** : عبارت است از عفونت در دستگاه ادراری که از نظر ساختمان یا عمل دچار اشکال یا اختلاف است، مثلا در کسانی که تومور دستگاه ادراری دارند ، بیمارانی که برای مدت های طولانی سوند دارند و قطع نخاعی هستند یا اعمال جراحی بزرگ روی سیستم ادراری انجام شده یا به طور مادرزادی ساختمان و عملکرد دستگاه ادراری آنها دچار مشکل خاصی است و معمولا عفونت های مکرر و اغلب بیش از یک نوع ارگانیسم دارند.

۳. **سندروم حاد اورترا (Acute Urethral Syndrome)**: اغلب در زنان جوان دیده می شود که علائم عفونت ادراری و باکتریوری خفیف با کلنی خیلی کم دارند.

۴. **باکتریوری بدون علامت**: در افراد مسن و زنان حامله شایع است و در زنان حامله باید با اهمیت تلقی شود. دیده شده است که عفونت های ادراری بدون علامت موجب زایمان سریع و پارگی کیسه آب و گاهی سقط جنین می شود.

۵. **التهاب مثانه یا سیستیت**: التهاب عفونی یا غیر عفونی مثانه.

۶. باکتریوری:عبارت است از وجود اوروپاتوژن های (بیماری زاهای ادراری) در ادرار که موجب عفونت ادراری می شوند.

۷. **پیوری**: عبارت از وجود گلبول های سفید در ادرار و زمانی اطلاق می شود که در یک گستره مطلوب از رسوب ادرار سانتریفوژ شده تعداد WBC>5 در هر میدان میکروسکوپی با درشت نمایی زیاد (40X) دیده می شود. این تعداد معادل WBC>50 در هر mm^3 ادرار است.

۸. **اورتریت(Urethritis)** : التهاب پیشابراه یا مجرای خروج ادرار که معمولا در حین بیماری های منتقله جنسی ایجاد می شود، مانند آرتریت گنوککی

۹. **پیلونفریت (Pyelonephritis)** : التهاب و عفونت حاد پارانشیم کلیه که معمولا با درد پهلوها و تب لرز همراه است.

۱۰.**حاملگی**: به زنان توصیه می شود از ابتدای حاملگی چند بار آزمایش کشت ادرار انجام دهند تا در صورت وجود باکتریوری بدون علامت تحت درمان باشند.

در برخي عفونت هاي دستگاه ادراري مانند سل ادراري يا عفونت با باكتري هاي بي هوازي و التهاب مثانه در اثر عفونت كلاميديايي ، مايكوپلاسما، يا برخي ويروس ها ممكن است تعداد زيادي گلبول سفيد در ادرار ديده شود، در حالي كه ارگانيسم ها مولد عفونت در محيط هاي كشت معمولي رشد نمي كند؛ بنابراين ، نتيجه كشت ادرار منفي است.

در التهاب غير عفوني مثانه يا كليه ها نيز با وجود گلبول سفيد در ادرار ، كشت ادرار منفي يا داراي شمارش كم است (پيوري استريل).

تفسیر و نحوه نتیجه گزارش دهی نتایج کشت ادرار

در تفسیر کشت باید به این موارد توجه کرد:

۱- عوامل مرتبط با بیمار (نوع نمونه ادرار ، سن ، جنسیت ، علائم بالینی و مصرف آنتی بیوتیک)

۲- نتیجه آزمون میکروسکوپی ادرار

۳- شرایط باکتری رشد یافته روی پلیت (تنوع کلنی رشد کرده یا خلوص کشت ، تعداد باکتری و نوع باکتری رشد یافته)

۴- روش نمونه برداری

جداول زیادی برای تفسیر نتایج کشت ادرار در کتاب های مختلف مرجع آورده شده است که مبنای آنها بر سه محور زیر است:

- تعداد کلنی ، خلوص کشت و رشد غالب یک یا دو نوع باکتری
- تعداد WBC (پیوری)
- علامت دار یا بدون علامت بودن بیمار (سمپتوماتیک یا آسمپتوماتیک)

جداول تفسیری زیر از چهار مرجع معتبر بالینی انتخاب شده اند می توانید با توجه به علائم بالینی بیمار و همچنین رشد ارگانیسم در کشت ادرار از این جدول ها برای نوه کار روی نمونه و توصیه لازم به پزشک استفاده نمایید.

نوع باکتری رشد یافته در تعیین بیماری زا بودن یا نبودن ، تعیین نوع آزمایش حساسیت میکروبی (انتخاب دیسک های آنتی بیوتیکی) و گزارش نهایی به پزشک اهمیت دارد.

روش و زمان بررسی نتایج

قرائت ابتدایی را باید روی همه کشت هایی انجام داد که قبل از نیمه شب دریافت شده اند

و در صورت رشد نکردن ، پلیت ها حتما باید ۴۸ ساعت نگه داری شوند. کشت هایی که بعد از نیمه شب پذیرش شده اند ، می توان اولین قرائت را به همراه سایر کشت های ارسالی در روز بعد انجام داد.

طبقه بندی عفونت های ادراری با توجه به سندرم بالینی

دسته	کلینیکال	آزمایشگاه
UTI حاد و بدون عارضه در زنان	سوزش ادرار ، درد سوپراپوبیک ، تکرر ادرار ، فقدان علائم ادراری در ۴ هفته اخیر قبل از مشکل جاری ، بدون تب و درد پهلو	≥10 WBC/mm^3 ≥10^3 CFU/ml پاتوژن های ادراری در CCMS
پیلونفریت حاد و بدون عارضه	تب ، لرز ، درد پهلو در معاینه ، فقدان تاریخچه یا شواهد کلینیکی از مشکلات کلیوی	≥10 WBC/mm^3 ≥10^4 CFU/ml پاتوژن های ادراری در CCMS
UTI پیچیده و UTI در مردان	هر ترکیبی از علائم که در بالا لیست گردیده ، یک یا فاکتور های بیشتری که در ارتباط با عفونت ادراری پیچیده است	≥10 WBC/mm^3 ≥10^5 CFU/ml پاتوژن های ادراری در CCMS
باکتریوریا بدون علامت	بدون علائم ادراری	≥10 WBC/mm^3 ≥10^5 CFU/ml در دو CCMS کشت ها در بیشتر از ۲۴ ساعت با دو نمونه جدا از هم

CCMS یا ادرار تمیز میانی: Clean-Catch Midstream Urine

راهنمای تفسیر کشت های ادراری

آزمایشات تشخیصی	نوع نمونه خاص در ارتباط با شرایط کلینیکی به شرط شناسایی بیماری	نتیجه
کامل	CCMS ادرار در پیلونفریت ، سیستیت حاد ، باکتری اوریا بدون علامت یا ادرار سوند دار	≤ 10^3 CFU/ml از یک پاتوژن مستعد یا برای هریک از دو پاتوژن مستعد
کامل	CCMS ادرار در مردان دارای علائم یا سندرم حاد اورترا یا ادرار سوند دار	≤ 10^3 CFU/ml از یک پاتوژن مستعد
هیچکدام ، بدلیل آلودگی نمونه ، درخواست نمونه دوباره	CCMS ادرار یا درار سوند دار	≤ سه نوع ارگانیزم بدون ارگانیزم غالب
آزمایشات تشخیصی کامل برای ارگانیسم غالب و توضیح ارگانیزم های دیگر	CCMS ادرار	دو یا سه نوع ارگانیزم با رشد یک ارگانیزم غالب و < 10^3 CFU/ml از ارگانیسم های دیگر
کامل	آسپیره شده از سوپراپوبیک ، ادرار به دست آمده از هر عمل جراحی دیگر	≤ 10^3 CFU/ml از هر تعداد نوع ارگانیزم

کامل :تشخیص ارگانیزم همراه با آزمایش حساسیت میکروبی

CCMS یا ادرار تمیز میانی: Clean-Catch Midstream Urine

رشد غالب = CFU/ml 10^5 ≤ تا 10^4

تفسیر نتایج کشت ادرار و انجام دادن عملیات تشخیصی

عملیات آزمایشگاهی مورد نیاز	تعداد ارگانیزم ها، انواع جدا شده	منبع ادراری	علائم ، بیماری کلینیکی یا جمعیت بیمار	تعداد کلنی
None ID & AST	هیچکدام ≥۲ ارگانیزم توسط کشت بی هوازی	CV/CA	اطفال	$<10^3$ $\geq 10^3$
ID & AST	کشت خالص	CV	زنان دارای علائم، اورتریت	$\geq 10^3$
ID & AST	≥ ۲ ارگانیزم	CA	مردان دارای علائم ،پروستاتیت	$\geq 10^3$
ID & AST ID & AST ID & AST Q & SID Q & M or Q & GS	کشت خالص کشت خالص ۲-۳ میکرو ارگانیزم >۳ ارگانیزم	CA Bladder wash - out CV	التهاب مثانه، پیلونفریت	$\geq 10^3$ $\geq 10^5$

۱.برای تعیین تعداد 10^2 کلنی در ادرار باید از لوپ ۰.۰۱ میلی لیتر استفاده کرد.

۲. CV (clean voided): ادرار تمیز

۳. CA (straight catheterized): ادرار گرفته شده توسط سوند کوتاه مدت

۴. Work-up: به عملیات آزمایشگاهی نیاز است، مخمر در کشت ادرار به تعداد که وجود داشته باشد باید به پزشک گزارش شود (ضروری است تعداد کلنی کاندا ذکر شود) و در صورتی که مخمر بیش از 10^5 مخمر در نمونه ادرار رشد کند ، گونه آن را باید تعیین کرد.

۵. Suprapubic : از نظر آناتومیکی ناحیه ای در بالا مثانه است که از طریق کاتتر وارد مثانه می گردند و ادرار به صورت استریل جمع آوری می گردد.

ID & AST : شناسایی و آزمایش حساسیت میکروبی.

ID & S: شناسایی را تا حد تعیین جنس و گونه و در صورت لزوم آزمایش حساسیت میکروبی را نیز انجام دهید.

برای مثال، در صورتی که بر اساس مرفولوژی کلنی و ظاهر میکروسکوپی به لاکتوباسیل مشکوک شدید، از آزمایش حساسیت ضد میکروبی جتناب کنید.

Q & SID: شمارش و شناسایی ظاهری و آزمایش بیوشیمی و AST لازم نیست.

Q & M : تعداد کل باکتری ها را بشمارید و به عنوان mixed urethral flora گزارش دهید.

Q & GS: شمارش گزارش ظاهری به وسیله رنگ گرم.

تفسیر نتایج کشت ادرار در نمونه های گرفته شده

تفسیر نتایج کشت ادرار در نمونه های گرفته شده به وسیله سوند ادراری

الف) تعداد کلنی رشد یافته بیشتر از 10^4CFU/ml

۱. رشد ۲ بیماری زای ادراری احتمالی در تعداد بیشتر از 10^4 CFU/ml:

- شناسایی کامل (ID) و انجام دادن آزمایش حساسیت آنتی بیوتیکی (AST) روی هر دو ارگانیسم؛
- شناسایی توصیفی گونه هایی که در تعداد کمتر از 10^4 رشد کرده اند.

۲.رشد یک یا دو نوع باکتری آلوده کننده احتمالی در تعداد بیشتر از 10^4 CFU/ml :

- شناسایی توصیفی ارگانیسم های موجود بر اساس ظاهر آنها. برای مثال ، دیفتروئید ها و گروه استرپتوکک های ویریدانس

نحوه گزارش:

- Multiple Organisms Present,Probable contamination , Please repeat culture

۳.رشد یک نوع بیماری زای ادراری احتمالی و یک نوع باکتری آلوده کننده

- شناسایی کامل (ID) روی بیماری زای احتمالی
- شناسایی توصیفی: باکتری آلوده کننده احتمالی بر اساس نوع ظاهری کلنی

۴.رشد سه نوع ارگانیسم در نمونه:

- شناسایی توصیفی ارگانیسم ها بر اساس شکل ظاهری کلنی

نحوه گزارش: مانند گزارش بالایی است.

Multiple Organisms Present, Probable contamination , Please repeat culture

ب)تعداد کلنی رشد یافته کمتر از 10^4 CFU/ml

۱. برای بیماران تحت درمان آنتی بیوتیک ، بیماران خانم مبتلا به ادر تریت و مردان علامت دار شناسایی کامل ID و آزمایش حساسیت آنتی بیوتیکی (AST) .

۲. برای بیماران دیگر توصیف نوع ظاهری ارگانیسم (شناسایی توصیفی) و درخواست تکرار نمونه گیری.

۳. کشت ادرار را در دمای اتاق به مدت ۷۲ ساعت نگه داری کنید تا در صورت درخواست انجام کارهای تکمیلی توسط پزشک ، کشت در دسترس باشد.

تفسیر نتایج کشت ادرار حاصل از تکنیک های تهاجمی

۱.وجود یک یا دو ارگانیسم:

- شناسایی ID و انجام دادن AST در صورتی که ارگانیسم های جدا شده بیماری زا باشند.

۲.وجود سه ارگانیسم:

- شناسایی کامل ID و نگهداری کشت ها به مدت ۳ روز برای درخواست مشاوره

نحوه گزارش:

If AST is required, plates will be hold for 72 hours for consultation.

۳.بدون رشد:

- کشت ها را پس از ۲۴ ساعت بررسی کنید:
- مجددا کشت ها را به مدت ۴۸ ساعت نگه داری کنید.

نحوه گزارش:

No growth at $<10^2$ CFU/ml at 48 hours./or No growth at 48 hours.

- در مواردي كه استافيلوكك اورئوس به طور خاص در محيط كشت رشد نمايد، صرف نظر از تعداد آن به عنوان يك عفونت بارز تلقي مي گردد كه بايد براي آن آزمايش حساسيت ميكروبي انجام داد و نتيجه را به پزشك گزارش نمود.
- وجود قارچ در كشت ادرار به هر تعداد كه باشد به پزشك گزارش داده شود(ذكر كلني كانت ضروري است) و در صورتي كه كشت هاي ادرار خالص از نظر كشت داشته باشيم بايد گونه قارچ آن را نيز تعيين كرد. لازم به ذكر است كه كانديدا ها معمولا پس از ۲ روز در محيط هاي معمولي رشد مي كنند.
- استرپتوكك گروه ب به خصوص در زناني در سن بارداري قرار دارند علاوه بر ايجاد عفونت ادراري باعث آلودگي نوزاد در ضمن عبور از كانال زايمان و ايجاد تب هاي بعد از زايمان مي شود. بنابراين جدا كردن اين ارگانيسم كشت ادرار اين افرد بايد بااهميت تلقي شودهمچنين در افراد مبتلا به ديابت جداسازي اين گونه استرپتوكك ممكن است نشانه عفونت ادرار باشد.
- سدوموناس انرو ژنوزا در بيماران مبتلا به ديابت يا كساني كه به نوعي بيماري زمينه اي دارند و به خصوص در بيماران با نقص سيستم ايمني يا بستري در بيمارستانها يا كساني كه پيوند كليه دارند از جمله يورو پاتوژنهاست .
- در بيماران بستري و داراري كتتر ادراري باكتريهاي مانند استيتو باكترها و گونه هاي سدوموناس ممكن است عامل عفونت هاي ادراري بيمارستاني باشد.
- جداسازي جنس هاي غير شايع مانند سالمونلا ،آئروموناس و ويبريو به هر تعداد كلوني ، از كشت ادرارباید گزارش شود .
- بعضي اوقات تكثير بيش از حد باكتري هاي غير هوازي و درگيري ويروسي دستگاه ادراري نيز سندرم اورترا ايجاد ميكند.كه در آزمايشگاه معمولي قابل تشخيص و شناسايي نيستند.

درمان

درمان با آنتی بیوتیک مرگ و میر و عوارض حاصل از UTI را به حداقل می رساند. هدف از رمان ریشه کنی عفونت می باشد. انتخاب آنتی بیوتیک مناسب براساس عامل بیماریزا، حساسیت آنتی بیوتیکی ، عفونت با یک یا چند ارگانیسم ، پاتوژن بودن ارگانیسم مورد نظر و یا فلور طبیعی بودن ان ، عفونت اکتسابی معمولی و یا بیمارستانی) ، شرایط بیمار (آلرژی ، بیماریهای زمینه ای ، سن ، درمان آنتی بیوتیکی قبلی، دیگر داروهای مصرفی، درمان سرپایی یا بستری یا بارداری) و محل عفونت (کلیه ، مثانه یا پروستات) صورت می گیرد. در بیمارانی که مبتلا UTI مکرر می شوندو یا در معرض خطر UTI قرار دارند میتوان آنتی بیوتیک را به صورت پروفیلاکتیک تجویز نمود.

انواع آنتی بیوتیک های ادراری(جهت آنتی بیوگرام)

تری متو پریم-سولفا متوکسازولSXT

بجز مواردی که عامل UTI انتروکوک و سدوموناس باشداز تری متو پریم-سولفا متوکسازول میتوان استفاده نمود.این دارو به نسبت ارزان و بسار کارآمد بوده و از متابولیسم فولات در باکتری ممانعت به عمل می آورد.ازین دارو در بیماران مبتلا به کمبود فولات ،کمبود G6PD ،ایدز و افراد حامله نباید استفاده نمود.

فلوروکینولون ها

این گروه از داروها به ویژه علیه باکتریهای گرم منفی موثر می باشند . خانواده این داروعلیه انواع استافیلو کک ها اثر خوبی دارند و لی علیه استرپتوکک و بیهوازی موثر نیستند. نحوه اثر مهارآنزیم DNA gyrase و ممانعت از تکثیر باکتری می باشد. این دارو به نسبت گران بوده ولی عوارض کمی داردازین خانواده دارویی در زنان باردار و کودکان نبایداستفاده کرد زیرا باعث آسیب غضروفی می گردد.

نیترو فورانتوئین FM

نیترو فورانتوئین علیه باکتریهای گرم منفی و استافیلوکک ها و انترو کک ها موثر است(بجزسدوناس و پروتئوس)و اثر آن روی DNAباکتری است .داروی ارزان و کارآمدی است.

آمینوگلیکوزیدها

ازاین خانواده برای درمانUTI _دارای عارضه استفاده می شود.داروهای این گروه به شدت علیه باکتریهای گرم منفی موثرند. مکانیسم اثر آنها مهار ساخت DNA وRNA می باشد.

سفالوسپورین ها

سفالوسپورینهای نسل اول اثر خوبی برروی باکتریهای گرم مثبت، اشرشیا کولی ، پروتئوس و کلبسیلا دارند.

سفالوسپورینهای نسل دوم علیه بیهوازیها و هموفیلوس آنفلوآنزا اثر زیادی دارندو اعضای نسل سوم برعلیه باکتریهای گرم منفی موثرند.مکانیسم اثر آن از طریق ممانعت از ساخت دیواره سلولی باکتری می باشد.

سفالوسپورین های خوراکی در درمان UTI بدون عارضه و در کودکان مبتلا به تب و پیلونفریت به کار میرود.

پنی سیلین ها

نسل اول این خانواده در درمان UTI جایی ندارندولی آمپی سیلین اثر خوبی روی انتروککها استافیلوکک ها اشرشیاکولی و پروتئوس دارد. بااین حال مقاومت دارویی خیلی سریع رخ می دهد.

مقاومت آنتی بیوتیکی

در سالهای اخیر میزان مقاومت آنتی بیوتیکی افزایش یافته که از تنوع جغرافیایی نیز برخوردارمی باشد. در میان عوامل پاتوژن سیستم ادراری بویژه به مقاومت اشرشیاکولی اشرشیاکولی اشاره کرد. که ۵۴-۱۸ درصد به آمپی سیلین،۲۷-۹ درصد به تریمتوپریم و ۴۹-۱۶ درصد به سولفامتوکسازول مقاوم شده است.

مقاومت نسبت به نیترو فورانتوئین و فلو رو کینولونها کمتر بوده است.(حدود ۳درصد)

جدول داروهای پیشنهادی برای درمان انواع پاتوژن های معمول سیستم ادراری

باکتری	آنتی بیوتیک
کوکسی های گرم مثبت	
استافیلوکک ارئوس	نافیسیلین-نیتروفورانتئین-سیپروفلوکساسین
استافیلوکک اپیدرمیدیس	آمپی سیلین- نیتروفورانتئین-سیپروفلوکساسین
استافیلوکک ساپرو فیتیکوس	آمپی سیلین- نیتروفورانتئین-سیپروفلوکساسین
استرپتوکک گروه D	
استرپتوکک فکالیس	آمپی سیلین- نیتروفورانتئین
استرپتوکک بوویس	پنی سیلین G- آمپی سیلین-ونکوماسین
استرپتوکک گروه B	آمپی سیلین- سفالوسپورین
کوکسی های گرم منفی	
نایسریا گونوره	سیپروفلوکساسین همراه با داکسی سایکلین
باسیلهای گرم منفی	
Ecoli	SXT-سیپروفلوکساسین-جنتامایسین-نیتروفورانتئین
انترو باکترها	SXT- سیپروفلوکساسین-جنتامایسین-نیتروفورانتئین
گاردنلا واژینالیس	مترونیدازول-آمپی سیلین
کلبسیلا	SXT- سیپروفلوکساسین-جنتامایسین
پروتئوس	SXT- سیپروفلوکساسین-جنتامایسین-آمپی سیلین
سدوموناس	تتراسایکلین-سیپروفلوکساسین-کاربنی سیلین-جنتا مایسین
سراشیا	SXT-کاربنی سیلین-آمیکاسین
پاتوژن های دیگر	
کلامیدیا	تتراسایکلین-اریترو مایسین
مایکوپلاسماها، اوره آپلاسما	تتراسایکلین-اریترو مایسین
بیهوازیهای اجباری	مترونیدازول-کلیندامایسین

بررسی ماکروسکوپی و میکروسکوپی نمونه مدفوع

الف- بررسی ماکروسکوپی

نمونه های مدفوع باید از نظر ظاهر بررسی گردند و از نظر وجود لخته خون، موکوس و قوام مدفوع مشاهدات ثبت شوند.

ب- بررسی میکروسکوپی

با تهیه اسمیر نازک از مدفوع و رنگ آمیزی گرم می توان وجود گلبولهای سفید، همچنین غالب بودن یک مورفولوژی باکتریایی، وجود سلولهای مخمر یا عدم وجود باسیلهای گرم منفی روده ای را در مدفوع تعیین نمود.

انتخاب، تلقیح و انکوباسیون محیط های کشت مدفوع

الف) انتخاب محیط های کشت

۱) محیطهای پلیتی افتراقی و انتخابی:

برای کشت روتین مدفوع، جهت جداسازی باکتریهای بیماریزای روده ای باید از محیط های افتراقی و انتخابی زیر استفاده شود:

محیط **MacConkey Agar (MAC)** که همه باسیلهای گرم منفی روده ای بتوانند روی آن رشد کنند، همراه با محیط افتراقی- انتخابی **Xylose-Lysine Decarboxylate (XLD)**.

(از محیط**Hektoen Enteric Agar (HE)** هم می توان به جای **XLD** استفاده نمود.)

تذکر:

a) محیط **SS (Salmonella Shigella Agar)** برای جداسازی سالمونلا به کار می رود، اما باعث مهار رشد برخی از گونه های شیگلا می شود. لذا نباید از این محیط در موارد مشکوک به جداسازی شیگلا به جای **MAC** ، **XLD** یا **HE** استفاده نمود.

b) محیط **XLD** چون میزان مهار کنندگی کمتری روی رشد کلی فرمها دارد، برای جداسازی شیگلا مناسب تر از محیط **HE** می باشد.

۲) محیط های مایع غنی کننده:

استفاده از این محیط ها به منظور بازیافت مقادیر کم سالمونلا یا شیگلا در افراد بدون علامت ناقل ، و بویژه در میان کارکنان دارای مشاغل حساس (مانند افراد شاغل در مهدهای کودک، آشپزخانه ها و ..) الزامیست.

رایجترین این محیط ها (**GN (Gram Negative Broth** براث و **SF (Selenite F Broth)** براث می باشند.

تذکر:

a) محیط **SF** براث برای جداسازی سالمونلا مناسب است، ولی برای برخی از گونه های شیگلا دارای اثر مهارکنندگی بوده، لذا بهتر است در موارد مشکوک به جدا سازی شیگلا از این محیط استفاده نشود. استفاده از **GN** براث به دلیل خاصیت مهار کنندگی کمتر برای گونه های سخت رشد شیگلا، ارجحیت دارد.

b) هنگام ساخت محیط **SF** براث، حرارت دادن بیش از اندازه باعث ایجاد ذراتی در محیط می شود که در این صورت نمی توان از آن استفاده کرد. همچنین عملکرد محیط **SF** براث در شرایط بی هوازی بهتر می باشد، بنابراین مقدار محیط در لوله باید به اندازه ای باشد که حداقل ۵ سانتی متر عمق ایجاد شود.

ب) تلقیح محیط های کشت و انکوباسیون

نمونه های مدفوع پس از تحویل به آزمایشگاه باید فورا" بر روی محیط های ذکر شده کشت داده شوند.

۱-تلقیح محیط های پلیتی:

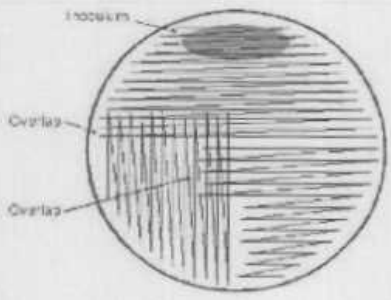
درصورتی که نمونه سواب رکتال باشد، سواب را روی سطح پلیت به قطر حدود ۲/۵ سانتیمتر می چرخانیم. سپس سطح پیلت را با لوپ استریل از منطقه تلقیح در تمامی پلیت **Streak** کرده به طوری که کلنی های جدا از هم بدست آید(مطابق شکل زیر). پلیت ها را به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷-۳۵ درجه سانتی گراد انکوبه می کنیم. در صورت عدم رشد یا رشد ضعیف، انکوباسیون را تا ۴۸ ساعت ادامه می دهیم.

تذکر:

a) برای هر بیمار استفاده از **یک پلیت با قطر ۱۰-۸ سانتیمتری** برای هر محیط الزامیست و نباید از پلیت ۶ سانتیمتری استفاده نمود، زیرا احتمال جداسازی کاهش می یابد.

b) برای تلقیح در محیط های انتخابی مانند **SF , HE , XLD** یا SS باید مقدار بیشتری نمونه تلقیح شود.

c) در مواردی که نمونه مدفوع قوام دار است توصیه می شود، کشت از سوسپانسیون مدفوع در سرم فیزیولوژی انجام گردد.



۲-تلقیح محیط مایع غنی کننده **GN** یا **SF** برات:

نمونه را با سواب به داخل محیط **GN** یا **SF** برات برده، سواب را دور می اندازیم.

معمولا"برای محیط **GN** برات ۶-۴ ساعت انکوباسیون و محیط **SF** برات ۱۲-۸ ساعت انکوباسیون در ۳۷-۳۵ درجه سانتی گراد توصیه می شود.همچنین در بعضی منابع جدید برای انکوباسیون **GN** برات ۸-۶ ساعت و **SF** برات ۲۴- ۱۸ ساعت ذکر شده است.[5]

بعد از این زمان از سطح محیط برات بدون مخلوط کردن (به دلیل حرکت بیشتر سالمونلاها در مقایسه با **E.coli** و تراکم سالمونلا در سطح برات) یک لوپ برداشته، روی پلیت **MAC** و **XLD** کشت می دهیم، به طوری که کلنی های جدا از هم بدست آید. همه پلیت ها را به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷-۳۵ درجه سانتی گراد انکوبه می کنیم. در صورت عدم رشد یا رشد ضعیف، انکوباسیون را تا ۴۸ ساعت ادامه می دهیم.

ج- جداسازی و تشخیص

بعد از انکوباسیون، میزان رشد، شکل و رنگ کلنی ها در هر یک از محیط های کشت داده شده بررسی و ثبت می شود.

آزمایشگاه مرجع سلامت	دستورالعمل روش استاندارد انتقال نمونه های عفونی	صفحه 1 از 17

دستورالعمل روش استاندارد انتقال نمونه های عفونی

انتقال نمونه های عفونی از طرق مختلف، تحت قوانین سازمان ملل متحد (United Nations) انجام می گیرد. همچنین انجمن حمل و نقل هوایی بین المللی (International Air Transport Association) در مورد چگونگی حمل ونقل مواد عفونی قوانینی سخت گیرانه را تحت عنوان IATA Dangerous Good Regulation (DGR) تدوین نموده است که در بیشتر کشورها مورد تأیید International Civil Aviation Organization (ICAO) می باشد.
سازمان جهانی بهداشت نیز کتابی تحت عنوان راهنمای قوانین انتقال نمونه های عفونی منتشر نموده است.

راهنمای ذیل خلاصه ای از منابع فوق و پانزدهمین ویرایش این قوانین توسط سازمان ملل متحد بوده که در مورد شرایط استاندارد نقل و انتقال نمونه های عفونی بحث می کند.

انتقال نمونه های آلوده یا نمونه هایی که احتمال آلودگی آنها وجود دارد، به صورت انتقال بین آزمایشگاهی، انتقال نمونه های بخش های مختلف بیمارستان به آزمایشگاه بیمارستان، انتقال بین بیمارستان و آزمایشگاه و نیز مطب پزشکان و آزمایشگاه، باید تحت شرایط استاندارد از نظر استفاده از ظروف استاندارد جهت بسته بندی با درج علائم و برچسب های لازم، روش بسته بندی استاندارد، رعایت اصول ایمنی جهت انتقال نمونه، رعایت زنجیره سرد در صورت لزوم و غیره انجام شود.
حمل ونقل نمونه ها می تواند از راه هوا، دریا، جاده، راه آهن و نیز پست طبق قوانین موجود در هر کشور و دستورالعمل مربوطه، تحت شرایط صحیح بسته بندی انجام شود.

تقسیم بندی موادخطرناک:

طبق قوانین International Airline Transport Association- IATA مواد خطرناک به ۹ گروه تقسیم می شوند (جدول پیوست شماره ۱) که بیشتر تقسیم بندی ها مربوط به انواع مواد شیمیایی بوده و **مواد عفونی در گروه 6.2** قرار می گیرند.

موادعفونی(Infectious Substances)

این گروه مواد عفونی شناخته شده و یا موادی که ممکن است عفونی باشند، را دربرگرفته و شامل باکتری ها، ویروس ها، ریکتزیا، انگل ها، قارچ ها و نیز عوامل دیگری مانند پریون ها می باشد و در صورتی که به دلیل بسته بندی نامناسب به بیرون نشت کنند، می توانند در تماس فیزیکی با انسان و یا حیوان باعث ایجاد بیماری گردند.

مواد عفونی به سه گروه **A, B** و **مواد معاف شده (Exempt human/animal specimens)** تقسیم می شوند.
مواد عفونی گروه A موادی هستندکه می توانند باعث ناتوانی دائمی ویا بیماری های کشنده و یا تهدید کننده زندگی در انسان و یا حیوان سالم شوندکه نمونه هایی از این مواد در پیوست ضمیمه آمده است (طبق جدول پیوست شماره ۲) و در ارتباط با بیماری های بومی وشرایط منطقه متفاوت می باشند.

موادعفونی که توانایی ایجاد شرایط فوق را دارا می باشند، تحت عنوان UN 2814 =**(United Nations Number)** طبقه بندی شده و مواد عفونی که فقط باعث بروز بیماری درحیوانات می شوند، تحت عنوان UN 2900 نامگذاری می شوند.

موادعفونی که در فهرست جدول شماره ۲ قرار نمی گیرند و شرایط فوق را از نظر بیماری زایی دارا نمی باشند، جزء **نمونه های بیولوژیکی**، گروهB و UN 3373 طبقه بندی می شوند و مطابق شکل پیوست شماره ۴ بسته بندی می شوند.

در مورد مواد معاف شده، معمولا باید ارزیابی پزشکی صورت گیرد و با پزشک راجع به شرح حال بیمار مشورت شود که آیا نمونه این بیمار در زمره مواد آلوده قرار می گیرد یا خیر.

نمونه های انسانی یا حیوانی که به احتمال کمی دارای عامل بیماری زا هستند، مشمول مقررات محموله های خطرناک (استفاده از سه محفظه جهت بسته بندی) می شوند.

از مواد معاف شده ای که مشمول بسته بندی سه محفظه ای نمی شوند، می توان به نمونه های لکه خون خشک شده، مواد حاوی میکروارگانیسم هایی که برای انسان و حیوان بیماری زا نیستند، موادی که هرگونه عامل بیماری زای موجود در آن خنثی و یا غیر فعال شده و هیچ گونه خطری نداشته باشد، می توان اشاره نمود.

مثال هایی از آزمایش های مربوط به این گروه، انجام آزمایش حاملگی و یا سنجش میزان داروها می باشد. در حال حاضر با توجه به مشکلات موجود در خصوص ارتباط با پزشک و یا اطلاع از سوابق بیماری فرد در ایران، معمولا جهت بسته بندی این مواد نیز از سه محفظه استفاده می کنیم.

مواد معاف شده شماره UN ندارند.

Proper Shipping Name:

نام مناسب جهت حمل محموله، در واقع مشخص کننده چگونگی طبقه بندی عوامل خطر و موادعفونی بوده و برای UN2814

باید عبارت INFECTIOUS SUBSTANCE AFFECTING HUMANS بر روی محفظه بیرونی درج شود.

و در مورد UN 2900 باید عبارت INFECTIOUS SUBSTANCE AFFECTING ANIMALS only درج گردد (مطابق شکل پیوست شماره ۳).

در مورد UN3373 باید عبارت BIOLOGICAL SUBSTANCE درج شود.

نام مناسب جهت حمل محموله در مورد مواد معاف شده (Exempt human/animal specimens) می باشد.

روش بسته بندی:

جهت بسته بندی نمونه ها طبق شرایط استاندارد، باید از سه محفظه که واجد شرایط ذیل باشد، استفاده نمود:

نمونه را داخل ظرف درپیچ دارکه غیرقابل نفوذ به مایعات و غیرقابل نشت بوده، قرار دهید.

درصورتی که تعداد نمونه ها و بالطبع تعداد لوله ها زیاد باشد، می توان مطابق اشکال پیوست لوله ها را توسط جداکننده های مقوایی ضخیم و یا جداکننده هایی از جنس دیگر مانند اسفنج بسته بندی نمود و در صورتی که نمونه مایع باشد، اطراف لوله ها به طور جداگانه ماده جاذب الرطوبه مانند تکه های ابر و ... قرارداد که در واقع این مواد جاذب بین محفظه اول و محفظه دوم قرار می گیرند، تا در صورت شکستن و یا نشت لوله ها، مواد آلوده به محفظه بیرونی نشت ننماید. حجم مواد جاذب باید متناسب با حجم مایع باشد.

سپس محفظه اول را داخل محفظه دوم مقاومی که غیرقابل نشت و غیرقابل نفوذ به مایعات بوده، قرارداده و مشخصات نمونه را روی آن درج کنید.

سپس محفظه دوم را داخل محفظه سوم مقاوم به ضربه و شرایط محیطی (که معمولاً در نمونه هایی که نیاز به رعایت زنجیره سرد دارند محفظه سوم را می تواند Cold Box تشکیل دهد) قرار داده و در غیر این صورت، باید این محفظه از مقاومت بسیار خوبی برخوردار باشد.

بر روی این محفظه باید مشخصات ذیل درج گردد:

نام و آدرس فرستنده و گیرنده، نام و شماره تلفن شخص مسئول تأیید کننده شرایط بسته بندی، شماره UN، و Proper shipping name شامل:

UN 2814 "INFECTIOUS SUBSTANCE AFFECTING HUMANS"

و یا

UN 2900 "INFECTIOUS SUBSTANCE AFFECTING ANIMALS"

در مورد نمونه هایی که باید با رعایت زنجیره سرد منتقل شوند، از یخ خشک و یا نیتروژن مایع استفاده می شود. در مورد این نمونه ها باید از UN 3245 و برچسب مخصوص آن که مربوط به گروه ۹ و نام آن Miscellaneous dangerous substances می باشد، استفاده نمود (شکل پیوست شماره ۶). همچنین باید وزن یخ خشک نیز بر روی محفظه بیرونی درج شود. یخ خشک باید بین محفظه دوم وسوم قرار گیرد.

باید با توجه به طول مسیر و حجم نمونه از مقدارکافی یخ خشک استفاده نمود و نیز در صورت استفاده از Cold box، این وسیله باید برای نگهداری نمونه ها در شرایط سرد، از کیفیت خوبی برخوردار باشد.

(Packing Instruction)

انواع ظروف مورد نیاز جهت بسته بندی مواد عفونی A و B و نیز چگونگی ساخت این ظروف تحت الزامات ساخت **(Packing Instruction)** P620 و یا PI602 و نیز P650 می باشدکه مبحث مفصلی بوده و در دستورالعمل IATA درج گردیده است.

اظهارنامه

باید **اظهارنامه** توسط فرستنده **(SHIPPER'S DECLARATION)** تکمیل شود (مطابق شکل پیوست شماره ۵).

اظهارنامه به عنوان یک سند قانونی مطرح بوده و باید دارای مشخصات ذیل شامل:

مشخصات کامل فرستنده، گیرنده، شماره بارنامه، تعداد صفحات بارنامه، فرودگاه مبدأ، فرودگاه مقصد، نوع حمل و نقل (فقط حمل هوایی و ....)، شماره UN، Proper Shipping name، گروه خطر تقسیم بندی شده، حجم مواد و طریقه بسته بندی،Packing Instruction، تاریخ، مکان، نام و امضاء فرد تایید کننده و .... باشد و تکمیل آن برای نمونه هایی که شماره UN 3373 دارند، ضروری نمی باشد. شکل شماره ۵- (شکل شماره ۳/۱ و شکل شماره ۴/۱)

بارنامه هوایی (Air Waybill)

یک سند استاندارد بوده که علاوه بر اظهار نامه باید تکمیل شود.

حجم نمونه ها:

در مورد نمونه هایی که در گروه UN 2814 قرار می گیرند، نمونه های با حجم بیش از ۵۰ میلی لیتر و یا ۵۰ گرم را نباید در هواپیمای مسافربری بارگیری نمود. حداکثر حجم نمونه هایی را که می توان با هواپیمای باربری انتقال داد ۴ لیتر و یا ۴ کیلوگرم می باشد.

برچسب:

برچسب دارای علامت خطر زیستی (مربوط به مواد عفونی) باید به صورت لوزی شکل (شکل پیوست شماره ۷) بر روی محفظه بیرونی نصب شود که گروه ۶ در قسمت پایین آن درج شده است.

برچسب **PACKAGE ORIENTATION** (شکل پیوست شماره ۸) باید بر روی نمونه های عفونی مایع که حجم آنها بیش از ۵۰ میلی لیتر می باشد، نصب گردد و نشان دهنده رعایت جهت رو به بالا برای حمل محفظه حاوی مواد می باشد. معمولاً این برچسب بر روی نمونه های Un 3373 نصب نمی شود، اما استفاده از آن توصیه می گردد.

برچسب **UN Specification Markings** که درمورد نمونه های عفونی استفاده می شود، بر روی محفظه بیرونی درج شده و حاوی اطلاعاتی مانند علامت UN، نوع بسته بندی از نظر وزن، گروه موادعفونی، سال ساخت محفظه، مشخصات کارخانه سازنده و غیره می باشد.

باید تمامی مشخصات ثبت شده فوق به طور واضح درج شده و خوانا باشد.

در صورت آسیب دیدن بسته بندی و یا نشت مواد باید فوراً به مسئولین مربوطه اطلاع داد.

برای بسته بندی نمونه های سرم، به طور مثال جهت تعیین مقدار کلسترول که از طریق هوا منتقل می شوند، باید از سه محفظه استفاده نمود و نمونه های حاوی ویروس ایدز و هپاتیت و ... و یا زمانی که انتظار جداسازی این ویروس ها از نمونه وجود دارد، باید طبق شرایط UN 3373 بسته بندی گردد.

انتقال نمونه های عفونی به صورت شخصی و توسط افراد از طریق هوا کاملاً غیرقانونی می باشد.

در شرایطی مسئولیت ارسال کننده نمونه به پایان می رسد که نمونه عفونی تحت شرایط استاندارد منتقل شده و ارسال کننده از دریافت آن توسط گیرنده مطمئن شود.

Classification of dangerous goods

Class 1 to 9

Class 6.2: Infectious substances
- Infectious substances, affecting humans (UN 2814)
- Infectious substances, affecting animals (UN 2900)
- Biological substances (diagnostic specimens) (UN 3373)
- Clinical waste (UN 3291)

Class 9: Different dangerous substances
- Genetically modified microorganisms (UN 3245)
- Dry ice (UN 1845)

جدول شماره (۱)

All nine hazard classes and the two divisions of Class 6 are listed below:

- Class 1 — Explosives
- Class 2 — Gases
- Class 3 — Flammable Liquids
- Class 4 — Flammable Solids
- Class 5 — Oxidizing Substances and Organic Peroxides
- Class 6 — Toxic and Infectious Substances
  - Division 6.1 — Toxic substances.
  - Division 6.2 — Infectious substances.
- Class 7 — Radioactive Material
- Class 8 — Corrosives
- Class 9 — Miscellaneous Dangerous Goods

جدول شماره(۲)

TABLE 3.3.A
Indicative Examples of Infectious Substances Included in Category A in Any Form Unless Otherwise Indicated (3.3.2) *(Cont'd)*

UN Number and Proper Shipping Name	Micro-organism
	Guanarito virus
	Hantaan virus
	Hantavirus causing hemorrhagic fever with renal syndrome
	Hendra virus
	Hepatitis B virus (cultures only)
	Herpes B virus (cultures only)
	Human immunodeficiency virus (cultures only)
	Highly pathogenic avian influenza virus (cultures only)
	Japanese Encephalitis virus (cultures only)
	Junin virus
	Kyasanur Forest disease virus
	Lassa virus
	Machupo virus
	Marburg virus
	Monkeypox virus
	Mycobacterium tuberculosis (cultures only)
	Nipah virus
	Omsk hemorrhagic fever virus
not rabies	*Poliovirus* (cultures only)
	Rabies virus (cultures only)
	Rickettsia prowazekii (cultures only)
	Rickettsia rickettsii (cultures only)
	Rift Valley fever virus (cultures only)
"	*Russian spring-summer encephalitis virus* (cultures only)
	Sabia virus
	Shigella dysenteriae type 1 (cultures only)
"	*Tick-borne encephalitis virus* (cultures only)
	Variola virus
	Venezuelan equine encephalitis virus (cultures only)
not rabies!	*West Nile virus* (cultures only)
	Yellow fever virus (cultures only)
	Yersinia pestis (cultures only)
UN 2900 Infectious substances affecting animals	African swine fever virus (cultures only)
	Avian paramyxovirus Type 1 – Velogenic Newcastle disease virus (cultures only)
	Classical swine fever virus (cultures only)
	Foot and mouth disease virus (cultures only)
	Lumpy skin disease virus (cultures only)
	Mycoplasma mycoides – Contagious bovine pleuropneumonia (cultures only)
	Peste des petits ruminants virus (cultures only)

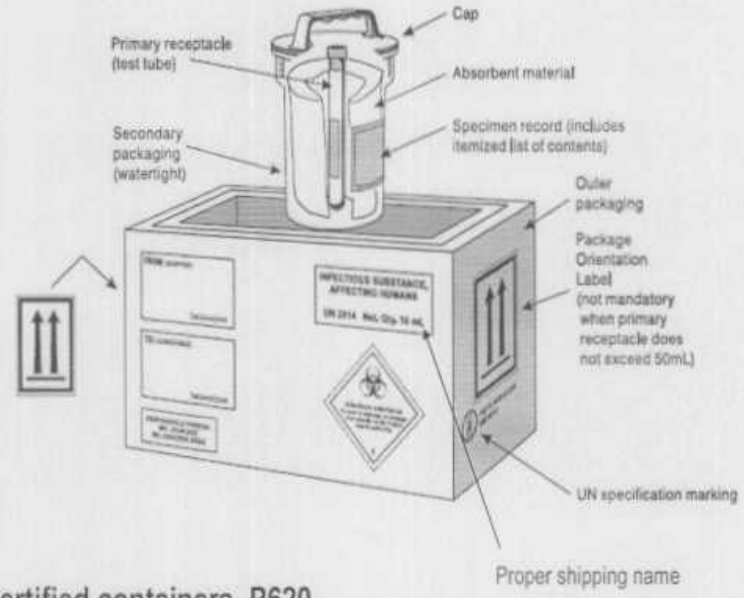
ادامه جدول شماره (۲)

TABLE 3.3.A
Indicative Examples of Infectious Substances Included in Category A in Any Form Unless Otherwise Indicated (3.3.2)

UN Number and Proper Shipping Name	Micro-organism
UN 2814 infectious substance affecting humans	*Bacillus anthracis* (cultures only) *Brucella abortus* (cultures only) *Brucella melitensis* (cultures only) *Brucella suis* (cultures only) *Burkholderia mallei – Pseudomonas mallei* – Glanders (cultures only) *Burkholderia pseudomallei – Pseudomonas pseudomallei* (cultures only) *Chlamydia psittaci* – avian strains (cultures only) *Clostridium botulinum* (cultures only) *Coccidioides immitis* (cultures only) *Coxiella burnetii* (cultures only) Crimean-Congo hemorrhagic fever virus Dengue virus (cultures only) Eastern equine encephalitis virus (cultures only) *Escherichia coli*, verotoxigenic (cultures only) Ebola virus Flexal virus *Francisella tularensis* (cultures only)

شکل شماره (۳)

Packaging instructions for UN 2900 and UN 2814: category A



UN certified containers, P620

شکل شماره (۳/۱)

8.4.2 Sample Documentation and Labelling for a Shipment of Infectious Substances in Category A with Dry Ice

Figure 8.4.2.A
Shipper's Declaration

UN2814	Infectious substance, affecting humans (Suspected category A infectious substance)	6.2		10 ml	602
UN1845	Dry Ice	9	III	3 kg All packed in one Fibreboard box.	904

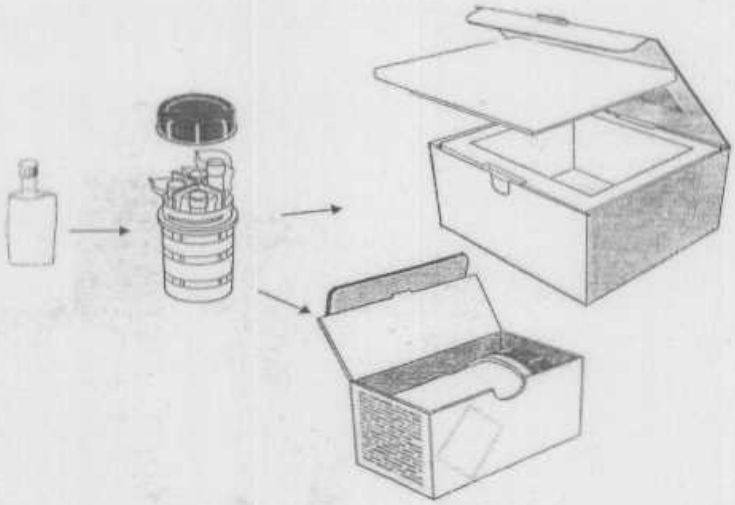
A way to show an infectious substance shipment packed together with dry ice inside a UN Class 6.2 specification package. Note that a "Q" value is not required, and the Air Waybill will require the statement as shown in 8.3.

Figure 8.4.2.B
Air Waybill

Airport of Destination	Requested Flight/Date	Amount of Insurance	INSURANCE – If carrier offers insurance, and such insurance is requested in accordance with the conditions thereof, indicate amount to be insured in figures in box marked "Amount of Insurance".
Handling Information			
Dangerous Goods as per attached DGD			SCI

No. of Pieces RCP	Gross Weight	kg lb	Rate Class / Commodity Item No.	Chargeable Weight	Rate / Charge	Total	Nature and Quantity of Goods (incl. Dimensions or Volume)
							Infectious substance

Transportation packagings for
Class 6.2 Infectious Substances
according to ICAO-TI and IATA/DGR
Packinginstructions 602 and 650

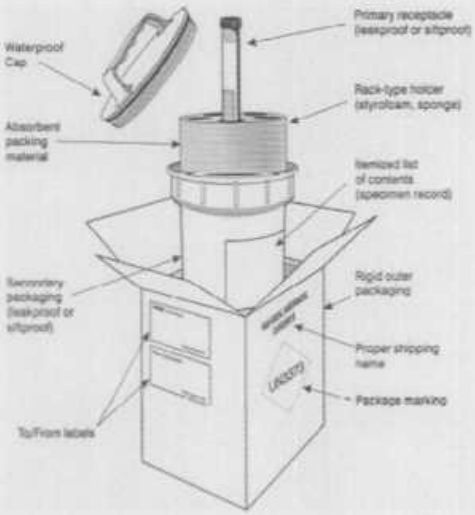


Noax Sys AB
PO Box 2022, SE-18202 Stockholm-Danderyd Sweden
Phone +46 8753 46 80 Fax +46 8753 06 70
Mail address: mail@noax.se
WWW.noaxsys.se

	دستورالعمل	
صفحه 11 از 17	روش استاندارد انتقال نمونه های عفونی	آزمایشگاه مرجع سلامت

شکل شماره (۴)

Packaging for UN 3373 (category B, P650)



Primary receptacle:
- Leakproof or stiftproof
- absorbent material (eg. Kleenex)

Secondary packaging:
- Leakproof or stiftproof

Rigid outer packaging:
Never envelopes

شکل شماره (۴/۱)

8.4.4 Sample Documentation and Labelling for a Shipment of Infectious Substances in Category B

Figure 8.4.4.A
Shipper's Declaration

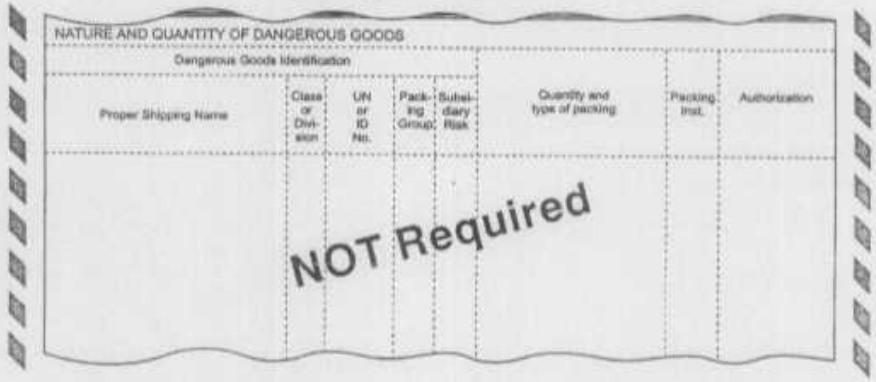
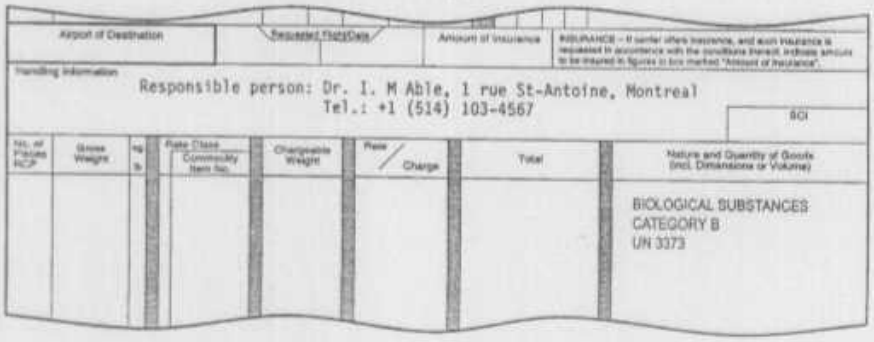


Figure 8.4.4.B
Air Waybill



آزمایشگاه مرجع سلامت	دستورالعمل روش استاندارد انتقال نمونه های عفونی	صفحه 13 از 17

شکل پیوست شماره ۵

SHIPPER'S DECLARATION FOR DANGEROUS GOODS

Shipper

Air Waybill No.

Page of Pages

Shipper's Reference Number (optional)

Consignee

Two completed and signed copies of this Declaration must be handed to the operator.

WARNING

Failure to comply in all respects with the applicable Dangerous Goods Regulations may be in breach of the applicable law, subject to legal penalties.

TRANSPORT DETAILS

This shipment is within the limitations prescribed for: *(delete non-applicable)*

PASSENGER AND CARGO AIRCRAFT | CARGO AIRCRAFT ONLY

Airport of Departure:

Airport of Destination:

Shipment type: *(delete non-applicable)*

NON-RADIOACTIVE | RADIOACTIVE

NATURE AND QUANTITY OF DANGEROUS GOODS

Dangerous Goods Identification						
UN or ID No.	Proper Shipping Name	Class or Division (Subsidiary risk)	Packing Group	Quantity and type of packing	Packing Inst.	Authorization

Additional Handling Information

I hereby declare that the contents of this consignment are fully and accurately described above by the proper shipping name, and are classified, packaged, marked and labelled/placarded, and are in all respects in proper condition for transport according to applicable international and national governmental regulations. I declare that all of the applicable air transport requirements have been met.

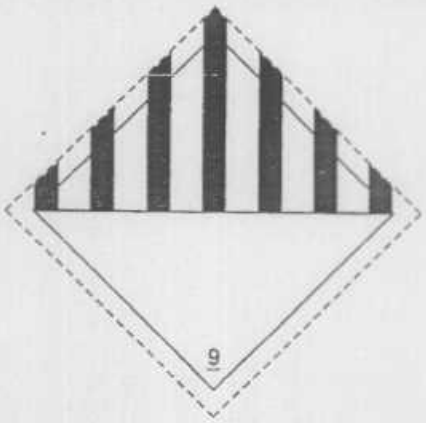
Name/Title of Signatory

Place and Date

Signature
(see warning above)

شکل شماره ۶

Figure 7.2.B
Class 9 — Miscellaneous Dangerous Goods



Name: Miscellaneous
Minimum dimensions: 100 × 100 mm
Symbol (seven vertical stripes in upper half): Black
Background: White

آزمایشگاه مرجع سلامت	دستورالعمل روش استاندارد انتقال نمونه های عفونی	صفحه 15 از 17

شکل شماره ۷

Figure 7.2.A
Class 6 — Infectious Substances (Division 6.2)

The lower part of the label should bear the inscription:
INFECTIOUS SUBSTANCE
In case of Damage or Leakage
Immediately Notify
Public Health
Authority

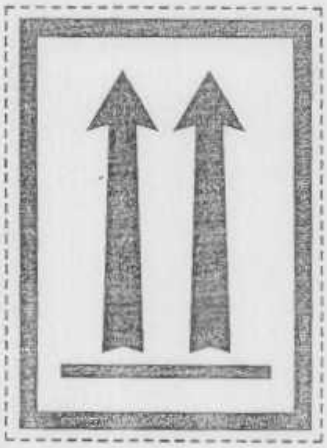
Name: Infectious Substance
Minimum dimensions: 100 × 100 mm

For small packages the dimensions may be 50 × 50 mm
Symbol (three crescents superimposed on a circle) and inscription:
Black
Background: White

آزمایشگاه مرجع سلامت	دستورالعمل روش استاندارد انتقال نمونه های عفونی	صفحه 16 از 17

شکل شماره ۸

Figure 7.2.F
Package Orientation



Name: Package Orientation (This Way Up)
Minimum dimensions: 74 × 105 mm
Colour: Red or Black on a contrasting background

References:
1_Guidance on regulations for the **Transport of Infectious Substances**- WHO- 2013–2014
2_WWW.IATA.Org_(Infectious substance transport)

دکتر شهلا فارسی
آزمایشگاه مرجع سلامت
دبیر کمیته کشوری ایمنی و امنیت زیستی آزمایشگاهی
بازنگری چهارم _ آذر ماه ۱۳۹۵

[Type here]

مقدمه

محیط های کشت نقش اساسی را در آزمایشگاه میکروب شناسی ایفا می کنند و به طور گسترده ای جهت جداسازی، تعیین هویت و آنتی بیوگرام میکروارگانیسم های بیماری زا به کار می روند. بسیاری از آزمایشگاه ها به طور روتین محیط های کشت مورد نیاز برای مصارف تشخیصی و تحقیقاتی را خودشان تهیه می نمایند. با این همه برای اطمینان از این که محیط های کشت، کیفیت خوب و نتایج مطلوبی دارند، باید روش های کنترل کیفی مناسبی به کار گرفته شود. برای رسیدن به این هدف باید در تهیه و مصرف محیط های کشت معیارهای ذیل در نظر گرفته شود.

نکات عمومی در مورد تهیه محیط های کشت:

آب:

کیفیت محیط های کشت به طور مستقیم به کیفیت مواد خام مورد استفاده در تهیه آنها بستگی دارد. آب یکی از مهمترین موادی است که در تهیه محیط های کشت به کار می رود. سه معیار مهم برای آب مورد استفاده در تهیه محیط های کشت (آب نوع III) شامل عدم وجود یون های مس، قدرت هدایت الکتریکی و pH می باشد. در شرایط ایده آل یون های مس به دلیل خاصیت مهارکنندگی برای اغلب میکروارگانیسم ها، نباید در آب مورد استفاده برای تهیه محیط های کشت وجود داشته باشد. قدرت هدایت الکتریکی آب باید حدود ۱۰ میکروزیمنس بر سانتی متر باشد و همچنین pH آب مورد استفاده بهتر است کمی اسیدی باشد، ولی نباید کمتر از ۵ و بیشتر از ۸ باشد.

توزین پودر محیط کشت و افزودن آب:

طبق دستورالعمل تهیه محیط کشت که بر روی ظرف آن نصب گردیده است، مقدار مناسبی از پودر محیط کشت را با دقت وزن نمایید. ظرف محیط کشت را دور از جریان هوا و رطوبت باز کنید. از استنشاق پودرها به خصوص آنهایی که دارای مواد سمی هستند و تماس طولانی مدت آنها با پوست اجتناب کنید. پودر را به سرعت، به دقت و بدون ایجاد غبار وزن کنید. هرچه زودتر درِ ظرف را ببندید. نصف حجم آب مورد نیاز را داخل ظرف بریزید. سپس مقدار وزن شده محیط کشت را به آن اضافه نمایید. برای چند دقیقه به تندی تکان دهید. باقیمانده آب را به دیواره داخلی ظرف بریزید تا ذرات محیط کشت چسبیده به دیواره نیز وارد محلول شوند. این مرحله بسیار مهم است، چون پودر خشک محیط کشت در بالای سطح آب، ممکن است در اتوکلاو استریل نشود و منبع آلودگی گردد.

حل کردن محیط کشت:

محیط های کشت بدون آگار، معمولا با تکان دادن آهسته و ملایم حل خواهند شد. اما محیط های کشت حاوی آگار باید قبل از حرارت دادن به مدت چند دقیقه با آب مخلوط شوند. سپس حرارت داده شوند تا آگار قبل از اتوکلاو کردن، حل شود. محیط های کشت را بجوشانید بدون آنکه بسوزند. محیط های کشتی که نباید اتوکلاو شوند، بعد از این مقدار حرارت دادن، برای تقسیم

[Type here]

داخل پلیت ها یا ظروف استریل دیگر آماده خواهند بود. اکثر محیط های کشت به استریلیزاسیون نهایی (در دمای ۱۲۱°C به مدت ۱۵ دقیقه) نیاز خواهند داشت.

توزیع:

محیط کشت را در ظرفی مناسب با حجم ۲ تا ۳ برابر حجم محیط کشت بریزید تا بتوانید آن را به خوبی تکان دهید و مخلوط کنید.

استریلیزاسیون:

بعضی از محیط های کشت به استریلیزاسیون با اتوکلاو احتیاجی نداشته و با جوشاندن قابل استفاده می شوند که دستور ساخت آنها بر روی برچسب ظرف محیط کشت قید گردیده است. استریلیزاسیون سایر محیط های کشت توسط حرارت مرطوب (اتوکلاو) یا صافی غشایی (فیلتراسیون) انجام می گردد که این موارد نیز بر روی برچسب ظرف محیط کشت قید گردیده است.

الف) استریلیزاسیون با حرارت مرطوب:

استریلیزاسیون محیط کشت تا حجم یک لیتر، در اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۱۲۱°C (فشار ۱/۲ کیلوگرم بر سانتی متر مربع) انجام می گیرد. برای حجم های بیشتر از یک لیتر باید چرخه استریلیزاسیون را به طور مناسب تغییر داد. اما چون اکثر مشکلات در استریلیزاسیون محیط های کشت هنگامی رخ میدهد که مقادیر بیشتر از دو لیتر محیط کشت باید استریل شود، لذا توصیه می شود که مقادیر زیاد محیط کشت را در حجم های کوچکتر تقسیم نمایید.

کنترل کیفی اتوکلاو، کنترل دما و فشار آن باید به طور مداوم انجام گردد. برای کنترل اتوکلاو از اندیکاتورهای شیمیایی کلاس ۶ (TST) در هر ران کاری استفاده می شود. از اندیکاتورهای بیولوژیکی جهت پایش عملکرد اتوکلاو حداقل به طور هفتگی یا فواصل بیشتر، متناسب با بار کاری اتوکلاو استفاده می شود که ویال حاوی اسپور *Geobacillus Stearothermophilus* ATCC 7953 است (SAL≤ 10^6 CFU) و به صورت تجاری در دسترس می باشد.

ب) استریلیزاسیون با صافی غشایی (فیلتراسیون):

از صافی غشایی برای استریل کردن محیط های کشت و ترکیبات حساس به حرارت استفاده می شود.

استریلیزاسیون به وسیله صافی غشایی تحت شرایط خلاء یا افزایش فشار انجام می پذیرد. از غشاء ها و صافی های با قطر منفذ ۰/۲۲ یا ۰/۴۵ میکرومتر استفاده نمایید. این فیلترها باید قبل از استفاده، در اتوکلاو استریل شوند. در مورد غشاء ها و صافی هایی که در بسته بندی های استریل به فروش می رسند، به دستورالعمل سازنده مراجعه نمایید. قسمت های مختلف دستگاه صافی را با صافی یا بدون صافی در اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱°C استریل نمایید.

[Type here]

آماده سازی جهت مصرف:

بعد از استریلیزاسیون، اجازه دهید دمای محیط کشت به حدود ۵۰°C برسد، سپس با رعایت شرایط آسپتیک در ظروف نهایی تقسیم نمایید. هیچ وقت محیط کشت را در دمای بالاتر از ۵۰°C تقسیم نکنید. مکمل های حساس به گرما و حرارت باید بعد از این که دمای محیط کشت به حدود ۵۰°C رسید، به آن اضافه شوند. دمای مکمل (سایلمنت) استریل قبل از این که به محیط کشت اضافه شود، باید به دمای اتاق برسد. سپس مکمل را با رعایت شرایط آسپتیک به محیط کشت اضافه نموده، خوب مخلوط کنید و در ظروف نهایی که از قبل استریل شده اند، تقسیم نمایید.

اندازه گیری و تنظیم pH:

محیط های کشت دهیدراته اگر به طور مناسب تهیه شوند، نیازی به تنظیم pH ندارند. pH نهایی محصول استریل شده را می توان روی پلیت یا بطری اندازه گیری کرد، اما باید آنها را بعد از سنجش pH دور ریخت. بنابراین بعد از استریل شدن و خنک شدن محیط کشت تا دمای ۲۵°C، مقدار pH را در حد مورد نظر (±۰/۲) تنظیم نمایید. تنظیم pH معمولاً با استفاده از هیدروکسید سدیم ۴۰ گرم در لیتر (تقریباً یک مولار) و یا با استفاده از اسید کلریدریک ۳۶/۵ گرم در لیتر (تقریباً یک مولار) انجام می شود. pH را به یکی از روش های ذیل کنترل نمایید:

- روش اول: روش خیساندن (Macerate): آگار یک پلیت را در ظرفی کوچک حاوی مقدار کمی آب مقطر (۵-۷ ml) له کرده و به مدت ۱۰ دقیقه بخیسانید، سپس نوک الکترود pH متر را در این مخلوط غوطه ور کنید.
- روش دوم: نوک الکترود pH متر را در داخل ارلن کوچکی قرار دهید. مقدار اندکی از آگار مذاب را به داخل ارلن ریخته، پس از سفت شدن آگار، pH را اندازه گیری نمایید.
- روش سوم: از الکترودهای سطحی استفاده نمایید.

نگهداری محیط های کشت تهیه شده:

طول عمر محیط های کشت تهیه شده به نوع اجزاء تشکیل دهنده محیط، نحوه نگهداری و ذخیره سازی آنها بستگی دارد. تمامی محیط های کشت باید دور از نور نگهداری شوند. تابش نور به محیط های کشت موجب تشکیل مواد باکتریوستاتیک و باکتریسایدماند پراکسیداز می گردد. طول عمر اغلب محیط های کشت پلیتی در دمای ۴ درجه سانتی گراد یک هفته می باشد، ولی اگر در داخل کیسه های پلاستیکی به گونه ای بسته بندی شوند که هوا داخل آنها نفوذ نکند، تا ۴-۳ هفته قابل مصرف هستند. طول عمر محیط های کشت حاوی آنتی بیوتیک به پایداری آنتی بیوتیک موجود در آن بستگی دارد. در مجموع، محیط های حاوی آنتی بیوتیک را در مدت یک هفته باید مصرف کرد. از سوی دیگر با گذشت زمان این گونه محیط های کشت رطوبت خود را از دست داده، به دلیل افزایش غلظت آنتی بیوتیک، قدرت انتخابی آنها افزایش می یابد. پلیت ها را باید قبل از مصرف به دمای اتاق رساند. اگر پلیت محیط کشت بیش از ۸ ساعت در دمای اتاق باقی بماند برای مصرف مناسب نمی باشد. محیط های کشت لوله ای در

[Type here]

مقایسه با محیط های کشت پلیتی عمر طولانی تری دارند. اغلب این محیط های کشت اگر در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شوند، ۶-۳ ماه قابل مصرف می باشند.

موارد استثناء: تایوگلیکولات براث، اندول نیترات براث و SIM فقط به مدت یک ماه قابل نگهداری می باشند. محیط های CTA Medium و OF Medium حاوی کربوهیدرات و مولر هینتون براث فقط به مدت ۶ هفته قابل نگهداری می باشند.

جدول شماره ۱- خطاها، مشکلات و علل ممکن در استریلیزاسیون محیط های کشت

مشکلات	علل ممکن
رنگ یا تیرگی غیر طبیعی محیط کشت (Abnormal color/darkening)	ـ آب ناخالص ـ ظروف شیشه‌ای کثیف ـ افت کیفیت محیط کشت دهیدراته ـ حرارت زیاد یا نادرست در طی استرایلیزاسیون ـ pH اشتباه یا تغییر و انحراف pH ـ حل نشدن کامل محیط کشت ـ ذخیره‌سازی طولانی مدت در دمای ۵۰°C
لخته یا منعقد شدن محیط کشت (Coagulation)	داغ بودن محیط کشت در هنگام افزودن سایلمنت (مکمل) به آن
رگه رگه شدن محیط کشت (Flecks in culture medium)	رگه رگهٔ سیاه: نیم‌سوز شدن آگار رگه رگهٔ روشن: سرد شدن تقریبی آگار در هنگام افزودن سایلمنت (مکمل) به آن
pH نادرست (Incorrect pH)	ـ آب ناخالص یا ظروف شیشه‌ای کثیف ـ حرارت زیاد در طی استرایلیزاسیون ـ ذوب مجدد یا ذخیره‌سازی طولانی مدت در دمای ۵۰°C ـ آلودگی شیمیایی ـ کالیبراسیون نادرست pH متر ـ حل نشدن کامل محیط کشت ـ اندازه‌گیری pH در دمای بالای ۲۵°C ـ افت کیفیت محیط کشت دهیدراته ـ ذخیره‌سازی نادرست یا بیش از نیمه عمر محیط کشت دهیدراته ـ کیفیت پایین آب یا ظروف

[Type here]

مشکلات	علل ممکن
ایجاد رسوب یا کدورت (Percipitation/Turbidity)	ـ حرارت بیش از اندازه در طی استریلیزاسیون ـ ذخیره‌سازی طولانی مدت (بیش از ۴ ساعت) در حالت مذاب (بیش از ۵۰°C) ـ افت کیفیت محیط کشت دهیدراته ـ pH اشتباه ـ آب ناخالص یا ظروف شیشه‌ای کثیف ـ حل نشدن کامل محیط کشت ـ داغ بودن محیط کشت در هنگام افزودن مکمل به آن ـ کیفیت پایین آب یا ظروف
سمّیت (Toxicity)	ـ حرارت بیش از اندازه در طی استریلیزاسیون ـ افت کیفیت محیط کشت دهیدراته ـ قرارگیری در معرض نور مستقیم خورشید ـ حجم اشتباه مکمل اضافه شده
رشد باکتریولوژیک ضعیف یا اثر روی خواص انتخابی/ افتراقی	ـ توزین یا مخلوط کردن نادرست ـ آب یا ظروف آلوده ـ مواد مهارکننده در آب یا ظروف ـ افت کیفیت محیط کشت دهیدراته ـ داغ بودن محیط کشت در هنگام افزودن مکمل به آن ـ داغ بودن محیط کشت در هنگام کشت نمونه بر روی آن ـ ذخیره‌سازی طولانی مدت محیط کشت ـ خشک شدن بیش از حد سطح محیط کشت ـ حل نشدن کامل محیط کشت ـ تیرگی محیط کشت و تغییر و انحراف pH ـ حرارت بیش از اندازه و طولانی مدت
شل بودن آگار (Soft agar)	ـ حرارت بیش از اندازه (به ویژه در مقابر pH پایین) ـ هیدرولیز اسید در محیط کشت با pH پایین ـ توزین یا مخلوط کردن نادرست ـ حل نشدن کامل آگار ـ حجم نادرست آب ـ رقیق‌سازی زیاد با مایه تلقیح یا مکمل‌های محیط کشت ـ ذخیره‌سازی طولانی مدت در دمای ۵۰°C

[Type here]

ارزیابی کیفیت محیط های کشت:

هر آزمایشگاه باید از کیفیت هر شماره ساخت از محیط های آماده مصرف تجاری و یا محیط های دهیدراته، قبل از استفاده اطمینان حاصل نماید. الزامات عمومی کنترل کیفیت محیط های کشت عبارتند از:

الف) ثبت اطلاعات محیط های کشت

۱. محیط های آماده مصرف تجاری:

- منبع تهیه آن، شماره ساخت، تاریخ انقضاء، تاریخ دریافت و تاریخ شروع به استفاده از آن را برای هر یک از انواع محیط ثبت کنید.
- هر محیط را مطابق دستورالعمل سازنده نگهداری کنید (معمولا در ۸-۲ °C).

۲. محیط های ساخته شده از پودر دهیدراته در آزمایشگاه:

- مقدار محیط ساخته شده، منبع تهیه آن، شماره ساخت، روش استریل نمودن آن، تاریخ ساخت، pH، تاریخ شروع به استفاده از آن، تاریخ انقضاء و نام فرد سازنده آن ثبت شود.

ب) بررسی مشخصات ظاهری:

محیط های کشت تهیه شده باید قبل از استفاده، از لحاظ فیزیکی و ظاهری نیز بررسی شوند:

- شکستگی یا آسیب دیدگی پلیت ها و لوله ها؛
- جدا شدن آگار از جداره پلیت ها و لوله ها؛
- یخ زدگی یا ذوب شدن آگار؛
- ناصاف پر شدن پلیت ها؛
- مقدار ناکافی آگار در پلیت ها (عمق کمتر از ۳ mm) و لوله ها (عمق و سطح ناکافی)؛
- وجود همولیز در محیط های حاوی خون؛
- تغییر در رنگ مورد انتظار برای هر محیط (احتمال اشکال در pH محیط)؛
- وجود حباب یا ناهمواری بیش از حد در سطح محیط؛
- رطوبت اضافی یا خشک شدن بیش از حد محیط؛
- آلودگی قابل مشاهده؛
- وجود رسوب.

ج) بررسی وجود آلودگی:

به عنوان یک قاعده کلی، برای سری ۱۰۰تایی یا کمتر (≤۱۰۰)، ۵-۳٪ از لوله ها/ پلیت ها باید از نظر عدم وجود آلودگی و رشد باکتریایی بررسی شوند. برای مقادیر بیشتر (>۱۰۰) باید ۱۰ لوله یا پلیت به صورت رندوم و تصادفی انتخاب، و انکوبه شوند. نمونه ها باید برای ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C-۳۵ انکوبه، و سپس به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق نگهداری شوند. نباید شواهدی از رشد میکروبی بعد از انکوباسیون مشاهده گردد. بعد از کامل شدن بررسی، باید تمام نمونه های بررسی شده دور ریخته شوند.

[Type here]

د) انجام آزمایش کنترل کیفیت:

هر محیط کشت باید از نظر میزان رشد قابل قبول و/یا خصوصیت مهارکنندگی، با میکروارگانیسم های کنترل مناسب مطابق جدول شماره ۳ بررسی شوند.

منابع تهیه میکروارگانیسم های کنترل عبارتند از:

- ATCC (American Type Culture Collection) یا PTCC (Persian Type Culture Collection)
- سویه های شناسنامه دار که طی برنامه ارزیابی خارجی کیفیت دریافت می شوند.
- سویه های شناخته شده بیماران که دارای ثبات فنوتیپی می باشند.

برای این کار لازم است از سویه های کنترل کیفی مورد نظر، سوسپانسیون میکروبی تهیه شود.

A. تهیه سوسپانسیون میکروبی:

یک کشت از ارگانیسم کنترل کیفی مورد نظر روی پلیت بلاد آگار تهیه کنید. بعد از انکوباسیون پلیت به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۵±۲°C، ۵-۳ کلنی ایزوله را در ۵-۳ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل حل کرده و کدورت آن را با کدورت استاندارد نیم مک فارلند تنظیم نمایید. این سوسپانسیون میکروبی باید کدورتی مطابق با استاندارد نیم مک فارلند (CFU/ml ۱۰۸- ۱۰۷) داشته باشد.

B. بررسی عملکرد محیط های کشت:

۱) **بررسی ظرفیت مغذی بودن (Nutritional activity) محیط های کشت غیر انتخابی پلیتی** مانند بلاد آگار، لوترینت آگار، تریپتیک سوی آگار و ...

سوسپانسیون اولیه میکروبی مطابقت یافته با کدورت 0.5 MF را مطابق شکل ۱ به نسبت ۱:۱۰۰ در سرم فیزیولوژی استریل رقیق نموده و مقدار ۱۰µl یا ۰/۰۱ ml سوسپانسیون رقیق شده را به محیط کشت مورد آزمایش، تلقیح نموده و به گونه ای کشت دهید که کلنی های ایزوله بدست آید. پلیت ها را مطابق شرایط ذکر شده در جداول شماره ۲ و ۳ انکوبه نمایید. تعداد کلنی های مورد انتظار در هر پلیت بعد از انکوباسیون (CFU/plate) ۱۰۴-۱۰۳ می باشد. برای اجتناب از رشد زیاد باکتری در بعضی از محیط های کشت غیر انتخابی و برای داشتن کلنی های ایزوله، ممکن است لازم باشد رقت ۱:۱۰۰۰ تهیه شود.

۲) **بررسی ظرفیت مهار کنندگی (Inhibitory activity) محیط های کشت انتخابی پلیتی** مانند مکانکی آگار، EMB آگار، XLD آگار و ...

سوسپانسیون اولیه میکروبی مطابقت یافته با کدورت 0.5 MF را مطابق شکل ۱ به نسبت ۱:۱۰ در سرم فیزیولوژی استریل رقیق نموده و مقدار ۱۰µl یا ۰/۰۱ ml سوسپانسیون رقیق شده را به محیط کشت مورد آزمایش تلقیح نموده و به گونه ای کشت دهید که کلنی های ایزوله بدست آید. پلیت ها را مطابق شرایط ذکر شده در جداول شماره ۲ و ۳ انکوبه نمایید. تعداد کلنی های مورد انتظار در هر پلیت بعد از انکوباسیون (CFU/plate) ۱۰۵-۱۰۴ می باشد. برای

[Type here]

اجتناب از ر شد زیاد باکتری در به ضی از محیط های ک شت انتخابی و برای دا شتن کلنی های ایزوله ممکن ا ست لازم باشد رقت ۱:۱۰۰ تهیه شود.

۳) بررسی محیط های کشت لوله ای مانند نوترینت براث، MRVP، SIM، مالونات و ...

هر لوله را با ۱۰µl یا ۰/۰۱ ml از سو سپانسیون اولیه میکروبی مطابقت یافته با کدورت 0.5 MF (بدون رقیق سازی) تلقیح نمایید. لوله ها را مطابق شرایط ذکر شده در جداول شماره ۲ و ۳ انکوبه نمایید. پس از انکوبا سیون، لوله ها را از نظر وجود رشد و/یا ایجاد کدورت و نیز ایجاد واکنش مناسب بیوشیمیایی بررسی نمایید.

C. زمان انکوباسیون (جدول شماره ۲):

سویه های کنترل کیفی	دمای انکوباسیون	اتمسفر انکوباسیون	مدت انکوباسیون
باکتری های دارای رشد سریع	۳۵-۳۷°C	*هوای محیط یا غنی شده با CO_2	۲۴- ۱۸ ساعت
باکتری های دارای نیازهای خاص برای رشد	۳۵-۳۷°C	غنی شده با CO_2	۷۲- ۲۴ ساعت
بی هوازی ها	۳۵-۳۷°C	گاز بی هوازی	۷۲- ۲۴ ساعت
کمپیلوباکتر	۴۲°C	گاز Campy	۴۸- ۲۴ ساعت
مایکوباکتریوم ها	۳۵-۳۷°C	غنی شده با CO_2	۲۱- ۷ روز
مخمر	۳۵-۳۷°C	هوای محیط	≥ ۷۲ ساعت
کپک ها	۲۵-۳۰°C	هوای محیط	≥ ۷۲ ساعت

* اتمسفر به نوع محیط بستگی دارد. توصیه های سازنده را بررسی نمایید.

D. تفسیر نتایج:

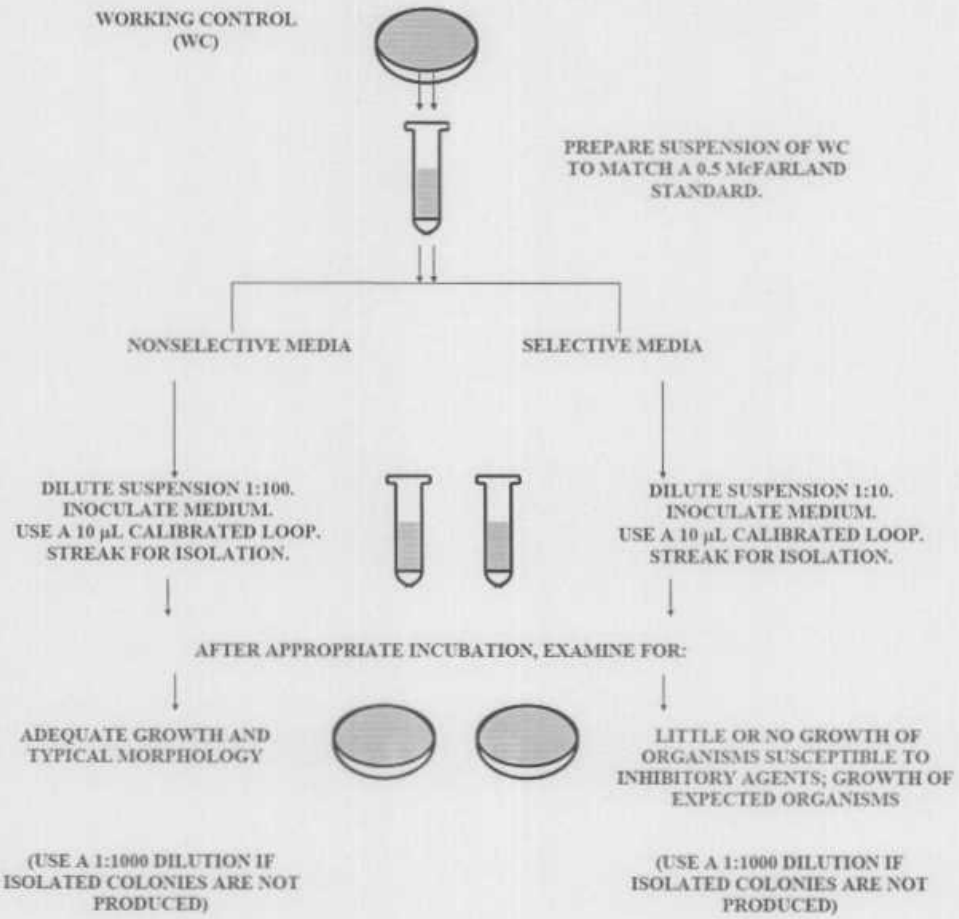
- عملکرد محیط های غیر انتخابی در صورتی رضایت بخش است که سویه های کنترل کیفی، رشد کافی، سایر مورد انتظار کلنی، مرفولوژی بارز کلنی را نشان دهند.
- عملکرد محیط های انتخابی در صورتی ر ضایت بخش ا ست که سویه های کنترل کیفی، ر شد کافی، سایر مورد انتظار کلنی، مرفولوژی بارز کلنی و مهار رشد بعضی از ارگانیسم های خاص را نشان دهند.

در بعضی موارد، واکنش های رنگی خاص یا همولیز همچنان که در جدول شماره ۳ آمده است، باید ایجاد شود. مثلاً در مورد محیط کشت بلاد آگار ایجاد همولیز مناسب ضروری است و یا برای محیط مکانکی آگار ایجاد واکنش های رنگی برای سویه های میکروبی مشخص ضروری می باشد.

- عملکرد محیط های لوله ای در صورتی رضایت بخش است که سویه های کنترل کیفی در آن رشد کافی نموده یا کدورت لازم را ایجاد کنند و واکنش های بیوشیمیایی مورد انتظار را نشان دهند.

[Type here]

شکل ۱- تهیه سوسپانسیون میکروبی برای کنترل کیفیت محیط های کشت



[Type here]

جدول شماره ۳- الزامات کنترل کیفیت محیط های کشت

محیط کشت	اتمسفر، مدت زمان و دمای انکوباسیون	ارگانیسم های کنترلی (شماره ATCC)	نتایج قابل انتظار
Alkaline peptone water (APW)	هوازی، ۱۲- ۶ ساعت، ۳۵°C	*V. cholerae* (9459) *E. coli* (25922)	رشد بر روی ساب کالچر (TCBS) عدم رشد بر روی ساب کالچر (TCBS)
Anaerobic sheep blood and laked blood agar	بی هوازی، ۴۸- ۲۴ ساعت، ۳۵°C	*B. fragilis* (25285) *C. perfringens* (13124) *F. nucleatum* (25586) *P. anaerobius* (27337) *P. melaninogenica* (25845)	رشد می کند رشد می کند همولیز بتا رشد می کند رشد می کند رشد می کند
Anaerobic broths—(thioglycolate medium را ملاحظه نمایید)			
Bile esculin agar	هوازی، ۴۸- ۲۴ ساعت، ۳۵°C	*E. faecalis* (29212) *S. pyogenes* (19615)	رشد می کند اطراف کلنی ها سیاه می شود (نصف یا بیشتر محیط سیاه می شود) مهار (جزئی تا کامل)، اطراف کلنی ها سیاه نمی شود
Bismuth sulfite agar	هوازی، ۴۸- ۲۴ ساعت، ۳۵°C	*S. typhi* (19430) *S. typhimurium* (14028) *E. coli* (25922) *E. faecalis* (29212)	رشد کلنی های سیاه یا درخشندگی رشد کلنی های سیاه یا خاکستری مایل به سبز، ممکن است درخشندگی داشته باشند مهار جزئی، کلنی های قهوه ای تا سبز مهار کامل رشد
Blood agar (BA)—nonselective sheep blood agar media	هوازی یا Co_2، ۲۴- ۱۸ ساعت، ۳۵°C	*S. pyogenes* (19615) *S. pneumoniae* (6305) *S. aureus* (25923) *E. coli* (25922)	رشد می کند همولیز بتا رشد می کند همولیز آلفا رشد می کند رشد می کند
Blood agar-CAMP test (trypticase soy agar [TSA] with sheep blood only)	هوازی، ۲۴- ۱۸ ساعت، ۳۵°C	*S. aureus* (33862) or (25923) *S. agalactiae* (12386) *S. pyogenes* (19615)	رشد می کند واکنش مثبت (تشکیل نوک پیکان شفاف) واکنش منفی (عدم تشکیل نوک پیکان)
Blood agar—Selective sheep blood agar media (Columbia [CNA] agar, phenylethyl alcohol [PEA] agar)	CNA، CO_2، ۴۸- ۲۴ ساعت، ۳۵°C PEA، CO_2، ۴۸- ۲۴ ساعت، ۳۵°C	*S. pyogenes* (19615) *S. pneumoniae* (6305) *S. aureus* (25923) *P. mirabilis* (12453) *S. pyogenes* (19615) *S. aureus* (25923) *P. mirabilis* (12453)	رشد می کند همولیز بتا رشد می کند همولیز آلفا رشد می کند مهار می شود (به طور جزئی) رشد می کند رشد می کند مهار می شود (به طور جزئی)
Blood culture media	بیهوازی، CO_2، ۵ روز، ۳۵°C هوازی، CO_2، ۵ روز، ۳۵°C	*B. fragilis* (25285) *S. pneumoniae* (6305)	رشد می کند رشد می کند
Brain heart infusion agar	هوازی، ۴۸- ۲۴ ساعت، ۳۵°C	*C. albicans* (10231) *S. flexneri* (12022) *S. pneumoniae* (6305)	رشد متوسط تا زیاد رشد متوسط تا زیاد رشد متوسط تا زیاد
Campylobacter agar	O_2 کاهش یافته، غنی شده با Co_2، ۴۸ ساعت، ۴۲°C	*C. jejuni* (33291) *E. coli* (25922)	رشد می کند مهار می شود (به طور جزئی)
Cary-Blair transport medium	هوازی، ۲۴- ۱۸ ساعت، ۲۵°C	*N. gonorrhoeae* (19424) *H. influenzae* (10211) *S. flexneri* (12022) *S. pneumoniae* (6305)	روی ساب کالچر (شکلات آگار) رشد می کند روی ساب کالچر (شکلات آگار) رشد می کند روی ساب کالچر (بلاد آگار) رشد می کند روی ساب کالچر (بلاد آگار) رشد می کند

[Type here]

محیط کشت	اتمسفر، مدت زمان و دمای انکوباسیون	ارگانیسم های کنترلی (شماره ATCC)	نتایج قابل انتظار
Chocolate agar	CO_2، ۴۸-۲۴ ساعت، ۳۵°C	*N. gonorrhoeae* (43069) *H. influenzae* (10211)	رشد می کند رشد می کند
DNase test agar	هوازی، ۲۴-۱۸ ساعت، ۳۵°C	*S. aureus* (25922) *S. marcescens* (8100) *S. pyogenes* (19615) *S. epidermidis* (12228) *K. pneumonia* (33495)	رشد خوب، ایجاد هاله رشد خوب، ایجاد هاله رشد خوب، ایجاد هاله رشد خوب، عدم ایجاد هاله رشد متوسط تا زیاد، عدم ایجاد هاله
Enrichment broths for enterics (gram-negative [GN] broth, selenite broths)	هوازی، ۲۴-۱۸ ساعت، ۳۵°C	*S. typhimurium* (14028) *S. sonnei* (9290) *E. coli* (25922)	روی سلب کالچر (مکانکی آگار) رشد می کند روی سلب کالچر (مکانکی آگار) رشد می کند (ممکن است روی محیط های دارای سلنیت مهار شود) مهار (جزئی تا کامل) بر روی سلب کالچر (مکانکی آگار)، اما از GN broth بر روی سلب کالچر رشد می کند
Eosin methylene blue media (Levine EMB agar; EMB agar, modified)	هوازی، ۲۴-۱۸ ساعت، ۳۵°C	*S. typhimurium* (14028) *E. coli* (25922) *E. faecalis* (29212)	رشد می کند، کلنی های بی رنگ تا کهربایی رشد می کند، کلنی های آبی- سیاه با جلای سبز فلزی مهار می شود (به طور جزئی)
Gelatin medium	هوازی، ۴۸-۱۸ ساعت یا تا ۲ هفته، ۳۵°C	*B. atrophaeus* (6633) *C. sporogenes* (11437) *E. coli* (25922)	رشد می کند، ژلاتیناز مثبت رشد می کند، ژلاتیناز مثبت رشد می کند، ژلاتیناز منفی
Hektoen enteric (HEK) agar	هوازی، ۲۴-۱۸ ساعت، ۳۵°C	*S. typhimurium* (14028) *S. flexneri* (12022) *E. faecalis* (29212) *E. coli* (25922)	رشد می کند، کلنی های آبی تا سبز- آبی با مراکز سیاه رشد می کند، کلنی های سبز تا سبز- آبی مهار می شود (به طور جزئی)، کلنی های زرد مهار (جزئی تا کامل)، کلنی های زرد تا زرد-قرمز
Kligler iron agar (KIA)	هوازی، ۲۴-۱۸ ساعت، ۳۵°C	*E. coli* (25922) *S. typhimurium* (14028) *S. flexneri* (12022) *P. aeruginosa* (27853)	A/A، ایجاد گاز Alk/A، با یا بدون گاز، ایجاد SH_2 Alk/A Alk/Alk
Loeffler medium	هوازی، ۹۶-۲۴ ساعت، ۳۵°C	*C. diphtheria* (51696) *P. aeruginosa* (10145)	رشد متوسط تا خوب، در بررسی میکروسکوپی، توده های متاکروماتیک و باسیل های زنجیره ای بدون اسپور، شکل چماقی متورم و برجسته دارد رشد کلنی های قهوه ای- سبز با پروتئولیز
Lysine iron agar (LIA)	هوازی، ۲۴-۱۸ ساعت، ۳۵°C	*S. arizonae* (13314) *C. freundii* (8454) *P. vulgaris* (9484)	Alk/Alk، ایجاد SH_2 Alk/A، با یا بدون SH_2 Red/A
MacConkey agar	هوازی، ۲۴-۱۸ ساعت، ۳۵°C	*E. coli* (25922) *P. mirabilis* (12453) *S. typhimurium* (14028) *E. faecalis* (29212)	رشد می کند، کلنی های صورتی رشد می کند، کلنی های بی رنگ، مهار جزئی سوارمینگ رشد می کند، کلنی های بی رنگ مهار می شود (به طور جزئی)
Malonate broth	هوازی، ۴۸-۲۴ ساعت، ۳۵°C	*E. aerogenes* (13048) *E. coli* (25922)	قلیایی (آبی) بدون تغییر رنگ (سبز) یا زرد (تخمیر دکستروز)

[Type here]

محیط کشت	اتمسفر، مدت زمان و دمای انکوباسیون	ارگانیسم های کنترلی (شماره ATCC)	نتایج قابل انتظار
Mannitol salt agar	هوازی، ۴۸- ۲۴ ساعت، ۳۵°C	*S. aureus* (25923) *S. epidermidis* (12228) *P. mirabilis* (12453)	رشد کلنی ها پس از ۴۸ ساعت هاله زرد دارند رشد کلنی ها پس از ۴۸ ساعت هاله قرمز دارند مهار جزئی در h ۲۴، مهار سوارمینگ در h ۴۸
Moeller decaboxylase broth with amino acids (Arginine, Ornithine and Lysin)	بیهوازی، ۹۶- ۲۴ ساعت، ۳۵°C	*K. pneumoniae* (33495) *E. cloacae* (13047)	دهیدرولاز آرژینین و دکربوکسیلاز اورنیتین: منفی (A) و دکربوکسیلاز لایزین: مثبت (Alk) دهیدرولاز آرژینین و دکربوکسیلاز اورنیتین: مثبت (Alk) و دکربوکسیلاز لایزین: منفی (A)
MR-VP broth	هوازی، ۴۸- ۲۴ ساعت، ۳۵°C	*E. coli* (25922) *E. aerogenes* (13048)	MR مثبت (قرمز) و VP منفی (بدون تغییر) MR منفی (زرد) و VP مثبت (قرمز)
Mycobacteria media (Lowenstein-Jensen agar and Middlebrook)	۳۵°C، ۲۱< روز، CO_2	*M. tuberculosis H37Ra* (25177) *M. kansasii* Group I (12478) *M. scrofulaceum* Group II (19981) *M. intracellulare* Group III (13950) *M. fortuitum* Group IV (6841) *E. coli* (25922)	رشد می کند رشد می کند رشد می کند - ممکن است روی محیط های انتخابی مهار شود رشد می کند- ممکن است روی محیط های انتخابی مهار شود رشد می کند مهار (جزئی تا کامل روی محیط های انتخابی)
Nitrate broth	هوازی، ۴۸ ساعت، ۳۵°C	*P. stutzeri* (17588) *A. calcoaceticus* (19606)	احیاء نیترات مثبت: تولید گاز احیاء نیترات منفی، عدم تولید گاز
Nonselective mycology media	هوازی، ≥ ۷۲ساعت، ۲۵-۳۵°C	*C. albicans* (60193 or 10231) *T. mentagrophytes* (9533)	رشد می کند رشد می کند
Nutrient agar (NA)	هوازی، ۴۸- ۲۴ ساعت، ۳۵°C	*P. aeruginosa* (10145) *S. flexneri* (12022) *S. aureus* (25923)	رشد متوسط تا زیاد ایجاد پیگمان سبز رشد متوسط تا زیاد رشد متوسط تا زیاد کلنی های کرم تا طلایی
Nutrient broth (NB)	هوازی، ۲۴- ۱۸ ساعت، ۳۵°C	*E. coli* (25922) *S. aureus* (25923)	رشد خوب رشد خوب
OF medium with Dextrose	هوازی، ۴۸- ۲۴ ساعت، ۳۵°C	*A. calcoaceticus* (19606) *E. aerogenes* (13048) *P. aeruginosa* (27853) *S. flexneri* (12022)	لوله بدون روغن: A (زرد) و لوله دارای روغن: Alk (سبز) لوله بدون روغن: A (زرد) و گاز و لوله دارای روغن: A (زرد) و گاز لوله بدون روغن: A (زرد) و لوله دارای روغن: Alk (سبز) لوله بدون روغن و لوله دارای روغن: A (زرد)
Phenol red agar/ broth with carbohydrates	هوازی، ۴۸- ۲۴ ساعت، ۳۵°C	*E. coli* (25922) *E. faecalis* (33186) *P. vulgaris* (8427) *P. aeruginosa* (10145) *S. typhimurium* (14028) *S. flexneri* (9199) *S. aureus* (25923)	دکستروز، لاکتوز و مانیتول: AG (اسید و گاز) دکستروز، لاکتوز و ساکاروز: A (اسید) دکستروز: A، مانیتول: Alk (قلیا) و ساکاروز: AG دکستروز: Alk لاکتوز و ساکاروز: Alk دکستروز و مانیتول: A، لاکتوز و ساکاروز: Alk مانیتول: AG
Phenylalanine agar	هوازی، ۲۴- ۱۸ ساعت، ۳۵°C	*P. vulgaris* (8427) *E. coli* (25922)	مثبت (ایجاد رنگ سبز) منفی (بدون تغییر رنگ)

[Type here]

محیط کشت	اتمسفر، مدت زمان و دمای انکوباسیون	ارگانیسم های کنترلی (شماره ATCC)	نتایج قابل انتظار
Salmonella-Shigella (SS) agar	هوازی، ۲۴ ساعت، ۳۵°C	*S. typhimurium* (14028) *S. flexneri* (12022) *E. faecalis* (29212) *E. coli* (25922)	رشد، کلنی های بی رنگ یا با بدون مراکز سیاه رشد می کند، کلنی های بی رنگ مهار می شود (به طور کامل) مهار می شود (جزئی تا کامل)، کلنی های صورتی تا قرمز یا رسوب)
Selective mycology media	هوازی، ≥ ۷ روز، ۲۵°C	*A. niger* (16404) *C. albicans* (10231) *T. mentagrophytes* (9533) *E. coli* (25922)	مهار (جزئی تا کامل) روی محیط های حاوی سیکوهگزیماید رشد می کند رشد می کند مهار (جزئی تا کامل) روی محیط های حاوی کلرامفنیکل
Selective media for pathogenic *Neisseria* spp.	CO_2، ۴۸-۲۴ ساعت، ۳۵°C	*N. gonorrhoeae* (43069) *P. mirabilis* (43071) *S. epidermidis* (12228)	رشد می کند مهار (جزئی) فقط برای محیط های حاوی تری متوپریم استفاده شود مهار می شود (به طور جزئی)
Selective media for enterococci, with azide	هوازی، ۴۸-۲۴ ساعت، ۳۵°C	*E. faecalis* (29212) *S. pyogenes* (19615) *E. coli* (25922)	رشد می کند، سیاه شدن اطراف کلنی ها مهار می شود (به طور جزئی تا کامل) مهار (جزئی)- کلنی های بی رنگ روی بابل اسکولین آگار
Selective media for enterococci, without azide	هوازی، ۴۸-۲۴ ساعت، ۳۵°C	*E. faecalis* (29212) *S. pyogenes* (19615)	رشد می کند، سیاه شدن اطراف کلنی ها مهار می شود (به طور جزئی تا کامل)
SIM medium	هوازی، ۴۸-۲۴ ساعت، ۳۵°C	*E. coli* (25922) *S. typhimurium* (13311) *S. sonnei* (9290)	تولید SH_2 منفی، اندول مثبت و حرکت مثبت تولید SH_2 مثبت، اندول منفی و حرکت مثبت تولید SH_2 منفی، اندول منفی و حرکت منفی
Simmons citrate agar	هوازی، ۹۶-۴۸ ساعت، ۳۵°C	*E. aerogenes* (13048) *E. coli* (25922)	رشد می کند، سطح شیب دار آبی می شود فاقد رشد تا رشد کم، بدون تغییر رنگ
Thioglycollate broth, with or without indicator	هوازی، ۴۸ ساعت (در پیچ های محکم)، ۳۵°C	*B. fragilis* (25285) *S. aureus* (25923)	رشد می کند رشد می کند
Thioglycollate broth, enriched with vitamin K and hemin	هوازی، ۴۸ ساعت (در پیچ های محکم)، ۳۵°C	*P. anaerobius* (27337) *B. vulgatus* (8482) *C. perfringens* (13124)	رشد می کند رشد می کند رشد می کند
Thiosulfate citrate bile salts sucrose (TCBS) agar	هوازی، ۲۴-۱۸ ساعت، ۳۵°C	*V. cholerae* (9459) *V. parahaemolyticus* (17802) *E. coli* (25922) *P. aeruginosa* (10145) *E. faecalis* (29212)	رشد متوسط تا زیاد، کلنی های زرد رشد متوسط تا زیاد، کلنی های سبز آبی مهار جزئی یا کامل، کلنی های کوچک و شفاف مهار جزئی یا کامل، کلنی های سبز آبی مهار جزئی یا کامل، کلنی های کوچک و زرد
Triple sugar iron (TSI) agar	هوازی، ۲۴-۱۸ ساعت، ۳۵°C	*E. coli* (25922) *S. typhimurium* (14028) *S. flexneri* (12022) *P. aeruginosa* (27853)	A/A، ایجاد گاز Alk/A، با یا بدون گاز، ایجاد SH_2 Alk/A Alk/Alk

[Type here]

محیط کشت	اتمسفر، مدت زمان و دمای انکوباسیون	ارگانیسم های کنترلی (شماره ATCC)	نتایج قابل انتظار
Trypticase soy agar (TSA)	هوازی، ۴۸- ۲۴ ساعت، ۳۵°C	*S. flexneri* (12022) *S. aureus* (25923) *E. coli* (25922)	رشد می کند کلنی های متوسط تا بزرگ سفید مایل به خاکستری و کمی محدب موکوئیدی رشد می کند کلنی های متوسط تا بزرگ مات منور، کامل با پیگمان کرم- زرد تا طلایی رشد می کند
Tubed media (brain heart infusion and tryptic soy broth)	هوازی، ۲۴- ۱۸ ساعت، ۳۵°C	*E. coli* (25922) *S. aureus* (25923)	رشد می کند رشد می کند
Urea agar/ broth	هوازی، ۴۸- ۸ ساعت، ۳۵°C	*P. vulgaris* (8427) *S. typhimurium* (13311)	اوره آز مثبت، رنگ قرمز صورتی اوره آز منفی، بدون تغییر رنگ
Xylose lysine desoxycholate (XLD) agar	هوازی، ۲۴ ساعت، ۳۵°C	*S. typhimurium* (14028) *S. flexneri* (12022) *E. faecalis* (29212) *E. coli* (25922)	رشد می کند کلنی های قرمز با مراکز سیاه رشد می کند کلنی های قرمز با مراکز سیاه مهار جزئی مهار می شود (جزئی تا کامل) کلنی های زرد تا زرد- قرمز)

منابع:

۱- محیط های کشت آزمایشگاهی (موارد مصرف و کنترل کیفی) به انضمام اطلس رنگی محیط های کشت؛ گردآوری و ترجمه مهناز صارمی، محمد علی صارمی؛ آزمایشگاه مرجع سلامت، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی؛ ۱۳۸۷

2- Quality Assurance for commercially prepared Microbiological Culture Media- Second Edition; Approved standard- Third edition document M22-A3. Vol. 24, No. 19; 2006.

3- Oxoid company- General Guide to the use of Oxoid culture Media.

4- Microbiological culture media; second Edition; 2009; Becton, Dickinson and Company.

آزمایشگاه مرجع سلامت	آزمایشگاه رفرانس بخش میکروب شناسی آزمایش رنگ آمیزی گرم	صفحه ۱ از 14

۱- هدف:

رنگ آمیزی گرم برای طبقه بندی باکتری ها بر اساس شکل، اندازه، مرفولوژی سلول و واکنش گرم آنها در آزمایشگاه میکروب شناسی پزشکی استفاده می شود. همچنین به عنوان آزمایش کلیدی و بسیار مهم برای تشخیص احتمالی عوامل عفونت و بررسی کیفیت نمونه های بالینی به کار می رود.

۲- دامنه کاربرد:

این دستورالعمل در بخش میکروب شناسی آزمایشگاه کاربرد دارد.

۳- اصول:

این آزمایش در ابتدا در سال ۱۸۸۴ توسط Christian Gram پایه گذاری شد. در سال ۱۹۲۱ توسط Hucker برای باکتری شناسی عمومی اصلاح شد، که معرف ها پایداری بیشتری داشته و افتراق ارگانیسم ها بهتر انجام می شود. اصلاحات دیگری به صورت اختصاصی برای رنگ آمیزی بی هوازی ها (Kopeloff's modification) و برای باسیل های گرم منفی که به صورت ضعیف رنگ آمیزی می شوند (*Legionella* spp., *Campylobacter* spp., *Brucella* spp.) با استفاده از کربول فوشین یا فوشین بازی انجام شده است. در واقع بسیاری از آزمایشگاه ها از این رنگ ها به طور معمول استفاده می کنند، به خصوص برای اسمیر مستقیم نمونه های بالینی.

باکتری ها بر اساس تفاوت در ساختمان و ترکیب دیواره سلولی، گرم مثبت یا گرم منفی رنگ می گیرند. گونه های گرم مثبت دارای لایه ضخیم پپتیدوگلیکان و مقدار زیادی اسید تیکونیک هستند و اگر دیواره سلولی آنها در اثر سن، عوامل ضد میکروبی یا دیگر فاکتورها آسیب ندیده باشد، به وسیله الکل، بی رنگ نشده و به رنگ بنفش تیره اولیه باقی می مانند. گونه های گرم منفی دارای تک لایه پپتیدوگلیکان هستند. پپتیدوگلیکان به یک غشاء خارجی دو لایه لیپوساکارید-فسفولیپید که به صورت پراکنده در آن پروتئین وجود دارد، متصل است. غشاء خارجی به وسیله الکل، تخریب شده، ترکیب کریستال ویوله و ید خارج شده و به وسیله رنگ دیگر جایگزین می شود.

این آزمایش علاوه بر واکنش رنگ آمیزی گرم، اندازه، شکل و آرایش سلول باکتریایی را بررسی می کند. این خصوصیات ممکن است تحت تأثیر عوامل متعددی شامل سن کشت، محیط کشت، شرایط محیط انکوباسیون، روش های رنگ آمیزی و وجود مواد مهارکننده قرار گیرد. برای تفسیر اسمیر تهیه شده از نمونه های بالینی نیز شرایط مشابه به کار می رود، اما عوامل دیگری مثل وجود انواع سلول های میزبان و فاگوسیتوز نیز مؤثر می باشند.

۴- نمونه:

- ✓ نمونه های بالینی عموماً شامل سواب حلق، سواب بینی، خلط بیماران مبتلا به فیبروز سیستیک، مایعات استریل بدن، مدفوع و پروتزهای مصنوعی می باشد. لام مستقیم برای نمونه های زخم، جراحات چشم، بافت های بدن و ترشحات خاص بسیار مفید است.
- ✓ کشت های مایع و کشت های خون برای تعیین رشد یا مرفولوژی باکتری ها
- ✓ کلنی های رشد کرده روی محیط کشت جامد
- توجه: تهیه اسمیر از کشت های تازه (کمتر از ۲۴ ساعت) روی محیط های غیر مهار کننده و نمونه های بالینی تازه، صحیح ترین نتیجه را می دهند. زمانی که مرفولوژی مهم است (مانند استرپتوکک ها و باسیل های گرم مثبت)، کشت های مایع ارجحیت دارد.
- ✓ برای جمع آوری نمونه به دستورالعمل های مربوطه برای هر نوع نمونه مراجعه شود.

آزمایشگاه مرجع سلامت	آزمایشگاه رفرانس بخش میکروب شناسی آزمایش رنگ آمیزی گرم	صفحه 2 از 14

- ✓ عموماً اسمیر در آزمایشگاه تهیه می شود، اما زمانی که انتقال آن با تأخیر صورت گیرد، یا ماده نگهدارنده به نمونه اضافه شود، اسمیر را آماده نموده و لام را به آزمایشگاه ارسال نمایید.
- ✓ **معیارهای رد نمونه:** رنگ آمیزی گرم برای اسمیر مستقیم مدفوع، خون یا خلط، ارزش کمی داشته و همچنین برای خلط بیماران مبتلا به فیبروز سیستیک کاربردی ندارد.

۵- معرف ها، لوازم و تجهیزات:

A. معرف ها:

a) کریستال ویوله

b) ید گرم

c) رنگ برها

- ✓ رنگ بر آهسته: اتانول ۹۵٪
- ✓ رنگ بر متوسط: استون ـ الکل: مخلوطی از اتانول ۹۵٪ و استون (Reagent grade) از هر کدام ۵۰ ml در بطری شیشه ای قهوه ای رنگ ریخته، با یک سال تاریخ انقضاء برچسب زده و در دمای اتاق نگهداری کنید.
- ✓ رنگ بر سریع: استون (Reagent grade)
- توجه: اتانول و استون قابل اشتعال هستند.

d) رنگ کننده ها:

- ✓ سافرانین
- ✓ جایگزین: فوشین بازی (۰/۸، ۰/۱ یا ۰/۲ درصد)

معرف ها ممکن است به صورت آماده مصرف تجاری، خریداری و یا در آزمایشگاه تهیه شوند. حجم زیادی از معرف ها را تهیه کرده و به اندازه نیاز، محلول کاری آماده نمایید. برای مصرف روزانه، معرف ها را در بطری های کوچک تر بریزید، اما برای دوری از ایجاد رسوب روی لام، بطری های کوچک تر کریستال ویوله و رنگ برها باید هر ماه جایگزین شوند.

- توجه: نام معرف، تاریخ آماده سازی، تاریخ استفاده، شماره ساخت، تاریخ انقضاء و شرایط نگهداری روی بطری و در برگه کاری مشخص شود. اگر تاریخ استفاده به طور واضح روی بطری های ذخیره و در برگه های کاری کنترل ثبت شده باشد، نیازی به برچسب گذاری بطری های کاری با این مشخصات نیست، به غیر از نام معرف.

B. لوازم:

- ✓ قلم الماس
- ✓ لام شیشه ای
- ✓ NaCl ۰/۸۵٪ استریل
- ✓ (نرمال سالین)، آب یا براث
- ✓ لوپ یا نیدل
- ✓ لوازم برای دور ریختن پسماند بیولوژیک مثل وسایل نوک تیز و برنده
- ✓ پنس
- ✓ چراغ گازی
- ✓ روغن ایمرسیون

آزمایشگاه مرجع سلامت	آزمایشگاه رفرانس بخش میکروب شناسی آزمایش رنگ آمیزی گرم	صفحه 3 از 14

۶- روش انجام آزمایش:

A. تهیه اسمیر

از یک لایه ارگانیسم با غلظت کافی اما با تراکم کم به گونه ای که خصوصیت آرایش میکروارگانیسم مشخص باشد، برای تهیه اسمیر مستقیم استفاده کنید. از لام های شیشه ای نو و تمیز استفاده نمایید.

- توجه: زمانی که از یک پی پت یا سواب برای تهیه اسمیر و تلقیح محیط کشت استفاده می کنید، همیشه قبل از تهیه اسمیر، ابتدا محیط کشت را تلقیح کنید.

نمونه های بالینی

a) مایعات بدن، BAL و CSF

۱) ۵ یا ۶ قطره از نمونه به اضافه ۱ قطره فرمالین ۳۷٪ را در Cytospin Slide Centrifuge سانتریفوژ کنید.

- توجه: برای مایعات غلیظ بدن از Cytospin Slide Centrifuge استفاده کنید، که باعث افزایش حساسیت رنگ آمیزی گرم، کاهش زمان سانتریفوژ و آزمایش و در نهایت نتیجه سریع تر می گردد.

۲) به عنوان یک روش جایگزین، زمانی که نمونه غلیظ یا کدر باشد یا مقدار نمونه کافی نباشد، ۱ یا ۲ قطره نمونه را به وسیله پی پت پاستور مستقیماً روی لام قرار دهید. سپس جای قطره را با قلم الماس مشخص کنید. اجازه دهید قطره ها یک قطره بزرگ تشکیل دهند. مایع را روی لام پخش نکنید. در صورت نیاز برای افزایش غلظت مایع مورد آزمایش، یک قطره دیگر از نمونه را روی همان اسمیر اضافه کنید.

b) نمونه های ادرار

۱) ۱۰ میکرولیتر از ادرار که به خوبی مخلوط شده، بدون سانتریفوژ نمودن روی لام شیشه ای قرار دهید. سپس جای قطره را با قلم الماس مشخص کنید.

۲) قطره را پخش نکنید و اجازه دهید قطره در مجاورت هوا خشک شود.

c) نمونه های فرستاده شده روی سواب

ترجیحاً باید یک سواب جدا برای رنگ آمیزی گرم فرستاده شود.

۱) جهت جلوگیری از تخریب عناصر سلولی و از بین رفتن آرایش باکتریایی، به آرامی سواب را در طول لام بچرخانید.

۲) در مواردی که فقط یک سواب فرستاده شده، سواب را در مقدار کمی سالین یا محیط مایع قرار داده و در لوله را بسته و آن را ورتکس کنید. سواب را به دیواره داخلی لوله فشرده، و آن را برای تهیه اسمیر استفاده کنید. باقیمانده سوسپانسیون را برای تلقیح محیط کشت استفاده کنید.

d) نمونه هایی که روی سواب فرستاده نمی شوند، شامل آسپیره ها، ترشحات، خلط و غیره

(۱) نمونه را روی یک لام تمیز قرار دهید

a) اگر نمونه داخل یک سرنگ ارسال شده است، ابتدا همه محیط های کشت را تلقیح کنید و سپس مقدار کمی از آن را روی لام قرار دهید.

آزمایشگاه مرجع سلامت	آزمایشگاه رفرانس بخش میکروب شناسی آزمایش رنگ آمیزی گرم	صفحه 4 از 14

- توجه: به کارکنان مربوطه آموزش دهید که در مورد نمونه هایی که با سرنگ ارسال می شود، قبل از ارسال، سوزن را از روی سرنگ بردارند.

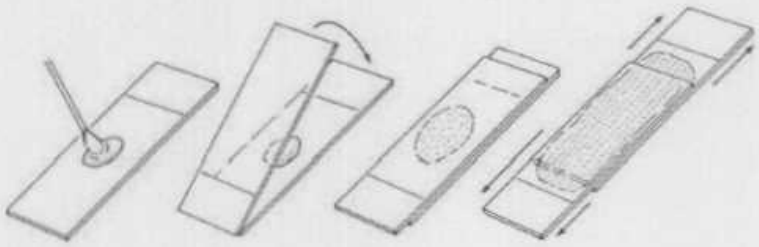
b) با استفاده از یک اپلیکاتور چوبی یا پی پت یا لوپ سیمی استریل، قسمت های چرکی یا خونی رنگ نمونه را انتخاب کنید.

c) نمونه را روی ناحیه بزرگی از لام پهن کنید تا لایه نازکی ایجاد شود.

(۲) برای نمونه های خیلی غلیظ یا چرکی

a) برای تهیه آسان تر اسمیر، نمونه را در یک قطره سالین روی لام رقیق کنید.

b) به عنوان یک روش جایگزین، نمونه را روی لام قرار داده، یک لام دیگر را روی آن قرار دهید. لام ها را روی یکدیگر فشار داده و مطابق شکل زیر لام را با کشیدن در دو جهت مخالف، از یکدیگر جدا کنید. مواد اضافی روی لام را با دستمال آغشته به محلول ضد عفونی کننده، بردارید.



c) مواد خشک یا نمونه های بالینی به مقدار خیلی کم

۱) نمونه را در ۰/۵ ml مایع استریل حل کنید. در صورت نیاز ورتکس نمایید.

۲) با استفاده از پی پت پاستور استریل، یک قطره از نمونه را روی لام قرار دهید.

۳) با استفاده از نوک پی پت قطره را پخش کنید تا لایه نازکی ایجاد شود.

کشت های مایع

روی هر اسلاید فقط یک اسمیر آماده کنید.

a) با استفاده از پی پت پاستور استریل (یا سوزن خلأ، برای ظروفی مثل بطری های کشت خون، جهت جلوگیری از آلودگی با سوزن و سرنگ) ۱ تا ۲ قطره روی لام قرار دهید.

b) قطره را پخش کنید تا لایه نازکی ایجاد شود.

کلنی از محیط های کشت جامد

a) یک قطره سالین یا آب استریل روی لام قرار دهید. آب مقطر ممکن است مرفولوژی طبیعی ارگانیسم های حساس را از بین ببرد.

b) مقدار کمی از کلنی را با یک اپلیکاتور چوبی، نیدل سیمی یا لوپ استریل بردارید.

c) به آرامی آن را در قطره مخلوط کنید. اسمیر باید کمی کدر و یکنواخت باشد. اگر خطوط حلقوی در اسمیر خشک شده مشاهده شود، یا تلقیح خیلی غلیظ بوده، یا قطره سالین خیلی کوچک بوده، و/یا اسمیر در ناحیه خیلی کوچکی پخش شده است.

B. فیکس کردن اسمیر

لام ها را در مجاورت هوا در هود ایمنی بیولوژیک یا روی گرم کننده اسلاید در دمای ۶۰°C خشک کنید.

۱- خشک کردن با حرارت

a) اسلاید های خشک شده را دو یا سه بار از روی شعله بگذرانید یا برای ۵ تا ۱۰ ثانیه در مقابل میکروواینسینریتور نگه دارید. برای جلوگیری از تغییر شکل سلول ها، از حرارت زیاد اجتناب نمایید.

c) بگذارید لام قبل از رنگ آمیزی خنک شود.

۲- به عنوان روش جایگزین لام را با متانول فیکس کنید. متانول مانع از لیز RBC ها می شود. از تخریب سلول های میزبان جلوگیری می کند، زمینه واضح تر می شود و مانع از شسته شدن نمونه های مایع می شود.

a) روی یک اسمیر خشک شده، چند قطره متانول به مدت ۱ دقیقه بریزید. متانول باقیمانده را بدون آبکشی از لام دور بریزید و اجازه دهید تا لام در مجاورت هوا خشک شود.

b) قبل از رنگ آمیزی از حرارت استفاده نکنید.

C. روش انجام رنگ آمیزی

برای مقایسه روش ها به جدول ۱ مراجعه نمایید.

- توجه: رنگ ها، آب یا رنگ برها را مستقیماً روی اسمیر نریزید. قطره های معرف را نزدیک انتهای لام ریخته و اجازه دهید معرف روی سطح اسمیر را بپوشاند.

❖ روش Hucker

- توجه: از این روش به طور گسترده ای در کارهای روتین استفاده می شود. استون- الکل نتایج سازگاری می دهد، اما اتانول ۹۵٪ برای دانشجویان و کارکنان کم تجربه ارجح است. استون یک رنگ بر سریع است و فقط برای کارکنان با تجربه پیشنهاد می شود. استفاده از استون- الکل برای نمونه های حاوی تعداد زیادی از سلول های میزبان مفیدتر واقع می شود.

a) اسمیر فیکس شده را با محلول کریستال ویوله بپوشانید. اجازه دهید رنگ به مدت ۳۰ ثانیه باقی بماند.

b) کریستال ویوله را دور بریزید و لام را به آرامی با آب شیر آبکشی کنید.

- توجه: آبکشی زیاد در این مرحله می تواند باعث شسته شدن کریستال ویوله از سلول های گرم مثبت شود.

c) آب اضافه را با محلول ید، شسته و سپس لام را با محلول ید بپوشانید. اجازه دهید ید به مدت ۳۰ ثانیه باقی بماند.

d) ید را دور بریزید و لام را به آرامی با آب شیر آبکشی کنید.

آزمایشگاه مرجع سلامت	آزمایشگاه رفرانس بخش میکروب شناسی آزمایش رنگ آمیزی گرم	صفحه 6 از 14

e) در حالی که لام را به صورت زاویه دار (کج) نگه داشته اید، استون- الکل را روی اسمیر بریزید. زمانی که رنگ خارج شده از روی لام کمرنگ شد، این مرحله را متوقف کنید. زمان رنگ بری را بر اساس ضخامت اسمیر و نوع رنگ ر مورد استفاده تنظیم کنید.

f) لام را با آب شیر آبکشی کنید.

g) لام را با سافرانین بپوشانید و اجازه دهید حداقل ۳۰ ثانیه و اگر از رنگ های فوشین استفاده می شود، یک دقیقه یا بیشتر روی لام بماند. در این مرحله می توانید یکی از رنگ های زیر را استفاده کنید:

- ✓ سافرانین
- ✓ فوشین بازی ۰/۱ تا ۰/۲ درصد
- ✓ کربول فوشین یا فوشین بازی ۰/۱ تا ۰/۸ درصد برای ارگانیسم های گرم منفی که کمرنگ رنگ می شوند.

h) رنگ را دور بریزید و لام را به آرامی با آب شیر آبکشی کنید.

i) آب اضافی را خارج کرده و لام را به صورت عمودی قرار دهید تا در مجاورت هوا خشک شود یا از خشک کننده لام تجاری استفاده نمایید.

j) اسمیر را از نظر میکروسکوپی بررسی کنید.

❖ روش Kopeloff

این روش برای مشاهده و افتراق بهتر باکتری های بی هوازی پیشنهاد می شود که ممکن است با روش Hucker به آسانی و خیلی زیاد تحت تأثیر رنگ بر، رنگ خود را از دست داده و کمرنگ رنگ بگیرند. این روش همچنین برای اسمیرهای واژن در تشخیص واژینوزیس باکتریایی پیشنهاد می شود. (برای انجام رنگ آمیزی به روش Kopeloff و روش استفاده از کربول فوشین به جدول ۱ مراجعه نمایید).

جدول ۱- روش های رنگ آمیزی گرم، معرف های پیشنهادی، زمان های رنگ آمیزی و موارد استفاده

Stain and use	Hucker's		Carbol fuchsin		Kopeloff's	
	Reagent	Time	Reagent	Time	Reagent	Time
Initial stain	Crystal violet	30 s	Crystal violet	30 s	Alkaline crystal violet: Blood with solution A; add 5 drops of solution B	2–3 min
Iodine	Gram's iodine	30 s	Gram's iodine	30 s	Kopeloff's iodine	≥2 min
Decolorizer	Acetone-alcohol	~1–5 s	95% ethanol	~30 s	3:7 acetone-alcohol; rinse immediately after applying	
Counterstain	Safranin*	30 s	Carbol fuchsin or 0.8% basic fuchsin	≥1 min	Kopeloff's safranin	10–30 s
Recommended use	General bacteriology		*Bacteroides* spp. *Fusobacterium* spp. *Legionella* spp. *Campylobacter* spp. *Brucella* spp. and other faintly staining gram-negative organisms		Anaerobes Diagnosis of bacterial vaginosis (Appendix 3.2.1–3)	

* Or, preferably, use 0.1 to 0.2% basic fuchsin as a counterstain (7).

D. برای دور ریختن اسمیر رنگ شده، آن را به عنوان پسماند بیولوژیک و تیز در نظر گرفته، و در safety box بریزید.

آزمایشگاه مرجع سلامت	آزمایشگاه رفرانس بخش میکروب شناسی آزمایش رنگ آمیزی گرم	صفحه 7 از 14

E. گزارش نتایج:

اسمیر رنگ شده را با عدسی روغنی (۱۰۰×) میکروسکوپ مشاهده کنید. میکروارگانیسم ها را از نظر وجود در اسمیر و مرفولوژی بررسی نمایید.

۱. واکنش گرم

a) گرم مثبت: بنفش تیره

b) گرم منفی: صورتی یا قرمز (رنگ های کربول فوشین پر رنگ ترند).

c) گرم متغیر: هم سلول های گرم مثبت و هم گرم منفی با یک مرفولوژی

- توجه: واکنش گرم متغیر ممکن است ناشی از ضخامت غیر یکنواخت اسمیر، رنگ بری ناکامل، رنگ بری زیاد، وجود سلول های کهنه، تخریب دیواره سلولی یا طبیعت گرم متغیر بودن ارگانیسم های خاص باشد.

۲. مرفولوژی باکتری ها:

a) گرم مثبت

- ✓ کوکسی های جفت (و زنجیره ای)
- ✓ کوکسی خوشه ای
- ✓ باسیل های بزرگ
- ✓ باسیل های کوچک
- ✓ باسیل های شاخه ای
- ✓ باسیل های کورینه فرم

b) گرم منفی

- ✓ دیپلوکک
- ✓ باسیل
- ✓ باسیل، رشته ای (یا پلی مرفیک)

c) گرم متغیر: کوکوباسیل

d) سلول های مخمر

e) هیف کاذب (Pseudohyphae)

برای مشاهده خصوصیات مرفولوژی و واکنش گرم میکروارگانیسم های گرم مثبت، گرم منفی و سایر میکروارگانیسم هایی که ممکن است در اسمیرهای مستقیم بعضی نمونه های بالینی دیده شود، به جداول ۲، ۳ و ۴ مراجعه نمایید.

آزمایشگاه مرجع سلامت	آزمایشگاه رفرانس بخش میکروب شناسی آزمایش رنگ آمیزی گرم	صفحه 8 از 14

جدول ۲- میکروارگانیسم های گرم مثبت مشاهده شده در اسمیرهای مستقیم بعضی نمونه های بالینی

Organism(s)	Gram stain morphology	Frequent sources	Comments and additional tests or media that may be included
Actinomyces spp.	Thin, beaded, branched gram-positive filaments; may be within sulfur granules with peripheral clubs	Cervicofacial, thoracic, abdominal, and pelvic abscesses and drainages; pleural fluid; bronchial washings	Modified acid-fast stain; if sulfur granules present, wash and crush in THIO
Nocardia spp.	Long, thin, branching, beaded, gram-positive or irregularly staining bacilli; in culture smears, may be pleomorphic with branching and coccoid forms	Sputum, bronchial washings, biopsy material, purulent exudates, CSF, blood	Modified acid-fast stain; if mixed microbiota, mycobacterial decontamination procedures may be used; plate incubated at 45°C may enhance recovery; use CYE+ or Thayer-Martin agar.
Mycobacterium spp.	Gram-positive beaded or gram-neutral bacilli; often found inside macrophages; bacilli may be short to long, banded or beaded, and/or slightly curved; some species appear pleomorphic and coccoid	Respiratory tract, urine, blood, biopsy material, CSF	Confirm with acid-fast stain. Add AFB culture.
Corynebacterium spp.	Gram-positive pleomorphic, club shaped, irregularly staining bacilli or coccobacilli with palisading and/or angular arrangements	Blood, tissue aspirates, skin lesions, wounds, indwelling catheters, prosthetic heart valves, upper and lower respiratory tracts	Add selective and differential media for *Corynebacterium diphtheriae*, if suspected.
C. jeikeium	Often small coccobacilli resembling streptococci		
Propionibacterium spp.	Gram-positive, very pleomorphic "diphtheroid" forms that may branch	Blood, CSF, other body fluids, skin lesions	Common skin contaminant during needle aspiration
Listeria monocytogenes	Gram-positive small to medium coccobacilli that may be pleomorphic; occur in short chains or palisades; may be confused with corynebacteria or enterococci	CSF, blood, amniotic fluid, placental or fetal tissue	Direct wet mount for tumbling motility; if mixed microbiota, cold enrichment may be used
Erysipelothrix rhusiopathiae	In tissue, long, slender, gram-positive bacilli; in blood, small "coryneforms"	Skin lesions, biopsy material, tissue aspirates, blood	Associated with occupational or animal contact
Lactobacillus spp.	Medium, straight, uniform gram-positive bacilli with rounded ends; may form chains or spirals; sometimes short and coccobacillary	Usually involved in mixed infections; rarely from blood, CSF	Recovery may be improved by anaerobic incubation; normal vaginal, mouth, and gastrointestinal tract microbiota
Bacillus spp.	Medium to large square-ended gram-positive bacilli with parallel sides with or without spores; some species have spores that swell sides; may stain gram variable or gram negative with age	May be clinically relevant from any source in compromised patient or intravenous-drug abuser; also intraocular	Frequent culture contaminants; may cause ocular infections

آزمایشگاه مرجع سلامت	آزمایشگاه رفرانس بخش میکروب شناسی آزمایش رنگ آمیزی گرم	صفحه 9 از 14

جدول ۲- میکروارگانیسم های گرم مثبت مشاهده شده در اسمیرهای مستقیم بعضی نمونه های بالینی (ادامه)

Organism(s)	Gram stain morphology	Frequent sources	Comments and additional tests or media that may be included
Clostridium perfringens	Gram-positive large "boxcars" with no spores; may stain gram negative	Blood, wounds, intra-abdominal	Add egg yolk agar incubated anaerobically; absence of inflammatory cells may indicate clostridial myonecroses; normal gastrointestinal tract microbiota
Clostridium spp.	Gram-positive, -variable, or -negative bacilli with or without spores; bacilli may be large, slender and short, or long; sometimes form coils; often smaller than *Bacillus* spp.	Blood, intra-abdominal, wounds, abscesses	Normal gastrointestinal and genital tract microbiota
S. pneumoniae	Gram-positive cocci in pairs, lancet shapes, short chains	Lower respiratory tract, blood, CSF, sterile fluids	Quellung test may be used on selected clinical specimens.
Enterococcus spp.	Gram-positive cocci in pairs, short chains; may resemble pneumococci	Urine, wounds, blood, intra-abdominal abscesses	Normal gastrointestinal tract microbiota; common cause of superinfections in patients treated with expanded-spectrum cephalosporins
Streptococcus spp.	Round to oval gram-positive cocci, occasionally elongated; in pairs and/or short to long chains; nutritionally variant streptococci often seen as highly pleomorphic, gram-variable to gram-negative coccobacilli with pointed ends and spindle shapes	Blood, CSF, respiratory tract, multiple other sources	May be difficult to distinguish from corynebacteria and lactobacilli
Aerococcus viridans	Gram-positive cocci in pairs, tetrads, clusters	Blood, CSF	
Staphylococcus spp.	Gram-positive cocci in pairs, tetrads, clusters	Abscesses, drainages, wounds, respiratory tract, blood, tissue, sterile fluids, indwelling catheters	Normal microbiota, especially skin, nares
S. aureus	May often be characterized by very uniform, geometric clusters of small cocci, whereas coagulase-negative species are often irregular and more pleomorphic, with greater size variation		
Rothia mucilaginosa	Large gram-positive cocci in pairs, tetrads	Blood in compromised patients, peritoneal dialysates	Normal oral microbiota

*CYE, charcoal-yeast extract agar.

آزمایشگاه مرجع سلامت	آزمایشگاه رفرانس بخش میکروب شناسی آزمایش رنگ آمیزی گرم	صفحه 10 از 14

جدول ۳- میکروارگانیسم های گرم منفی مشاهده شده در اسمیرهای مستقیم بعضی نمونه های بالینی

Organism(s)	Gram stain morphology	Frequent sources	Comments
Enterobacteriaceae	Straight thick bacilli; short to medium length with rounded ends; antimicrobial agent-affected organisms may be pleomorphic, filamentous, and/or irregularly staining	Urinary tract, multiple other sources	Includes organisms that cause gastroenteritis and bacterial dysentery; also normal gastrointestinal tract microbiota; nosocomial strains may be multiply resistant to antimicrobial agents
Pseudomonas spp.	Thin bacilli; medium length to long with rounded to pointy ends; often in pairs; antimicrobial agent-affected organisms may appear filamentous, coiled, and/or pleomorphic	Lower respiratory tract, wounds, eyes, multiple sites in compromised patients	Nosocomial strains may be multiply resistant to antimicrobial agents
Haemophilus spp., *Pasteurella* spp., fastidious gram-negative bacilli	Small coccoid to bacillary forms; pleomorphic; often with filamentous forms; may be faintly staining	Blood, sterile fluid (including CSF), lower respiratory tract, abscesses, wounds, eyes, genital tract	Inoculate CHOC
Legionella spp.	Pleomorphic slender bacilli of variable lengths that may stain pale; may not take stain in clinical specimens	Lower respiratory tract	Add special growth media; direct fluorescent antibody stains and molecular probes available; acid wash method may be used to enhance recovery from specimens with mixed microbiota
Fusobacterium nucleatum, *Capnocytophaga* spp.	Long slender bacilli with tapered to pointed ends; "needlelike"; may be in pairs, end to end, or filamentous	Respiratory tract, wounds, blood, abscesses	Endogenous microbiota
Fusobacterium necrophorum, *Fusobacterium mortiferum*, or *Fusobacterium varium*	Highly pleomorphic bacilli with rounded to tapered ends; pale and irregularly staining, with bizarre forms and round bodies	Wounds, blood, abscesses	Endogenous microbiota
Bacteroides spp.	Pleomorphic straight bacilli with possible irregular to bipolar staining	Wounds, blood, abscesses	Direct fluorescent antibody stain available; endogenous microbiota
Vibrio spp.	Slightly curved to straight bacilli	Stool, wounds	If mixed microbiota, selective medium (TCBS) recommended
Campylobacter spp. (*Helicobacter* spp.)	Thin, curved bacilli, including S shapes, gull wings, and long spiral forms	Stool, blood, gastric biopsy samples	Microaerophilic or capnophilic atmosphere required; if mixed microbiota, 42°C incubation recommended for recovery of thermophilic species
Acinetobacter spp.	Medium to large cocci in pairs; occasionally coccoid, bacillary, and filamentous forms; often resistant to decolorization	Urine, lower respiratory tract, blood, sterile fluids, wounds, abscesses, tissues, stool	Multiple sites in compromised patients
Neisseria spp., *Moraxella catarrhalis*	Medium to large cocci in pairs and tetrads, coffee bean shaped; no bacilli seen	Genital tract, urine, lower respiratory tract, blood, sterile fluids, wounds, abscesses	If mixed microbiota, selective medium may be used to enhance recovery of *Neisseria gonorrhoeae*
Veillonella spp.	Tiny cocci in sheets or clumps	Wounds, blood	Endogenous microbiota

آزمایشگاه مرجع سلامت	آزمایشگاه رفرانس بخش میکروب شناسی آزمایش رنگ آمیزی گرم	صفحه 11 از 14

جدول ۴- سایر میکروارگانیسم های مشاهده شده در اسمیرهای مستقیم بعضی نمونه های بالینی

Organism(s)	Gram stain morphology	Frequem sources	Comments
Pneumocystis carinii	Gram-negative spherical cysts (5–7 μm) often containing rosette of eight gram-negative intracystic bodies, or cluster of gram-negative cysts surrounded by halos in background of amorphous gram-negative material	Open lung and transtracheal biopsy materials, bronchial washings and lavage specimens, sputum	Confirm with Grocott methenamine-silver, toluidine blue O, Gram-Weigert, or direct or indirect fluorescent antibody stain.
Blastomyces dermatitidis	Gram-variable, broad-based, thick-walled yeast cell with figure-eight appearance	Bronchial washings, sputum, purulent exudates, skin lesions	
Microsporidia	Gram-variable spherical cells (1–4 μm), thicker at one end	Stool, respiratory, cornea, urine	Confirm with chromotrope stain
Cryptococcus neoformans	Partially or completely gram-positive round yeast cell with clear or red-orange halo; yeast cells may appear stippled or gram neutral	CSF, blood, biopsy material, sputum, bronchial washings, cutaneous lesions	Confirm capsule with India ink; direct antigen detection procedures may be used on CSF; inoculate urea slant.
Candida spp.	Gram-positive budding yeast cell with or without pseudohyphae; may also appear stippled or gram neutral	Sputum, urine, blood, biopsy material, vaginal discharge, upper respiratory tract	Endogenous microbiota
Malassezia furfur	Bottle-shaped yeast cells in compact clusters, usually with short hyphal elements	Skin scrapings, blood drawn through catheter lines, hyperalimentation fluids	Inoculate lipid-enriched medium.

۷- کنترل کیفیت:

a) معرف ها را از نظر ظاهری، به طور روزانه بررسی کنید.

۱. اگر کریستال ویوله رسوب کند یا ته نشین شود، قبل از استفاده آن را صاف کنید.

۲. اگر محلول های کاری یا مصرف روزانه تمام نمی شوند، باید به طور منظم عوض شوند. تبخیر مواد ممکن است عملکرد معرف ها را تغییر دهد.

۳. معرف های کاری را حداقل به صورت ماهانه دور بریزید تا استفاده مکرر آنها محدود شود.

توجه: رنگ ها می توانند آلوده شوند. وقتی مشکوک می شوید، باید از سری ساخت جدید معرف استفاده کنید.

b) روش انجام آزمایش رنگ آمیزی را قبل از استفاده از هر سری ساخت جدید هر رنگ و معرف رنگ بر و بعد از آن حداقل به صورت هفتگی با یک میکروارگانیسم گرم مثبت و یک گرم منفی آزمایش کنید. کارکنان آزمایشگاه که رنگ آمیزی گرم را به دفعات کم انجام می دهند، باید به صورت روزانه یا با هر بار آزمایش نمونه بیمار، با یک کنترل مثبت و یک کنترل منفی آزمایش کنند.

۱. سوسپانسیونی با کدورت کم از *Escherichia coli* (ATCC 25922) و *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) در محیط مایع تهیه کنید.

۲. دو قطره از برات روی هر لام ریخته و دو اسمیر تهیه نمایید.

۳. آنها را در متانول فیکس کرده و در ۲۰°C- نگهداری کنید.

۴. مطابق روش رنگ آمیزی گرم، رنگ آمیزی نمایید.

آزمایشگاه مرجع سلامت	آزمایشگاه رفرانس بخش میکروب شناسی آزمایش رنگ آمیزی گرم	صفحه 12 از 14

۵. نتایج مورد انتظار:
- ✓ باسیل گرم منفی: صورتی
- ✓ کوکسی گرم مثبت: بنفش پررنگ

۶. به طور جایگزین، از بین دندان ها یا یک اپلیکاتور چوبی نمونه گیری کرده و در انتهای لامی که برای نمونه استفاده شده است، قرار دهید. این یک روش کنترل Built-in می باشد که شامل سویه های گرم مثبت و گرم منفی است.

c) وقتی که اسمیرهای رنگ شده کیفیت خوبی نداشته باشند، تفسیر رنگ ها مشکل باشد، یا تفسیر آنها صحیح نباشد، اقدام اصلاحی انجام دهید. مشخصات رنگ آمیزی نامناسب (مانند رنگ آمیزی کمرنگ ارگانیسم های گرم مثبت، باقی ماندن کریستال ویوله در ارگانیسم های گرم منفی، رنگ گرفتن فقط کناره های اسمیر، رسوب روی لام و غیره) ممکن است به دلیل نامناسب بودن مراحل آماده سازی نمونه، معرف ها یا روش انجام رنگ آمیزی باشد. بعضی عوامل رایج که باعث ایجاد نتایج نامناسب در رنگ آمیزی گرم می شوند، عبارتند از:

۱. استفاده از لام های شیشه ای که تمیز نباشند.
۲. اسمیری که خیلی ضخیم تهیه شده باشد.
۳. حرارت دادن زیاد اسمیر، زمانی که برای فیکس کردن از روش حرارت استفاده می شود.
۴. آبکشی زیاد در طی انجام رنگ آمیزی، به خصوص اگر اسمیر به طور صحیح فیکس نشده باشد.
۵. وجود رسوب در معرف ها

d) به علاوه، برای اطمینان از صحت تفسیر، برنامه ای برای مرور گزارش های رنگ آمیزی گرم تهیه کنید.

۱. مرور رنگ آمیزی های گرم انتخابی به وسیله سوپروایزر، برای تعیین نیازهای آموزشی و همچنین کمک به یکپارچگی اطلاعات بالینی مربوطه
۲. نتایج کشت نهایی را با گزارش های رنگ آمیزی گرم مقایسه کنید. مرفولوژی های گزارش شده در رنگ آمیزی گرم را که در کشت جدا نشده اند، بررسی کنید. همچنین زمانی که به تعداد ۴-۳ میکروارگانیسم از کشت جدا شده، اما در رنگ آمیزی گرم میکروارگانیسمی مشاهده نشده است، هم رنگ آمیزی و هم کشت را بررسی نمایید.

- توجه: تعداد قابل توجهی از ارگانیسم های تشخیص داده شده روی اسمیر، از کشت جدا می شوند. بنابراین تفاوت ها باید برای از بین بردن خطاهای ناشی از بررسی اسمیر یا به عنوان نشانه هایی برای به کارگیری سایر روش های کشت (مانند کشت بی هوازی، کشت برای قارچ یا کشت باسیل های اسید فست [AFB]) بررسی شوند.

۳. مجموعه ای از لام های مرجع برای آموزش تهیه نمایید.

۸- محدودیت ها:

a) نتایج رنگ آمیزی گرم را در ارتباط با سایر یافته های بالینی و آزمایشگاهی استفاده کنید. از روش های اضافی دیگر (مثل رنگ آمیزی های خاص، استفاده از محیط های انتخابی و غیره) برای تأیید اطلاعات بدست آمده از اسمیرهای رنگ شده گرم استفاده نمایید.

b) به کارگیری دقیق روش انجام آزمایش و معیارهای تفسیر برای کسب نتایج صحیح نیاز می باشد. صحت، ارتباط زیادی با آموزش و مهارت شخص مشاهده کننده لام دارد.

c) روش های رنگ آمیزی دیگر برای نمونه های بالینی چرکی که هیچ ارگانیسمی در روش رنگ آمیزی گرم مشاهده نشده، پیشنهاد می شود.

d) مشاهده میکروارگانیسم در لام گرم برای کشت های منفی ممکن است ناشی از آلودگی معرف ها و لوازم، وجود عوامل ضد میکروبی یا عدم رشد ارگانیسم ها تحت شرایط کشت معمول (محیط کشت، اتمسفر و غیره) باشد.

e) نتایج گرم کاذب ممکن است مربوط به مقدار ناکافی نمونه یا تأخیر در ارسال آن باشد.

f) تهیه اسمیر از کشت های تازه (کمتر از ۲۴ ساعت) روی محیط های غیر مهار کننده و نمونه های بالینی تازه، صحیح ترین نتیجه را می دهند. زمانی که مرفولوژی مهم است (مانند استرپتوکک ها و باسیل های گرم مثبت)، کشت های مایع ارجحیت دارد.

۹- ملاحظات ایمنی:

a) ید ماده خطرناکی است. از استنشاق، خوردن و تماس آن با پوست پرهیز شود.

b) اتانول و استون قابل اشتعال می باشند.

c) برای آماده سازی اسمیر از دستکش لاتکس و سایر وسایل محافظ مناسب با احتیاطات عمومی استفاده نمایید (BSL2).

d) به کارکنان مربوطه آموزش دهید که در مورد نمونه هایی که با سرنگ ارسال می شود، قبل از ارسال، سوزن را از روی سرنگ بردارند.

e) هنگام تهیه اسمیر، هیچگاه قطره را به شدت مخلوط نکنید، تا از ایجاد ذرات معلق در هوا (آئروسل) جلوگیری شود.

۱۰- مراجع:

1. Clinical Microbiology Procedures Handbook, second edition update, Garcia, Lynne S. & Isenberg, Henry D., 2007

موارد بحرانی در آزمایشگاه میکروب شناسی

تعریف:

موارد بحرانی در آزمایشگاه میکروب شناسی ، شامل نتایج آزمایش هایی است که می توانند تهدید کننده حیات بیمار باشند و باید فورا" و از هر طریق ممکن به اطلاع پزشک معالج برسد. این موارد شامل یافته های مرتبط با ارگان های درگیر، تشخیص میکروارگانیسم ها و بعضی از مقاومت های میکروبی است که از نظر بالینی مهم هستند و نیاز به اطلاع رسانی فوری آزمایشگاه دارد، به نحوی که اقدام سریع پزشک معالج، پرسنل بیمارستان و یا گزارش به مراجع مسئول را طلب می کند.

وظایف آزمایشگاه:

۱- کلیه آزمایشگاه های بیمارستانی و غیر بیمارستانی موظف هستند نتایج بحرانی را فورا" به طور شفاهی و به شیوه مناسب و از هر طریق ممکن به اطلاع پزشک معالج یا پرسنل درمانی برسانند.

۲- آزمایشگاه موظف است فردی را به عنوان تأیید کننده و گزارش دهنده نتایج بحرانی مشخص نماید.

۳- تمام مراحل فرایند اطلاع رسانی باید با ذکر جزئیات، مستند و نگهداری شود. برای مثال: نام فرد گزارش دهنده، نام فرد تأیید کننده و مسئول، نحوه تماس، ساعت و تاریخ تماس، شماره تماس، مشخصات فردی که با او تماس گرفته شده است و ....

۴- اگر تمامی تلاش های منطقی و قابل قبول برای تماس با پزشک یا یکی از کادر درمانی بیمار ناموفق بود، تمام مراحل انجام شده باید توسط آزمایشگاه به صورت مکتوب نگهداری شود.

۵- به دنبال گزارش شفاهی، لازم است نتیجه آزمایش اولیه به صورت کتبی نیز گزارش شود.

۶- گزارش نهایی موارد بحرانی، بعد از تکمیل مراحل آزمایش باید به صورت کتبی به اطلاع پزشک یا پرسنل درمانی رسانده شود.

توضیح:

۱- تلاش شده است مجموعه پیوست، به صورت جامع و برای تمام آزمایش های میکروب شناسی تهیه گردد. بدیهی است آزمایشگاه هر مرکز با توجه به سطح و نوع آزمایش هایی که انجام می دهد، می تواند از بخش های مختلف این مجموعه استفاده نماید.

۲- مجموعه پیوست شامل موارد بحرانی در بخش های ذیل می باشد:

- باکتری شناسی: اسمیر، کشت، آزمایش های آنتی ژنی و سرولوژی، سنجش توکسین و روش های مولکولی
- قارچ شناسی: اسمیر، کشت و آزمایش های آنتی ژنی
- انگل شناسی: اسمیر، کشت، آزمایش های آنتی ژنی و سرولوژی، و روش های مولکولی
- ویروس شناسی: کشت و روش های مولکولی
- سایر آزمایش های مرتبط با بخش میکروب شناسی

۳- برای سهولت خواننده قسمت های ویرایش شده با علامت ذیل مشخص شده است.

❖ متن ویرایش شده

جدول ۱- موارد بحرانی در آزمایشگاه میکروب شناسی - آزمایش های باکتری شناسی

آزمایش		سن	نتایج بحرانی	ملاحظات
اسمیر (رنگ امیزی گرم و متیلن بلو)	کشت خون	تمام گروه های سنی	هر نتیجه مثبت	
	مایع مغزی نخاعی (CSF)	تمام گروه های سنی	هر نتیجه مثبت	
	مایعات استریل بدن شامل: جنب، آسیت، مفصل، زجاجیه، پریکارد و ...	تمام گروه های سنی	هر نتیجه مثبت	اولین تشخیص باکتری در رنگ آمیزی گرم بحرانی تلقی می شود. در صورت مثبت شدن مجدد طی یک هفته، این نتیجه دیگر بحرانی تلقی نمی گردد.
	بیوپسی بافت مانند مغز، کبد، کلیه، استخوان و مغز استخوان	تمام گروه های سنی	هر نتیجه مثبت	
	نمونه های بخش جراحی مانند آبسه های مغزی و مایعاتی که در حین جراحی برداشته می شوند	تمام گروه های سنی	هر نتیجه مثبت یا منفی	
	تراشه قرنیه	تمام گروه های سنی	هر نتیجه مثبت	
	پنشی از نظر منتگوکک	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	نمونه قانقاریای گازی	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	باسیل های گرم مثبت درشت مشابه کلستریدیوم
	اسمیر گرم و پارشیال اسید فست نوکاردیا	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	اسمیر اسید فست در نمونه های تنفسی	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	

ادامه جدول ۱- موارد بحرانی در آزمایشگاه میکروب شناسی - آزمایش های باکتری شناسی

آزمایش		سن	نتایج بحرانی	ملاحظات
کشت	کشت خون	تمام گروه های سنی	هر نتیجه مثبت	
	مایع مغزی نخاعی (CSF)	تمام گروه های سنی	هر نتیجه مثبت	
	مایعات استریل بدن شامل: جنب، آسیت، آمنیوتیک، مفصل، زجاجیه، پریکارد و ...	تمام گروه های سنی	هر نتیجه مثبت	اولین تشخیص باکتری در کشت بحرانی تلقی می شود. در صورت مثبت شدن مجدد طی یک هفته، این نتیجه دیگر بحرانی تلقی نمی گردد.
	ترشحات قرنیه	تمام گروه های سنی	هر نتیجه مثبت	
	بیوپسی بافت مانند مغز، کبد، کلیه، استخوان و مغز استخوان	تمام گروه های سنی	هر نتیجه مثبت	
	مدفوع	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت برای *ویبریو کلرا*	
		کمتر از ۱۸ سال	نتیجه مثبت برای *E. coli* Enterohemorrhagic مانند *E. coli* O157	
		کمتر از ۱۲ سال	نتیجه مثبت برای *شیگلا*	در بیماران بستری
		تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت برای *شیگلا دیسانتریه*	در بیماران بستری و سرپایی
		اطفال	نتیجه مثبت برای *کمپیلوباکتر*	در صورت وجود خون یا گلبول سفید در نمونه بیمار
		تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت برای *سالمونلا تایفی*	در بیماران بستری و سرپایی
		تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت برای *سالمونلاهای غیر تایفی*	بیماران با علائم بالینی شدید یا دارای نقص سیستم ایمنی
	مایع دیالیز	تمام گروه های سنی	هر نتیجه مثبت	
	بورخلدریا مالئی و *سودومالئی*	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	نیسریا منتژیتیدیس در نمونه های مایع مغزی نخاعی، خون، مایع مفصل و پنتشی	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	

ادامه جدول ۱- موارد بحرانی در آزمایشگاه میکروب شناسی - آزمایش های باکتری شناسی

	آزمایش	سن	نتایج بحرانی	ملاحظات
کشت	*سودوموناس* در نمونه چشم	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	گونه های *بروسلا*	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	هر نمونه ای
	باسیلوس آنتراسیس	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	هر نمونه ای
	فرانسیسلا تولارنسیس	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	هر نمونه ای
	یرسینیا پستیس	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	هر نمونه ای
	استرپتوکک گروه A جدا شده از فاسیت و یا زخم های جراحی	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	لژیونلا	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	لپتوسپیرا	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	لیستریا	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	زنان باردار و افراد مبتلا به هر گونه نقص سیستم ایمنی
	کشت مثبت *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس*	تمام گروه های سنی	اولین بار جداسازی و جداسازی سویه های مقاوم (MDR و XDR)	در صورتی که از نمونه مجدد بیمار طی دو هفته دوباره باکتری جدا شود دیگر به گزارش شفاهی یا فوری نیازی نیست.
	سایر گونه های *مایکوباکتریوم*	تمام گروه های سنی	اولین جواب مثبت	هر نمونه ای
	کورینه باکتریوم دیفتریه	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	استرپتوکوکوس آگالاکتیه در نمونه های ادرار، تناسلی و رکتوم در زنان باردار	زنان باردار هفته ۳۷-۳۵ بارداری	نتیجه مثبت	
	سودوموناس آئروژینوزا یا گونه های *باسیلوس* در نمونه ترشحات چشم	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	بردتلا پرتوسیس	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	❖ ارگانیسم هایی با مقاومت میکروبی مانند MRSA، MRS، CRE، VRSA، VISA، VRE، پنوموکک مقاوم به پنی سیلین و مقاومت باکتری های گرم منفی به کلیستین و هر گونه مقاومت غیر منتظره	تمام گروه های سنی	نتایج مثبت	این مقاومت ها باید با نظر کمیته کنترل عفونت در بخش های مختلف بیمارستان به عنوان موارد بحرانی در نظر گرفته شود.

ادامه جدول ۱- موارد بحرانی در آزمایشگاه میکروب شناسی - آزمایش های باکتری شناسی

	آزمایش	سن	نتایج بحرانی	ملاحظات
آزمایش های آنتی ژن و سرولوژی	*استرپتوکوکوس پنومونیه، استرپتوکوکوس آگالاکتیه، هموفیلوس انفلوانزا، لیستریا منوسیتوژنز، نیسریا منتژیتیدیس* در نمونه مایع مغزی نخاعی	تمام گروه های سنی	نتایج مثبت	
	تشخیص مورد جدید سیفیلیس	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	لپتوسپیرا	تمام گروه های سنی	تیتر با ارزش آنتی بادی	
سنجش توکسین	توکسین A و B *کلستریدیوم دیفیسیل* در نمونه مدفوع	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	تشخیص اولیه به عنوان نتیجه بحرانی تلقی می شود و جواب های مثبت مجدد طی یک هفته، دیگر به عنوان نتیجه بحرانی تلقی نمی گردد.
	کلستریدیوم بوتولینوم در نمونه ماده غذایی مصرفی	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	شیگاتوکسین در نمونه مدفوع	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
روش های مولکولی	TB در نمونه های مایع مغزی نخاعی و تنفسی	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	بردتلا پرتوسیس	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	کلامیدیا در نمونه چشم	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	MRSA	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	انتروبلا	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	

جدول ۲- موارد بحرانی در آزمایشگاه میکروب شناسی - آزمایش های قارچ شناسی

آزمایش		سن	نتایج بحرانی	ملاحظات
اسمیر	رنگ آمیزی India Ink در مایع مغزی نخاعی از نظر کریپتوکوکوس	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	پنوموسیستیس با روش DFA	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	تراشه قرنیه	تمام گروه های سنی	هر نتیجه مثبت	
	نمونه های کشت خون، مایع مغزی نخاعی، مایعات بدن یا نمونه های بیوپسی بافت	تمام گروه های سنی	هر نتیجه مثبت	اولین تشخیص مستقیم قارچ در این نمونه ها، بحرانی تلقی می شود و در صورت مثبت شدن مجدد طی یک هفته، دیگر بحرانی تلقی نمی گردد.
	نمونه بیوپسی سینوس در بیماران دیابتی و دارای نقص سیستم ایمنی	تمام گروه های سنی	هر نتیجه مثبت	
کشت	نمونه های کشت خون، مایع مغزی نخاعی، مایعات بدن یا نمونه های بیوپسی بافت	تمام گروه های سنی	هر نتیجه مثبت	
	نمونه بیوپسی سینوس در بیماران دیابتی و دارای نقص سیستم ایمنی	تمام گروه های سنی	هر نتیجه مثبت	
	تراشه قرنیه	تمام گروه های سنی	هر نتیجه مثبت	
آزمایش های آنتی ژنی	آنتی ژن کریپتوکوکوس در نمونه مایع مغزی نخاعی و سرم	تمام گروه های سنی	اولین جواب مثبت	نتیجه اولیه بحرانی تلقی می شود و نیازی به گزارش مجدد نمی باشد؛ مگر آن که در آزمایش کمی، افزایش معنی داری معادل ۴ تیتر در آزمایش های بعدی مشاهده گردد.

جدول ۳- موارد بحرانی در آزمایشگاه میکروب شناسی - آزمایش های انگل شناسی

آزمایش		سن	نتایج بحرانی	ملاحظات
اسمیر یا کشت	اسمیر مالاریا	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	اسمیر لارو استروژیلوئیدس استرکورالیس در نمونه های خارج روده ای	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	اسمیر تروفوزوئیت انتامبا هیستولیتیکا در مدفوع خونی	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	اسمیر یا کشت گونه های اکانتامبا از مایع مغزی نخاعی یا چشم	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	اسمیر یا کشت گونه های نگلریا از سیستم اعصاب مرکزی (CNS)	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
آزمایش های انتی ژنی و سرولوژی	توکسوپلاسما در نمونه مایع مغزی نخاعی و مایع آمنیوتیک	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
روش های مولکولی	توکسوپلاسما در نمونه مایع مغزی نخاعی و مایع آمنیوتیک	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	

جدول ٤- موارد بحرانی در ازمایشگاه میکروب شناسی - ازمایش های ویروس شناسی

	ازمایش	سن	نتایج بحرانی	ملاحظات
کشت	ویروس هرپس سیمپلکس در نمونه های مایع مغزی نخاعی، مغز، مایع آمنیوتیک و چشم	تمام گروه های سنی	نتایج مثبت	
	ویروس هرپس سیمپلکس در نمونه های زخم تناسلی	در پایان دوره بارداری	نتیجه مثبت	
	انسفالیت های ویروسی	تمام گروه های سنی	نتایج مثبت	
	نمونه مایع مغزی نخاعی شیرخواران	کمتر از ۱۲ ماه	هر نتیجه مثبت	
	انفلوانزای A و B	تمام گروه های سنی	نتایج مثبت	در شروع اپیدمی
	نورو ویروس در نمونه مدفوع	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	نمونه های مایع مغزی نخاعی، خون، مایعات استریل بدن، مایع آمنیوتیک یا نمونه های بیوپسی بافت	تمام گروه های سنی	نتایج مثبت	مانند CMV، انترو ویروس، EBV، VZV
	Respiratory Syncytial Virus (RSV)	اطفال	نتیجه مثبت	
روش های مولکولی	ویروس هرپس سیمپلکس در نمونه های مایع مغزی نخاعی، مغز، مایع آمنیوتیک و چشم	تمام گروه های سنی	نتایج مثبت	
	ویروس هرپس سیمپلکس در نمونه های زخم تناسلی	در پایان دوره بارداری	نتیجه مثبت	
	انسفالیت های ویروسی	تمام گروه های سنی	نتایج مثبت	
	نمونه مایع مغزی نخاعی شیرخواران	کمتر از ۱۲ ماه	هر نتیجه مثبت	
	انفلوانزای A و B	تمام گروه های سنی	نتایج مثبت	در شروع اپیدمی
	نورو ویروس در نمونه مدفوع	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	سیتومگالوویروس (CMV) به روش کمی (viral load) در بیماران پیوندی یا دارای نقص سیستم ایمنی و شیرخواران کمتر از ۳ ماه	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	RSV	اطفال	نتیجه مثبت	

جدول ۵- موارد بحرانی مرتبط با آزمایشگاه میکروب شناسی

آزمایش	سن	نتایج بحرانی	ملاحظات
وانکومایسین	تمام گروه های سنی	> ۴۵ µg/ml	
آمیکاسین	تمام گروه های سنی	> ۳۵ µg/ml	
جنتامایسین	تمام گروه های سنی	> ۲۰ µg/ml	
تست پروکلسیتونین	تمام گروه های سنی	> ۱۰ ng/ml	

تشخیص عوامل میکروبی با دستگاه Bactec

بیماران زیادی در اثر عدم تشخیص به موقع عوامل میکروبی، مقاومت آنتی بیوتیک و یا تاخیر در شروع درمان مناسب آنتی بیوتیک جان خود را از دست می دهند.

در حال حاضر ۳ روش کشت خون در شرایط آزمایشگاهی در دسترس می باشد.

۱- روش مرسوم و استفاده از محیط های غنی کننده در شیشه های کشت خون، می باشد که همزمان با رشد ارگانیسم ایجاد کدورت، همولیز، تولید گاز و ایجاد کلنی می نماید.

۲- روش نیمه اتوماتیک :

این سیستم بر اساس شناسایی CO_2 حاصل از متابولیسم گلوکز توسط میکروارگانیسم با اشعه مادون قرمز پایه ریزی شده است.

۳- روش اتوماتیک:

بهترین نوع این روش استفاده از دستگاه Bactec می باشد.

این سیستم از تکنولوژی فلوروسنت بهره مند می باشد.

در هر شیشه کشت خون یک گیرنده CO_2 وجود دارد که نسبت به یون های مواد محیط کشت و خون غیر قابل نفوذ بوده اما CO_2 به آسانی در آن نفوذ می کند. اگر ارگانیسمی در محیط وجود داشته باشد، CO_2 تولید کرده که در ماتریکس این گیرنده منتشر شده و یون هیدروژن تولید می گردد که موجب تقلیل PH می گردد.

این تغییر موجب افزایش فلورسانس گیرنده شده و سبب تغییر علایم منتقله به اجزا اپتیک و الکترونیک دستگاه شده و موجب به کار افتادن آلارم دستگاه می شود.

نمونه دستگاه BACTEC

استفاده از تکنولوژی BACTEC موجب تسریع در زمان تشخیص عوامل میکروبی شده و کمک شایانی در زمینه تشخیص و درمان به موقع عوامل میکروبی نموده است.

به ویژه در تشخیص مایکوباکتریوم های عامل بیماری سل که تشخیص آن ۸ هفته زمان نیاز دارد، با این تکنولوژی این زمان نصف شده است و درمان بیماران مبتلا به سل در کمترین زمان ممکن انجام می شود. لذا با درمان به موقع از انتشار بیماری در جامعه نیز جلوگیری به عمل آمده و از آسیب های اجتماعی، اقتصادی تا حد زیادی جلوگیری به عمل می آید.

نمای داخلی دستگاه BACTEC

از معایب دستگاه BACTEC گرانقیمت بودن خود دستگاه می باشد و همچنین محیط کشت بکار گرفته شده علاوه بر گرانقیمت بودن، نیاز به تامین آن از طرف شرکت سازنده دارد.

همچنین نسبت به نوسانات برق حساس بوده و باید تمهیدات لازم در این زمینه اندیشیده شود.

رفرانس :

۱- میکروب شناسی جاوتز

۲- میکروب شناسی هنری دیویدسون، ۲۰۲۳

۳- جزوات آموزشی آزمایشگاه مرجع سلامت، وزرات بهداشت، درمان و آموزش پزشکی

۴- چکیده ارولوژی اسمیت، ۱۳۹۸

۵- راهنمای آزمایشگاهی تشخیص عفونت های بیمارستانی، ۱۴۰۰

۶- تشخیص عوامل میکروبی در فصل گرما، جزوه آموزشی آزمایشگاه مرجع سلامت، ۱۳۹۹

۷- طغیان بیماری های میکروبی، دکتر شهلا فارسی ، ۱۳۹۵

۸- دستور عمل انتقال امن و ایمن نمونه، جزوه آموزشی آزمایشگاه مرجع سلامت، ۱۴۰۲

۹- محیط کشت باک تک یک روش موثر برای جدا کردن میکروارگانیسم ها از نواحی استریل بدن، مجله دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دوره ۹۶، شماره ۵، مرداد ۱۳۹۷، ۳۱۰-۳۰۵