مدیریت نمونه در آزمایشگاه میکروب شناسی

دکتر محمد رهبر

رئیس بخش میکروب شناسی آزمایشگاه مرجع سلامت

آذر ماه 1403

مقدمه

- **هدف** از این دستورالعمل شرح روش های جمع آوری نمونه های رایج بالینی ، رنگ آمیزی گرم ، نحوه کشت و تفسیر نتایج آنها در آزمایشگاه میکروب شناسی بالینی است
- **اساس و اهمیت بالینی**
- جمع آوری مناسب نمونه ها ی بالیني برای آزمایش های میکروبیولوژیکی از اهمیت خاصی برخوردار می باشد. در جمع آوری نمونه از دستورالعمل های استاندارد باید استفاده کرد. این دستورالعمل باید برای کارکنان آزمایشگاه و کلیه پرسنل بیمارستان که مسئولیت جمع آوری نمونه را دارند قابل دسترس باشند. در ضمن پرسنل گروه پزشکی که با نمونه های بیماران سروکار دارند در معرض عفونت های شغلی از قبیل هپاتیت وسایر عوامل عفونی می باشند. ظروفی که درب آنها شل بوده ویا اگر نمونه داخل آنها نشت کرده باشد موجب ابتلای حمل کنندگان نمونه وپرسنل بیمارستان به عوامل عفونی می گردد

درخواست آزمایش

- رخواست برای انجام آزمایش به همراه نمونه باید به صورت کتبی و یا الکترونیکی به آزمایشگاه ارسال گردد در فرم درخواست اطلاعات زیر باید درج شده باشند و مشخصات بیمار به تفضیل وشامل موارد زیر باشد
- نام بیمارستان وشماره پذیرش
- شماره تخت ونام بخش\
- نام پزشک معالج
- نام و نام خانوادگی
- جنس
- تاریخ تولد/سن
- آدرس ودر صورت لزوم شماره تماس
- کد ملی
- در صورتی که خانمی حامله باشد در فرم قید شود

اصول کلی جمع آوری نمونه برای کشت

- 1-نمونه را ازمحل واقعی عفونت جمع آوری کنید واز آلودگی آن با فلور طبیعی بافت های مجاور و ترشحات اجتناب نمائید.

- ۲- نمونه را در زمان مناسب جمع آوری کنید (بعنوان مثال جمع آوری خلط در صبح زود برای آزمایش از لحاظ باسیل اسید فاست مناسب است) .

- ۳-حجم نمونه باید کافی باشد. از ظروف وابزار مناسب واستریل استفاده نمائید. ظرف نمونه گیری نباید نشتی داشته باشند ودر صورت لزوم از محیط کشت انتقال مناسب استفاده شود. (ویال های انتقالی بیهوازی برای جداکردن باکتریهای بیهوازی ، محیط کشت انتقالی استوارت برای کشت های معمولی ،کری بلر برای کشت مدفوع و Viral) Transport Medium VTM) برای کشت ویروس ها وکلامیدیا بکار می روند. تمامی محیط های کشت وابزار مورد استفاده را از لحاظ تاریخ انقضا بررسی کنید.

اصول کلی جمع آوری نمونه برای کشت

- 4-تمونه تا حد ممکن قبل از شروع درمان آنتی بیوتیکی جمع آوری شود.
- 5-نمونه را بطور کامل برچسب زده و فرم درخواست نمونه را کاملا تکمیل نمائید در ضمن محل اصلی که نمونه از آنجا گرفته شده است ذکر گردد. (بعنوان مثال نمونه زخم از پای چپ)
- 6- در حداقل زمان ممکن نمونه به آزمایشگاه ارسال گردد.
- 7-موقع گرفتن نمونه سعی کنید که با فلور طبیعی پوست آلوده نگردد. ابتدا از الکل 70% وسپس از کلروهگزایدین 2% ویا تنتور ید 2-1% استفاده کنید 2 دقیقه صبر کنید تا اثرات ضد عفونی کنندگی آنها اعمال گردد

اصول کلی جمع آوری نمونه برای کشت

- برای هر نوع درخواست از محیط انتقال مناسب آن استفاده گردد بعنوان مثال اگر درخواست کشت بیهوازی شده باشد از محیط انتقال مخصوص بیهوازی استفاده شود . محیط های کشت انتقال ویروسی برای باکتریها مناسب نمی باشند ویا در خواست نمونه از لحاظ باسیل اسید فاست نباید در محیط کشت بیهوازی انتقال یابد

معیار های رد نمونه

- ۱–اگر اطلاعات موجود در روی برچسب نمونه وفرم در خواست باهم مغایرت داشته باشند
- ۲–اگر نمونه در ظروف نامناسب ویا دمای نامناسب حمل شده باشد
- ۳– مقدار نمونه برای آزمایش درخواست شده کافی نباشد
- ۴–نمونه نشت کرده باشد
- ۵–بزاق برای کشت خلط مناسب نمی باشد از خلطی که با سرفه کردن عمیق ویا القا ئی جمع آوری شده باشد استفاده نمائید.

معیار های رد نمونه

- –نمونه های متعددی از قبیل ادرار ،مدفوع و خلط که از یک بیمار که در یک روز ارسال شده باشد. .مگر اینکه از دو نقطه آناتومیکی متفاوت باشند .بعنوان مثال از یک بیمار ممکن است دو نمونه ادرار ، یک نمونه ادرار میانی و یک نمونه ادرار جمع آوری شده بروش سیستسکوپی در یک روز به آزمایشگاه ارسال شود هر دونمونه باید کشت داده شوند ولی اگر هردونمونه نمونه ادرار میانی باشند فقط بر روی یک نمونه کار شود .ویا مثال دیگر اگر دو نمونه خلط از یک بیمار یک نمونه در صبح و دیگری عصر به آزمایشگاه ارسال گردد .فقط نمونه اول بیمار باید کشت داده شود شود ولی اگر از همان بیمار در یک روز دو نمونه ارسال شود که یکی خلط و دیگری BAL باشد هم خلط بیمار و هم BAL باید آزمایش شوند.

معیار های رد نمونه

- نمونه هائی که داخل فیکساتور باشند
- ۷–سواب های خشک شده
- ۸–نوک کاتتر های فولی
- ۹–ادرار ویا خلط ۲۴ ساعته از لحاظ کشت باکتری وقارچ
- ۱۰–نمونه ادراری که بیش از دو ساعت در دمای اتاق مانده باشد
- ۱۱–مایعاتی که در لوله های درب پنبه ای جمع آوری شده باشد
- ۱۲–نمونه های سواب جهت کشت بیهوازی در محیط انتقالی بیهوازی ارسال نشده باشند

معیار های رد نمونه

- –نمونه های کشت مدفوع از بیمارانی که بیش از ۳ روز در بیمارستان بستری شده باشند برای کشت ارزش ندارندر(در این بیماران بایستی مدفوع از لحاظ وجود توکسین *کلستریدیوم دیفیسلی* بررسی شود)
- ۱۴– در خواست کشت بیهوازی برای نمونه های واژینال ، سرویکال وادرار (مگر نمونه سوپرا پوبیک)
- در صورت رد نمونه ، باید با پزشک و یا پرستار بخش در اسرع وقت تماس گرفت وآنها را از علت رد نمونه آگاه ساخت.
- **توجه: تمامی نمونه هایی را که به روش تهاجمی جمع آوری شده اند و امکان گرفتن نمونه مجدد را نداشته باشنداز لحاظ میکروبیولوژیکی بررسی کنید ولی موقع ارسال جواب به پزشک اشکال نمونه را ذکر کنید.** .

معیار های رد نمونه

- پس از جمع آوری نمونه و ارسال آن به آزمایشگاه میکروب شناسی ، پرسنل آزمایشگاه باید فرایند کار روی نمونه را شروع کنند. هر آزمایشگاه باید دستورالعمل های لازم را در خصوص نحوه کار روی نمونه که اغلب شامل رنگ آمیزی گرم ، کشت و ایزولاسیون ، تفسیر نتایج ، تعیین هویت وانجام آزمایش سنجش حساسیت ضد میکروبی (آنتی بیوگرام) و گزارش دهی هستند را داشته باشند.

رنگ آمیزی گرم

- .رنگ آمیزی گرم قدم اول و یک امر حیاتی در آزمایشگاه میکروب شناسی می باشدکه متاسفانه انجام آن در بعضی از آزمایشگاه ها کم رنگ شده است .نتایج رنگ آمیزی گرم در خصوص نمونه هایی که بویژه از نقاط استریل بدن گرفته شده باشند از قبیل نمونه مایع مغزی نخاعی در انتخاب آنتی بیوتیک مناسب ودرمان خیلی ارزش دارد. از سوی دیگر از نتایج رنگ آمیزی گرم می توان در تفسیر نتایج کشت استفاده بهینه کرد. در این دستورالعمل بطور خلاصه نحوه نمونه گیری ، ارسال ،رنگ آمیزی گرم ، کشت و تفسیر نمونه هائی که بطور رایج به آزمایشگاههای میکروب شناسی ارسال می شوند توضیح داده شده است . برای اطلاعات بیشتر و همچنین روش های تعیین هویت و آنتی بیوگرام سویه های جدا شده از نمونه های بالینی به کتابهای مرجع که در آخر این نوشتار آمده است رجوع شود.

نتایج و تفسیر

- ۱--وضعیت کلی اسمیر را با بزرگنمایی کم (۱۰X) ارزیابی کنید.

- الف-دقت نمایید‌که اسمیر بطور مناسبی رنگ بری شده باشد. بسته به نوع نمونه، زمینه عموما باید شفاف یاصورتی باشد. اگر در نمونه گلبول های سفید وجود داشته باشند ، بایدبه صورت گرم منفی ظاهر شوند.رسوب های نازک سوزنی شکل کریستال ویوله رابا باکتری های میله ای شکل گرم مثبت اشتباه نگیرید.

- ب- دقت نمایید ضخامت اسمیر مناسب باشد. برای تفسیر مناسب،گستره نباید بیش از یک سلول ضخامت داشته و روی هم افتادگی سلول نباید مشاهده شود.

- ۲- اسمیرهای تهیه شده از نمونه های بالینی را جهت بررسی موارد زیر با بزرگنمایی کم بررسی کنید.

نتایج و تفسیر

- ب–تعداد سلولهای اپی تلیال ،باکتریهای فلور طبیعی که ممکن است نشان دهنده جمع آوری نا مناسب نمونه باشد.
- ۳–فیلد های متعددی از اسمیر رابا عدسی ایمرسیون از نظر وجود میکروارگانیسم مشاهده و به شیوه زیر گزارش کنید
- الف– در صورت عدم مشاهده هرگونه میکروارگانیسم ، هیچ میکروارگانیسم مشاهده نشد
- ب– در صورت مشاهده میکروارگانیسم ،تراکم و مورفولوژی آنها را شرح دهید.

رنگ آمیزی گرم

- –مقادیر مربوط به سلول ها و میکروارگانیسم های مشاهده شده را گزارش دهید برای این منظور معمـولا از سیسـتم هـای کمـی استفاده می شود و بصورت عددی و یا توصیفی بیان می شود.

1. بصورت عددی

- الف + ۱ (rare or occasional) ۱> در هر فیلد روغن ایمرسیون
- ب– +۲ (few) ۵ –۱ عدد در هر فیلد روغن ایمرسیون
- ج–+۳ (moderate) ۳۰–۶ عدد در هر فیلد روغن ایمرسیون
- د– +۴ (heavy) ۳۰< در هر فیلد روغن ایمرسیون
- الف–پس از ثبت نتایج رنگ آمیزی گرم لام ها را به مدت کافی برای مرور و تائید نگهداری کنید.
- ب– روغن اضافی روی لام را خالی و به آرامی پاک کنید .

نکات مهم

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

1. به کارگیری دقیق روش انجام آزمایش و معیارهای تفسیر برای کسب نتایج صحیح نیاز می باشد.
   تفسیر نتایج رنگ آمیزی گرم ارتباط زیادی با آموزش و مهارت تشخیصی مشاهده کننده لام دارد.

رنگ آمیزی گرم

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

2. نتایج رنگ آمیزی گرم کاذب ممکن است مربوط به ناکافی بودن مقدار نمونه یا تأخیر در ارسال آن باشد.

۳. . نتایج رنگ آمیزی گرم نادرست ، ممکن است مربوط به کیفیت نامناسب جمع آوری نمونه باشد.

- ۴-ممکن است گاهی واکنش رنگ آمیزی گرم با کلنی های خیلی تازه در مقایسه باکلنی های کهنه تر متفاوت باشد. وقتیکه اسمیرها از ساب کالچر ۲۴-۱۸ ساعته تهیه می شوند ، زمانی که سلول های باکتریایی در فاز لگاریتمی رشدهستند ،مورفولوژی اغلب باکتری ها در رنگ آمیزی گرم،دربهترین شرایط می باشد.

استفاده از محیط کشت

- اغلب محیط کشت های مورد استفاده در آزمایشگاه های باکتریولوژی بصورت تجاری قابل دسترس می باشند این محیط های کشت یا بصورت پودر بوده که خود پرسنل آزمایشگاه طبق دستورالعمل های موجود مبادرت به ساخت محیط کشت می کنند و یا بصورت آماده مصرف (Ready to use) ازشرکت های تولید کننده خریداری می کنند. تهیه محیط کشت در آزمایشگاه ویا خریداری آن بصورت آماده مصرف بستگی به امکانات آزمایشگاه ، بودجه و تعداد نمونه های کشت دارد.

استفاده از محیط کشت

- . در صورت خرید محیط های کشت بصورت آماده مصرف باید از شرکت های تولیدی که دارای تائیدیه از آزمایشگاه مرجع سلامت و یا ادراره تجهیزات هستند خریداری شوند و موقع خرید مستندات کنترل کیفی را نیز می توانید از فروشنده در خواست کنید . محیط کشت های مورد استفاده در آزمایشگاه اغلب بصورت جامد، مایع و نیمه جامد هستند که هر کدام کاربرد خاص خودشان را دارند.انتخاب محیط کشت بستگی به نوع نمونه دارد وباید از محیط کشت های استفاده نمود که پاتوژن های بالقوه موجود در نمونه بتوانند در آن رشد کنند.

روش های کشت و ایزولاسیون

- روشهای متداول تعیین هویت باکتریها بستگی به ، بدست آوردن کلنی های ایزوله یا به اصطلاح تک کلنی دارد. .بسیاری از نمونه های بالینی حاوی مخلوطی از ارگانیسم های مختلف هستند لذا آنها را در محیط کشت جامد بصورت خطی (streak) کشت می دهند تا هر ارگانیسم موجود در نمونه بصورت کلنی منفرد رشد کنند.روش ایزولاسیون شامل کشت خطی از یک لوپ سیمی از جنس فولاد ، نیکروم ویا لوپ یکبار مصرف می باشند.انتخاب نوع لوپ بستگی به نوع نمونه و نتیجه مورد انتظار دارد.

کشت و ایزولاسیون

- روش کشت خطی در پلیت یک روش عملی و سریع می باشد. هدف از روش کشت خطی در پلیت رقیق کردن نمونه به منظور بدست آوردن کلنی های ایزوله می باشد. هر دو نوع لوپ فلزی و یا نیکروم و یا یکبار مصرف به این منظور کفایت می کند.
- نیکروم نباید برای باکتریهای بیهوازی استفاده کرد. در اغلب موارد قسمتی از نمونه در قسمت فوقانی از یک چهارم پلیت قرار می دهند. روش قرار دادن نمونه به پلیت بستگی به نوع نمونه دارد اگر نمونه مایع باشد از پی پت پاستور ویا سرنگ و سوزن استفاده می کنند و یک یا دو قطره از نمونه را در اولین قسمت از یک چهارم پلیت قرار می دهند. نحوه کشت ادرار استثنا است و بصورت کمی کشت داده می شود

روش های کشت و ایزولاسیون

- اگر نمونه با سواب ارسال شده باشد آنرا بصورت غلطیدن در ناحیه ای به وسعت دو سانتی متر مربع ودر یک چهام اول پلیت تلقیح کنید.برای تلقیح نمونه های مدفوع و خلط بجای لوپ از یک سواب استفاده کنید. پس از قراردادن نمونه در روی پلیت ابتدا لوپ را حرارت داده و صبر کنید خنک شود. لوپ را بین انگشت شست و انگشت اشاره گرفته و آنرا بصورت خطی از ناحیه یک چهارم اول بطرف ناحیه یک چهارم دوم کشت خطی دهید سپس پلیت را نود درجه چرخانده و همین روش را با کشت دادن خطی از ناحیه دوم به سوم تکرار کنید و نهایتا دوباره ۹۰ درجه پلیت را چرخانده و از ناحیه سوم بطرف ناحیه چهارم کشت خطی دهید.در بین فواصل کشت لوپ را حرارت دهید . مگر اینکه نمونه خیلی کم ویا محیط کشت مورد استفاده انتخابی باشد

روش های کشت و ایزولاسیون

- بعنوان مثال در مواردی از قبیل کشت مایع نخاع و سایر مایعات استریل بدن نباید بهیچ وجه در فواصل کشت خطی دادن لوپ را حرارت داد در حالیکه در مواردی از قبیل کشت مدفوع که مملو از فلور طبیعی می باشد حرارت دادن لوپ در فواصل کشت توصیه می شود. برای لزوله کردن و بدست آوردن کلنی تک نیز از این روش استفاده می کنند. در روش کشت خطی علاوه بر ایزوله کردن ارگانیسم های مختلف تعداد تقریبی آنها نیز بصورت نیمه کمی قابل گزارش می باشد که برای پزشک بخصوص در مواردی که ارگانیسم های مختلفی وجود دارند کمک کننده است. روش های مختلفی جهت گزارش نیمه کمی کلنی ها وجود دارد بعضی از آزمایشگاه ها بصورت very few ,few. Moderate or many و برخی از آزمایشگاه ها بصورت ۱+ الی ۴+ گزارش می کنند

انکوباسیون کشت ها

- پلیت ها را پس از کشت دادن بصورت وارونه داخل انکوباتور قرار دهید دمای مناسب برای اکثر باکتریهای بیماریزا ۳۵ درجه سانتیگراد می باشد.اغلب باکتریهای پس از ۱۸ ساعت کلنی های قابل رویت تولید می کنند

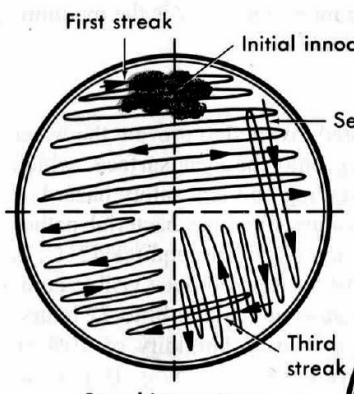
- اگرچه برخی از باکتریها نیاز به انکوباسیون ۷۲-۴۸ ساعت دارند.

- معمولا باکتریها نیاز به رطوبت ۸۰٪-۷۰ دارند .انکوباتور های جدید یک مخزن آب جهت تولید رطوبت را دارند در غیر اینصورت می توان با قرار دادن یک ظرف کوچک حاوی آب در طبقه پایینی انکوباتور رطوبت لازم را فراهم کرد

کشت و ایزولاسیون

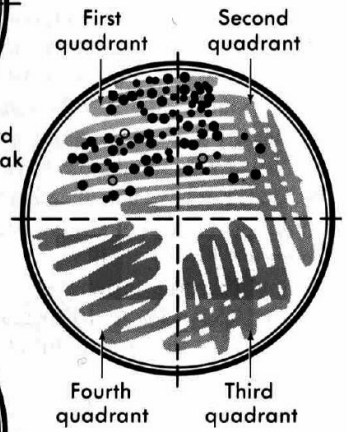
- بسیاری از باکتریها در هوای معمولی بخوبی رشد می کنند ولی تعدادی جهت رشد مطلوب نیاز به (۱۰٪-۵) CO2 دارند (کاپنوفیل) ویا اکسیژن کاهش یافته و CO2افزایش یافته (میکروآئروفیل) ویا شرایط بیهوازی دارند برای تامین CO2 می توان از انکوباتور CO2و یا جار شمع دار (candle jar) استفاده کرد

کشت خطی نمونه



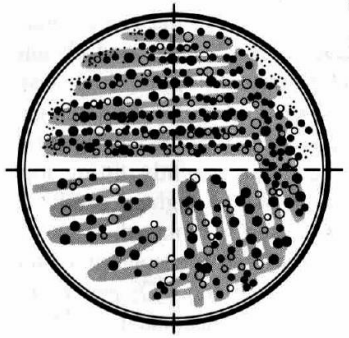
Streaking pattern

Figure 1



1-2+ growth

Figure 2a



4+ growth

Figure 2b

نحوه جمع آوری نمونه های رایج وکشت آنها

کشت ادرار

- **نوع نمونه** : **ادرار (ادرار میانی)**
- ظرف انتقال نمونه : ظرف استریل درب دار. از ظروفی که دارای مواد نگهدارنده هستند نیز می توان استفاده کرد
- آماده سازی بیمار : خانم ها و آقایان طبق دستورالعمل های موجود قسمت بیرونی دستگاه ادراری خود را بشویند وادرار میانی خود را جمع کنند
- دستورالعمل خاص : ندارد
- انتقال به آزمایشگاه : اگر از مواد نگهدارنده استفاده شده باشد ۲۴ ساعت در دمای اتاق در غیر اینصورت کمتر از دو ساعت در دمای اتاق قابل نگهداری می باشد.
- امکان نگهداری قبل از فرایندآزمایش : ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد
- محیط کشت های اولیه : بلاد آگار ، مک کانکی آگار و یا EMB

کشت ادرار

- آزمایش مستقیم : نمونه ادرار باید از لحاظ وجود پیوری بررسی شود . اگر چه انجام رنگ امیزی گرم درمنابع معتبر از ادرار سانتریفیوژ نشده توصیه شده است و مشاهده حد اقل یک عدد باکتری در هر میدان میکروسوپی با عدسی ایمرسون معادل 10^5 CFU/ml باکتری در ادارار می باشد ولی عملا رنگ آمیزی گرم از ادرار بطور روتین انجام نمی شود.

کشت ادرار

- **توضیح** : کشت باید کمی انجام شود و بصورت CFU/ml گزارش گردد ، درخانم های جوان دارای علایم اورتریت تعداد ۱۰۰۰ کلنی نیز دارای ارزش می باشد. بنابراین باید از لوپ کالیبره استفاده کرد و به اندازه یک لوپ از ادرار برداشته و کشت داد سپس تعداد کلنی باکتری کشت یافته را در ضریب لوپ (هزار لاندا تقسیم بر حجم لوپ) ضرب کرد .

کشت ادرار

- **نوع نمونه : ادرار (جمع آوری شده با سوند مستقیم)**
- ظرف انتقال نمونه : ظرف استریل درب دار
- آماده سازی بیمار : ناحیه مجرای ادرار را با آب و صابون شسته و تمیز کنید
- دستورالعمل خاص : سوند را از طریق مجرا وارد مثانه کرده و ۱۵ میلی لیتر اول ادرار را دور ریخته و سپس برای کشت جمع آوری کنید .
- انتقال به آزمایشگاه :کمتر از دو ساعت در دمای اتاق . در صورت استفاده از مواد نگهدارنده ۲۴ ساعت در دمای اتاق

کشت ادرار

- نگهداری قبل از فرایند آزمایش : ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد
- محیط کشت های اولیه : بلاد آگار ، مک کانکی یا EMB
- آزمایش مستقیم : رنگ آمیزی گرم و ار لحاظ پیوری چک شود
- کامنت : کشت باید کمی انجام شود . کشت سوند فولی توصیه نمی شود.

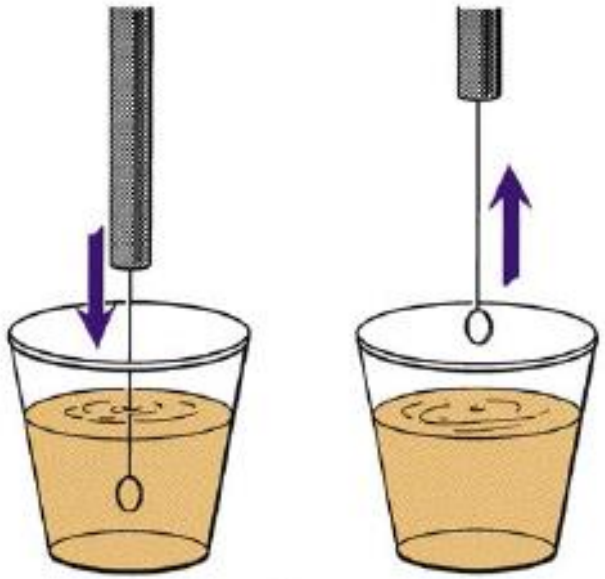
کشت ادرار

- **نوع نمونه : ادرار (جمع آوری شده بروش آسپیراسیون از سوپرا پوبیک)**
- ظرف انتقال نمونه : ظرف استریل درب دار ویا محیط انتقال بیهوازی
- آماده سازی بیمار : محل آسپیراسیون را ضد عفونی کنید
- دستورالعمل خاص : از بالای استخون شرمگاهی و دیوار شکم و توسط پزشک آسپیره می شود
- انتقال به آزمایشگاه : سریعا و در دمای اتاق .
- نگهداری قبل از فرایند آزمایش : بلافاصله باید کشت داده شود

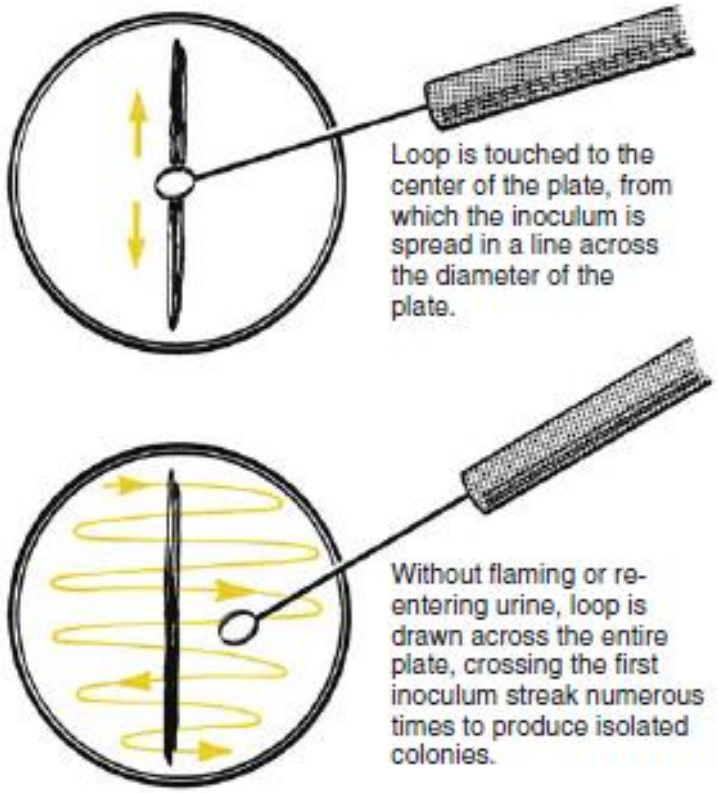
کشت ادرار

- محیط کشت های اولیه : بلاد آگار مکانکی یا EMB وتایو گلیکولات و محیط کشت بیهوازی (در صورت موجود بودن)
- آزمایش مستقیم : رنگ آمیزی گرم و از لحاظ پیوری چک شود
- توضیح : کشت ادرار باید کمی انجام شود .

روش کشت ادرار



• **Fig. 72.3** Method for inserting a calibrated loop into urine to ensure that the proper amount of specimen adheres to the loop.



• **Fig. 72.4** Method for streaking with calibrated urine loop to produce isolated colonies and countable colony-forming units.

شرایط نگهداری و انتقال ادرار

- **شرایط نگهداری و انتقال ادرار:**
- نمونه ادرار تهیه شده تا ۲ ساعت در دمای اتاق و تا ۲۴ ساعت در یخچال قابل نگهداری است .
- افزودن اسیدبوریک به غلظت ۲-۱ درصد تعداد باکتری ها در ادرار را تا ۹۶-۴۸ ساعت در دمای محیط ثابت نگه میدارد و بندرت روی رشد بعضی از ارگانیسم ها تاثیر منفی دارد.

شرایط رد نمونه ادرار

- ۱-نمونه های بدون برچسب مشخصات بیمار
- ۲-نمونه هایی که در ظروف نامناسب به آزمایشگاه رسیده باشند.
- ۳-نمونه ادرار ۲۴ ساعته
- ۴- نمونه های ادراری که بیش از ۲ ساعت در حرارت اتاق (RT) مانده باشد
- ۵-نمونه های ادراری جمع آوری شده از کیسه ادرار
- ۶-کشت از نوک کاتتر ادراری
- ۷-به غیر از نمونه هایی که به طریق سوپراپوبیک جمع آوری شده اند ، نمونه های که جهت کشت بی هوازی در خواست شده است را قبول نکنید

شرایط رد نمونه ادرار

- -به غیر از نمونه هایی که به طریق سوپراپوبیک جمع آوری شده اند ، نمونه های که جهت کشت بی هوازی در خواست شده است را قبول نکنید.
- ۸-اگر نمونه ای که صحیح جمع آوری نشده باشد و یا نگهداری و انتقال آن نامناسب باشد با نمونه جدید قابل جایگزینی نباشد در گزارش نهایی نامناسب بودن نمونه ذکر شود. در مجموع در بیماران بستری بدلیل در دسترس بودن آنها تکرار نمونه راحت تر است

آزمایش کامل ادرار

- بر اساس پیشنهاد NNISتوجه بـه علائم بـالینی و هـمچنین نتایج آزمایش کامل ادرار برای تفسیر و گزارش کشت‌های ادرار و تشخیـص عفـونت ادراری ضـروری است. بنابراین، بـرای اطمینان از درستی تفسیر بایـد از صحیح بودن نتایج آزمایش کامل ادرار مطمئن شد. در این رابطه، می‌توان به موارد زیـر اشـاره نمود:

1. زمان و دور سانتریفیوژ (۲۰۰۰–۲۵۰۰ rpm) به مدت ۵ دقیقه

- National Nosocomial Infection Surveillance

آزمایش کامل ادرار

1. حجم ادرار سانتریفیوژ شده نباید کمتر از ۱۰ میلی‌لیتر باشد (درصورتی‌که این حجم مثلاً ۶ میلی‌لیتر باشد باید تعداد عناصر مشاهده‌شده را در عدد ۲ ضرب کرد)

• ۳-تعداد ۵ < لکوسیت در هر (۴۰X)HPF ادرار سانتریفیوژ شده به‌عنوان پیوری (Pyuria) تلقی می‌شود که معادل ۵۰ < لکوسیت در هر میلی‌متر مکعب است

• ۴-نکته: مقادیر طبیعی لکوسیت در ادرار زنان و مردان باهم متفاوت است:

مردان = 0-3/HPF زنان = 0-5/HPF

آزمایش نیتریت

- باکتری‌های بیماری زای ادراری مـانـنـد اشرشیا کلی، انتروباکتر، کلبسیلا، پروتئوس، سودوموناس، استرپتوکوکوس، نـیـتـریت مـثبت بوده ولـی استـافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس و انتروکوکوس نیتـریـت منـفی هستنـد.

- بعضی مؤلـفان نتـایج آزمایش نیتریت را در ارزیـابی عفونت‌های بیمارستانی رضایت‌بخش نمی‌دانند. مثبت کاذب به ندرت دیده می‌شود، به‌عنوان‌مثال ممـکن است مصرف داروی فنازوپیریدین آزمایش را مثبت کاذب کنـد. منفی کاذب ممکن است در این موارد دیده شود:

موارد منفی کاذب آزمایش نیتریت ادرار

1. تعداد باکتری کمتر از 10^5 در هر میلی‌لیتر
2. مقدار pH کمتر از ۶،
3. اسید اسکوربیک بالا
4. وزن مخصوص بالای نمونه
5. وقتی بیمار کمتر از چهار ساعت قبل هم ادرار کرده باشد
6. نمونه‌های گرفته‌شده از کاتترهای ادراری
7. کمبود نیترات در برنامه ی غذایی بیمار

آزمایش لکوسیت استراز

- در صورت وجود نوتروفیل های سالم یا لیز شده در ادرار این آزمایش مثبت می‌شود.

- **موارد منفی کاذب:**

- افـزایـش زیـاد وزن مخصـوص، پـروتئین و گلوکـز در ادرار، ۲- مقادیـر خیـلی زیـاد اسیـدآسکوربیک؛ ۳- مصرف تتراسیکلین، سفالکسین و سفـالوتین، ۴- افزودن اسیدبوریک بـه ادرار به‌عنوان ماده نگه‌دارنده.

- **موارد مثبت کاذب:**

- آلودگی شدید بـا تـرشـحات واژن بـه علت WBC زیاد، تعـداد زیـاد سلول‌های اپیتلیال سنگفرشی و

محیط کشت های لازم برای کشت ادرار

- –بلاد آگار در مجاورت CO_2 در دمای ۳۵ در جه سانتیگراد بمدت ۲۴ سا عت
- ۲– EMB یا مک کانکی در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد بمدت ۲۴ ساعت
- ۳– کشت بیهوازی برای ادرار لزومی ندارد مگر اینکه از طریق سوپرا پوبیک گرفته شده باشد.
- توجه برای کشت ادارار از لوپ کالیبره از جنس نیکروم باید استفاده کرد و بیشتر از لوپ با ضریب۰.۰۱ استفاده می شود
- از یک پلیت ۸ سانتی برای بیش از دو بیمار استفاده نشود بهتر است جهت سهولت خواندن کشت های ادرار از یک پلیت دوخانه که یک طرف آن بلاد آگار و طرف دیگر آن مک کانکی / EMB باشد برای یک بیمار استفاده شود.
- کشت بیهوازی برای ادرار لزومی ندارد مگر اینکه از طریق سوپرا پوبیک گرفته شده باشد.

تفسیر نتایج کشت ادرار

- در تفسیر نتایج کشت باید به این موارد توجه کرد:

  - عـوامل مـرتبط بـا بیمـار (نـوع نمونـه ی ادرار، سـن، جنسیت، عـلائـم بـالینی و مصرف آنتی‌بیوتیک)
  - نتیجهٔ آزمون میکروسکوپی رسوب ادرار (وجود باکتری و پیوری)
  - روش نمونه برداری
  - شرایط کلنی‌های رشد یافته روی پـلیت (تنـوع کلنـی رشد کرده یا خلوص کشت، تعداد باکتری و نوع باکتری رشـد یافته)
  - آزمایشهای کامل ادرار از قبیل آزمایش نیترات و لکوسیت استراز

عوامل شایع عفونت های ادراری

1. انتروباکترال اشریشیا کولی ، گونه های کلبسیلا ،پروتئوس میرابیلیس و...
2. *سودوموناس آئروژینوزا*
3. *اسینتو باکتر بومانی*
4. *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس*
5. *استافیلو کوکوس اروئوس*
6. استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و سایر استافیلوکک های کوآگولاز منفی
7. استرپتوکوک های بتا همولیتیک
8. انترو کوکها
9. *کاندیدا آلبیکانس*

توجه

- باکتریهای از قبیل لاکتو باسیل ها ، دیفتروئید ها و باسیلوس ها بعنوان آلودگی تلقی می شوند ولی اگر بعد از تکرار مجددا بصورت خالص رشد کنند و تعداد کلونی ها آنها بیشتر باشد قابل ارزش می باشند در اینگونه موارد آزمایشگاه باید آنها گزارش کند ولی نیاز به آزمایش سنجش حساسیت ضد میکروبی نمی باشد

- استرپتوکوک گروه B را در خانم های باردار با هر تعداد باید گزارش کرد.

کشت خون و مغز استخوان

- ظرف انتقال نمونه : بطری های کشت خون هوازی و بیهوازی
- آماده سازی بیمار : ضد عفونی کردن محل نمونه گیری با الکل ۷۰٪ و بتادین یا کلراهگزیدین
- دستورالعمل خاص: نمونه خون را در زمان تب بگیرید . حد اقل دو سری خون از دو قسمت آناتومیکی مختلف (بازوی چپ و بازوی راست) گرفته شود . در ۲۴ ساعت بیش از سه ست نمونه گرفته نشود .در هر ست خون گیری از بزرگسالان ، برای کشت های هوازی و بیهوازی حدود ۲۰ میلی لیتر و در صورتی که فقط کشت هوازی مد نظر باشد ۱۰ میلی لیتر خون گرفته شود
- انتقال به آزمایشگاه: : در عرض دوساعت

کشت خون

- نگهداری قبل از فرایند آزمایش : کمتر از ۲ساعت در دمای اتاق بعد از رسیدن نمونه به آزمایشگاه سریعا در دمای ۳۷ انکوباسیون گردد.

- محیط کشت های اولیه: بطریهای کشت خون که بصورت روتین استفاده میشود در صورت استفاده از سیستم های خودکار از بطری های کشت خون توسط شرکت سازنده استفاده گردد .

- آزمایش مستقیم : رنگ آمیزی گرم از کشت های مثبت به عمل آید.

- توضیح : توصیه میشود در صورت مشکوک بودن به بروسلوزیس ،تولارمی ، لپتوسپیروزیز و باسیل های اسید فاست کشت خون قبل از آنتی بیوتیک درمانی صورت گیرد.

کشت خون

• آزمایش کشت خون رایج ترین روش جهت تشخیص عفونت های گردش خون توسط باکتریها و قارچ ها می باشد .تشخیص بموقع و شروع درمان بیماران مبتلا به سپسیس نه تنها باعث کاهش مرگ ومیر بیماران می شود بلکه باعث کاهش مدت زمان بستری بیماران در بیمارستان و صرفه جویی در هزینه ها می گردد. محل نمونه گیری با الکل ۷۰٪ و بتادین یا کلراهگزیدین nضد عفونی شود. حجم خون گرفته شده نسبت به حجم محیط کشت خون ۱:۵ الی ۱:۱۰ می باشد .مقدار خون گرفته شده از بیماران به بطری کشت خون هوازی و ۱۰ میلی لیتر دیگر آن به محیط کشت خون بیهوازی تلقیح می گرد بزرگسال در هر نوبت حدود۲۰ میلی لیتر می باشکه ۱۰ میلی لیتر آن به بطری کشت خون هوازی و ۱۰ میلی لیتر دیگر آن به محیط کشت خون بیهوازی تلقیح می گردد.

کشت خون

- در یک مطالعه نشان داده شده تلقیح ۱۰ میلی لیتر خون به محیط کشت خون در مقایسه با تلقیح ۵ میلی لیتر باعث افزایش ۵/۷ ٪ تشخیص باکتریمی شده است .اگر میزان خون گرفته شده از بیمار کم باشد اولویت تلقیح به محیط کشت خون هوازی می باشد .فاصله گرفتن هر ست خون ۲-۱ ساعت می باشد و توصیه می شود زمانیکه بیمار دچار تب می باشد نمونه گرفته شود. در ضمن نمونه گیری از دو ناحیه آناتومیکی مجزا باشد پس از گرفتن نمونه باید مشخصات بیمار شامل نام ونام خانوادگی، تاریخ جمع آوری بر روی برچسب نمونه قید شود. و ترجیحا تا دوساعت به آزمایشگاه ارسال شود

مقدرار خون لازم برای کشت با توجه به سن و وزن بیمار

Age & body weight	Amount (divided between 2 blood cultures)	Remarks
Neonates to 1 year (<4 kg)	0.5 to 1.5 ml	At least 1 ml Two separate venipunctures are generally not possible
Children (< 40 kg)	10 to 20 ml	Blood culture volumes should be limited to <1% of total blood volume (usually about 0.7 ml/kg). e.g. total sample limit would be 7 ml for a 10 kg patient and 28 ml for a 40 kg patient.
Adults & children (>40 kg)	30 to 40 ml	At least 10-20 ml of blood

محیط های کشت خون

- ۱-بطری های کشت خون حاوی TSB حاوی SPS پس از تلقیح خون بیمار به مدت ۷ روز در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد انکوباسیون گردند و در صورت مشکوک بودن به بروسلا(۴-۳ هفته) .اگر از سیستم های خود کار کشت خون مانند Bactec یا Bactalert استفاده می کنید طبق دستور شرکت سازنده عمل شود.

- علاو بر ساب کالچر کردن روتین که در بالا به آن اشاره شد بطریهای کشت خون باید هر روز از لحاظ ظاهری بررسی گردند و به دنبال مشاهده هر گونه علایم رشد از قبیل ایجاد کدورت ،همولیز و.....) ابتدا یک اسمیر جهت رنگ آمیزی گرم تهیه شده ونتیجه آن به پزشک معالج گزارش گردد

مشاهده ظاهری محیط کشت های خون انکوبه شده

مشاهدات ظاهری	میکروارگانیسم
همولیز :	استرپتوکک ها ، استافیلو کوک ها ، لیستریا مونوسیتوژن گونه های کلستریدیوم و گونه های باسیلوس
کدورت :	باسیل های گرم منفی هوازی ،استافیلوکوکها ،و گونه های باکتروئید
تولید گاز :	باسیل های گرم منفی هوازی و بیهوازیها
تشکیل ورقه نازک :	گونه های سودوموناس، گونه های باسیلوس و مخمر ها
کلونی های قابل روئیت :	استافیلو کوک ها و استرپتوکوک ها

عوامل ایجاد کننده کشت های مثبت خون

- گزارش کشت خون مثبت دلیل بر وجود باکتریمی می باشد تعدادی از میکروارگانیسم هایی که بعنوان فلور طبیعی پوست می باشند باعث آلودگی کشت های خون ونهایتا باکتریمی کاذب می گردند .میزان آلودگی کشت های خون در شرایط معمولی حدود ۳ درصد می باشد. مهم ترین پاتوژن های کشت خون عبارتند از

- *استافیلوکوکوس اروئوس، استرپتوکوکوس پیوژن، استرپتوکوکوس پنمونیه ،انترکوکوس فکالیس ،انتروکوکوس فسیوم ، اشریشیا کولی ، کلبسیلا پنمونیه، سا لمونلا ، پسودوموناس آئروژینوزا ، گونه های آسینتو باکتر ،،هموفیلوس آنفلونزا ، نیسریا منتژیتیدیس و کاندیدا آلبیکنس*

عوامل ایجاد کننده آلودگی درکشت های مثبت خون

- باکترهای کومانسال که اغلب از محیط های کشت خون جدا می شوند شامل استافیلو کک های کوآگولاز منفی، گونه های باسیلوس (بجز *باسیلوس آنتراسیس*) گونه های کورینه باکتریوم (دیفتروئیدها) میکروکوک ها و گونه های پروپینو باکتریوم می باشند.
- جدا شدن باکتری های کومانسال فقط از یک بطری کشت خون نشان دهنده آلودگی می باشد مگر اینکه حداقل از بیش از یک بطری کشت خون جدا شده باشند ویا هم زمان علاوه بر کشت خون از نمونه های دیگری از قبیل مایع مغزی نخاعی نیز جدا شده باشند و درضمن علایم بیماری نیز باید در نظر داشت که در اینصورت باید بعنوان پاتوژن تلقی کرد.

عوامل ایجاد کننده کشت های مثبت خون

- بعنوان مثال استافیلوکک های کوآگولاز منفی یکی از مهمترین میکروارگانیسم های ایجاد کننده باکتریمی در بیمارستان ها می باشد ودر عین حال از شایعترین باکتریهای آلوده کننده بطریهای کشت خون هستند .میزان آلودگی بطری های کشت خون در شرایط عادی حدود ۳- ۱ درصد می باشد.در صورتیکه میزان آلودگی بیش از ۳٪ باشد احتمال آلودگی موقع نمونه گیری وجود دارد که باید در مراحل ضد عفونی کردن خون گیری تجدید نظر شود یکی دیگر از منابع آلودگی کشت های خون سوند های درون رگی و احتمال آلودگی مواد ضد عفونی کننده می باشد.

روشهای دیگر در تشخیص

- روش های سریع دیگری نیز جهت تشخیص عفونت های خون وجود دارند که شامل , FISH ، روشهای مولکولی و اندازه گیری بیومارکر ها می باشند. اخیر ا در آزمایشگاه های مدرن میکروب شناسی جهت تشخیص سریع ارگانیسم های مولد سپتیسمی ویا سایر عفونت ها اعم از باکتری ها و قارچ ها از سیستمی بنام MALDI -TOF استفاده می کنند که قادر است در اسرع وقت میکروارگانیسم های در سطح گونه شناسی کند ، در این روش ارگانیسم اول باید از کشت های خون ساب کالچر شوند. استفاده مستقیم از بطری های کشت خون هنوز توسط FDA تائید نشده است

کشت نیمه کمّی نوک کاتتر

- کشت نیمه کمی شایع ترین روش کشت از نوک کاتتر می باشد.و با توجه به امکانـات مـوجود در ایـران در حـال حاضر، عملی‌ترین روش است. حساسیت این روش تا ۸۵٪ گزارش شده است، ولی اختصاصیت آن پایین می‌باشد.
- در این تکنیک نوک کاتتر روی مـحیط کشیده می‌شود. اگر کلونیزاسیون در سطح خارجی کاتتر باشد، ماننـد کاتترهای کمتر از ۱۰ روز که منشأ آلودگی از سطح پوست است، این روش ارزش بیشتری دارد.

- دامنه cut off ≥15CFU/tipدر مورد استـافیـلوکوك هـا ارزش بیشتری دارد تا مواردي که عفونت با باکتری‌های گرم منفی، قارچ‌ها و استرپتوکوك گروه A ایجاد شـده باشد که ممکن است در آن تعداد کمتر از ۱۵CFU/ tip باشد، درحالی‌که بیمار دچار عفونت واقعی شده است. بعضی از تحقیقات برای بالا بردن حساسیت دامنه باارزش CFU/tip 5 را در نظر گرفته‌اند، ولی در ایـن حـالت اختصاصیت این روش کاهش می‌یابد.

روش انجام کشت نیمه کمّی از نوک کاتتر

- ۱-ابتدا محل ورود کاتتر بـه پـوست را با الکل ۷۰٪ ضدعفونی و پس از خشک شدن کاتتر را خارج می‌کنیم.
- ۲-حدود ۴ تا ۵ سانتی‌متر آخر کاتتر را با قیچی استریل جدا می‌کنیم و در لولهٔ استریل قرار می‌دهیم و در مدت زمان کمتر از ۱۵ دقیقه و قبل از خشک شدن به آزمایشگاه منتقل می‌کنیم. کاتتر نبایـد در سـالین یـا محیط‌های انتقالی قرار داده شود. در مورد کاتترهای بلند در صورت درخواست پزشک می‌توان کاتتر نزدیک به پوست را نیز به‌طور جداگانه کشت داد و نتیجه را گزارش نمود.
- ۳-در صورت تأخیر در انجام آزمایش، می‌توان نمونـه را به مدت ۲ سـاعـت در یـخچـال ۴ درجه سانتیگراد نگهداری نمود.
-

کشت نیمه کمّی نوک کاتتر

- ۴–نوک کاتتر را به‌وسیلهٔ پنس استریل چند بار روی یک محیط جامد شکلات آگار یا بلاد آگار یا به حالت غلتشی حرکت می‌دهیم.
- ۵–بایستی دقت کرد که اندازه کمتر یـا بیشتر از ۴–۵ سانتی‌متر از طول کاتتر جدا شده در نتیجهٔ آزمایش تأثیر می‌گذارد و عـدد ۱۵ ≤ بـرای این اندازه استاندارد سازی شده است.
- ۶–محیط کشت را در دمای ۳۵°C و در شرایط CO_2 برای مـدت زمان ۷۲ تا ۹۶ ساعت انکوبه کرده و به‌طور روزانه بررسی می‌کنیم. در صورت مثبت شدن و مشاهده چند نوع کلنی مختلف، هرکدام را جداگانه شمارش کرده و گزارش می‌دهیم.
- ۷–آزمون تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی در این موارد نیاز نیست، مگر به درخواست پزشک باشد ویا یـا مثبت شدن هم‌زمان کشت خون با همان نوع باکتری که از کاتتر جداسازی شده است.

نوع نمونه : مدفوع (کشت روتین)

- ظرف انتقال نمونه : ظرف درپیچ دار شفاف تمیز .اگر فاصله نمونه تا ارسال به آزمایشگاه بیش از یک ساعت باشد از محیط انتقالی کری بلر استفاده شود.
- آماده سازی بیمار : ندارد
- دستورالعمل خاص : کشت روتین مدفوع برای جدا سازی سالمونلا ، شیگلا و کمپیلوباکتر می باشد .در صورت لزوم به جدا سازی *ویبریو کلرا* ،آئرومونا‌س ، پلزیومونا‌س و *اشریشیا کولی* O157;H7 در خواست گردد

کشت مدفوع

- انتقال به آزمایشگاه: ۲۴ ساعت در محیط انتقال بدون محیط انتقال کمتر از یک ساعت در دمای اتاق
- نگهداری قبل از فرآیند آزمایش : ۲۴ ساعت در دمای اتاق و کمتر از ۴۸ ساعت در در دمای اتاق و یا ۴ درجه سانتیگراد
- محیط کشت های اولیه: بلاد آگار ، مک کانکی آگار ، XLD، Campy blood agar، مکانکی سوربیتول آگار و کروموژنیک آگار (برای O157;H7)
- آزمایش مستقیم : متیلن بلو برای لکوسیت و رنگ آمیزی گرم برای تشخیص احتمالی کامپیلو باکتر
- توضیح : برای بیمارانی که بیش از ۷۲ ساعت در بیمارستان بستری شده اند کشت مدفوع ارزش ندارد و باید از لحاظ توکسین *کلستریدیوم دیفسیلی* باید آزمایش شود.

نوع نمونه : **رکتال سواب**

- ظرف انتقال نمونه : سواب در داخل محیط انتقال (کری بلر)
- آماده سازی بیمار : ندارد
- دستورالعمل خاص : سواب را حدود ۵/۱ –۱اینچ در داخل رکتوم فروبرده به طوری که کاملا به مدفوع آغشته شده و قابل رویت باشد
- انتقال به آزمایشگاه: : کمتر از دوساعت در دمای اتاق
- نگهداری قبل از فرآیند آزمایش : کمتر از ۲۴ ساعت در دمای اتاق
- محیط کشت های اولیه بلاد آگار ، مک کانکی آگار ، XLD

آزمایش مستقیم

- آزمایش مستقیم مدفوع : از رنگ آمیزی متیلن بلو برای مشاهده لکوسیت مدفوعی استفاده می شود. . با توجه به اینکه کشت کمپیلوباکتر در بسیاری از آزمایشگاه اتجام نمی شود لذا استفاده از روش رنگ آمیزی گرم تغییر یافته جهت مشاهده کمپیلوباکتر در مدفوع کمک کننده می باشد. در این روش در مرحله آخر رنگ امیزی گرم به جای سافرانین از کربول فوشین ویا فوشین بازی 0.1%استفاده می شود.در این روش کمپیلو باکتر بصورت باسیل های گرم منفی خمیده شبیه به بال مرغ دریائی دیده می شود

- توضیح : علاوه بر سالمونلا و شیگلا و کمپیلوباکتر سایر ارگانیسم ها از قبیل ویبریو کلر، یرسینیا انترکولیتیکا ، پلزیوموناس ، آئروموناس نیسریا گونوره آ استرپتو کوک های گروه B را نیز باید در نظر داشت.

کشت مدفوع

- نمونه های مدفوع را در محیط های زیر کشت دهید

1. مک کانکی آکار انکوباسیون در دمای ۳۵ در جه سانتیگراد ۲۴ ساعت
2. زایلوز لیزین دزوکسی کولات (XLD) انکوباسیون در دمای ۳۵ در جه سانتیگراد ۲۴ ساعت
3. هکتون انتریک آگار انکوباسیون در دمای۳۵ درجه سانتیگراد ۲۴ ساعت
4. بلاد آگار : انکوباسیون در دمای ۳۵ در جه سانتیگراد ۲۴ ساعت
5. کامپیلو باکتر آگار : در دمای ۴۲ در جه سانتیگراد و شرایط میکروآئروفیل ۷۲-۴۸ ساعت
6. سوربیتول مک کانکی آگار برای اشریشیا کولی آگار O157: H7

کشت مدفوع

- در صورت در خواست برای ارگانیسم های خاص می توان از محیط های اختصاصی استفاده کرد بعنوان مثال TCBS برای ویبریو کلرا CIN agar برای یرسینیا انترکولیتیکا
- پاتوژن های مهم دستگاه گوارش
- مهمترین پاتوژن های گوارش شامل
- سالمونلا و شیگلا و کمپیلوباکتر ، اشریشیا کولیO157 : H7 سایر ارگانیسم هااز قبیل ویبریو کلر، یرسینیا انترکولیتیکا ، پلزیوموناس ، آئروموناس
- **نکته :**کشت مدفوع بیمارانی که بیش از ۷۲ ساعت در بیمارستان بستری شده اند ارزش تشخیصی ندارد. در این بیماران مدفوع باید از لحاظ وجود توکسین کلسریدیوم دیفسیلی بررسی گردد.

نوع نمونه : آسپیراسیون شیره معده

- ظرف انتقال نمونه : لوله استریل در پیچ دار
- آماده سازی بیمار : صبح زود ناشتا انجام شود
- انتقال به آزمایشگاه: کمتر از ۱۵ دقیقه
- نگهداری قبل از فرآیند آزمایش : کمتر از ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد.در عرض یک ساعت باید با سدیم بیکربنات خنثی شود.
- محیط کشت های اولیه: بلاد آگار ، شکلات آگار و هکتون انتریک آگار و کشت بی هوازی
- آزمایش مستقیم : گرم و آکریدین اورنج
- توضیح : از لحاظ باسیل های اسید فست نیز کشت داده شود.
- این روش بیشتر در کودکان که اغلب قادر به دادن خلط نیستند جهت تشخیص سل ریوی بکار میرود و به دستورالعمل های آزمایشگاه سل مراجعه شود.

مایع مغزی نخاعی :

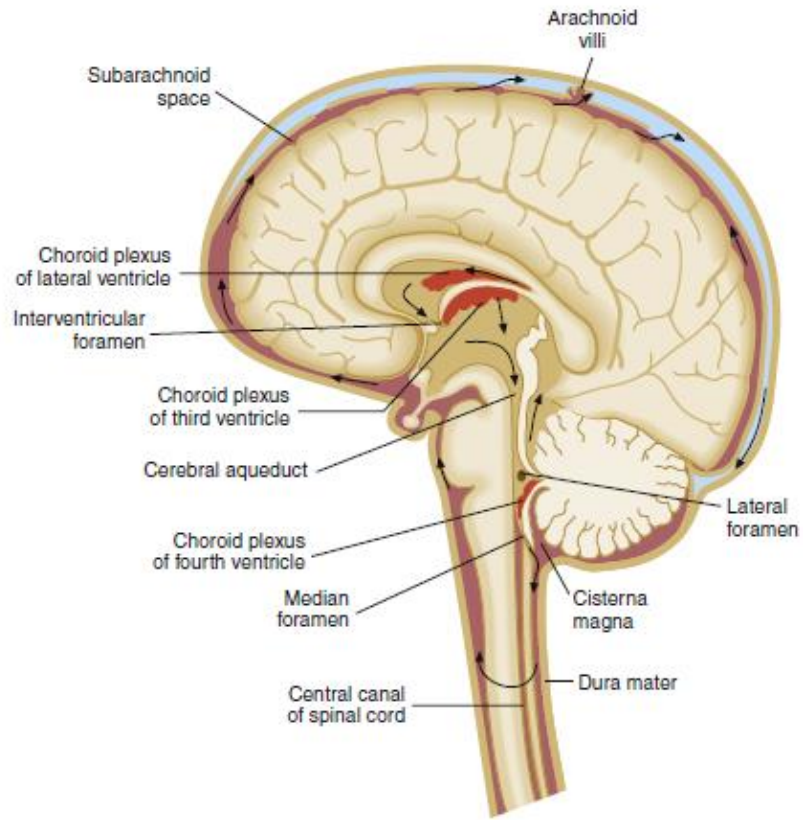
- ظرف انتقال نمونه : لوله درب پیچ دار استریل
- آماده سازی بیمار : ضد عفونی کردن محل نمونه گیری با الکل ۷۰٪ و بتادین قبل از آسپیراسیون
- دستورالعمل خاص : تست های سریع از قبیل رنگ آمیزی گرم و آزمایش سریع برای آنتی ژن کریپتوکوکوس
- انتقال به آزمایشگاه: : کمتر از ۱۵ دقیقه
- نگهداری قبل از فرآیند آزمایش : کمتر از ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه
- محیط کشت های اولیه: بلاد آگار ، شکلات آگار و مک کانکی آگار ، اگر نمونه از شنت گرفته شده باشد در محیط تایوگلیکولات ویا سایر محیط کشت بی هوازی قابل دسترس نیز کشت داد شود

آزمایش مستقیم : رنگ آمیزی گرم

- توضیح : اگر نمونه از شنت CNS جمع آوری شده باشد در محیط تایو گلیکولات نیز کشت داده شود. مایع مغزی نخاعی و نمونه های گرفته شده ازشنت در محیط کشت خون یا محیط های کشت خون دستگاهی نیزکشت داده شوند.

- ۱-نمونه مایع مغزی نخاعی را هر چه سریعتر به آزمایشگاه ارسال کنید و به آزمایشگاه اطلاع دهید که نمونه در حال انتقال به آزمایشگاه می باشد

- ۲-نمونه را به هیچ وجه داخل یخچال قرار ندهید



• **Fig. 70.2** Flow of cerebrospinal fluid (CSF) through the brain. CSF originates in the choroid plexus and then flows through the ventricles and subarachnoid space and into the bloodstream.

اسمیر مستقیم

- بلافاصله یک اسمیر از مایع مغزی نخاعی تهیه کنید و پس از رنگ آمیزی گرم زیر میکروسکوپ بررسی کنید. در بررسی میکروسکوپی حتما به وجود PMNs و تعدادآنها توجه داشته باشید. در صورت وجود باکتری تعداد و مورفوتایپ آنها را در نظر داشته باید . حداکثر تا یک ساعت (بطور متوسط ۴۰ دقیقه) پس از رسیدن نمونه مایع مغزی نخاعی نتیجه رنگ آمیزی گرم را به پزشک اطلاع دهید .در ضمن می توانید از رنگ آمیزی بلو دومتیلن بعنوان یک رنگ کمکی نیز استفاده کنید . یافته های آزمایشگاهی از قبیل میزان گلوکز ، پروتئین وسیتولوژیکی نیز در تشخیص منتژیت کمک کننده است.

جدول-۱راهنمای تفسیر نتایج آزمایشگاهی در مبتلایان به مننزیت با در نظر گرفتن یافته های هماتولوژیکی و بیوشیمیایی

Clinical Setting	Leukocytes/mm^3	Predominant Cell Type	Protein	Glucose*
Normal	0-5	None	15-50 mg/dL	45-100 mg/dL
Viral infection	2-2000 (mean of 80)	Mononuclear†	Slightly elevated (50-100 mg/dL) or normal	Normal
Purulent infection	5-20,000 (mean of 800)	Polymorphonuclear	Elevated (>100 mg/dL)	Low (<45 mg/dL), but may be normal early in the course of disease
Tuberculosis and fungi	5-2000 (mean of 100)	Mononuclear	Elevated (>50 mg/dL)	Normal or often low (>45 mg/dL)

*Must consider cerebrospinal fluid (CSF) glucose level in relation to blood glucose level. Normally, the CSF glucose serum ratio is 0.6, or 50% to 70% of the blood glucose normal value.
†About 20% to 75% of cases may have PMN leukocytosis early in the course of infection.

کشت مایع مغزی نخاعی

- از مایع مغزی ونخاعی در روی محیط های کشت زیر کشت دهید . اگر حجم مایع مغزی ونخاعی بیشتر باشد پس ازسانتریفیوژ کردن از رسوب هم اسمیر تهیه کرده و هم کشت دهید در صورت کم بودن نمونه (کمتر از یک میلی لیتر) چند قطره از آنرا روی لام بریزید و بدون اینکه پخش کنید رنگ آمیزی گرم انجام دهید و چند قطره نیز در هرکدام از محیط های زیر کشت دهید.

کشت مایع مغزی نخاعی

1. محیط های کشت بلاد آگار در مجاورت CO_2 در دمای ۳۵در جه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت
2. شکلات آگار در مجاورت CO_2 در دمای ۳۵در جه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت
3. مک کانکی آگار در دمای ۳۵درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت
4. بطری کشت خون طبق دستور کشت خون
5. محیط کشت تایوگلیکولات (نمونه گرفته شده از شنت سیستم اعصاب مرکزی در ۳۵ در جه سانتیگراد به مدت ۷ روز.

مهمترین عوامل مننژیت

- نوزادان کمتر از ۲۸ روز : اشریشیا کولی ، استرپتو کوکوس گروهB و لیستریا مونوسیتوژن
- کودکان کمتر از دو ماه : استرپتو کوکوس گروه Bو هموفیلوس آنفلونزا
- کودکان کمتر از ۱۰ سال: هموفیلوس آنفلونزا و استرپتوکوکوس پنومونیه
- بزرگسالان : استرپتوکوکوس پنومونیه و نیسریا مننژیتیدیس
- افراد دارای نقص ایمنی : . باکتریهای معمول ، کریپتوکوکوس نئوفورمنس و لیستریا مونوسیتوژن
- عفونت های شنت سیستم اعصاب مرکزی : استا فیلو کوک های کوآگولاز منفی و استافیلوکوکوس اروئوس

نوع نمونه : کشت مایعات استریل بدن (مایع آمنیوتیک ، مایع آسیت ، مایع مفصلی و مایع پریکارد)

- ظرف انتقال نمونه : ظرف استریل درب دار ، محیط انتقال بیهوازی و یا بطری های کشت خون
- آماده سازی بیمار : ضد عفونی کردن محل نمونه گیری با الکل ۷۰٪ و بتادین قبل از آسپیراسیون(مثل روش خون گیری برای کشت خون)
- دستورالعمل خاص : آسپیراسیون
- انتقال به آزمایشگاه: کمتر از ۱۵ دقیقه
- نگهداری قبل از فرآیند آزمایش : کمتر از ۲۴ ساعت (در اسرع وقت) در دمای اتاق ، مایع پریکاردیال وکشت از لحاظ قارچ کمتر از ۲۴ ساعت در دمای یخچال
- محیط کشت های اولیه: بلاد آگار ، شکلات آگار و مک کانکی آگار ، تایو گلیکولات و محیط کشت های اختصاصی بیهوازی

آزمایش مستقیم : رنگ آمیزی گرم

- توضیح : می توان نمونه را سانتریفیوژ کرده و از رسوب آن برای کشت و اسمیر گرم استفاده نمود عفونت های مایعات استریل بدن اغلب منجر به مرگ ومیر قابل توجهی می شوند. بنابراین تشخیص سریع و صحیح اینگونه عفونت ها توسط آزمایشگاه میکروب شناسی از اهمیت ویژه ای برخوردار می باشد .کشت و جدا سازی میکروارگانیسم های ایجاد کننده عفونت از مایعات استریل بدن خیلی مشکل نمی باشد ولی تشخیص اهمیت تعداد کم این ارگانیسم ها بدلیل فلور طبیعی بودن همیشه چالش بر انگیز می باشد. موقع جمع آوری نمونه از مایعات استریل بدن باید دقت کرد که با میکروبیوتای کومنسال آلوده نگردد.چون این نمونه ها بصورت تهاجمی گرفته می شوند باید توسط پزشک صورت گیرد و آمنیو سنتز باید توسط متخصص زنان و زایمان انجام شود.

نمونه گیری مایعات استریل بدن

- ۱ قبل از شروع درمان آنتی بیوتیکی نمونه گیری کنید.
- ۲-محل فرو بردن سوزن را به روشی که برای گرفتن خون استفاده می کنید ضد عفونی کنید
- بصورت اسپتیک با سوزن نمونه را آسپیره کنید.
- ۳- نمونه را داخل یک لوله استریل ویا ظرف استریل بریزید بعضی مواقع نمونه را با سرنگ به آزمایشگاه ارسال می کنند.در این موراد سر سوزن را بر داشته ویک در پوش استریل به جای آن قرار دهید. اگر کشت بیهوازی لازم باشد آنر در محیط انتقالی بیهوازی ارسال کنید.

نمونه گیری مایعات استریل بدن

- – برای جمع آوری مایعات استریل بدن از سواب استفاده نکنید برای اینکه حجم نمونه کافی نمی باشد و نمی توان از آن یک اسمیر مناسب برای رنگ آمیزی گرم تهیه کرد و از سوی دیگر به دلیل کم بودن حجم نمونه اصلا برای کشت قارچ ومایکوباکریوم توبرکلوزیس کفایت

- نمی کند.

- ۵– نمونه های استریل بدن را در بطری های کشت خون نیز تلقیح کنید . نسبت حجم تلقیحی به بطری کشت خون مثل نسبت خون به محیط کشت است.

- ۶– لوله های حاوی ماده ضد انعقاد برای مایعات استریل مناسب نیستند. در صورت نیاز هپارین ارجحتر است اگر چه می توان از EDTA نیز استفاده کرد.

- ۱–نمونه های گرفته شده از نقاط استریل بدن را هرچه سریعتر به آزمایشگاه ارسال کنید و ارسال نمونه را اطلاع دهید.

چند نکته مهم

- ۱-اگر نمونه فقط در بطری کشت خون ارسال شده باشد رنگ آمیزی گرم قابل انجام نیست.
- ۲-نمونه ها را جهت تشخیص بهتر ،حتی المقدور قبل از آنتی بیوتیک درمانی بگیرید.
- ۳-نمونه ها را از محل هایی که با مواد ضد میکروبی انفیوژن شده است برداشت نکنید.
- ۴-اگر نمونه با سواب ارسال شده باشد به پزشک اطلاع دهید.
- ۵-اگر مقدار نمونه با توجه به تعداد آزمایش های در خواست شده کم باشد به پزشک اطلاع دهید
- ۶-نمونه های گرفته شده با سواب جهت کشت نمونه های استریل بدن ،کمترین ارزش را دارند

چند نکته مهم

- ۷-برای اینکه میزان نمونه خیلی ناچیز است لذا می توانید نمونه را کار کنید و در صورت انجام کشت موقع ارسال جواب نامناسب بودن نمونه را گزارش کنید.
- ۸-کشت های روتین خون برای برای باکتری ها ، برای ایزولاسیون کاندیدا کفایت می کند .
- نمونه های ارسالی از نقاط استریل بدن را از لحاظ ظاهری بررسی کنید

1. شفاف ، کدورت ضعیف- حالت ابری و چرکی بودن
2. خونی بودن
3. داشتن لخته

کشت و رنگ آمیزی گرم

- -اگر حجم نمونه بیشتر باشدابتدا تلقیح به بطری های کشت خون توصیه میشود
- ۲- پس از تلقیح اگر حجم باقیمانده بیش از ۵ میلی لیتر باشد آنر با دورrpm ۳۰۰۰-۲۰۰۰ بمدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژکرده سپس مایع رویی را در یک لوله دیگر ریخته و رسوب آنرا ورتکس کنید.
- با استفاده از یک پی پت پاستور استریل یک قطره از رسوب را در هرکدام از محیط های کشت های بلاد آگار ، شکلات آگار و مکانکی آگار کشت دهید برای کشت دادن در محیط تایو گلیکولات ۱۰-۵ قطره به آن تلقیح کنید. اگر نمونه سواب ارسال شده باشد نیاز به کشت در محیط تایو نمی باشد.
- یک قطره از رسوب را نیز بر روی یک لام تمیز ریخته و رنگ آمیزی گرم انجام دهید

- -در صورتیکه حجم باقیمانده کمتر از ۵ میلی لیتر باشد نیاز به سانتریفیوژکردن نیست و بطور مستقیم در روی محیط های ذکر شده کشت داده شود ودر ضمن چند قطره از آن را در روی لام ریخته و بدون اینکه پخش کنید رنگ آمیزی گرم انجام دهید.

- توجه : اگر حجم نمونه خیلی کم باشد فقط در شکلات آگار و تایوگلکولات کشت داده و یک اسمیر نیز برای رنگ آمیزی گرم تهیه کنید.در ضمن می توانید نمونه را با اضافه کردن ۳-۲ قطره براث رقیق کرده و از آن برای کشت و رنگ آمیزی گرم استفاده کرد.

- ۶- پس از رنگ آمیز گرم نتایج آنرا زیر میکروسکوپ بررسی کرده ثبت کنید.

مایعات استریل بدن را در محیط کشت های زیر کشت دهید

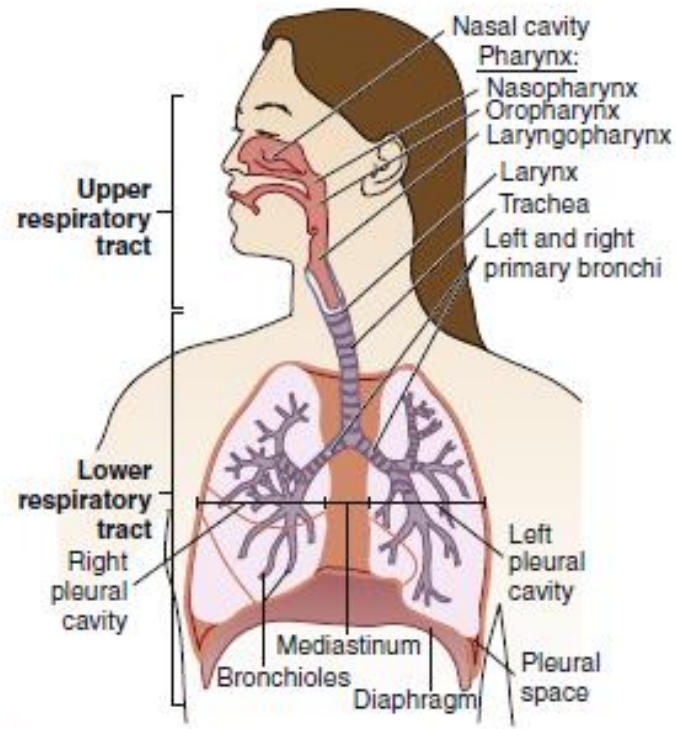
- -بلاد آگار : در مجاورت CO_2 و در دمای ۳۵در جه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت
- ۲- شکلات آگار : در مجاورت CO_2 در دمای ۳۵در جه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت
- ۳- مک کانکی آگار: در دمای ۳۵در جه سانتیگراد به مدت ۷۲ساعت
- ۴- محیط کشت بیهوازی : در دمای ۳۵در جه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت
- ۵- محیط کشت خون: مانند فرآیند کشت خون عمل شود
- محیط کشت تایو گلیکولات : در دمای ۳۵در جه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت

کشت مایعات استریل بدن

- ب- اگر کشت مخلوط باشد تمامی ارگانیسم ها را تعیین هویت کنید (پاتوژن های از قبیل بروسلا ، فرانسیسلا و...) باید در زیر هود بیولوژیکی کار شوند. تعیین هویت و آزمایش شوند
- سنجش حساسیت را برای ایزوله هایی که احتمال آلودگی را دارند انجام ندهید (بعنوان مثال اگر یک یا دوتا کلنی از استافیلو کوک ها کواگولاز منفی رشد کرده باشد)
- ج-برای نمونه های پریتوان که دارای رشد مخلوط میکروبیوتای دستگاه گوارش هستند تعیین هویت و انجام آزمایش سنجش حساسیت لزومی ندارد درمان آنتی بیوتیکی تجربی منجر به سوراخ شدن روده میشود وباکتریهای رایج از قبیل انتروباکترال ، بی هوازی هایی از قبیل استرپتوکوک ها ، باکتروئید فرازیلیس ، استرپتو کوک ها / انتروکوکوک می باشند ، ولی کشت جهت ایزولاسیون پاتوژن های مقاوم شده از قبیل مخمر ها ، سودوموناس آئروژینوزا ، و انترو کوک های مقاوم به وانکومایسین ضرورت دارد . علاوه براین پیدایش سویه های انتروباکترل مقاوم به چند دارو(MDR) نیز ممکن است نیاز به آزمایش های سنجش حساسیت ضد میکروبی داشته باشند.

نوع نمونه دستگاه تنفسی فوقانی – گلو

- ظرف انتقال نمونه : سواب مرطوب شده در محیط انتقالی استوارت و یا Amies
- آماده سازی بیمار : ندارد
- دستورالعمل خاص : نمونه برداری از قسمت خلفی گلو و لوزه ها صورت گیرد. .کشت روتین فقط از لحاظ استرپتوکوکوس پیوژن انجام می شود
- انتقال به آزمایشگاه: : کمتر از دوساعت در دمای اتاق
- نگهداری قبل از فرایند آزمایش : ۲۴ ساعت در دمای اتاق
- محیط کشت اولیه : بلاد آگار و شکلات آگار
- آزمایش مستقیم : رنگ آمیزی گرم



• **Fig. 68.1** Anatomy of the respiratory tract, including upper and lower respiratory tract regions.

کشت گلو

- توضیح : علاوه بر استرپتوکوکوس پیوژن سایر عوامل از قبیل کورینه باکتریوم دیفتری ، نیسریا گونوره آ و عامل اپی گلوتیت (هموفیلوس آنفلونزا) را باید در نظر داشت ودر صورت وجود امکانات از محیط کشت های اختصاصی برای ایزوله کردن این میکروارگانسیم ها استفاده نمود.

- برای نمونه برداری از گلو از دوتا سواب جداگانه استفاده کنید یکی برای کشت و دیگری برای رنگ آمیزی گرم. اسمیر تهیه شده را رنگ امیزی گرم کرده و در زیر میکرو سکوپ آنرا بررسی کنید رنگ آمیزی گرم می تواند در تشخیص عواملی از قبیل دیفتری ویا آنژین ونسان کمک کننده باشد.

کشت گلو

- محیط کشت های لازم : محیط بلاد آگار و شکلات آگار انکوباسیون در مجاورت CO_2 در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد بمدت ۴۸ ساعت

- پاتوژن مهم عامل فارنژیت استرپتوکوکوس پیوژن می باشد. توجه داشته باشید چون آزمایشگاه های میکروب شناسی امکانات لازم جهت کشت و جدا سازی کورینه باکتریوم دیفتری و بورده تلا پرتوسیس را ندارند لذا در صورت درخواست پزشک از لحاظ تشخیص دیفتری و سیاه سرفه بیمار به آزمایشگاه کشوری دیفتری و سیاه سرفه واقع در انسیتوپاستور ارجاع داده شوند.

نوع نمونه : دستگاه تنفسی تحتانی (خلط و آسپیراسیون تراشه)

- ظرف انتقال نمونه ظرف استریل درب دار
- آماده سازی بیمار : : بیمار مسواک زده و دهان خود را با آب غرغره کند
- دستورالعمل خاص : .بیمار سرفه های عمیق بکند رنگ آ میزی گرم از نمونه جهت مناسب بودن کشت انجام شود
- انتقال به آزمایشگاه: : کمتر از دوساعت در دمای اتاق
- نگهداری قبل از فرایندآزمایش : ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد.

دستگاه تنفسی تحتانی (خلط و آسپیراسیون تراشه)

- محیط کشت های اولیه بلاد آگار ، بلاد آگار ، شکلات آگار و مک کانکی آگار در مورد سیستیک فیبروزیس می توان از محیط اختصاصی OFPBL (جهت جدا سازی بورخلدریا سپاشیا) استفاده نمود.
- آزمایش مستقیم : رنگ آمیزی گرم و درصورت لزوم DFA و ذیل نلسون برای اسید فست.
- توضیح : با سیل های اسید فست و نوکاردیا نیز مد نظر باشد.

نمونه های گرفته شده بروش برونکوسکوپی

- ظرف انتقال نمونه : ظرف استریل درب دار
- آماده سازی بیمار : ندارد
- دستورالعمل خاص : کشت بیهوازی در صورتیکه نمونه بیوپسی باز ریه باشد.
- انتقال به آزمایشگاه: : کمتر از دوساعت در دمای اتاق
- نگهداری قبل از فرایند آزمایش : ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد
- محیط کشت های اولیه بلاد آگار ، شکلات اگار ، مک کانکی آگار ، محیط بیهوازی
- آزمایش مستقیم : رنگ آمیزی گرم و درصورت لزوم DFA و ذیل نلسون برای اسید فست

نمونه های گرفته شده بروش برونکوسکوپی

- توضیح : کشت کمی برای BAL و اندو تراکئال آسپیرسیون انجام شود و بررسی از لحاظ لژیونلا، نوکاردیا –مایکوپلاسما و پنموسیتیس و سایتو مگالو ویروس نیز صورت گیرد

- رنگ آمیزی گرم از نمونه خلط باید هر چه سریعتر انجام شود و زیر میکرسکوپ با عدسی Low Power Filed (LPF) کیفیت آن از لحاظ وجود سلول های اپیتلیال و PMNs بررسی شوند.

- ۱–حد اقل ۱۰ میدان میکروسکوپی را با عدسی 10xجهت مشاهده WBCs وسلول های اپی تلیال بررسی کنید .

نمونه های گرفته شده بروش برونکوسکوپی

- ۲- اگر بیش از ۲۵ سلول اپی تلیال در هر (low power field (LPF مشاهده کردید .با بخش پرستاری تماس بگیرید و نمونه دیگری را درخواست کنید. برای اطلاع از جزئیات به دستورالعمل کشت نمونه های تنفسی مراجعه کنید.

- ۳-لام رنگ آمیزی گرم را از لحاظ وجود باکتری با مورفوتایپ های مختلف و تعداد آنها بررسی کنید واز آن برای تفسیر نتیجه کشت استفاده کنید.

- ۴-.در بررسی رنگ امیزی گر م نمونه BAL که جهت تشخیص پنومونی استفاده می شود اگر بیش از ۵ درصد از سلول های BAL حاوی باکتری های داخل سلولی باشند بیمار دچار پنومونی می باشد این روش دارای حساسیت ۹۰٪ و اختصاصیت ۱۰۰-۸۹ ٪ می باشد.

- توجه : در بیماران دچار نوتروپنی ممکن است نوتروقیل دیده نشود

کشت

- نمونه ها را در محیط کشت های زیر بصورت خطی کشت دهید
  - بلاد آگار : در مجاورت CO_2 در دمای ۳۵در جه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت
  - شکلات آگار : در مجاورت CO_2 در دمای ۳۵در جه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت
  - مک کانکی آگار: در دمای ۳۵در جه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت

نوع نمونه ساکشن یا نوک لوله تراشه

- اگرچه نمونه مناسب در بیماران که به آنها ونتیلاتور وصل شده است آسپیراسیون از لوله تراشه میباشد ولی متاسفانه در بسیاری از موارد نوک لوله ساکشن را جهت کشت به آزمایشگاه می فرستند. در اینگونه موارد نیم میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل را داخل منفذ نوک ساکشن ریخته و خوب مخلوط کنید با استفاده از یک لوپ کالبیره شده از مایع برداشت کرده و در محیط بلاد آگار و مکانکی آگار کشت داده و پس از شمارش کلونی ها نتایج آنرا بصورت نیمه کمی (light , Moderate ,Heavy growth) گزارش کنید

رشد باکتریهای زیر را در خلط و آسپیراسیون از تراشه گزارش کنید

- -استرپتوکوکوس پنومونیه
- ۲-استا فیلوکوکوس اروئوس
- ۳-هموفیلوس آنفلونزا
- ۴-باسیل های گرم منفی
- ۵-سودوموناس آئروژینوزا
- ۶-اسینتوباکتر بومانی
- -مورکسلا کاتارالیس
- ۸-استرپتوکوکوس پیوژن

نوع نمونه : آبسه (آبسه عمقی)

- ظرف انتقال نمونه : در محیط انتقال بیهوازی
- آماده سازی بیمار : ضد عفونی کردن محل نمونه گیری با الکل ۷۰٪ ویا سرم فیزیولوژی
- دستورالعمل خاص: از دیواره آبسه آسپیره شود.
- انتقال به آزمایشگاه: در کمتر از دوساعت .
- نگهداری قبل از فرایند آزمایش : کمتر از ۲۴ ساعت در دمای اتاق.
- توضیح : در صورت وجود گرانول آنها را شسته ویک امولسیون تهیه کنید

نوع نمونه : آبسه (آبسه عمقی)

- -برداشت از نمونه های بافتی و یا آسپیره کردن ، بهترین نمونه جهت جدا کردن ارگانیسم های ایجاد کننده عفونت های زخم هستند . نمونه هایی که با روش جراحی جمع آوری شده باشند دارای ارزش بیشتری هستند ولی روشهای تهاجمی ممکن است برای بیمار خطر داشته باشد
- داشته باشند. لذا باید اینگونه نمونه ها را بطور مناسب جمع آوری کرد و آزمایشات مناسبی را بر روی اینگونه نمونه ها انجام داد.

- ۲--آسپیره کردن از بافت های عمقی با نمونه برداری با سواب ارجحیت دارد.اگر مجبور به نمونه برداری با سواب باشید دقت کنید که سواب کاملا با مایع بافتی خیس شده و از لبه های زخم گرفته شده باشد.

- ۳-هرچه سریعتر ، اسمیر تهیه شده را رنگ آمیزی گرم کنید و نتایج اولیه آنرا در سیستم کامپیوتری آزمایشگاه ثبت کنید.

رنگ آمیزی گرم زخم

- الف: از رنگ آمیزی گرم میتوان جهت ارزیابی نتایج کشت استفاده کرد. نمونه های زخم باز که از آنها نمونه مناسب برداشته شده است در رنگ آمیزی گرم در این نمونه ها اغلب PMNs دیده می شود.در این موارد تعداد نسبی WBC ، سلول های اپیتلیال و وجود مورفوتایپ باکتری و قارچ را ثبت کنید.توجه داشته باشید در صورتیکه کیفیت نمونه خوب نباشد اغلب حاوی تعداد زیادی سلول های اپیتلیال بوده و فاقد PMNs در رنگ آمیزی گرم میباشد.

نمونه نمونه های آبسه و زخم را در محیط زیر کشت دهید

- نمونه نمونه های آبسه و زخم را در محیط زیر کشت دهید
- ۶-محیط های کشت بلاد آگار : در مجاورت CO_2 در دمای ۳۵در جه سانتیگراد تا ۷۲ ساعت
- ۷-شکلات آگار : در مجاورت CO_2 در دمای ۳۵در جه سانتیگراد تا ۷۲ ساعت
- ۸- مک کانکی آگار: در دمای ۳۵در جه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت
- ۹- محیط کشت بیهوازی : CNA در شرایط بیهوازی در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد تا ۷۲ ساعت ۱۰- محیط تایوگلیکولات : در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد بمدت ۷ روز

نمونه های آبسه و زخم

- پلیت ها را بعد از ۴۸-۲۴ ساعت قرائت کنید.در صورت منفی بودن ، تا ۷۲ ساعت دیگر انکوباسیون کنید و پس از ۷۲ ساعت اگر منفی شد آن را دور بریزید ، ولی محیط THIO را تا ۷ روز انکوباسیون کرده و آنرا هر روز از لحاظ رشد بررسی کنید و قبل از اینکه آنرا دور بریزید یک رنگ آمیزی گرم از آن انجام دهید.
- نمونه های آبسه ، زخم های عمیق و نمونه های بافتی باید در شرایط بیهوازی نیز کشت داده شوند.عفونت های ایجاد شده در این نمونه اغلب مخلوط و جند میکروبی هستند.
- ۱-نتایج رشد در روی محیط های بلاد آگار و مک کانکی آگار را گزارش کنید
- ۲-نتایج رنگ آمیزی گرم را با نتایج کشت مطابقت دهید
- ۳-در صورت عدم رشد در پلیت ها و شرایط بی هوازی No growth گزارش کنید

نتایج کشت زخم

- –معمولا در کشت تا سه گونه میکروارگانیسم اگر هر کدام از شرایط زیر را داشته باشند را تعیین هویت میکنیم.
- الف: وجود PMNS در لام مستقیم
- ب: نمونه از محل های استریل جمع آوری شده باشد.
- ج: کیفیت نمونه مطلوب باشد(بعنوان مثال سلول های اپیتلیال وجود نداشته باشد)
- د: ارگانیسم در اسمیر مستقیم مشاهده شده باشد.

- ۵–در مواردی که نمونه بصورت غیر تهاجمی جمع آوری شده باشد ، در صورت مشاهده موارد زیر حداقل آزمایشات لازم را انجام دهید.

- الف:در اسمیر مستقیم تعداد سلول های اپیتلیال متوسط یا بیشتر باشد.

- ب:در اسمیر مستقیم شواهدی دال بر عفونت وجود نداشته باشد.

- (بعنوان مثال WBC مشاهده نگردد) و یا علائم بالینی دال بر وجود عفونت نباشد
- ج: بیش از سه ارگانیسم در کشت رشد کرده باشد.

عوامل ایجاد کننده عفونت های زخم

- میکروارگانیسم های مختلفی می توانند ایجاد عفونت های زخم کنند که مهمترین آن ها شامل استافیلوکوکوس اروئوس ، سودوموناس آئروژینوزا، ،انتروباکتریاسه، باکتریهای بیهوازی ازقبیل پپتوکوکوس،آکتینو مایسیس،گونه های کلستریدیوم، پروپیونوباکتریوم آکنه ،باکتروئیدوس فراژیلیس، فوزوباکتریوم ها می باشند.در بعضی از موارد میکرو ارگانیسم های غیر معمول نیز از قبیل آئروموناس، باسیلوس آنتراسیس ،اریزوپیلوتریکس روزوپاتیه وباکترهای منتقله ازطریق گاز گرفتن حیوانات (پاستورلاو کاپنوسایتو فاگا) در ایجاد فونت های زخم نقش دارند. مخمرها نیز از قبیل کاندیدا آلبیکانس نیز ایجاد عفونت های زخم می کنند.

کشت نمونه های چشم (ملتحمه)

- ظرف انتقال نمونه : لوله در پیچ دار استریل ویا سواب در محیط انتقالی استوارت ویا Amies
- آماده سازی بیمار : ندارد
- دستورالعمل خاص : از سواب استریل مرطوب شده استفاده شود و نمونه از هر دو ملتحمه گرفته شود
- انتقال به آزمایشگاه: کمتر از ۲ ساعت در دمای اتاق
- نگهداری قبل از فرایند آزمایش : کمتر از ۲۴ ساعت در دمای اتاق
- محیط کشت های اولیه: بلاد آگار ، شکلات آگار و مک کانکی آگار
- آزمایش مستقیم : **رنگ آمیزی گرم**
- توضیح : در عفونت های چشم کلامیدیا ، ویروس ها و قارچ ها را نیز باید در نظر داشت

نوع نمونه : (مایع ویتره)

- **ظرف انتقال نمونه : لوله در پیچ دار استریل**
- **آماده سازی بیمار : چشم را جهت آسپیراسیون آماده کنید (بی حس کردن)**
- **دستورالعمل خاص : ندارد .**
- **انتقال به آزمایشگاه: کمتر از ۱۵ دقیقه در دمای اتاق**
- **نگهداری قبل از فرایند آزمایش : کمتر از ۲۴ ساعت در دمای اتاق. نمونه باید بلافاصله بعد از رسیدن به آزمایشگاه کشت داده شود.**
- **محیط کشت های اولیه: بلاد آگار ، شکلات آگار و مک کانکی آگار و محیط کشت های بی هوازی**
- **آزمایش مستقیم : رنگ آمیزی گرم و آکریدین اورنج**
- **توضیح : کشت از لحاظ قارچی نیز انجام شود.استفاده از مواد بیحس کننده ممکن برای بعضی از ارگانیسم ها مهارکننده باشد.**

: (تراش قرنیه)

- ظرف انتقال نمونه : در بالین بیمار در محیط BHI براث
- آماده سازی بیمار : قطره بی حسی کننده توسط پزشک داخل چشم چکانده شود
- دستورالعمل خاص : ندارد
- انتقال به آزمایشگاه: کمتر از ۱۵ دقیقه در دمای اتاق
- نگهداری قبل از فرایند آزمایش : کمتر از ۲۴ ساعت در دمای اتاق
- محیط کشت های اولیه: BHI آگار با ۱۰٪ خون گوسفندی شکلات آگار و سابرو دکستروز آگار حاوی آنتی بیوتیک
- آزمایش مستقیم : رنگ آمیزی گرم و آکریدین اورنج
- توضیح : سایر عوامل از قبیل آکانتا موبا ، هرپس سیملکس ، سایر ویروس ها ، کلامیدیا تراکوماتیس
- و قارچ ها را نیز باید در نظر گرفت.

نمونه های مربوط به چشم را در محیط زیر کشت دهید:

- بلاد آگار : در مجاورت CO_2 در دمای ۳۵در جه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت
- شکلات آگار : در مجاورت CO_2 در دمای ۳۵در جه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت
- مک کانکی آگار در دمای ۳۵در جه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساع
- محیطGC Agar یا محیط مارتین لویس اصلاح شده برای نوزادان در مجاورت CO_2 در دمای ۳۵در جه سانتیگراد به مدت 72 ساعت برای جدا سازی نیسریا گونوره آ
- محیط قارچ (سابرودکستروز آگار) در دمای ۳۰درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت
- محیط قارچ (انتخابی) در دمای ۳۰ در جه سانتیگراد به مدت ۴ هفته (اختیاری)

تهیه اسمیر

- از نمونه های گرفته شه دو ویا سه اسمیر برای رنگ آمیزی گرم تهیه کنید
- لام ها را از لحاظ سلول های سوماتیک و ارگانیسم های داخل و خارج سلولی بررسی کنید
- وجود PMNs نشان دهنده عفونت باکتریال می باشد.وجود سلول های مونونوکلئوز ممکن است نشان دهنده عفونت ویروسی باشد.

گزارش نتایج

- –هر نوع نتیجه مثبت نمونه هایی را که به طور تهاجمی جمع آوری شده اند را به پزشک اطلاع دهید– تمامی ارگانیسم هایی را که از نمونه های تهاجمی از قبیل مایع زجاجیه رشدکرده اند تعیین هویت کرده و آزمایش سنجش حساسیت را در مورد آنها انجام دهید.

- ۲– تمامی میکرارگانیسم هایی را که در پلیت های اولیه رشد کرده ودر آزمایش مستقیم نیز مشاهده شداند دارای ارزش هستند آنها را تعیین هویت کرده و آزمایش سنجش حساسیت را برای آنها انجام دهید

گزارش نتایج

- -استافیلوکوک های کواگولاز منفی ، دیفتروئید ها ، پروپینوباکتریوم آکنه و استرپتوکوک های ویریدانس که در بیش از یک محیط کشت رشد یافته باشند دارای ارزش می باشند.
- ۴- میکروارگانیسم های فلور طبیعی زمانیکه در یک محیط جامد ویا محیط مایع رشد کرده باشند ممکن است از لحاظ بالینی دارای ارزش باشند در اینگونه موراد علائم بالینی را باید در نظر گرفت

پاتوژن های مهم چشم

- **کونژکتیویت**

از مهمترین عوامل کونژکتیویت می توان کلامیدیا تراکوماتیس را نام برد اگر چه شیوع آن در مقایسه با گذشته کم شده است .از عوامل مهم کونژکتیویت در کودکان می توان هموفیلوس آنفلونزا استرپتوکوکوس پنمونیه ، استافیلوکوکوس اروئوس ،همو فیلوس ایجپتیوس و موراکسسلا کاتارالیس را نام برد.اگر چه باکتری های دیگری نیز مانند مایکو باکتریوم توبرکلوزیس،فرانسیسلا تولارنسیس ، تره پونما پالیدم ، یرسینیا انترکولیتیکا نیز می توانند ایجاد کونژکتویت نمایند . از عوامل دیگر کونژکتویت می توان قارچ ها را نام برد که اغلب به دنبال تروما ایجاد می شود. در بزرگسالان عوامل اصلی کونژکتویت ویروس ها می باشند.

کراتیت

- باکتریها عامل ۹۰-۶۵ ٪ از موارد کراتیت می باشند.از عوامل اصلی کراتیت باکتریایی می توان استافیلوکوکوس اروئوس،استرپتوکوکوس پنمونیه وسودوموناس آئروژینوزا را نام برد. اگر چه باکتری های دیگر نیزاز قبیل نیسریا گنوره آ و هموفیلوس آنفلونزا نیز می توانند در ایجاد کراتیت نقش داشته باشند. از ویروس ها هرپس سیمپلکس ویروس در ایجاد کراتیت نقش مهمی را دارد. از تک یاخته های ایجاد کننده کراتیت می توان به گونه های آکانتا موبا اشاره کرد و از مهمترین قارچ های ایجاد کننده کراتیت می توان فوزاریوم را نام برد.

اندوفتالمیت

- مهمترین باکتری های عامل اندوفتالمیت شامل استافیلوکوکوس اروئوس ، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس ،استرپتوکوکوس پنومونیه ، باسیلوس سرئوس ، کلبسیلا پنومونیه و سایر باسیل های گرم منفی ،نوکاردیا می باشند و از ویروس ها می توان هرپس سیمپلکس ویروس و واریسلا زوستر را نام برد. از قارچ ها کاندیدا آلبیکانس ،گونه های آسپرژیلوس و فوزاریوم را می توان نام برد .از انگل ها توکسو کارا . انکوسرکا ولولوس قابل ذکر هستند.

نمونه گوش

- **نوع نمونه : کشت نمونه گوش داخلی**
- ظرف انتقال نمونه : ظرف استریل درب دار ویا محیط انتقالی بیهوازی
- آماده سازی بیمار : ضد عفونی کردن کانال داخلی گوش با محلول ملایم صابون
- دستورالعمل خاص : اگر پرده گوش پاره نشده باشد با سرنگ آسپیره شود ولی اگر پرده گوش پاره شده باشد از یک سواب جهت نمونه برداری استفاده کنید.
- انتقال به آزمایشگاه: کمتر از ۲ ساعت نگهداری قبل از فرایند آزمایش : ۲۴ ساعت در دمای اتاق
-

محیط کشت

- محیط کشت های اولیه: بلاد آگار ، شکلات آگار و مک کانکی آگار . اگر بیمار قبلا آنتی بیوتیک مصرف نکرده باشد از محیط بی هوازی ویا تایوگلیکولات نیز استفاده شود

- **آزمایش مستقیم : رنگ آمیزی گرم**

- توضیح : در صورت نمونه گیری بروش Tympanocentesis از محیط کشت بیهوازی نیز استفاده شود

نوع نمونه : گوش خارجی

- ظرف انتقال نمونه : لوله در پیچ دار استریل ویا سواب در محیط انتقالی استوارت ویا Amies
- آماده سازی بیمار : با استفاده از یک سواب استریل ، آشغال های گوش را تمیز کنید
- دستورالعمل خاص : سواب را داخل کانال خارجی گوش بچرخانید
- انتقال به آزمایشگاه: کمتر از دو ساعت در دمای اتاق
- نگهداری قبل از فرایند آزمایش : ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه
- محیط کشت های اولیه: بلاد آگار ، شکلات آگار و مک کانکی آگار و محیط برای قارچ
- آزمایش مستقیم : رنگ آمیزی گرم

کشت

- نمونه را بشرح زیر کشت داده و انکوباسیون کنید
- ۱-بلاد آگار: در مجاورت CO_2 در دمای ۳۵درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت
- ۲- شکلات آگار : در مجاورت CO_2 در دمای ۳۵درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت
- ۳- مک کانکی آگار : در دمای ۳۵درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت
- ۴- محیط قارچ (سابرودکستروز آگار) :در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت
- ۵-محیط قارچ (انتخابی) : در دمای ۳۰درجه سانتیگراد به مدت ۴ هفته (اختیاری

عوامل ایجاد کننده عفونت های گوش خارجی

- مهمترین عوامل ایجاد عفونت های حاد گوش خارجی شامل استافیلو کوکوس اروئوس استرپتوکوکوس پیوژن پسودووناس آئروژینوزا و سایر باسیل های گرم منفی می باشند ودر ایجاد عفونت های مزمن گوش خارجی باکتری هایی از قبیل پسودوموناس ائروژینوزا و باکترهای بی هوازی دخیل هستند

عوامل ایجاد کننده عفونت های گوش میانی

- در کودکان که عفونت های گوش میانی که در آنها شایع می باشند باکتری هایی از قبیل هموفیلوس آنفلونزا، استرپتوکوکوس پنومونیه ، استرپتوکوکوس پیوژن ، مورکسلا کاتارالیس ، استافیلوکوکوس اروئوس ، باسیل های گرم منفی و باکترهای بی هوازی نقش دارند وبعضی از ویروس ها نیز از قبیل ویروس سیشیسیال تنفسی ، کرونا ویروس ها رینو ویروس ها و آنفلونزا و قارچ هایی از قبیل مخمرها و آسپرژیلوس نیز ایجاد عفونت های گوش میانی می کنند اوتیت های مزمن اغلب توسط فلور طبیعی از قبیل گونه های پروپینوم ، باکتروئید فرژیلیس ،گونه های پرووتلا ،فوزوباکتریوم نوکلئوتوم ایجاد عفونت های گوش میانی می کنند. از باکتری های دیگر ایجاد کننده عفونت های مزمن گوش میانی می توان استافیلوکوکوس اروئوس پسودوموناس آئروژینوزا ، گونه های پروتئوس را نام برد.

منابع

- –ولی زاده بابک و سایر همکاران : راهنمای آزمایشگاهی تشخیص عفونت های بیمارستانی .وزارت بهداشت ودرمان و آموزش پزشکی –مرکز مدیریت بیماریها و آزمایشگاه مرجع سلامت انتشارات صدرا چاپ اول ۳۸۶

- ۲–رقیه صبوریان دستورالعمل نمونه گیری ، انتقال و کشت نمونه مدفوع جهت جدا سازی و تشخیص باکتریهای سالمونلا و شیگلا. آزمایشگاه مرجع سلامت ،وزارت بهداشت ودرمان و آموزش پزشکی خرداد ۱۳۸۹

- ۳–راهنمای رنگ آمیزی گرم (دستورالعمل) M-12–بخش میکروب شناسی آزمایشگاه مرجع سلامت – وزارت بهداشت ودرمان وآموزش پزشکی تابستان ۱۳۹۶

- 1-Garcia, L.S. and Isenberg, H.D. (*2010*) Clinical *Microbiology Procedures*Handbook. Third Edition, ASM Press, Washington DC.

- **2-**Connie Mahon, Donald Lehman et al. Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th Edition .2016

- 3-Standard Operating Procedures Bacteriology Antimicrobial Resistance Surveillance and Research Network.2nd Edition 2019. Indian Council of Medical Research New Delhi, India

- **4-Patricia Tille. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology, 15th Edition.2022**

تشکر از توجه شما