راهنمای آزمایشگاهی تشخیص عفونت‌های بیمارستانی

وزارت بهداشت، درمان، و آموزش پزشکی
معاونت سلامت
مرکز مدیریت بیماری‌ها ـ مرکز تحقیقات آزمایشگاه‌های رفرانس کشور

راهنمای آزمایشگاهی
تشخیص عفونت‌های بیمارستانی

نویسندگان(به‌ترتیب حروف الفبا):

دکتر پیمان تربتی
پاتولوژیست، عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

دکتر سهیلا حکمت‌یزدی
پاتولوژیست، کارشناس مسئول بخش میکروب‌شناسی آزمایشگاه رفرانس

مژگان دلداری
باکتریولوژیست، کارشناس ارشد بخش میکروب‌شناسی بیمارستان میلاد

دکتر محمد رهبر
میکروبیولوژیست، عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات آزمایشگاه رفرانس

دکتر افشین صفایی
دکترای علوم آزمایشگاهی MPH، کارشناس مسئول ادارهٔ امور آزمایشگاه‌های مرکز مدیریت بیماری‌ها

دکتر محمدجواد کاویانی
دکترای علوم آزمایشگاهی، کارشناس مسئول ادارهٔ کل امور آزمایشگاه‌ها

دکتر بابک ولی‌زاده
دکترای علوم آزمایشگاهی، مسئول بخش میکروب‌شناسی آزمایشگاه بهار

دکتر مهرداد ونکی
دکترای علوم آزمایشگاهی، کارشناس مسئول امور آزمایشگاه‌های استان تهران، سازمان تأمین اجتماعی

ویراستار:
دکتر بابک ولی‌زاده

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

مرکز نشر

سرشناسه: ولی‌زاده، بابک. . . **[و دیگران]**.
عنوان و پدیدآور: *راهنمای آزمایشگاهی تشخیص عفونت‌های بیمارستانی*/
تألیف: بابک ولی‌زاده . . . [و دیگران].
زیر نظر: محمدمهدی گویا.
مشخصات نشر: تهران: مرکز نشر صدا، ۱۳۸۶.
مشخصات ظاهری: ۲۰۰ ص.: جدول، مصور.
شابک: 978-964-359-195-3
یادداشت: فیپا.
موضوع: عفونت‌های بیمارستانی - - تشخیص.
موضوع: دستنامه‌های آزمایشگاهی.
رده‌بندی کنگره: ۹ر۷ع/RA۶۴۴
رده‌بندی دیویی: ۶۱۴/۴۴

مرکز نشر صدا

مرکز مدیریت بیماری‌ها

تلفن: ۸۸۵۵۳۴۲۹ و ۸۸۵۵۳۴۰۳

دورنگار: ۸۸۷۱۳۶۵۳

راهنمای آزمایشگاهی تشخیص عفونت‌های بیمارستانی

نویسندگان: دکتر پیمان تربتی، دکتر سهیلا حکمت‌یزدی، مژگان دلداری، دکتر محمد رهبر، دکتر افشین صفایی، دکتر محمدجواد کاویانی، دکتر بابک ولی‌زاده و دکتر مهرداد ونکی
ویراستار: دکتر بابک ولی‌زاده

خدمات چاپ و نشر: مرکز نشر صدا
نوبت چاپ: اول(۱۳۸۶)
شمارگان: ۵۰۰۰ نسخه
شابک: ۳-۱۹۵-۳۵۹-۹۶۴-۹۷۸ **ISBN:** 978-964-359-195-3
«حق چاپ برای مرکز مدیریت بیماری‌ها محفوظ است.».

سرآغاز

مرکز مدیریت بیماری‌ها مسئولیت تدوین راهنماهای کشوری را برعهده دارد و در اجرای وظایف خود برای تأمین، حفظ و ارتقای سطح سلامت جامعه، از روش‌های مراقبت، پیشگیری، گزارش‌دهی، همه‌گیرشناسی، آموزش و مشاوره بهره می‌گیرد. این مرکز همواره به دانش استادان باتجربه، دستاوردهای محققان و تلاش کارشناسان زبده نیاز دارد.

مجموعهٔ حاضر با عنوان ***راهنمای آزمایشگاهی تشخیص عفونت‌های بیمارستانی*** تألیف شده و مکمل کتاب *راهنمای کشوری نظام مراقبت عفونت‌های بیمارستانی* است.

مرکز مدیریت بیماری‌ها از نظریات، پیشنهادها و انتقادهای صاحب‌نظران و دست‌اندرکاران آموزشی، پژوهشی و اجرایی امور بهداشتی‌درمانی کشور استقبال می‌کند.

دکتر محمدمهدی گویا

«رئیس مرکز مدیریت بیماری‌ها»

پیش گفتار

عفونت‌های بیمارستانی همواره از مشکلات گروه پزشکی بوده‌است و نقش آزمایشگاه در شناسایی، کنترل و پایش این عفونت‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

با توجه به این مهم، کتاب حاضر تحت عنوان ***راهنمای آزمایشگاهی تشخیص عفونت‌های بیمارستانی*** برای اولین بار تدوین شده‌است.

کتاب شامل ۹ فصل است. فصل‌های ۲، ۳، ٤ و بخش اول فصل ۵ با تقسیم‌بندی عفونت‌های بیمارستانی براساس استاندارد NNIS در ارتباط است. بخش دوم فصل ۵ و فصل‌های ٦، ۷، ۸ و ۹ به مباحث نمونه‌برداری از کاتترهای خونی، لوازم و محیط‌های بیمارستانی، هوا، آب و مایعات دیالیز اختصاص دارد.

در این کتاب، نویسندگان برای سهولت استفاده و با توجه به تخصصی بودن بسیاری از اصطلاحات، تعدادی از جدول‌ها و شکل‌ها را به زبان اصلی آورده‌اند.

امید آن که راهنمای تشخیص ارگانیسم‌های بااهمیت در عفونت‌های بیمارستانی مانند MRSA، VRE، *کلستریدیوم دیفیسیل* نیز منتشر شود.

در پایان از زحمات و همکاری «مرکز نشر صدا» سپاسگزاری می‌شود.

دکتر بابک ولی‌زاده

«ویراستار»

۱۳۸۶

فهرست فصل‌ها

عنوان	صفحه
فصل اول	۱۹
نقش آزمایشگاه میکروب‌شناسی در کنترل عفونت‌های بیمارستانی	
فصل دوم	۲۳
عفونت‌های ادراری	
فصل سوم	٤٥
عفونت‌های تنفسی	
فصل چهارم	۷۱
عفونت‌های زخم‌های جراحی	
فصل پنجم	۱۰۱
کشت خون، کاتترهای خونی و فرآورده‌های بانک خون	
فصل ششم	۱۳۱
ارزیابی میکروب‌شناسی و نمونه‌برداری از محیط‌های بیمارستانی و وسایل پزشکی	
فصل هفتم	۱٤۳
نمونه‌برداری از هوا	
فصل هشتم	۱٦۳
کشت آب بیمارستان برای جداسازی *لژیونلا*	
فصل نهم	۱۸۳
کشت و اندازه‌گیری اندوتوکسین مایعات همودیالیز و دیالیز صفاقی	

فهرست

عنوان	صفحه
فصل اول	
نقش آزمایشگاه میکروب‌شناسی در کنترل عفونت‌های بیمارستانی	۲۰
فصل دوم	۲۵
عفونت‌های ادراری	۲۵
عفونت‌های ادراری بیمارستانی(HAUTI)	۲۵
دستورالعمل جمع‌آوری نمونه‌های ادراری	۲۶
۱. شرایط آمادگی بیمار قبل از جمع‌آوری نمونه	۲۶
۲. تکمیل فرم درخواست یا دریافت نمونهٔ ادراری	۲۷
۳. نمونه‌گیری	۲۷
۳-۱. بیمارانی که سوند ادراری دارند	۲۷
نحوهٔ نمونه‌گیری و جمع‌آوری ادرار تمیز میانی در زنان، مردان و نوزادان	۲۹
الف) زنان	۲۹
ب) مردان	۳۰
ج) نوزادان	۳۰
روش جمع‌آوری ادرار به‌طریق Four-glass یا VB1-VB2 -EPS- VB3	۳۱
۴. وسایل و مواد لازم	۳۱
۵. حجم نمونه	۳۲
۶. شرایط نگهداری و انتقال	۳۲
۷. شرایط رد نمونه	۳۲
۸. آزمایش‌های تکمیلی و مرتبط	۳۲
آزمایش نیتریت	۳۳
آزمایش لکوسیت استراز	۳۴
نحوهٔ کشت نمونهٔ ادرار	۳۵

تعریف انواع سندروم‌های بالینی ۳۵

عنوان **صفحه**

تفسیر و نحوهٔ گزارش‌دهی نتایج کشت ادرار ۳۷
روش و زمان بررسی نتایج ۳۸
تفسیر نتایج کشت ادرار در نمونه‌های گرفته‌شده به‌وسیلهٔ سوند ادراری ۴۲
تفسیر نتایج کشت ادرار حاصل از تکنیک‌های تهاجمی ۴۴

فصل سوم

عفونت‌های تنفسی ۵۰
عفونت‌های تنفسی بیمارستانی ۵۰
تشخیص آزمایشگاهی پنومونی بیمارستانی ۵۴
نمونه‌برداری و انتقال نمونه ۵۵
روش‌های غیرتهاجمی ۵۷
جمع‌آوری خلط ۵۷
جمع‌آوری خلط ازطریق روش‌های القایی ۵۷
کشت خون ۵۸
روش‌های تهاجمی ۵۸
آسپیراسیون شیرهٔ معده ۵۸
آسپیراسیون آندوتراکئال ۵۸
برونکوسکوپی ۵۹
بیوپسی ریه باز ۶۲
بررسی باکتریولوژیک نمونه‌های دستگاه تنفسی ۶۴
الف) محیط‌های کشت مورد استفاده ۶۴
ب) آزمون میکروسکوپی ۶۴
تفسیر رنگ‌آمیزی گرم در نمونهٔ خلط ۶۵
گزارش نتایج رنگ‌آمیزی گرم ۶۷
کشت و آزمایش نمونه‌های خلط، آسپیراسیون تراشه، شستشوی برنش، براشینگ برنش و نمونه‌های بیوپسی برنش ۶۸
کشت و پیگیری آسپیراسیون داخل نای، آسپیراسیون ریه و نمونه‌های بیوپسی ریه ۶۹
براشینگ برنش و مایع BAL درصورتی که برای کشت کمّی فرستاده شده‌باشد ۷۰
گزارش میزان رشد ۷۱

روش نیمه‌کمّی ۷۱
روش کمّی ۷۱

عنوان **صفحه**

نکته‌های مهم در تفسیر نتایج ۷۲
کشت نمونه‌های مجاری تنفسی تحتانی ۷۲
الف) نمونه‌های خلط بدون سلول‌های اپی‌تلیال یا با سلول اپی‌تلیال کم ۷۲
ب) نمونه‌های خلط با میزان زیادی سلول‌های اپی‌تلیال و WBC که در رنگ‌آمیزی گرم مشاهده‌می‌شوند ۷۶
ج) شستشوی برنش‌ها، براشینگ برنش‌ها، نمونه‌های بیوپسی برنش‌ها، مایع BAL، آسپیراسیون ریه و مواد داخل نای و نمونه‌های بیوپسی ریه ۷۷

فصل چهارم

عفونت‌های زخم‌های جراحی ۷۹
روش نمونه‌گیری زخم ۸٤
روش کمّی ۸٤
روش نیمه‌کمّی و کیفی ۸۵
نحوهٔ نمونه‌برداری ۸۵
الف) زخم سطحی ۸٦
ب) زخم‌ها و ندول‌ها ۸٦
ج) بافت زیرجلدی و نمونه‌های پوست ۸٦
د) زخم‌های عمیق، آسپیراسیون و نمونه‌های بافتی عمیق ۸۷
روش انتقال نمونه ۸۸
نحوهٔ آماده‌سازی نمونه ۹۰
۱. هموژن و یکنواخت‌کردن بافت ۹۰
۲. آماده‌سازی اسمیر ۹۲
۳. آماده‌سازی اسمیر نازک ۹۳
روش تلقیح نمونه‌ها در محیط کشت ۹۳
زمان و دمای انکوباسیون ۹۷
کشت بی‌هوازی ۹۷
نحوهٔ کشت ۹۸
ارزیابی و بررسی نمونه‌های زخم ۹۹

رنگ‌آمیزی گرم ۱۰۰
رنگ‌آمیزی گرم(روش کوپلوف) ۱۰۱

عنوان **صفحه**

تفسیر کشت نمونه‌های زخم ۱۰۳
گزارش نتایج میکروب‌شناسی ۱۰٤
تفسیر و گزارش لام، رنگ‌آمیزی گرم و کشت ۱۰۵

فصل پنجم

کشت خون، کاتترهای خونی و فرآورده‌های بانک خون ۱۱۳
بخش اول
کلیات ۱۱۳
مواد ضدعفونی‌کننده برای نمونه‌گیری ۱۱۷
نمونه‌گیری با Povidone – Iodine 10% ۱۱۷
تعداد کشت خون، زمان نمونه‌گیری و حجم خون مورد نیاز ۱۱۸
تعداد و زمان خون‌گیری ۱۱۸
حجم نمونه ۱۱۹
انتقال ۱۲۰
کشت ۱۲۰
نسبت خون به محیط کشت ۱۲۱
اتمسفر ۱۲۱
انکوباسیون ۱۲۱
روش (ISOLATOR) Lysis - Centrifugation ۱۲۳
سیستم‌های خودکار ۱۲۳
گزارش و تفسیر ۱۲٤
بخش دوم
کاتترهای عروقی و عفونت‌های بیمارستانی ۱۲۵
آلودگی ازطریق مواد تزریقی(Infusate) ۱۳٤
میکروب‌شناسی ۱۳٤
روش‌های تشخیص ۱۳۶
۱. کشت کیفی از خون و کاتتر ۱۳۷

۲. کشت نیمه‌کمّی از نوک کاتتر ۱۳۷
۳. کشت کمّی از نوک کاتتر ۱۴۰

عنوان **صفحه**

۱-۴. کشت از نمونه خون گرفته‌شده از کاتتر و خون ورید محیطی و مقـایسهٔ زمان مثبت‌شدن ۱۴۰
۲-۴ کشت کمّی خون گرفته‌شده از کاتتر و خون ورید محیطی ۱۴۱
۵. کشت فرآورده‌های بانک خون ۱۴۲

فصل ششم

ارزیابی میکروب‌شناسی و نمونه‌برداری از محیط‌هـای بیمارستانی و وسایل پزشکی ۱۳۱
استافیلوکوک‌ها ۱۳۳
انتروکوک‌ها ۱۳۳
اسینتوباکترها ۱۳۴
نمونه‌برداری میکروب‌شناسی از سطوح محیطی ۱۳۵
روش‌های آزمایشگاهی ۱۳۵
محیط‌های کشت برای روش‌های کمّی و کیفی ۱۳۶
محلول‌ها ۱۳۶
کشت سطوح محیطی ۱۳۷
روش کمّی ۱۳۷
روش کیفی ۱۳۸
نمونه‌برداری از سطوح محیطی ۱۳۸
روش سواب ۱۳۸
روش غوطه‌ورکردن ۱۳۹
روش RODAC ۱۳۹
تشخیص ۱۴۰
تفسیر ۱۴۰

فصل هفتم

نمونه‌برداری از هوا ۱۴۳
نمونه‌برداری میکروبیولوژیک هوا ۱۴۴
روش‌ها ۱۴۸
کشت هوا برای قارچ‌ها ۱۵۰

ملاحظات پیش از آزمایش ۱۵۲
نمونه ۱۵۲
۱. انتخاب محل نمونه‌برداری ۱۵۲
عنوان **صفحه**
۲. حجم نمونه و انکوباسیون ۱۵۲
۳. وسایل نمونه‌برداری از هوا ۱۵۳
٤. پلیت‌گذاری ۱۵٤
٥. نمونه‌برداری از سطوح ۱۵٤
٦. محیط‌های کشت ۱۵۵
ملاحظات حین آزمایش ۱۵۵
۱. نمونه‌برداری ۱۵۵
۲. دمای انکوباسیون ۱۵۵
۳. کنترل کیفی ۱۵٦
ملاحظات پس از آزمایش ۱۵٦
محاسبات ۱۵٦
تفسیر اطلاعات ۱۵۷
پیوست ۱۵۸
ویژگی‌های وسایل نمونه‌برداری حجمی مکانیکی ۱۵۸
۱. مکنده‌های آبکشی ۱۵۸
۲. مکنده‌های شکافی ۱۵۹
۳. نمونه‌برداری‌های سانتریفوژی ۱٦۰
٤. Impingers ۱٦۰
٥. فیلتراسیون ۱٦۰
٦. پلیت‌گذاری ۱٦۰

فصل هشتم
کشت آب بیمارستان برای جداسازی *لژیونلا* ۱۸۵
اصول کار ۱۸۵
الف) نحوهٔ انتقال و اکولوژی *لژیونلا* ۱۸۵
ب) معیارهای جداسازی و تأیید لژیونلا از منابع ۱۸٦
معرف‌ها، محیط کشت و مواد مصرفی مورد نیاز ۱۸٦

الف) ظرف‌ها و سواب‌های لازم برای جمع‌آوری نمونه ۱۸۶
ب) فیلترها و ضمائم آنها ۱۸۷
ج) محیط کشت ۱۸۷
عنوان **صفحه**
د) معرف‌ها ۱۸۸
ه) میکروسکوپ و ابزارهای مرتبط ۱۸۸
ملاحظات پیش از آزمایش ۱۸۹
نمونه‌های برداشت‌شده ۱۸۹
الف) مکان برداشت نمونه و انتخاب آن ۱۸۹
ب) جمع‌آوری نمونه‌ها ۱۹۰
۱. نمونه‌های سواب ۱۹۰
۲. نمونه‌های آب ۱۹۱
۳. نمونهٔ مخزن‌های ذخیرهٔ آب ۱۹۱
ملاحظات حین آزمایش ۱۹۲
کنترل کیفی و اطمینان کیفیت ۱۹۲
الف) محیط‌های کشت تجاری و آمادهٔ استفاده ۱۹۲
ب) محیط‌های کشت ساخته‌شده در آزمایشگاه ۱۹۲
ج) کنترل کیفی معرف‌ها ۱۹۴
د) اطمینان کیفی(QA) ۱۹۴
آماده‌سازی نمونه‌ها ۱۹۴
الف) تغلیظ ازطریق فیلتراسیون(آب آشامیدنی) ۱۹۴
ب) پلیت‌گذاری مستقیم برای آب و رسوبات غیرآشامیدنی ۱۹۶
ج) یکنواخت‌کردن نمونه‌های آب تغلیظ‌شده و تغلیظ‌نشده ۱۹۶
د) نمونه آب حاصل از تغلیظ و اضافه‌کردن اسید ۱۹۶
کشت نمونه‌ها روی پلیت ۱۹۸
الف) نمونه تغلیظ‌شده به‌طریق فیلتراسیون ۱۹۸
ب) نمونه‌های پلیت‌گذاری مستقیم ۱۹۸
ج) روش کار ۱۹۸
د) ذخیره‌سازی نمونه‌ها ۱۹۸
انکوباسیون ۱۹۹
ارزیابی و تفسیر کشت ۱۹۹
الف) شمارش باکتری ۱۹۹

۱. نمونه‌های اصلی(پلیت‌گذاری مستقیم) ۱۹۹
۲. نمونه اصلی تغلیظ‌شده به روش فیلتراسیون ۱۹۹
ب) **بررسی کشت‌ها از لحاظ *لژیونلا*** ۲۰۰

عنوان **صفحه**

ج) **تعیین هویت احتمالی *لژیونلا*** ۲۰۰
ویژگی‌های کلنی *لژیونلا* ۱۷۷
د) **فلوئورسنس کلنی** ۲۰۱
رنگ‌آمیزی گرم ۱۷۸
روش‌های تأییدی شناسایی لژیونلا ۲۰۲
روش کار ایمونوفلوئورسنس ۲۰۲
الف) آزمایش مستقیم آب(آماده‌سازی گسترش) ۲۰۲
ب) تأیید کشت(آماده‌سازی گسترش) ۲۰۳
ج) روش رنگ‌آمیزی فلوئورسنس ۲۰٤
د) آزمایش لام‌های رنگ‌آمیزی‌شده ۲۰٤
هـ) پیگیری آزمایش‌ها ۲۰۵

فصل نهم

کشت و اندازه‌گیری اندوتوکسین مایعات همودیالیز و دیالیز صفاقی ۲۰۷
ملاحظات پیش از آزمایش ۲۰۹
تعداد و زمان نمونه‌برداری ۲۰۹
الف) نمونه‌برداری روتین ۲۱۰
ب) نمونه‌برداری مکرر ۲۱۰
ج) نمونه‌برداری موردی ۲۱۰
د) زمان نمونه‌برداری ۲۱۰
جمع‌آوری ۲۱۱
الف) آب دیالیز ۲۱۱
ب) مایع دیالیز ۲۱۱
ج) حجم ۲۱۱
وسایل و مواد لازم جهت شمارش پلیت ۲۱۲
ملاحظات حین آزمایش ۲۱۳
روش کار ۲۱۳

عنوان	صفحه
تفسیر	۲۱٤
الف) مایع دیالیز	۲۱٤
ب) آب مورد استفاده در دیالیز	۲۱۵
ج) آب‌های مورد استفاده در همودیالیز	۲۱۵
گزارش کشت	۲۱۵
آزمایش اندوتوکسین باکتریال	۲۱۵
ملاحظات پیش از آزمایش اندوتوکسین	۲۱٦
نمونه	۲۱٦
وسایل و مواد لازم	۲۱۷
ملاحظات حین آزمایش	۲۱۷
روش	۲۱۷
کنترل کیفی	۲۱۷
ملاحظات پس از آزمایش	۲۱۸
گزارش نتایج	۲۱۸
محدودیت	۲۱۸
کشت مایع دیالیز صفاقی	۲۱۹
نمـونـه	۲۲۰
جمع‌آوری و انتقال	۲۲۰
شـرایط انتقال	۲۲۱
آماده‌سازی	۲۲۱
آزمایش میکروسکوپی	۲۲۲
الف) رنگ‌آمیزی گرم	۲۲۲
ب) رنگ‌آمیزی اسید فاست	۲۲۲
کشت	۲۲۲
کشت موازی	۲۲۳
روش‌های تکمیلی	۲۲۳
تفسیر	۲۲۳
ارزیابی کمّی	۲۲٤
یافته‌های مکمل بالینی	۲۲٤
الف) شمارش سلولی	۲۲٤

فصل اول

نقش آزمایشگاه میکروب‌شناسی در کنترل عفونت‌های بیمارستانی

نقش آزمایشگاه میکروب‌شناسی در شناسایی، کنترل و پایش عفونت‌های بیمارستانی انکارناپذیر است. این مهم هنگامی محقق خواهدشد که فرآیندهای پیش از آزمون، حین آزمون و پس از آزمون با تکیه بر منابع و مراجع معتبر و به‌روز شناسایی، تعریف و تدوین شوند و به ارتقای مداوم دانش، مهارت و شایستگی نیروی انسانی در سایهٔ برنامه‌ریزی‌های آموزشی توجه شود.

بدیهی است فعالیت کمیته‌های کنترل عفونت بیمارستانی متأثر از نتایج میکروب‌شناسی و ارتباط متقابل و تنگاتنگ متخصصان ذی‌ربط با دیگر اعضای علمی و اجرایی این کمیته است.

چکیدهٔ مهم‌ترین وظایف آزمایشگاه میکروب‌شناسی:

۱. جمع‌آوری، انتقال و نگهداری صحیح نمونه‌های بیولوژیک: از آنجا که بسیاری از عفونت‌های بیمارستانی توسط میکروارگانیسم‌های فرصت‌طلب و کم ویرولانس که در سطوح پوستی و مخاطی کلنیزه هستند، ایجادمی‌شود، جمع‌آوری صحیح و دقیق نمونه‌ها از محل تعیین‌شده به شناسایی دقیق عوامل بالقوهٔ بیماری‌زا یا قطعاً بیماری‌زا کمک شایانی می‌نماید. ارزیابی کیفیت

نمونه‌هـا و تـصمیم‌گیـری درخصوص قبول یا رد آنها مستقیماً بر صحت نتایج آزمون تأثیر خواهدگذاشت.

۲. کشت، جداسازی و شناسایی دقیق میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا: امروزه دامنهٔ بیماری‌زاهایی که باعث بیماری‌های خطیر می‌شوند روبه گسترش است. از دیگر سو، توان علمی و عملیاتی واحدهای میکروب‌شناسی به تناسب زیرساخت‌ها و منابع انسانی در سطوح مشخص، محدود و تعریف‌شده‌ای قراردارد. بنابراین، در مواردی که ارگانیسم بیماری‌زا از انواع غیرشایع باسیل‌های گرم منفی غیرتخمیری و برخی قارچ‌ها، مایکوباکتریوم‌ها و ویروس‌ها است، نگهداری و انتقال صحیح نمونه به آزمایشگاه مرجع قویاً توصیه‌می‌شود.

۳. گزارش و تفسیر نتایج: برای ارائهٔ یک تفسیر دقیق آگاهی از یافته‌های بالینی، عوامل زمینه‌ساز و اقدام‌های تشخیصی ـ درمانی انجام‌شده ضروری است. ایجاد بستر مناسب و تأکید بر ارائه و انتقال اطلاعات از سوی پزشکان و سایر کارکنان واجد صلاحیت خدمات درمانی از اهم وظایف کمیتهٔ عفونت‌های بیمارستانی است. بدیهی است ارائهٔ یک تفسیر جامع که متضمن توصیه‌ها و نظریات مشورتی مناسب باشد، در چارچوب برقراری ارتباطات مؤثر محقق خواهدشد.

٤. ایجاد آگاهی و اطلاع‌رسانی به کمیتهٔ کنترل عفونت نسبت به امکانات موجود، توانمندی‌ها و محدودیت‌های متدولوژیک، کاربری وسایل و تجهیزات و روش‌های تشخیصی جاری در آزمایشگاه که برای تشخیص ارگانیسم‌های بیماری‌زا به‌کار گرفته‌می‌شوند.

۵. مسئول بخش میکروب‌شناسی موظف است تا دستگاه‌ها و تجهیزات مناسب و مدرن یا آزمایش‌ها و کیت‌های آزمایشگاهی جدید را معرفی کند که به پاسخ‌دهی صحیح، سریع و دقیق منجرمی‌شوند و دستیابی به آنها را خواستار شود.

٦. انجام‌دادن آزمون تعیین حساسیت میکروبی به روش استاندارد، مطالعهٔ روند مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی موجود و شناسایی تغییرات احتمالی در روند

مقاومت‌ها یا ظهور مقاومت‌های جدید و گزارش دوره‌ای آنها. همچنین، شناسایی و جستجوی بیماری‌زاهای مقاوم به چند دارو(MDR) و گزارش آنها به کمیتهٔ کنترل عفونت‌های بیمارستانی از دیگر وظایف این واحد است.

۷. شناسایی منابع و راه‌های احتمالی انتقال عفونت توسط نمونه‌برداری از ناقلین مشکوک در موارد بروز طغیان(Outbreak). تعیین و انتخاب نوع و محل نمونه‌برداری، نحوهٔ کشت و شیوهٔ گزارش‌دهی باید با دستورالعمل خاص منطبق باشد که در فصول آتی به آن پرداخته‌می‌شود.

۸. حفظ و پایش شرایط استریلیتی در دستگاه استریلیزاسیون با حرارت خشک و مرطوب.

۹. مشارکت با دیگر اعضای کمیتهٔ کنترل عفونت بیمارستانی درخصوص تصمیم‌گیری دربارهٔ آزمایش‌های میکروبیولوژیک و اقلام مصرفی خاص همچون کیسه‌های خون، مایعات دیالیز و بافت‌های پیوندی.

لازم به تأکید است که حصول موارد فوق جز با حمایت و پشتیبانی مدیریت اجرایی واحد درمانی، تأمین زیرساخت‌ها و منابع مالی ـ انسانی و رعایت استانداردهای استخدام و آموزش کارکنان فنی متصور نیست. بنابراین، مدیر اجرایی بیمارستان مسئولیت حسن اجرای اهداف کمیتهٔ عفونت‌های بیمارستانی را برعهده دارد.

فصل دوم

عفونت‌های ادراری

عفونت‌های ادراری بیمارستانی(HAUTI)[1]

عفونت‌های ادراری شایع‌ترین عفونت‌های بیمارستانی است که حدود $\frac{1}{3}$ موارد را تشکیل می‌دهند.

اکثر این عفونت‌ها به‌دنبال استفادهٔ مستقیم از وسایل و ابزار پزشکی[2] در سیستم ادراری به‌وجود می‌آیند. حدود ۸۰ درصد موارد به‌علت استفاده از کاتترهای ادراری[3] است؛ به‌همین دلیل، در برخی موارد به این عفونت‌ها، عفونت‌های ادراری ناشی از کاتتر(CAUTI)[4] اطلاق می‌شود.

در ۲۰-۱۰ درصد افرادی که سوند ادراری کوتاه‌مدت داشته‌اند باکتریوری دیده‌می‌شود که فقط ۲ درصد آنها علائم ادراری دارند که به‌صورت عفونت ادراری ظاهر می‌شود.

همچنین، در بیمارانی که سوند ادراری دارند به‌ازای هر روز، ۵ درصد احتمال بروز باکتریوری وجوددارد و در افرادی که بین ٤ تا ٦ هفته سوند داشته‌اند، احتمال باکتریوری به ۱۰۰ درصد افزایش می‌یابد.

---

1. Hospital Acquired Urinary Tract Infections
2. Instrumentation
3. Catheterisation
4. Catheter-Associated UTI

شایع‌ترین میکروارگانیسم‌های مولد عفـونت‌های ادراری بیمارستانی عبارت‌اند از:

1. *Escherichia coli*
2. *Enterococcus* spp.
3. *Candida* spp.
4. *Pseudomonas aeruginosa*
5. *Klebsiella* spp.
6. *Proteus* spp.
7. *Other Enterobacteriacea*
8. *Acinetobacter* spp.
9. *Other nonfermenters*

دستورالعمل جمع‌آوری نمونه‌های ادراری[1]

۱. شرایط آمادگی بیمار قبل از جمع‌آوری نمونه

- در مواردی که بیمار سوند ادراری ندارد، بهترین نمونه اولین ادرار صبحگاهی است که حداقل به‌مـدت ۸ سـاعت داخـل مثـانه بـاقی‌مانـده و تغلیظ شده‌باشد. درغیر این‌صورت، می‌توان از نمونه‌های ادرار تصادفی[2] استفاده‌نمود.
- در نمونـهٔ ادرار تصـادفی، بیمـار ترجیحاً بایـد از آشامیدن آب و مایعات اضافی به‌منظور تـولید ادرار خودداری‌نماید؛ زیـرا ایـن امـر مـوجب رقیق‌شـدن ادرار و کاهش تعداد باکتری می‌شود.
- بیمار نباید در ٤٨ ساعت گذشته آنتی‌بیوتیک مصرف کرده‌باشد، مـگر بـا تجویـز پـزشک معـالج. **تـوصیـه‌می‌شـود در باکتریوری بدون علامت از سـه نمـونـهٔ ادرار صبحگاهی استفـاده‌شود که در سه روز متـوالی جمع‌آوری شـده‌است.**

1. Specimen Collection
2. Random urine

۲. تکمیل فرم درخواست یا دریافت نمونهٔ ادراری

■ نام و شمارهٔ بیمار	■ نام پزشک درخواست‌کننده
■ سن و جنسیت	■ تاریخ درخواست آزمایش
■ پذیرش(سرپایی و بستری)	■ تاریخ و زمان جمع‌آوری نمونه
■ نام بخش	■ تاریخ و زمان تحویل نمونه
■ نوع نمونه(کاتتر یا ...)	■ علت مراجعه و تشخیص احتمالی بیماری
ذکر عوامل مداخله‌گر احتمالی(بیماری‌های زمینه‌ای، مصرف آنتی‌بیوتیک و ...)	

۳. نمونه‌گیری

در بیمارانی که سوند ادراری ندارند، لازم است ادرار مطابق دستورالعمل‌های نمونه‌گیری جمع شود که به‌طور مجزا برای زنان، مردان و نوزادان تهیه شده‌است.

۳-۱. بیمارانی که سوند ادراری دارند

۳-۱-۱. در مواردی که از سوندهای ادراری طولانی‌مدت استفاده‌می‌شود[1]، برای نمونه‌گیری سوند را قبل از محل اتصال به لولهٔ کیسهٔ ادراری با یک پنس یا وسیلهٔ مشابه مسدود می‌نماییم. حدود ۱- ۰/۵ ساعت بعد لولهٔ کیسهٔ ادرار را جدا و محل اتصال را با الکل تمیز می‌کنیم و پس از خروج مقداری ادرار، باقی نمونه را در ظرف استریل جمع می‌کنیم. همچنین، می‌توان برای نمونه‌گیری از سرنگ یا سوند ادراری تازه تعویض‌شده استفاده‌نمود.

توجه:

۱. نمونه‌گیری ادرار نباید از کیسهٔ سوند ادراری صورت‌گیرد.
۲. نمونه‌گیری و کشت از نوک کاتتر فولی قابل قبول نیست.

1. Indwelling Catheter

۳-۱-۲. سوند نلاتون یا کاتتر Straight: ابتدای مجرای ادرار را با آب و صابون مایع معمولی می‌شوییم و پس از سوندگذاری قسمت اول ادرار را دور می‌ریزیم و بقیه را در ظرف استریل جمع می‌کنیم.

۳-۱-۳. Ileal Conduit Urine: پس از تمیزکردن Stoma Opening با الکل، نوک کاتتر را به‌آرامی و به عمق ۲/۵-۵cm داخل می‌بریم و صبرمی‌کنیم تا ادرار به‌تدریج خارج و در ظرف نمونه‌گیری جمع شود.

توجه: به هیچ وجه نباید از Stomabag نمونه بگیرید.

۳-۱-۴. نمونهٔ ادرار سوپراپوبیک

- نمونه‌گیری از نوزادان؛
- کشت بی‌هوازی؛
- مواردی که نمونه ادرار تمیز میانی CCMS[1] یا CVMS[2] به‌دلیل آلودگی حین نمونه‌گیری دارای نتایج تشخیصی و تفسیری مناسبی نیست.

۳-۱-۵. نمونه‌گیری ادرار با سیستوسکوپی: گرفتن ادرار به کمک کاتتر ضمن عمل سیستوسکوپی در اتاق عمل و توسط متخصص انجام‌می‌شود. در این روش می‌توان ادرار را جداگانه از دو حالب تهیه و منبع عفونت را مشخص‌نمود.

نحوهٔ نمونه‌گیری و جمع‌آوری ادرار تمیز میانی در زنان، مردان و نوزادان

الف) زنان

۱. درپوش ظرف استریل مخصوص جمع‌آوری ادرار را بازکنید و مراقب باشید تا لبه و سطوح داخلی ظرف با انگشتان شما تماس پیدا نکند.

۲. در موقعیت ادرارکردن قراربگیرید و تا آنجا که ممکن‌است پاها را از یکدیگر بازکنید.

۳. با انگشتان یک دست چین‌های پوستی دستگاه تناسلی را از یکدیگر بازنگهدارید و تا پایان جمع‌آوری همین وضعیت را حفظ‌کنید.

٤. دستگاه تناسلی خارجی را از جلو به عقب با گاز آغشته به صابون مایع تمیز و با آب کاملاً آبکشی و سپس خشک کنید(**از مواد ضدعفونی‌کننده برای شستشو استفاده‌نکنید**).

براساس توصیهٔ سازمان بهداشت جهانی(WHO)، می‌توان درصورت دسترسی نداشتن به مواد شوینده، از آب و گاز استفاده‌کرد.

1. Clean-Catch, Midstream
2. Clean-Voided, Midstream

۵. قسمت اول ادرار را بیرون بریزید و بدون توقف جریان ادرار قسمت‌های میانی ادرار را داخل ظرف استریل بریزید و درپوش ظرف را محکم ببندید.
٦. توجه‌کنید که مشخصات کامل شما(نام، جنسیت و ...)، تاریخ و ساعت دریافت نمونه به‌طور صحیح روی برچسب ظرف نوشته شده‌باشد.
۷. ظرف کشت ادرار را در محل مخصوص جمع‌آوری نمونه‌ها قراردهید.

ب) مردان

۱. درپوش ظرف استریل مخصوص جمع‌آوری ادرار را بازکنید و مراقب باشید تا لبه و سطح داخلی ظرف با انگشتان شما تماس پیدانکند.
۲. قسمت اول ادرار را بیرون بریزید و بدون توقف جریان ادرار، قسمت میانی ادرار را داخل ظرف استریل جمع‌آوری کنید.
۳. درپوش ظرف را روی آن قراردهید و کاملاً سفت کنید.
٤. توجه‌کنید که مشخصات کامل شما به‌طور صحیح روی برچسب ظرف نوشته شده‌باشد.
۵. ظرف کشت ادرار را در محل مخصوص جمع‌آوری نمونه‌ها قراردهید.

ج) نوزادان

۱. کودک را به پشت بخوابانید و پاهای او را با خم‌کردن زانوهایش به حالت نیمه‌باز درآورید.
۲. دستکش بپوشید. ناحیهٔ تناسلی را با پنبهٔ آغشته به صابون مایع و آب تمیز کنید.
۳. سپس با آب گرم آبکشی و کاملاً خشک نمایید.
٤. توجه کنید که کیسهٔ ادرار به‌کار رفته برای کودکان دختر و پسر متفاوت است.
۵. کیسهٔ مخصوص پسربچه‌ها سوراخ چسب‌دار به‌شکل دایره دارد.
٦. کیسهٔ مخصوص دختربچه‌ها سوراخ چسب‌دار به‌شکل بیضی دارد.

۷. آلت تناسلی پسربچه را با حداقل دستکاری داخل سوراخ کیسه قراردهید و برچسب آن را محکم کنید.
۸. پس از برداشتن برچسب از اطراف دهانهٔ کیسه، دستگاه تناسلی دختربچه را به‌آرامی بازکنید و کیسه را از محل سوراخ طوری بچسبانید که مجرای ادرار در داخل کیسه قراربگیرد و برچسب آن را محکم کنید.
۹. حداکثر نیم ساعت اجازه‌دهید تا ادرار(تقریباً ۲۰ سی‌سی) در داخل کیسه جمع شود.
۱۰. کیسهٔ ادرار را با دقت از محل اتصال جداکنید و داخل ظرف استریل مخصوص کشت قراردهید.

روش جمع‌آوری ادرار به‌طریق Four-glass یا EPS[1]- VB3 -VB1-VB2[2]

برای تعیین منشأ عفونت ادراری و افتراق آن از عفونت پروستات.

نحوهٔ نمونه‌گیری:

VB_1: ۱۰ml اول ادرار را داخل ظرف استریل کشت ادرار جمع می‌کنیم.

VB_2: پس از تخلیهٔ حدود ۲۰۰ml از ادرار، ۱۰ml از وسط ادرار را داخل ظرف استریل دوم جمع می‌کنیم.

EPS: پروستات را ماساژ می‌دهیم و چند قطره ترشحات خارج‌شده از پیشابراه را داخل ظرف استریل سوم جمع می‌کنیم.

VB_3: اولین ۱۰ml ادرار پس از ماساژ را داخل ظرف استریل چهارم جمع می‌کنیم.

۴. وسایل و مواد لازم

- ظرف استریل دهان‌گشاد، غیرقابل نشت و با در محکم(برای تمام بیماران)؛
- کیسهٔ ادرار(دخترانه و پسرانه) برای نوزادان و شیرخواران؛

1. Express Prostatic Secretions
2. Voided Bladder

- صابون(ترجیحاً دستمال یا گاز آغشته به صابون مایع برای شستشو)؛
- راهنمای مکتوب نحوهٔ نمونه‌گیری، زمان و شرایط مناسب انتقال(برای ارسال به تمام بخش‌های بیمارستانی).

۵. حجم نمونه

در افراد بزرگسال حداقل ۱۰ml است. هر چند در شرایط خاص مثلاً در نوزادان ممکن‌است کمتر از ۱۰ml باشد.

۶. شرایط نگهداری و انتقال

- نمونهٔ ادرار تهیه‌شده تا ۲ ساعت در حرارت اتاق و تا ۲٤ ساعت در یخچال قابل نگهداری است.
- افزودن اسید بوریک با غلظت ۲-۱ درصد تعداد باکتری را برای ۹٦-٤۸ ساعت در دمای محیط ثابت نگه‌می‌دارد و به‌ندرت روی رشد بعضی ارگانیسم‌ها تأثیر منفی دارد.

۷. شرایط رد نمونه

- نمونه‌های بدون برچسب مشخصات بیمار؛
- نمونه‌هایی که در ظرف‌های نامناسب به آزمایشگاه رسیده‌باشد؛
- نمونهٔ ادرار ۲٤ ساعته؛
- نمونهٔ ادراری که بیش از ۲ ساعت در حرارت اتاق(RT) مانده‌باشد یا نحوهٔ نمونه‌گیری صحیح نباشد؛
- کشت از نوک کاتتر ادراری[1].

۸. آزمایش‌های تکمیلی و مرتبط

براساس پیشنهاد NNIS[1] توجه به علائم بالینی و همچنین نتایج آزمایش کامل ادرار برای تفسیر و گزارش کشت‌های ادرار و تشخیص عفونت ادراری

1. Foley Catheter Tip

ضـروری است. بنابراین، بـرای اطمینان از صحت تفسیر بایـد از صحیح بودن نتایج آزمایش کامل ادرار مطمئن شد. در این رابطه، می‌تـوان به موارد زیـر اشـاره‌نمود:

- زمان و دور سانتریفوژ(2000-2500 rpm) به‌مدت ۵ دقیقه؛
- حجم ادرار سـانتریفوژشـده نبایـد کمتر از ۱۰ml بـاشد(درصورتی که این حجـم مثـلاً ٦ml باشد باید تعداد عنـاصـر مشاهده‌شـده را در عـدد ۲ ضـرب‌کـرد)؛
- تعداد ۵> لکوسیت در هر HPF(40X) ادرار سانتریفوژشـده به‌عنـوان پیوری[2] تلقی‌می‌شود کـه معادل ۵۰> لکوسیت در هر میلی‌متر مکعب است.

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

> **توجه بـه میـزان RBC، سلول‌هـای اپی‌تلیـال و سیلنـدرهـای ادراری، وجـود باکتری در ادرار، وزن مخصوص و به‌خصوص آزمایش نیتریت و لکوسیت استـراز اهمیت دارد.**

آزمایش نیتریت[3]

بیماری‌زاهـای ادراری مـانـنـد *E.coli* ، *کلبسیلا*، *انتروباکتر*، *پروتئوس*، *پسودوموناس*، *استرپتوکوکوس*، نـیتـریت مـثبت هـستنـد، ولـی *استـافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* و *انتروکوکوس* نیتـریـت منـفی هستنـد.

بعضی مؤلـفان نتـایج آزمایش نیتـریت را در ارزیـابی عفـونت‌هـای بیمارستانی رضایت‌بـخش نمی‌دانـند.

---

1. National Nosocomial Infection Surveillance
2. Pyuria
3. Nitrite Test

مثبت کاذب به‌ندرت دیده‌می‌شود، به‌عنوان مثال ممکن‌است مصرف داروی فنازوپیریدین آزمایش را مثبت کاذب کند.

منفی کاذب در این موارد دیده‌می‌شود:

۱. تعداد باکتری کمتر از $۱۰^{۵}$ در هر میلی‌لیتر؛
۲. pH کمتر از ٦؛
۳. اسید اسکوربیک بالا؛
٤. نمونه‌های ادرار تصادفی یا نمونه‌های گرفته‌شده از کاتترهای ادراری؛
۵. کمبود نیترات در برنامهٔ غذایی بیمار.

آزمایش لکوسیت استراز

درصورت وجود نوتروفیل‌های سالم یا لیزشده در ادرار این آزمایش مثبت می‌شود.

موارد منفی کاذب:

۱. افزایش زیاد وزن مخصوص، پروتئین و گلوکز در ادرار؛
۲. مقادیر خیلی زیاد اسید آسکوربیک؛
۳. مصرف تتراسیکلین، سفالکسین و سفالوتین؛
٤. افزودن اسید بوریک به ادرار به‌عنوان مادهٔ نگهدارنده.

موارد مثبت کاذب:

۱. آلودگی شدید با ترشحات واژن به‌علت WBC زیاد، تعداد زیاد سلول‌های اپی‌تلیال سنگفرشی[1] و باکتری؛
۲. وجود تریکوموناس و ائوزینوفیل؛
۳. مواد اکسیدکننده و فرمالین.

1. Squamous cell

نحوهٔ کشت نمونهٔ ادرار

به‌طور معمول، کشت ادرار روی محیط‌های آگار خون‌دار، EMB یا مکانکی آگار[1] انجام‌می‌شود. زمانی که ادرار را با استفاده از روش‌های جراحی یا سوپراپوبیک یا با روش سیستوسکوپی یا ماساژ پروستات جمع‌آوری نموده‌اند یا در مواردی که شک نسبت به ارگانیسم‌های سخت‌رشد در نمونه ادرار وجوددارد، **علاوه‌بر محیط‌های فوق از محیط شکلات آگار[2] نیز استفاده‌می‌شود.**

برای کشت ادرار می‌توان از لوپ کالیبره ۰/۰۱ یا ۰/۰۰۱ میلی‌لیتری استفاده‌کرد.

شمارش کلنی‌ها در محیط‌های کشت ادرار

تعداد کلنی‌های حاصل از رشد باکتری‌ها در محیط کشت را می‌شماریم و در ضریب حجم لوپ ضرب‌می‌کنیم. نتیجه به‌صورت واحد شمارش کلنی باکتری در میلی‌لیتر ادرار بیان می‌شود(CFU/ml[3]).

تعریف انواع سندروم‌های بالینی

۱. **عفونت ادراری بدون عارضه**[4]: عبارت است از عفونت درحالی که ساختمان و عمل دستگاه ادراری سالم است. در این موارد شایع‌ترین بیماری‌زای جداشده از کشت‌های ادراری *E.coli* است.

1. MacConkey Agar
2. Chocolate Agar
3. Colony Forming Unit
4. Uncomplicated UTI

۲. **عفونت ادراری پیچیده**[1]: عبارت است از عفونت در دستگاه ادراری که ازنظر ساختمان یا عمل دچار اشکال یا اختلال است، مثلاً در کسانی که تومور دستگاه ادراری یا سنگ دارند، بیمارانی که برای مدت‌های طولانی سوند دارند و قطع نخاعی هستند یا اعمال جراحی بزرگ روی سیستم ادراری آنها انجام‌شده یا به‌طور مادرزادی ساختمان و عملکرد دستگاه ادراری آنها دچار مشکل خاصی است و معمولاً عفونت‌های مکرر و اغلب بیش از یک نوع میکروارگانیسم دارند.

۳. **سندروم حاد اورترا**[2]: اغلب در زنان جوان دیده‌می‌شود که علائم عفونت ادراری و باکتریوری خفیف با کلنی کانت خیلی کم دارند.

٤. **باکتریوری بدون علامت**: در افراد مسن و زنان حامله شایع است و در زنان حامله باید بااهمیت تلقی‌شود. دیده شده‌است که عفونت‌های ادراری بدون علامت موجب زایمان زودرس و پارگی کیسهٔ آب و گاهی سقط جنین می‌شود.

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

٦. **باکتریوری**: عبارت است از وجود اوروپاتوژن‌ها(بیماری‌زاهای ادراری) در ادرار که موجب عفونت ادراری می‌شوند.

۷. **پیوری**: عبارت است از وجود گلبول‌های سفید در ادرار و زمانی اطلاق می‌شود که در یک گسترهٔ مرطوب(Wet mount) از رسوب ادرار سانتریفوژشده تعداد ۵ < لکوسیت در هر میدان میکروسکوپی با درشت‌نمایی زیاد(٤۰X) دیده‌شود. این تعداد معادل ۵۰ < لکوسیت در هر mm^3 ادرار است.

1. Complicated UTI
2. Acute Urethral Syndrom

۸. **اورتریت**[1]: التهاب پیشابراه یا مجرای خروج ادرار که معمولاً در حین بیماری‌های منتقلهٔ جنسی ایجادمی‌شود، مانند اورتریت گونوکوکی.

۹. **پیلونفریت**[2]: التهاب و عفونت حاد پارانشیم کلیه که معمولاً با درد پهلوها و تب‌ولرز همراه است.

۱۰. **حاملگی**: به زنان حامله توصیه‌می‌شود از ابتدای حاملگی چند بار آزمایش کشت ادرار انجام‌دهند تا درصورت وجود باکتریوری بدون علامت تحت درمان قرارگیرند.

در برخی عفونت‌های دستگاه ادراری مانند سل ادراری یا عفونت با باکتری‌های بی‌هوازی و التهاب مثانه در اثر عفونت‌های کلامیدیای، *مایکوپلاسما* یا برخی ویروس‌ها ممکن‌است تعداد زیادی گلبول سفید در ادرار دیده‌شود، درحالی که ارگانیسم مولد عفونت در محیط‌های کشت معمولی رشد نمی‌کند؛ بنابراین، نتیجهٔ کشت ادرار منفی است.

در التهاب‌های غیرعفونی مثانه یا کلیه‌ها نیز با وجود گلبول سفید در

تفسیر و نحوهٔ گزارش‌دهی نتایج کشت ادرار

در تفسیر نتایج کشت باید به این موارد توجه کرد:

۱. عوامل مرتبط با بیمار(نوع نمونهٔ ادرار، سن، جنسیت، علائم بالینی و مصرف آنتی‌بیوتیک)؛

۲. نتیجهٔ آزمون میکروسکوپی رسوب ادرار؛

۳. شرایط باکتری رشدیافته روی پلیت(تنوع کلنی رشدکرده یا خلوص کشت، تعداد باکتری و نوع باکتری رشدیافته)؛

٤. روش نمونه‌برداری.

جداول زیادی برای تفسیر نتایج کشت ادرار در کتاب‌های مختلف مرجع آورده‌شده‌اند که مبنای تفسیر آنها بر سه محور زیر است:

1. Urethritis
2. Pyelonephritis

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

جداول تفسیری پیوست از چهار مرجع معتبر میکروب‌شناسی بالینی انتخاب‌شده‌اند(جدول‌های ۲-۱، ۲-۲، ۲-۳ و ۲-٤). می‌توانید باتوجه به علائم بیمار و همچنین رشد ارگانیسم در کشت ادرار از این جدول‌ها برای نحوهٔ کار روی نمونه و توصیهٔ لازم به پزشک استفاده‌نمایید.

نوع باکتری رشدیافته در تعیین بیماری‌زا بودن یا نبودن، تعیین نوع آزمایش حساسیت ضدمیکروبی(انتخاب دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی) و گزارش نهایی به پزشک اهمیت دارد(جدول‌های ۲-۵ و ۲-٦).

روش و زمان بررسی نتایج

قرائت ابتدایی را باید روی همهٔ کشت‌هایی انجام‌داد که قبل از نیمه‌شب دریافت‌شده‌اند و درصورت رشدنکردن، پلیت‌ها باید حتماً تا ٤٨ ساعت نگهداری‌شوند. برای کشت‌هایی که بعد از نیمه‌شب پذیرش شده‌اند، می‌توان اولین قرائت را به‌همراه سایر کشت‌های ارسالی در روز بعد انجام‌داد.

جدول ۲-۱: طبقه‌بندی عفونت‌های ادراری با توجه به سندروم‌های بالینی

CATEGORY	CLINICAL	LABORATORY
Acute, uncomplicated UTI In women	Dysuria, urgency, frequency, suprapubic pain No urinary symptoms in last 4 wk before current episode No fever, flank pain	≥ 10 WBC/mm^3 ≥ 10^3 CFU/ml uropathogens[1] in CCMS urine[2]
Acute, uncomplicated pyelonephritis	Fever, chills Flank pain on examination Other diagnosis excluded No history or clinical evidence of urologic abnormalities	≥ 10 WBC/mm^3 ≥ 10^4 CFU/ml uropathogens in CCMS urine
Complicated UTI and UTI in men	Any combination of symptoms listed above One or more factors associated with complicated UTI	≥ 10 WBC/mm^3 ≥ 10^5 CFU/ml uropathogens in CCMS urine
Asymptomatic bacteriuria	No urinary symptoms	± ≥ 10 WBC/mm^3 ≥ 10^5 CFU/ml in two CCMS cultures > 24 hrs apart

۱. یوروپاتوژن: ارگانیسمی است که به‌طور معمول باعث عفونت ادراری می‌شود.

۲. ادرار تمیز میانی(CCMS): Clean - Catch Midstream Urine.

جدول ۲-۲: راهنمای تفسیری کشت‌های ادراری

RESULT	SPECIFC SPECIMEN TYRE/ ASSOCIATED CLINICAL CONDITION, IF KNOWN	WORKUP
≥ 10^4 CFU/ml of a single potential pathogen or for each of two potential pathogens	CCMS urine/ pyelonephritis, acute cystitis, asymptomatic bacteriuria, or catheterized urines	Complete[1]
≥ 10^3 CFU/ml of a single potential pathogen	CCMS urine/ symptomatic males or catheterized urines or acute urethral syndrome	Complete
≥ Three organism types with no predominating organism	CCMS urine or catheterized urine	None, Because of possible contamination, ask for another specimen
Either two or three organism types with predominant growth of one organism type and < 10^4 CFU/ml of the other organism type(s)	CCMS urine	Complete workup for the predominating[2] organism (s); description of the other organism(s)
≥ 10^2 CFU/ml of any number of organism types(set up with a 0.001 and the 0.01-ml calibrated loop)	Suprapubic aspirated, any other surgically obtained urines(including ileal conduits, cystoscopy specimens)	Complete

۱. تشخیص ارگانیسم همراه با آزمایش حساسیت میکروبی Complete workup.

۲. Predominant growth = 10^4 to ≥ 10^5 CFU/ml.

جدول ۲-۳: تفسیر نتایج کشت ادرار و انجام‌دادن عملیات تشخیصی

Colony count (CFU/ml)[1]	Symptoms, Clinical Disease, or Patient Population	Unine Source	No. of Organisms, Types Isolated	Laboratory Work-up Suggested[4]
< 10^2	Pediatric	CV[2]/CA[3]	None	None[5]
≥ 10^2		Suprapubic	≤ 2 organisms by anaerobic culture	ID & AST
≥ 10^2	Symptomatic female, urethritis	CV	Pure culture	ID & AST
≥ 10^3	Symptomatic male, prostatitis	CA	≤ 2 organisms	ID & AST
≥ 10^3	Cystitis/pyelonephritis	CA	Pure culture	ID & AST
		Bladder wash-out		ID & AST
≥ 10^5		CV	Pure culture	ID & AST
			2-3 organisms	Q & SID
			> 3 organisms	Q & M or Q & GS

۱. برای تعیین تعداد 10^2 کلنی در ادرار باید از لوپ ۰/۰۱ml استفاده‌کرد.

۲. CV(Clean Voided): ادرار تمیز.

۳. CA(Straight Catheterized): ادرار گرفته‌شده توسط سوند کوتاه‌مدت.

٤. Work-up: به عملیات آزمایشگاهی نیاز است. مخمر در کشت ادرار به هر تعداد که وجود داشته‌باشد، باید به پزشک گزارش شود(**ضروری است کلنی کانت ذکرشود**) و درصورتی که بیشتر از 10^5 مخمر در نمونه ادرار رشدکند، گونهٔ آن را نیز باید تعیین‌کرد.

۵. با توجه به جدول ۲-٤ توصیه‌ها و اطلاعات آموزشی مفید را به پزشک پیشنهادکنید.

ID&AST: شناسایی و آزمایش تعیین حساسیت ضدمیکروبی.

ID&S: شناسایی را تا حد تعیین جنس و گونه و درصورت لزوم آزمایش حساسیت ضدمیکروبی را نیز انجام‌دهید.

برای مثال، درصورتی که براساس مورفولوژی کلنی و ظاهر میکروسکوپی به لاکتوباسیل مشکوک شدید، از آزمایش حساسیت ضدمیکروبی اجتناب کنید.

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

Q&M: تعداد کل باکتری‌ها را بشمارید و به‌عنوان mixed urethral flora گزارش‌کنید.

Q&GS: شمارش گزارش ظاهری به‌وسیلهٔ رنگ‌آمیزی گرم.

جدول ۲-۴: تفسیر نتایج کشت ادرار براساس تعداد باکتری، پیوری و علائم بالینی

I. PREDOMINANT BACTERIAL COUNT	II. PYURIA[1]	III. SYMPTOMS[2]	ALTERNATIVE CHOICE(S)
(no growth)	AC	A	No bacterial disease
		P	Chlamydia; CMV; adenovirus, type ll or HSV; urethral, cervical, and/ or urine culture recommended
	P	A	"Aseptic" pyuria, i.e., dehydration
		P	Presumed urethral syndrome: chlamydia, Gonorrhea, or ureaplasma: urethral or cervical culture recommended; patient Receiving antibiotic treatment
$\geq 10^2$ to 10^5	AC	A	Probable perineal contact or colonization (Foley catheter)
		P	Chlamydia, gonorrhea, noninfectious Etiology, or patient receiving antibiotic treatment; re-examing in 1 week if symptoms persist. Leukopenic?
	P	A	Asymptomatic bacteriuria; previous antibiotic treatment
		P	Symptomatic bacteriuria
$\geq 10^5$	AC	A	Asymptomatic bacteriuria(pregnancy and geriatric) gross contamination or transient infection (recent sexual activity).
		P	Cystitis, pyelonephritis
	P	A	Asymptomatic bacteriuria (pregnancy and geriatric)
		P	Cystitis, pyelonephritis

۱. لکوسیت استراز مثبت (+) برابر است با حداقل 5WBC/HPF P=present A=absent.

۲. سوزش ادرار و تکرر.

درصورتی که بیمار تحت درمان با آنتی‌بیوتیک است، رنگ‌آمیزی گرم، شمارش WBC و نتیجهٔ کشت ممکن‌است قابل قبـول نباشـد.

تعداد ارگانیسم و شـمارش WBC در ادرار سـانتریفوژ شده(سدیمان ادراری) ارزش مقایسه‌ای ندارد. پلیت‌ها برای بررسی و مشورت باید تا ۷۲ ساعت نگهداری‌شوند.

جدول ۲-۵: Urine Cultures-Definitive Identification and Susceptibility Criteria

Organism Group	Description (Presumptive/ Definitive Identification)	Set Up Susceptibility?
Staphylococcus	• *Staphylococcus*	• yes
	Staphylococcus Coagulase-negative	• yes
	• *Staphylococcus* saprophyticus	• no
Streptococcus	• *Beta streptococcus*	• no
	• *Enterococcus*	• s/p [facility-specific]
	• *Streptococcus* viridans	• no
Gram-positive rods	• C. urealyticum	• no
	• Diphtheroids	• no
	• Lactobacillus	• no
Gram-negative rods	• Presumptive identification	• yes
	• Definitive identification	• yes
Yeast	[facility-specific] presumptive vs. definitive	• no

تفسیر نتایج کشت ادرار در نمونه‌های گرفته‌شده به‌وسیلهٔ سوند ادراری

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

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

- شناسایی کامل(ID) و انجام‌دادن آزمایش حساسیت آنتی‌بیوتیکی(AST) روی هر دو ارگانیسم؛
- شناسایی توصیفی گونه‌هایی که در تعداد کمتر از 10^4 رشدکرده‌اند.

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

- شناسایی توصیفی ارگانیسم‌های موجود براساس ظاهر آنها. برای مثال، دیفتروئیدها و گروه استرپتوکوک‌های ویریدانس.

نحوهٔ گزارش:

Multiple organisms present, probable contamination, please repeat culture.

۳. رشد یک نوع بیماری‌زای ادراری احتمالی و یک نوع باکتری آلوده‌کنندهٔ احتمالی:

- شناسایی کامل(ID) روی بیماری‌زای احتمالی؛
- شناسایی توصیفی: باکتری آلوده‌کنندهٔ احتمالی براساس نوع ظاهری کلنی.

٤. رشد سه نوع ارگانیسم در نمونه:

- شناسایی توصیفی ارگانیسم‌ها براساس شکل ظاهری کلنی.

نحوهٔ گزارش: مانند گزارش بالایی است.

Multiple organisms present, probable contamination, please repeat culture.

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

۱. برای بیماران تحت درمان آنتی‌بیوتیک، بیماران خانم مبتلا به اورتریت و مردان علامت‌دار شناسایی کامل(ID) و آزمایش حساسیت آنتی‌بیوتیکی(AST).

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

۳. کشت ادرار را در دمای اتاق به‌مدت ۷۲ ساعت نگهداری‌کنید تا درصورت درخواست انجام کارهای تکمیلی توسط پزشک، کشت در دسترس باشد.

توجه:

۱. در کسانی که Indwelling Catheter دارند، تعداد باکتری بین ۱۰۰-۱۰۰۰CFU/mL برای پیگیری باارزش است؛ چون ممکن‌است تعداد باکتری در این افراد درصورتی که تحت درمان با آنتی‌بیوتیک نباشند، در عرض ۷۲ ساعت به بیش از 10^5 برسد.
۲. درصورتی که چند گونه باکتری در کشت وجوددارد، باید بااحتیاط تفسیر شود؛ زیرا ممکن‌است این تعداد باکتری نشان‌دهندهٔ بیماری‌زاهای واقعی نباشد.
۳. تکرار نمونه‌گیری در طی ۳-۲ روز در موارد ۱ و ۲ توصیه‌می‌شود.

تفسیر نتایج کشت ادرار حاصل از تکنیک‌های تهاجمی

۱. وجود یک یا دو ارگانیسم:

- شناسایی ID[1] و انجام‌دادن AST[2] درصورتی که ارگانیسم‌های جداشده بیماری‌زا باشند.

۲. وجود سه ارگانیسم:

- شناسایی کامل ID و نگهداری کشت‌ها به‌مدت سه روز برای درخواست مشاوره.

نحوهٔ گزارش:

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

۳. بدون رشد[3]:

1. Identification
2. Antimicrobia Susceptibility Testing
3. No growth

- کشت‌ها را پس از ۲٤ ساعت بررسی‌کنید؛
- مجدداً کشت‌ها را به‌مدت ٤۸ ساعت نگهداری‌کنید.

نحوهٔ گزارش:

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

جدول ۲-۶

- در مواردی که *استافیلوکوک اورئوس*[1] به‌طور خالص در محیط کشت رشدنماید، صرف‌نظر از تعداد آن به‌عنوان یک عفونت بارز[2] تلقی‌می‌شود که باید برای آن آزمایش حساسیت میکروبی(AST) انجام‌داد و نتیجه را به پزشک گزارش‌نمود.
- وجود قارچ در کشت ادرار به هر تعداد که باشد باید به پزشک گزارش داده‌شود(ذکر کلنی کانت ضروری است) و درصورتی که کشت‌های ادرار خالص ازنظر قارچ داشته‌باشیم باید گونهٔ آن قارچ را نیز تعیین‌کرد. لازم به ذکر است که کاندیداها معمولاً پس از ۲ روز در محیط‌های کشت معمولی رشدمی‌کنند.
- استرپتوکوک گروه ب[3] به‌خصوص در زنانی که در سن بارداری قراردارند علاوه‌بر ایجاد عفونت ادراری باعث آلودگی نوزاد درضمن عبور از کانال زایمان و ایجاد تب‌های بعد از زایمان می‌شود. بنابراین، جداکردن این ارگانیسم از کشت ادرار این افراد باید بااهمیت تلقی‌شود. همچنین، در افراد مبتلا به دیابت جداسازی این گونه *استرپتوکوک* ممکن‌است نشانهٔ عفونت ادراری باشد.
- *پسودوموناس آئروژنوزا*[4] در بیماران مبتلا به دیابت یا کسانی که به نوعی بیماری زمینه‌ای دارند و به‌خصوص در بیماران با نقص سیستم ایمنی یا بستری در بیمارستان‌ها یا کسانی که پیوند کلیه دارند ازجمله یوروپاتوژن‌ها است.
- در بیماران بستری و دارای کاتتر ادراری باکتری‌هایی مانند *آسینتوباکترها*[5] و گونه‌های *پسودوموناس* ممکن‌است عامل عفونت‌های ادراری بیمارستانی باشند.
- جداسازی جنس‌های غیرشایع مانند *سالمونلا*[6]، *آئروموناس*[7]، و *ویبریو*[8] به هر تعداد از کشت ادرار باید گزارش‌شود.
- بعضی اوقات تکثیر بیش از حد باکتری‌های غیرهوازی[9] و درگیری ویروسی دستگاه ادراری نیز سندروم اورترا ایجادمی‌کند که در آزمایشگاه‌های معمولی قابل تشخیص و شناسایی نیستند.

1. *Staphylococcus aureus*
2. Significant
3. Streptococcus agalactiae
4. Pseudomonas aeruginosa
5. Acinetobcter
6. *Salmonella*
7. *Aeromonas*
8. *Vibrio*
9. Anaerobic

پیوست ۲-۱: Urinary microbiota

Microbiota	Organism	Extent of workup if count is appropriate
Urogenital	Viridans group strepto-cocci, *Neisseria* spp. diphtheroids, *Lactoba-cillus* spp. anaerobes	Report as urogenital microbiota/ flora
Skin	Diphtheroids. *Staphylococcus* spp.	Report as skin or with urogenital microbiota unless present in amounts > 10-fold more than other microbiota. Then treat as uropathogen
Uropathogens	Gram-negative bacilli *Staphylococcus*	ID to species level and AST ID and AST of *S. aureus*; ID of *Staphylococcus saprophyticus* with novobiocin disk for females of childbearing age; AST generally not needed for S. *saprophyticus* or other coagulase-negative staphylococci
	Yeasts	ID of *C. albicans* and *Candida glabrata*; ID of others to species level only on request
	Beta-hemolytic *Streptococcus Enterococcus* spp.	ID especially of group B in women in childbearing years. Check for VRE
	G. vaginalis	ID only if number is 10 times greater than that of all other microbiota
	Aerococcus urinae	ID only if number is 10 times greater than that of all other microbiota
	Corynebacterium (urease positive)	ID and AST, if number is 10 times greater than that of all other microbiota and ≥ 100,000 CFU

* Abbreviations: AST antimicrobial susceptibility testing; ID, identification; VRE, vancomycin-resistant enterococcus

پیوست ۲-۲: گزارش موارد ایزوله‌شده با حداقل آزمایش

Report	Minimal testing
Enteric gram-negative rod	Grows typically on MAC or EMB and appears lactose positive or spreading on any medium or is indole positive and oxidase negative.
Non-glucose-fermenting, gram-negative rod	Appears lactose negative on MAC or EMB and is oxidase positive and indole negative or has odor of Pseudomonas or *Alcaligenes*. If desired, inoculation and incubation of KIA or TSI can be used to distinguish from enteric rods.
Gram-negative rod or Non-lactose-fermenting, gram-negative rod	Grows well on EMB or MAC but does not fit either or the above criteria for gram-negative rods.
Yeast	Morphology consistent with yeast wet mount or “feet” present on plate.
S. aureus	Catalase-positive, gram-positive cocci and slide coagulase positive. *Caution: S. saprophyticus* can be positive in latex or coagglutination serologic coagulase tests.
Coagulase- negative staphylococci	Catalase- positive, gram-positive cocci and slide coagulase negative
Enterococcus	Catalase-negative, PYR-positive, nonhemolytic, and gram-positive cocci
Viridans group streptococci	Gram-positive cocci in pairs and chains, catalase negative, alpha-hemolytic, or PYR negative. Rule out *A. urinae* (differs by a Gram stain showing tetrads and clusters) prior to reporting, if numbers are significant.
Lactobacillus spp.	Gram-positive rods. Catalase negative, alpha-hemolytic
Corynebacterium spp.	Gram-positive rods. Catalase positive. Rule out uropathogenic *Corynebacterium* with rapid urease test. if numbers are significant.

∗ Abbreviations: KIA. Kligler’s iron agar; TSI, triple sugar iron agar; PYR, pyrrolidonyl-β-naphthylamide.

References

1. Isenberg D. Henry: *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, American Society for Microbiology, 1992 & 2004.
2. Murray R. Patrick: *Manual of Clinical Microbiology*, 8 TH editions, American Society for Microbiology, 2003.
3. Forbes A. Betty: *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*, 11 TH editions, Mosby, 2002.
4. Mahon R. Connie: *Textbook of Diagnostic Microbiology*, 2 ED editions, W.B. Saunders, 2000.

فصل سوم

عفونت‌های تنفسی

عفونت‌های تنفسی بیمارستانی

پنومونی بیمارستانی از عفونت‌های شایع محسوب‌می‌شود که در بیماران دارای تهویهٔ مکانیکی(VAP)[1]، افراد مسن با بیماری‌های زمینه‌ای، جراحی‌های وسیع و بیماران بستری در ICU شایع‌تر است.

در دهه‌های اخیر شیوع بیماری ۱-۰/۵ درصد با مورتالیتی حدود ۵۰-۳۰ درصد گزارش شده‌است که در بیماران VAP شانس ابتلا به عفونت ۲۰-۶ برابر افزایش‌می‌یابد.

مطالعات متعدد نشان‌می‌دهد که عامل مهم ایجاد و گسترش پنومونی‌های بیمارستانی کلنیزاسیون ناحیهٔ اروفارنکس و تراشه توسط باکتری‌های گرم منفی و آسپیراسیون ناشی از آن است. پنومونی‌های ناشی از باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها مانند *استافیلوکوک‌های* مقاوم به متی‌سیلین(MRSA) و یا باسیل‌های گرم منفی مقاوم به

1. Ventilator Associated Pneumonia

چند دارو نشان‌دهندهٔ کلنیزاسیون یا عفونت‌های متقاطع[1] است که ممکن‌است ازطریق دست آلودهٔ کارکنان بیمارستان و ... ایجادشود.

برخی ارگانیسم‌ها می‌توانند ازطریق انتشار در خون در ریه، پنومونی ایجاد نمایند که در کمتر از ۱۵ درصد موارد در این بیماران کشت خون هم‌زمان مثبت است. همچنین، آسپیراسیون محتویات معده و مری یا استفاده از وسایل پزشکی آلوده مانند برونکوسکوپ، ساکشن تراشه و اسپیرومتر آلوده از دیگر راه‌های غیرشایع در انتقال عفونت است.

در دههٔ اخیر روش‌های تشخیصی با استفاده از برونکوسکوپی همراه با کشت‌های کمی از نمونه‌های لاواژ برونکوآلوئولار(BAL)[2] یا نمونه PSB[3] برای تشخیص عامل اتیولوژیک و پایش بیماری به‌خصوص در بیماران VAP کاربرد وسیعی یافته‌است.

نتایج به‌دست آمده از کشت‌های کمی به‌خوبی با یافته‌های هیستوپاتولوژیک و کشت نمونه‌های بافتی مطابقت دارد درحالی که در بسیاری موارد این نتایج با کشت نمونه‌های خلط یا ترشحات تراشه همخوانی ندارند.

بنابراین، در این فصل استفاده از این روش‌ها به‌عنوان روش استاندارد و مرجع تشخیص عامل بیماری به تفصیل توضیح داده شده‌است.

در مطالعات حاصل از کشت‌های کمی BAL یا PSB نشان داده شده‌است که در روزهای اول بستری(۵-۴ روز اول) آسپیراسیون فلور نرمال اروفارنکس یا عفونت‌های اکتسابی از جامعه مانند *هموفیلوس آنفلوانزا*، *استرپتوکوک پنومونیه*، *موراکسلا کاتارالیس* و ویروس‌ها در اولویت قراردارند درحالی که در بیماران بستری برای طولانی‌مدت و یا تحت درمان با آنتی‌بیوتیک‌ها و ... استاف ارئوس و باسیل‌های گرم منفی از عوامل شایع ایجاد بیماری هستند.

1. Cross infection
2. Bronchial Alveular Lavage
3. Protected Specimen Brushing

عفونت‌های پسودوموناپی، اسینتوباکتر یـا بیماری‌زاهـای مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها در بیماران VAP یـا تـحت درمـان با آنتی‌بیوتیک‌های وسیـع‌الطیف شیـوع بیشتری دارند و در ایـن بیمـاران ۵۰-۲۰ درصد عفـونت‌هـا پلی‌میکروبیـال هستند.

جدول‌های ۳-۱ و ۳-۲ بیماری‌زاهای شـایع پنـومونی‌هـای اکـتسابی و جدول ۳-۳ پنومونی بیمـارستانی را نـشان‌می‌دهنـد.

جدول ۳- ۱: Most Common Etiologies of Community- Acquired Pneumonia in Adults who are Hospitalized

Generally Requiring Intensive Care Unit	Most Common Etiologies*
NO	H.influenzae; polymicrobial aerobic gram-negative bacilli; *Legionella* spp.; Staphylococcus aureus; Chlamydia pneumoniae; Respiratory Viruses
NO	*Legionella* spp., aerobic gram-negative bacilli, Mycoplasma pneumonia, Respiratory Virusses

* Streptococcus pneumoniae is the most common etiology for all categories of adult patients hospitalized with pneumonia

جدول ۳-۲: COMMUNITY ACQUIRED PNEUMONIA ETIOLOGIC AGENTS

PATHOGEN	FREQUENCY(%)
Streptococcus pneumoniae	66
Haemophilus influenzae	1-12
M. catarrhalis	10
Legionella species	2-15
Mycoplasma pneumoniae	2-14
Klebsiella species	3-14
Enteric gram negative bacilli	6-9
Staphylococcus aureus	3-14

Chlamydia species	5-15
Influenza viruses	5-12
Other viruses	<1-12
Unknown	23-49

Carroll KC.2002. J Clin Microbiol 40:3115-3120 Sharp SE, et.al. Cumitech 2003

جدول ۳-۳: Hospital Acquired Pneumonia

- Most frequent nosocomial infection(30-33% of cases) among combined medical surgical intensive care units
- 83% are ventilator associated
- Etiologic agents
  - Gram positive cocci
- *S. aureus* 17%
- *S. pneumoniae* 2-20%
  - Aerobic gram-neg bacilli 60%
- Pseudomonas aeruginosa
- Enterobacter sp.
- Klebsiella pneumoniae
- Acinetobacter
- *Legionella*
  - Anaerobes 10-20%
  - Fungi 0-10%

Modified from: Carroll KC. 2002. J Clin Microbiol 40:3115-3120.

تشخیص آزمایشگاهی پنومونی بیمارستانی

درخصوص تشخیص آزمایشگاهی پنومونی‌های بیمارستانی به‌خصوص پنومونی مرتبط با ونتیلاسیون(VAP) تردیدهایی وجوددارد. تعداد زیادی از محققان باور دارند که VAP یک بیماری بالینی است. عده‌ای نیز اعتقاد دارند که باید از روش‌های تهاجمی و غیرتهاجمی در تشخیص پنومونی‌های بیمارستانی برای تصمیم‌گیری در درمان آنتی‌بیوتیکی استفاده‌کرد. روش طلایی[1] آزمایش بافت‌شناسی ریه از نمونه‌های بیوپسی یا اتوپسی است.

1. Gold Standard

جداسازی میکروارگانیسم‌های عامل در پنومونی‌های بیمارستانی و انجام آنتی‌بیوگرام در پایش و کنترل این عفونت‌ها فواید زیادی دارد. با این‌همه بررسی‌های میکروبیولوژیکی بیماران بستری در ICU تحت ونتیلاسیون با محدودیت‌هایی همراه است:

۱. ممکن‌است نتایج منفی کاذب موجب اشکال در درمان شود.

۲. جداسازی میکروارگانیسم‌هایی که در دستگاه تنفسی فوقانی و تحتانی کلنیزه می‌شوند، موجب نتایج مثبت کاذب می‌گردند.

نمونه‌برداری و انتقال نمونه

روش‌های مختلفی برای اجتناب از آلودگی نمونه‌ها با فلور طبیعی دستگاه تنفسی فوقانی وجوددارند که عبارت‌اند از:

۱. استفاده از روش‌های تهاجمی برای جمع‌آوری نمونه از محل عفونت مانند برونکوسکوپی و بیوپسی،

۲. استفاده از وسایل نمونه‌برداری دارای حفاظ[1] برای پیشگیری از آلودگی نمونه‌ها با فلور طبیعی دستگاه تنفسی فوقانی.

از سوی دیگر، دربارهٔ کشت کمّی و تعیین آستانهٔ تعداد کلنی برای افتراق بین عفونت و کلنیزاسیون به‌طور گسترده تحقیق و بررسی شده‌است که از جنبه‌های تشخیصی و اقتصادی مقرون‌به‌صرفه است.

به‌طور کل، روش نمونه‌برداری برای تشخیص پنومونی‌های بیمارستانی به دو دستهٔ غیرتهاجمی و تهاجمی تقسیم‌می‌شوند(جدول ۳-٤ روش‌های جمع‌آوری، انتقال و آماده‌سازی نمونه‌های تنفسی را نشان‌می‌دهد).

1. Protected devices

جدول ۳-۴: جمع‌آوری، انتقال، ذخیره و آماده‌سازی نمونه‌های دستگاه تنفس تحتانی

نمونه	ظرف انتقال	آماده‌سازی بیمار	دستورالعمل‌های ویژه	انتقال به آزمایشگاه	نگهداری قبل از انجام کشت	محیط کشت	بررسی میکروسکوپی	توضیحات
دستگاه تنفسی تحتانی BAL*, BB**, BW**	ظرف استریل		کشت بی‌هوازی فقط درصورت استفاده از کاتترهای حفاظت‌شده انجام‌می‌شود	حداکثر ۲ ساعت در دمای اتاق	۲۴ ساعت در دمای ۴°C	BA*** CA Mac	رنگ‌آمیزی گرم و دیگر رنگ‌آمیزی‌ها بنا به درخواست برای مثال: DFA برای *لژیونلا* و AFB****	موارد دیگر: کشت شمارشی BAL، AFB، *لژیونلا*، *نوکاردیا*، *مایکوپلاسما*، *پنوموسیستیس*، *سایتومگالوویروس*
خلط، آسپیراسیون تراشه(ساکشن)	ظرف استریل	خلط؛ شستن یا قرقرهٔ آب قبل از جمع‌آوری	خلط را باید بیمار با سرفهٔ عمیق جمع‌آوری کند، نمونه باید ازنظر مناسب‌بودن برای کشت به‌وسیلهٔ رنگ‌آمیزی گرم آزمایش شود. خلط تحریکی در کودکان یا بیماران تحت عمل گرفته‌می‌شود. در این بیماران خلط ممکن‌است آبکی باشد (به‌علت استفاده از سرم فیزیولوژی)	حداکثر ۲ ساعت در دمای اتاق	۲۴ ساعت در دمای یخچال	BA CA Mac	رنگ‌آمیزی گرم و دیگر رنگ‌آمیزی‌ها بنا به درخواست؛ برای مثال DFA برای *لژیونلا* و AFB برای تشخیص توبرکلوزیس	موارد دیگر: AFB و *نوکاردیا*

* Bronchial Washing
** Bronchial Brush
*** Blood Agar
**** Acid Fast Bacilli

روش‌های غیرتهاجمی

جمع‌آوری خلط[1]

استفاده از نمونه خلط روشی غیرتهاجمی و ارزان برای تعیین عامل بیماری در پنومونی است.

اگرچه این روش خیلی راحت و سهل‌الوصول است، اما نتایج نمونه‌های خلط اغلب مفید نمی‌باشد؛ چون در جمع‌آوری خلط، نمونه با فلور طبیعی اروفارنژیال آلوده‌می‌شود، حتی اگر برای جمع‌آوری نمونه خلط آموزش‌های کافی به بیمار داده شده‌باشد. بیماران باید با یک سرفهٔ عمیق خلط خود را جمع‌آوری و تاحدامکان از آلوده‌شدن با آب دهان اجتناب کنند. نمونه را داخل یک ظرف استریل جمع‌آوری و سریعاً به آزمایشگاه ارسال‌نمایند.

جمع‌آوری خلط ازطریق روش‌های القایی

بیمارانی که قادر نیستند خلط خود را بگیرند، لازم است به‌وسیلهٔ کارکنان بخش‌های بیمارستان برای نمونه‌گیری یاری‌شوند تا با تحریک بتوانند یک نمونهٔ قابل‌قبول تهیه‌کنند. این نوع نمونه برای جداسازی عواملی چون مایکوباکتریوم‌ها و قارچ‌ها مناسب است. همچنین، برای تشخیص *پنوموسیستیس کارینی*[2] مفید است.

این نمونه به‌واسطهٔ استنشاق محلول نمکی حاوی ۱۵ درصد سدیم کلراید و ۱۰ درصد گلیسرین برای حدود ۱۰ دقیقه یا تا شروع سرفهٔ عمیق به‌دست می‌آید. ترشحات دستگاه تنفسی تحتانی که به این روش تهیه‌می‌شود شبیه آب دهان و آبکی است؛ زیرا حاوی موادی هستند که مستقیم از فضای کیسه‌های هوایی گرفته‌می‌شوند. این نمونه‌ها معمولاً برای کشت کافی هستند

1. Expectorated
2. *Pneumocystis carini*

و در آزمایشگاه باید بدون بررسی مقدماتی پذیرش شوند. گرفتن چنین نمونه‌هایی ممکن‌است در بیشتر موارد پزشک را از استفاده از روش‌های تهاجمی‌تر مانند برونکوسکوپی یا آسپیراسیون به‌وسیلهٔ سوزن، معاف کند.

کشت خون

در ۲۰–۸ درصد پنومونی‌های مرتبط با ونتیلاسیون کشت خون مثبت است. مطالعات نشان داده‌است که در بیماران بدحال، باکتریمی همیشه مربوط به عفونت‌های ریوی نیست. درصورتی که از کشت خون بیمار مبتلا به عفونت ریوی ارگانیسم مشابه جداشود، نشان‌دهندهٔ کانون عفونت در ریه است، ولی تحقیقات نشان‌داده‌اند که در ۵۰ درصد از مواردی که کشت خون آنها مثبت است، منشأ عفونت در قسمت دیگری از بدن وجوددارد. در این موارد، میکروارگانیسم جداشده از خون و ترشحات دستگاه تنفسی یکسان نیست.

روش‌های تهاجمی

آسپیراسیون شیرهٔ معده[1]

این نوع نمونه برای جداسازی باسیل اسید ـ فاست مناسب و برای بیمارانی که قادر به جمع‌آوری خلط نیستند به‌ویژه کودکان مفید است.

آسپیراسیون آندوتراکئال[2]

آسپیراسیون آندوتراکئال اغلب برای تشخیص پنومونی در بیمارانی به‌کار می‌رود که لوله‌گذاری شده‌اند. ترشحات به‌سادگی در ظرف مخصوص (Lukens trap) (شکل ۳–۱) جمع‌آوری می‌شوند. این ترشحات در

1. Gastric aspiration
2. Endotracheal aspirate or tracheostomy suction

آزمایشگاه باید مانند خلط درنظر گرفته‌شود. بیمارانی که تراکئوستومی شده‌اند به‌سرعت با باسیل‌های گرم منفی و دیگر بیماری‌زاهای بیمارستانی کلنیزه می‌شوند.

شکل ۳-۱: Lukens trap

این کلنیزاسیون ممکن‌است ارتباط بالینی خاصی نداشته‌باشد، اما این ارگانیسم‌ها ممکن‌است به داخل ریه آسپیره و موجب پنومونی شوند. به‌این دلیل، ممکن‌است تشخیص عفونت از کلنیزاسیون مشکل باشد.

برونکوسکوپی[1]

برای تشخیص پنومونی، به‌ویژه در افراد آلوده به HIV و دیگر بیماران دارای نقص سیستم ایمنی، اغلب لازم است از روش‌های تهاجمی‌تر استفاده‌کرد. با این روش می‌توان ترشحات مخاط برنش را مستقیماً مشاهده‌کرد و برای بیوپسی جمع‌آوری نمود. در هنگام برونکوسکوپی پزشکان می‌توانند نمونه‌هایی از شستشوی برنش‌ها یا آسپیراسیون برنش‌ها(BAL) را به‌دست آورند. به‌این صورت که زمانی که ترشحات چرکی قابل مشاهده نیستند، مقداری از سرم فیزیولوژی استریل را داخل برنش‌ها تلقیح و سپس توسط برونکوسکوپ جمع‌آوری‌می‌کنند. از آن‌جا که برونکوسکوپ ازطریق بینی واردمی‌شود، بنابراین، با فلور دستگاه تنفسی فوقانی آلوده می‌شود، اما این نمونه‌ها برای تشخیص بسیار مفیدتر از خلط است. **نمونه‌گیری عمیق‌تر مانند برونکوسکوپی و BAL مخصوصاً برای جستجوی کیست‌های پنوموسیستیس و قارچ‌ها مفید هستند.** در این روش حجم بالایی از سرم فیزیولوژی(۱۰۰-۳۰۰ml) به داخل ریه و اجزای آن فرستاده‌می‌شوند. تخمین زده‌می‌شود که بیش از ۱,۰۰۰,۰۰۰ کیسهٔ هوایی درحین عمل، نمونه‌برداری می‌شوند. اخیراً ارزش این تکنیک در کشت کمّی برای تشخیص بیماری‌زاهای اصلی دستگاه تنفسی، شامل پنومونی باکتریال اثبات

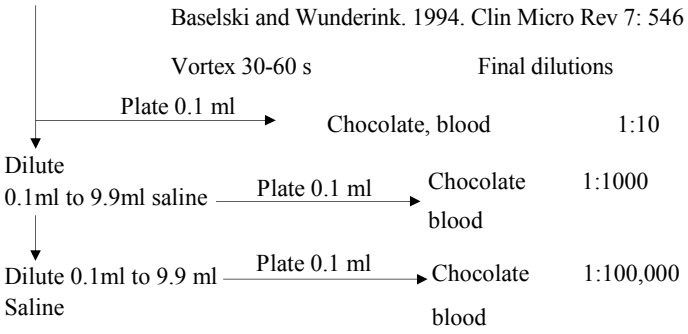
1. Bronchoscopy

شـده‌است. ۵ سی‌سی از BAL برای بررسی‌های میـکروبیـولوژیکی و سـلولی کفـایت می‌کنـد. رنـگ‌آمیـزی گـیمسا و گـرم و بـررسی میکروسکوپی، روشی سریع برای شمارش سلول‌هـا و افتراق سلول‌هـای حـاوی ارگانیسم‌های داخل سلولی است. وجود بیش از ۱ درصد سلول‌هـای اپی‌تلیال نـشان‌دهندهٔ آلودگی با فلور دهانی ـ حلقی است. کـشت کمّی BAL در افتراق بین کلنیزاسیون و عفونت بسیار مهم است. رشد بیش از $۱۰^{۴}$ باکتری در هر میلی‌لیتر BAL به‌عنوان معیار برای تعیین عفونت محسوب‌می‌شـود. از مایع BAL رقت‌های متوالی تهیه‌می‌شود. به‌این ترتیب که ۰/۱ml از مایع لاواژ در ۹/۹ml نرمال سالین ریخته(رقت $\frac{۱}{۱۰}$) و سپس از آن رقت $\frac{۱}{۱۰۰}$ تهیـه‌می‌شود(روش اول).

نمودار ۳-۱: روش اول

Bronchoscopy Samples Quantitative Methods

PSB[1] or BAL



از هر کدام از رقت‌ها ۰/۱ml روی بلاد آگار و شکلات آگار کشت داده‌می‌شود. بـه‌جـای تـهیـهٔ رقت بعضـی آزمایـشگاه‌هـا از لوپ‌هـای کالیبـره ۰/۰۱ یـا ۰/۰۰۱ استفاده‌می‌کنند(روش دوم).

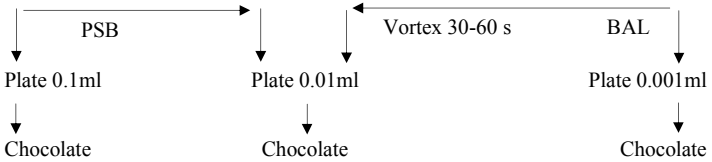
نمودار ۳-۲: روش دوم

Bronchoscopy Samples Quantitative Methods

1. Protected Specimen Brushing

Calibrated loop method

Baselski and Wunderink. 1994. Clin Micro Rev 7:547



Final Dilutions

1:10 1:100 1:1000

وقتی یک نمونه BAL به آزمایشگاه ارسال‌می‌شود، رنگ‌آمیزی و کشت باید براساس نوع درخواست انجام‌شود(به‌عنوان مثال: باکتری، قارچ، مایکوباکتریوم یا *پنومو‌سیستیس کارینی* یا ویروس‌ها). اگر بیمار دچار نقص ایمنی باشد، باید تمام عوامل گفته‌شده در بالا را جستجو کرد. ممکن‌است استفاده از روش‌های تعیین آنتی‌ژن برای تشخیص بیماری‌زاهای اختصاصی مانند *لژیونلا* یا *استرپتوکوکوس پنومونیه* نتایج بهتری از کشت داشته‌باشد.

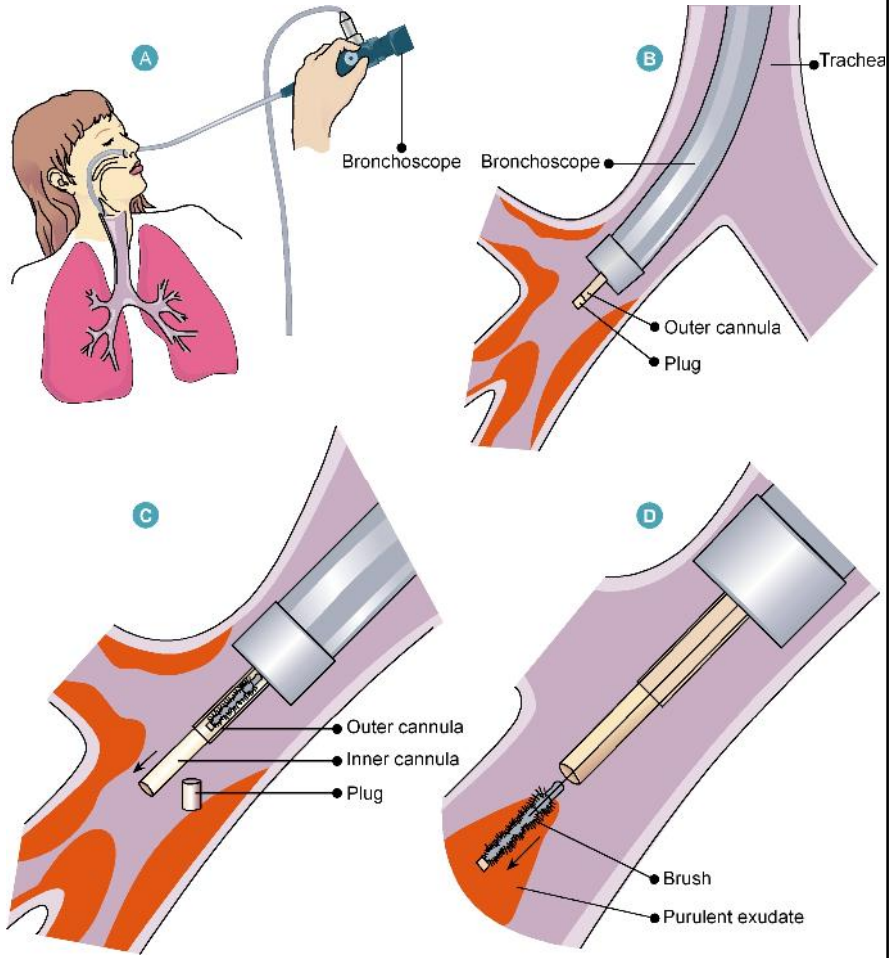
نوع دیگری از نمونه‌های تنفسی که ازطریق برونکوسکوپی به‌دست می‌آید، براشینگ[1] است. نمونه‌های به‌دست‌آمده به‌وسیلهٔ این روش نسبتاً تهاجمی، برای مطالعات میکروب‌شناسی به‌خصوص در تشخیص پنومونی ناشی از آسپیراسیون مناسب‌تر است. این روش نمونه‌برداری در شکل ۳-۲(از A تا D) نشان داده شده‌است. محتویات براشینگ برنش بهتر است در ۱ml از محلول مایع ورتکس و سپس با استفاده از لوپ کالیبره ۰/۰۱ در محیط کشت تلقیح شود. برخی عقیده دارند که نمونه‌های به‌دست‌آمده از کاتترهای دوجداره برای هر دو کشت هوازی و بی‌هوازی مناسب است. شمارش کلنی بیشتر یا مساوی با ۱۰۰۰($CFU \geq 10^3$) ارگانیسم در هر میلی‌لیتر از مایع رقیق‌شده(10^6ml در نمونهٔ اصلی) نشان‌دهندهٔ عفونت است.

1. Brushing

بیوپسی ریه باز[1]

این روش علاوه‌بر تشخیص در درمان مواردی کاربرد دارد که از سایر روش‌های کمتر تهاجمی نتوان استفاده‌کرد(در بیماران مبتلا به پنومونی منتشر). برای نمونهٔ بیوپسی باید کشت کمّی انجام‌شود. در مطالعهٔ انجام‌شده ارتباط کمی بین نتایج باکتریولوژیک و یافته‌های هیستوپاتولوژیک مشاهده شده‌است. مقایسهٔ روش‌های تشخیصی VAP نشان‌داده که بهترین روش کشت از بافت ریه است.

1. Open Lung Biopsy



شکل ۳-۲: مراحل جمع‌آوری ترشحات برنش توسط کاتتر با حفاظ

معیار هیستوپاتولوژیک در پنومونی ریه در بیماران VAP تجمع بیش از حد لکوسیت‌های پلی‌مورفو نوکلئر در آلوئل‌های ریه توأم با اگزودای

فیبرین و تعدادی اریتروسیت است. معیار باکتریولوژی شامل رشد بیشتر از($۱۰^{۴}$–$۱۰^{۳}$ ≤) باکتری بـه ازای هر گرم بافت ریـه است.

بررسی باکتریولوژیک نمونه‌های دستگاه تنفسی

آنالیـز نمونه‌هـای تنفسی شامل بـررسی میکروسـکوپی و کشت کـمّی استفـاده از روش‌های سریع تـعیین آنتـی‌ژن و روش‌های ملکولی مانند PCR است.

الف) محیط‌های کشت مورد استفاده

۱. بلاد آگار(BA)[1]،
۲. مکانکی آگار(MAC)[2]،
۳. شکلات آگار(CHOC)[3]،
٤. تـایـوگلیـکولات(THIO)[4] (بـرای آسپیـره‌ها و نـمـونـه‌هـای بیـوپسی حـاصل از تکنیک‌هـای تهاجمی).

ب) آزمون میکروسکوپی

برای هـمهٔ نمونه‌هـای دستـگاه تنفسی تحتانی یک اسمیر رنگ‌آمیزی گرم تهیه‌کنید. شاخص تعیین وجود آلودگی‌های حلقی ـ دهانی سلول‌های اپی‌تلیال سنگفرشی و شاخص ترشحات دستگاه تنفسی تحتانی WBC است و ارگانیسم غالب در ارتباط با وجود WBC مشخص‌می‌شود.

توجه: نمـونـه‌هـای خـلط برای کشت *لـژیونلا*، نبایـد ازنـظـر میـکروسکوپی غربالگری شوند. زیـرا در این مورد خلط رقیق و آبـکی است و محتوی WBC نبوده یا تعداد آن بسیـار کم است.

1. Blood Agar
2. MacConkey
3. Chocolate Agar
4. Thioglycolate

تفسیر رنگ‌آمیزی گرم در نمونهٔ خلط[۱]

الف) شمارش سلول‌های اپی‌تلیال سنگفرشی با بررسی ۱۰ میدان در بزرگنمایی ۱۰۰ (lpf یا عدسی ۱۰) و استفاده از معیارهای جدول ۳–۵ (Q-Score) انجام‌می‌شود.

ب) تعداد WBC و موکوس در بزرگنمایی lpf با استفاده از معیارهای جدول ۳–۵.

Q-Score

Q-Score= # of potential pathogens(PP) to work up

جدول ۳–۵: Squamous Epithelial Cells

			No Cells	1-9/ lpf	10-24/ lpf	≥ 25/ lpf
		Score	0	-1	-2	-3
Neutrophils	No Cells	0	3	0	0	0
	1-9/lpf	+1	3	0	0	0
	10-24/lpf	+2	3	1	0	0
	≥ 25/ lpf	+3	3	2	1	0

۱. اگر WBC در رنگ‌آمیزی گرم خلط دیده‌نشود، اما سلول‌های اپی‌تلیال به‌صورت غالب وجود داشته‌باشند، در این‌صورت اسمیر را ازنظر ارگانیسم‌ها بررسی‌نکنید.

توجه: نمونه‌های به‌دست آمده از بیماران پیوند مغز استخوان یا بیماران با ایمنی سرکوب‌شده WBC ندارند، اما ممکن‌است محتوی سلول‌های اپی‌تلیال مژکدار باشند.

۵. توجه: برای تهیهٔ اسمیر گرم از خلط، نمونه باید در زیر نور مناسب بررسی‌گردد و توسط لوپ استریل از قسمت چرکی و آغشته به خون برای اسمیر و کشت نمونه‌برداری شود.

۲. اگر نمونه محتوی WBC باشد، اسمیر را با عدسی ۱۰۰[1] بررسی‌کنید. بر مناطقی تمرکزکنید که میزان WBC بالا دارد و از مناطقی اجتناب‌کنید که آلودگی با فلور ناحیهٔ حلقی ـ دهانی دارد.

- ارگانیسم غالب: اگر یک ارگانیسم در نواحی با تعداد زیاد WBC، غالب باشد، آن را گزارش‌کنید. برای مثال، اگر باسیل گرم منفی غالب است گزارش‌کنید:

Gram - negative bacilli; predominant organism seen on Gram stain.

همچنین، اگر اشکال دیگری از باکتری‌ها در اسمیر حضور دارند اضافه‌کنید:

Mixed bacterial morphotypes also present on Gram stain

- بدون ارگانیسم غالب: اسمیرهایی که هیچ ارگانیسم غالبی در نواحی با WBC زیاد نشان‌نمی‌دهند یا بیشتر از یک نوع ارگانیسم در منطقه وجوددارد، به‌عنوان

Mixed bacterial morphotypes seen on Gram stain

گزارش‌می‌شود. اگر فقط یک نوع ارگانیسم دیده‌شود، مورفولوژی رنگ‌آمیزی گرم را گزارش و ارگانیسم را شمارش کنید. برای مثال: Few، Moderate و Many.

- بدون ارگانیسم: اسمیرهایی که هیچ ارگانیسمی در آن دیده‌نمی‌شود به‌این صورت گزارش‌شوند:

No organisms seen

۳.از نتایج رنگ‌آمیزی گرم برای ارزیابی پلیت‌های کشت استفاده‌کنید.

برای مثال، اگر دیپلوکک گرم مثبت در رنگ‌آمیزی گرم غالب باشد، پلیت‌های کشت را بادقت برای *استرپتوکوکوس پنومونیه* بررسی‌کنید. اگر دیپلوکک گرم منفی در

1. OIF: Oil Immersion Field (× 1000)

رنگ‌آمیزی گرم غالب باشد، ازنظر موراکسلا(برانهاملا) کاتارالیس[1] بررسی‌نمایید.

گزارش نتایج رنگ‌آمیزی گرم

نتایج رنگ‌آمیزی گرم را باتوجه به سلول‌های اپی‌تلیال و WBC گزارش‌کنید.

۱. اگر هیچ سلول اپی‌تلیال سنگفرشی دیده‌نشد، گزارش‌کنید:

No squamous epithelial cells seen

۲. اگر فقط تعداد کمی از سلول‌های اپی‌تلیال سنگفرشی یافت‌شود، گزارش‌کنید:

Few squamous epithelial cells seen

۳. اگر میزان زیادی از سلول‌های اپی‌تلیال سنگفرشی همراه با ارگانیسم غالب مشاهده‌شوند، گزارش‌کنید:

Abundant (many) squamous epithelial cells seen indicating oropharyngeal contamination

این گزارش شامل زمانی است که ارگانیسم غالب در اسمیر دیده‌شود یا در مناطقی که WBC زیاد وجوددارد؛ بنابراین، کشت به بررسی بیشتری نیاز دارد.

٤. اگر سلول‌های اپی‌تلیال سنگفرشی زیادی دیده‌شوند، می‌توانید همچنین گزارش‌کنید:

Contaminated with saliva please submit another specimen

> **توجه:** این گزارش را فقط برای نمونه‌های خلط با سلول‌های اپی‌تلیال بالا و بدون وجود ارگانیسم غالب استفاده‌کنید.

1. Moraxella(Branhamella) Catarrhalis

۵. اگر هیچ WBC دیده‌نشد، گزارش‌کنید:

No WBC_S Seen

کشت و آزمایش نمونه‌های خلط، آسپیراسیون تراشه، شستشوی برنش، براشینگ برنش و نمونه‌های بیوپسی برنش

- نمونه‌های خلطی که سلول‌های اپی‌تلیال به میزان بالا دارند کشت ندهید، مگر آنکه WBC دیده‌شود.

> **توجه: رد یا تأیید نمونهٔ BAL:**
> الف) اگر کمتر از ۱٪ سلول‌های مایع حاوی سلول‌های سنگفرشی باشند، نمونه قابل قبول است.
> ب) اگر بیشتر از ۱٪ سلول‌های مایع سنگفرشی باشند، نمونه غیرقابل قبول است.

- نمونه‌ها را روی بلاد آگار، شکلات آگار و Mac(برای باسیل‌های گرم منفی) کشت دهید. شکلات و بلاد را در CO_2 در ۳۵°C انکوبه کنید. اگر ظرفیت انکوباتور CO_2 محدود است، محیط BA را تحت شرایط هوازی انکوبه کنید.

اگر یک نمونه از براشینگ برنش دریافت‌شد، برس را به‌صورت استریل به‌وسیلهٔ یک پنس استریل در سطح پلیت BA بغلتانید و سپس آن را در لبهٔ پلیت آگار قراردهید.

- همهٔ پلیت‌ها را پس از ۴۸-۲۴ ساعت انکوباسیون بررسی‌کنید. پلیت مکانکی را درصورتی که هیچ رشدی وجودنداشت، دور بیندازید. پلیت‌های نمونه‌هایی از خلط که حاوی سلول‌های اپی‌تلیال فراوان است، اما ارگانیسم غالب وجودندارد، به پیگیری‌های بعدی نیاز ندارد.
- اگر رشدی مشاهده‌شد، روش اجرایی توصیفی در این راهنما را دنبال‌کنید.

کشت و پیگیری آسپیراسیون داخل نای، آسپیراسیون ریه و نمونه‌های بیوپسی ریه

- کشت این نمونه‌های تهاجمی مانند سایر نمونه‌های استریل روی BA، Choc، Mac و Thio است. این محیط‌ها را در CO_2 در دمای ۳۵°C انکوبه نمایید. Thio به CO_2 نیاز ندارد.
- همهٔ پلیت‌ها را بعد از ۲٤ ساعت انکوباسیون بررسی‌کنید. درصورتی که هیچ رشدی در Mac مشاهده‌نشد، پلیت‌ها را مجدد انکوبه و پس از ۲٤ ساعت مشاهده‌کنید.
- محیط Thio را روزانه تا ۵ روز بررسی‌کنید:
  - اگر محیط شفاف باشد، نشان‌می‌دهد که هیچ رشدی وجودندارد و آن را پس از ۵ روز دور بیندازید. درصورت شک به ارگانیسم‌های سخت‌رشد و دیررشد، مدت زمان انکوباسیون را طولانی‌تر کنید.
  - اگر ظاهر محیط مایع کدر باشد، یک اسمیر گرم از مایع تهیه و مشاهده‌کنید.
    - اگر ارگانیسم‌ها در اسمیر گرم مشاهده‌شوند، آن را با رشد پلیت‌ها مقایسه‌کنید.
    - اگر ارگانیسم‌های دیده‌شده در رنگ‌آمیزی گرم متفاوت از کلنی‌های رشدیافته در روی پلیت‌ها باشد، محیط مایع را روی محیط جامد مناسب کشت مجدد دهید. برای مثال، BA، Mac و Choc برای باسیل‌های گرم منفی، BA برای کوکسی‌های گرم مثبت، BA برای سلول‌های مخمر(BHI_{agar} + کلرامفنیکل، اگر سلول‌های مخمر با ارگانیسم‌های دیگر Mix باشد). محیط‌های مایع

محتـوی هـر دو ارگانـیسم گرم مـثبت و گـرم منـفـی را روی Mac یـا BA، Choc و فـنیـل‌اتیـل الکـل آگـار[1] کشت‌دهیـد.

برای انتخاب محیط‌های کشت بی‌هوازی به کتاب‌های مرجع مراجعه‌کنید.

— کشت هوازی پلیت‌های کشت داده‌شـده از Thio را که بـا رشـد پلیت‌های اولیه متفاوت است، بـررسی‌کنید.

— درصورتی که بی‌هوازی‌ها در آسپیراسیون محتویات داخل نای وجوددارند، با پزشک برای شناسایی کامل آن مشورت‌کنید.

براشینگ برنش و مایع BAL درصورتی که برای کشت کمّی فرستاده شده‌باشد

- براشینگ بـرنش را در آزمایشـگاه در ۱ml سـرم فیزیولوژی قراردهید و سپس لوله را ورتکس کنید تـا مـواد از بـرس جـداشونـد و بـه‌صـورت سوسپانسیون درآیـنـد. سـوسپـانسیـون بـراشینگ بـرنـش و BAL را روی BA، Choc، Thio و Mac کشت‌دهیـد. بـرای تـلقیح پلیت‌هـا از یک لـوپ کـالیبره ۰/۰۱ یـا از یـک پیپت ۰/۱ml استفـاده‌نمـاییـد. پلیت‌هـا را در شـرایط CO_2 در ۳۵°C انکوبه‌کنیـد.
- پلیت‌هـا را پس از ۲٤ سـاعت انکـوباسیون امتحان‌کنید و درصورت عدم رشد، انکوباسیون را ۲٤ سـاعت دیگر ادامه‌دهید.
- اگر رشد مشاهـده‌شـد، تعـداد را براسـاس موارد گفته‌شـده در قسمت شمارش کلنی محاسبه‌کنید.
- کشت روی محیط اختصـاصی *لژیونلا*، مخمر، قارچ یـا مـایکوباکتریوم براساس درخواست پزشک یا شرح حال بیمار است.

---

۱. جهت مهار رشد گرم منفی‌ها: Phenylethyl alcohol agar

گزارش میزان رشد

روش نیمه‌کمّی

- اگر هیچ رشدی روی پلیت‌ها یا محیط مایع دیده‌نشود، گزارش‌کنید:

No growth

- اگر یک یا دو کلنی روی هر پلیت رشدکند، گزارش‌کنید:

Rare

- اگر ۱۰-۳ کلنی در هر پلیت رشدکند، گزارش‌کنید:

Few

- اگر بیشتر از ۱۰ کلنی در هر پلیت و فقط در منطقهٔ اولیه تلقیح مشاهده‌شود، گزارش‌کنید:

Moderate

- اگر کلنی‌ها در منطقهٔ تلقیح اولیه و ثانویه رشدکنند، گزارش‌کنید:

Heavy

- اگر یک ارگانیسم در رنگ‌آمیزی گرم از محیط مایع(Thio) دیده‌شود(محیط مایعی که هنوز تجدید کشت نشده‌است یا پس از تجدید کشت هیچ رشدی مشاهده‌نشود)، گزارش‌کنید:

Organism observed in Gram stain of broth only

روش کمّی

دو روش کمّی برای شمارش تعداد باکتری‌ها در نمونه‌های حاصل از دستگاه تنفسی تحتانی شرح داده شده‌است:

۱. رقیق‌سازی،

۲. استفاده از لوپ کالیبره.

تعداد کلنی رشدیافته در پلیت را در ضریب رقت ضرب‌می‌کنیم. تعداد کلنی برحسب CFU در هر میلی‌لیتر به‌دست می‌آید. در نمونه‌های PSB، اگر تعداد بیشتر از $۱۰^{۳}$CFU/ml باشد، بیماری‌زا محسوب‌می‌شود و در نمونه‌های BAL، اگر تعداد بیشتر از $۱۰^{٤}$CFU/ml باشد، اهمیت بالینی دارد.

نکته‌های مهم در تفسیر نتایج

کشت نمونه‌های مجاری تنفسی تحتانی

الف) نمونه‌های خلط بدون سلول‌های اپی‌تلیال یا با سلول اپی‌تلیال کم

۱. گونه‌های *استرپتوکوکوس*:

- استرپتوکوک‌های آلفاهمولیتیک:
  - درصورتی که رشد بالا یا متوسط(یا غالب) داشته‌باشد یا هر تعداد استرپتوکوک آلفاهمولیتیک مشابه *S.pneumoniae* دیده‌شود، باید برای تأیید وجود یا نبود این بیماری‌زا آزمایش‌های تشخیصی انجام‌شود.
  - درصورتی که *S.pneumoniae* جدا نشد، گزارش‌کنید:

Alpha-hemolytic Streptococci as normal microbiota Isolated

- استرپتوکوک‌های بتاهمولیتیک:
  - اگر کلنی‌های مشکوک به استرپتوکوک‌های بتاهمولیتیک به‌صورت مخلوط با میکروارگانیسم‌های دیگر یا میزان رشد کم باشد، ابتدا روی یک پلیت BA کشت مجدد دهید و در قسمت اولیهٔ تلقیح به‌وسیلهٔ لوپ پلیت را به‌منظور مشاهدهٔ همولیز حساس به اکسیژن Stab[۱] نمایید. BA را برای

۱. به‌وسیلهٔ لوپ سطح آگار را در مناطق مختلف کشت شکاف دهید تا باکتری به عمق محیط داخل و شرایط بی‌هوازی مهیاشود.

۲۴–۱۸ ساعت در ۳۵°C قراردهید. همچنین، می‌توانید BA را به‌صورت بی‌هوازی برای افزایش همولیز انکوبه‌کنید.

- اگر در کشت اولیه رشد کافی از استرپتوکوک‌های بتاهمولیتیک وجوددارد، برای تشخیص استرپتوکوک‌های بتاهمولیتیک به جدول‌های تشخیصی مراجعه‌کنید.
  - اگر نتیجهٔ تست برای استرپتوکوک گروه A مثبت باشد، ارگانیسم را به‌این صورت گزارش‌کنید:

Group A Streptococcus(Streoptococcus pyogenes) Isolated

  - اگر تست‌های شناسایی بیشتری برای شناسایی استرپتوکوک‌های بتاهمولیتیک دیگر(غیر از گروه A) لازم است، باید تست سروتایپینگ برای گروه‌های C، F و G انجام‌گیرد.

۲. **گونه‌های *هموفیلوس***: اگر باسیل گرم منفی مشابه گونه‌های *هموفیلوس* به‌عنوان ارگانیسم غالب در کشت رشد کرده‌باشد، ابتدا آن را روی یک Choc ایزوله و سپس دیگر تست‌های تشخیصی را براساس جدول‌های تشخیصی انتخاب‌کنید.

۳. **گونه‌های *نایسریا* و *موراکسلا (برانهاملا)***: اگر رشد غالبی از گونه‌های *نایسریا* یا *موراکسلا* دیده‌شود یا اگر دیپلوکک‌های گرم منفی در رنگ‌آمیزی گرم غالب باشند، از جدول‌های تشخیصی نایسریاها برای ایزوله و شناسایی باکتری استفاده‌کنید.

٤. **سایر ارگانیسم‌های گرم منفی**: به‌غیر از نایسریا، موراکسلا(برانهاملا) و *هموفیلوس*(جدول ۳–٦).

جدول ۳–۶ s other than Neisseria and

Haemophilus species isolated from sputum specimens

No. of: Colony types	Colonies	Normal microbiota	Action*
1-2	Rare to few	Absent to few, or if gram-negative bacilli predominant on Gram stain	ID and AST
		Moderate to abundant	ID and AST only if requested
1-2	Moderate to abundant	Present or absent	ID and AST
> 2	Few to abundant	Present or absent	ID and AST only if requested

* ID, identify; AST, perform antimicrobial susceptibility testing

۵. گونه‌های *استافیلوکوکوس*:

جدول ۳-۷: Workup of Staphylococcus species isolated from sputum specimens

No. of colonies	Colony morphotypes	Normal microbiota	Action	Report
Any no.	CNS	Moderate to abundant	None	Normal microbiota
Moderate, abundant, or predominant	CNS	Absent to few	ID	CNS as normal microbiota
Rare to few	*S. aureus*	Moderate to abundant	None	Normal microbiota
Rare to few	*S. aureus*	Absent to few or gram-positive cocci predominant on Gram stain	ID, AST	*S. aureus*
Moderate to abundant, or predominant	*S. aureus*	Present or absent	ID, AST	*S. aureus*

٦. مخمرها:

- اگر رشد بسیار کم(Rare) تا رشد متوسط(Moderate) از سلول‌های مخمر و رشد متوسط تا بسیار زیاد(Abundant/ Heavy) از باکتری‌های فلور نرمال وجود داشته‌باشد، به‌عنوان باکتری‌های فلور نرمال گزارش‌کنید:

Normal microbiota

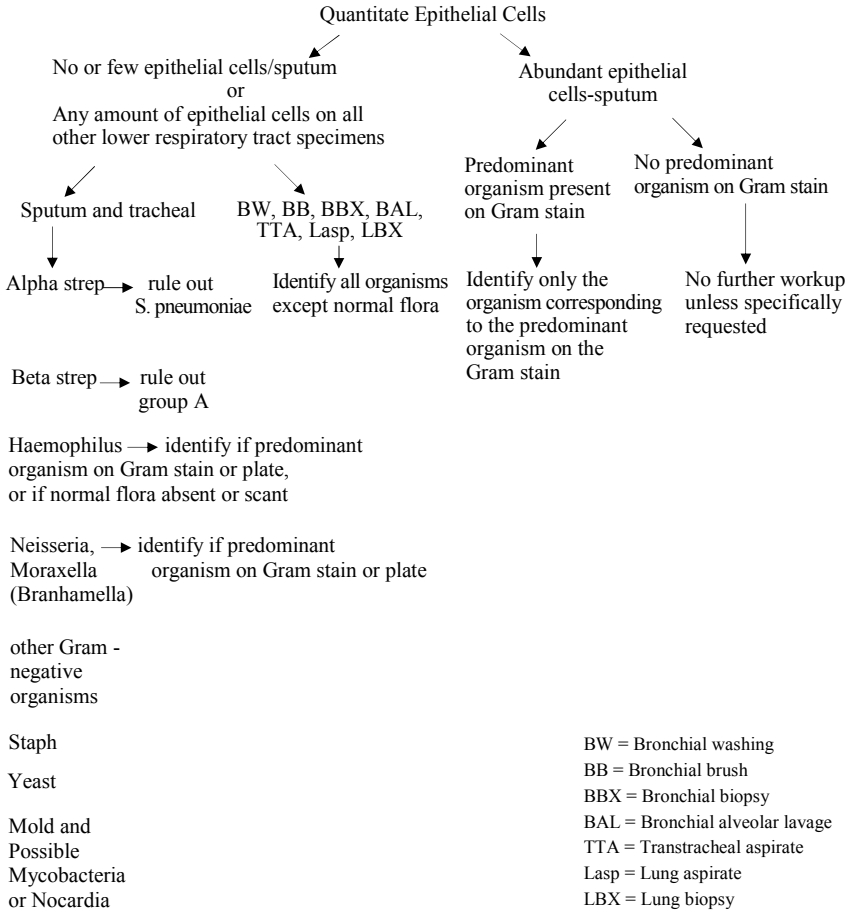
- اگر رشد کم تا متوسط از سلول‌های مخمر وجود داشته‌باشد، اما هیچ فلور نرمالی رشد نکرده‌باشد یا رشد آن کم باشد یا اگر سلول‌های مخمر به‌صورت غالب در رنگ‌آمیزی گرم مشاهده‌شوند، مخمر را شناسایی کنید.

■ اگر تعداد زیاد یا رشد غالب از سلول‌های مخمر وجود داشته‌باشند، مخمر را شناسایی‌کنید.

۷. **کپک‌ها:** درصورت جداشدن باید شناسایی شوند.

۸. **مایکوباکتریوم و *نوکاردیا*:** اگر ایزوله مشابه کلنی‌های مایکوباکتریوم یا *نوکاردیا* باشد، آن را شناسایی و ایزوله کنید(مورفولوژی کلنی بسیار متنوع و به‌صورت باسیل‌های گرم مثبت Beaded در اسمیر گرم مشاهده‌می‌شوند).

نمودار ۳-۳: Flow chart for examining lower respiratory tract specimens



ب) نمونه‌های خلط با میزان زیادی سلول‌های اپی‌تلیال و WBC که در رنگ‌آمیزی گرم مشاهده‌می‌شوند:

- اگر هیچ ارگانیسم غالبی در رنگ‌آمیزی گرم مشاهده‌نشود، تست‌های تشخیصی بعدی یا کشت تکمیلی را انجام‌ندهید. در مواردی که اطلاعات اضافی درخواست شده‌باشد، پلیت‌ها را برای ۷-٤ روز در دمای اتاق نگهداری‌کنید.
- اگر یک ارگانیسم غالب در رنگ‌آمیزی گرم مشاهده‌شود، BA و Choc را به‌مدت ٤٨-٢٤ ساعت نگهداری و بررسی‌کنید. پلیت Mac را پس از ٢٤ ساعت درصورت نداشتن رشد دور بیندازید.
  - ارگانیسم غالبی را که در اسمیر گرم مشاهده شده‌است درصورت رشد روی محیط کشت شناسایی‌کنید و تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی را انجام‌دهید.
    - اگر ارگانیسم غالب فلور نرمال قسمت حلقی ـ دهانی باشد، ایزوله را بیشتر شناسایی نکنید.
    - اگر باسیل گرم منفی غالب در رنگ‌آمیزی گرم با WBC همراه باشد و فقط یک نوع کلنی در کشت جداشده یا یک نوع کلنی در کشت غالب باشد، آن را شناسایی‌کنید و تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی را انجام‌دهید.
    - اگر دو نوع کلنی یا بیشتر از باسیل‌های گرم منفی جداشود و هیچ‌کدام غالب نباشد، گزارش‌کنید:

Multiple species of gram-negative bacilli, No predominant organism Isolated

- کشت فاقد ارگانیسم غالب را گزارش‌کنید:

Mixed bacterial morphotypes

شناسایی بیشتر لازم نیست.

ج) شستشوی برنش‌ها، براشینگ برنش‌ها، نمونه‌های بیوپسی برنش‌ها، مایع BAL، آسپیراسیون ریه و مواد داخل نای و نمونه‌های بیوپسی ریه

- همهٔ ایزوله‌هایی را که در شرایط هوازی رشد کرده‌باشند شناسایی‌کنید. برای آسپیراسیون ریه و نمونه‌های بیوپسی، باکتری‌های بی‌هوازی را شناسایی کنید.
- درصورتی که فلور نرمال قسمت حلقی ـ دهانی از نمونه جداشد، نتیجهٔ رشد را گزارش‌کنید:

Normal Oropharyngeal organisms present

- آزمایش‌های شناسایی را براساس توضیحات قبلی روی استرپتوکوک‌های آلفاهمولیتیک و گونه‌های *نایسریا* و *موراکسلا* انجام‌دهید.
- اگر هر تعداد سلول مخمر وجود داشته‌باشد، آن را شناسایی و گزارش‌کنید.
- اگر قارچ جداشود، آن را شناسایی و گزارش‌کنید.
- اگر ایزوله مشکوک به مایکوباکتریوم یا *نوکاردیا* باشد، آن را شناسایی و گزارش‌کنید.

References

1. Hall. GS, Abmm SM, *Diagnosis of hospital-acquired pneumonia and the microbiology lab*, Merion publication publisher of advance Newsmayasin 2005, http://www.advanceweb com.
2. Chastre. Jand Fagon. JY. *Ventilator-associated pneumonia AM*., J. Respir. Cret. Care Med 2002; 165:867-903.
3. Pan. Z, Xiao hong. WU. Etal. *Diagnostic Value of quantitative of endotracheal aspiration for ventilator-associated pneumonia,* Chin. Med. J. 2002; 115:1-4.
4. Ioanas. M, Ferrer. R. Angrill. J, Ferrer M. and Torres A. *Microbial investigation in ventilator-associated pneumonia,* Eur Respir J. 2001; 17: 791-801.
5. Carroll.KC. Laboratory diagnosis of lower respiratory tract infections: *Controversy and conundrums*, J. clin Microbial 2002; 40: 3115-3120
6. Isenberg D. Henry: *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, American Society for Microbiology, 1992 & 2004.
7. Murray R. Patrick: *Manual of Clinical Microbiology*; 8 TH editions, American Society for Microbiology, 2003.
8. Forbes A. Betty: *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*, 11 TH editions, Mosby, 2002.
9. Mahon R. Connie: *Textbook of Diagnostic Microbiology*, 2 ED editions, W.B. Saunders, 2002.
10. Mandell L. Gerald: *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 6 TH editions, Elsevier Churchill Livingstone, 2005.
11. Karen C. Carroll & Punam Verma: *Advanced Specimen Collection and Culture Work-up* The Johns Hopkins Hospital, Baltimore, MD & Rush University Medical Center, Chicago, IL, 2004.

فصل چهارم

عفونت‌های زخم‌های جراحی[1]

در کشورهـای غـربی بـاوجـود کوشش‌هـای فـراوان در جهت جلوگیری از بروز عفونت‌های زخم محل جراحـی از ۳٤ میلیـون جـراحی انجام‌شده در سـال حـدود ۳۰۰ تا ۸۰۰ هزار مورد عفونت زخم گـزارش شده‌است.

میزان ابتلا به عفونت‌های محل جراحی به موارد زیر بستگی دارد:

۱. عوامل مرتبط با بیمار؛ مانند ایمنی، وضع تغذیه و ابتلا به دیابت.
۲. عوامل مرتبط با روش کار؛ مـانند استفـاده از وسـایل[2] در محل یـا ضربـه به بافت میزبان درحین انجام جراحی.
۳. عوامل مرتبط با ارگانیسم بیماری‌زا؛ مانند قدرت تهاجم ارگانیسم به بافت، میزان تحمل ارگانیسم در مقابل پاسخ‌های دفاعی میزبان و همچنین تحمل آنتی‌بیوتیک‌ها.
٤. پروفیلاکسی ضـدمیکروبی قبل از جراحی؛ فلور داخلی بیمار یکی از عوامل و منابع عفونت باکتریایی است(عفونت‌های اندوژن[3]).

مثلاً افراد مبتلا به دیابت و افراد همـودیـالیزی در بـیش از ۵۰ درصد مـوارد بـا *استافیلوکوک اورئوس* کلنیزه شده‌اند. حتی باوجود استفاده از تکنیک‌های ضدعفونی‌کنندهٔ جدید و پروفیلاکسی آنتی‌بیوتیکی، کلنیزاسیون با *استافیلوکوک اورئوس* بزرگ‌ترین خطر در عفونت‌های زخم است.

1. Surgical site infection 2. Instrumentation 3. Endogen

تحقیقات انجام‌شده نشان‌داده‌اند که میزان عفونت در جراحی قلب برای ناقلین ۸ درصد و در افراد غیرناقل ۱/۱ درصد است. **اگرچه روش‌های جدید ضدعفونی می‌توانند موجب کاهش میکروفلورای پوست شوند، اما باعث حذف کامل آنها نمی‌شوند. زیرا حدود ۲۰ درصد از باکتری‌های پوست در زوائد آن مانند فولیکول‌های مو و غدد سباسه لوکالیزه می‌شوند و به‌علت اینکه در مکان‌های زیر سطح پوست مقیم هستند، با مواد ضدعفونی‌کننده ازبین نمی‌روند.**

حتی در جراحی‌های مناطق تمیز خطر عفونت‌های پس از جراحی ۵-۱ درصد تخمین زده‌می‌شود. برای مثال، میزان عفونت‌های زخم حاصل از جراحی‌های ارتوپدی به‌نسبت پایین است(۶/۸-۲ درصد) و اغلب منبع آلودگی در خارج از بدن قراردارد(اگزوژن)[1]. میزان آلودگی خارجی به میزان استفاده از روش‌های کنترل و پیشگیری بستگی دارد. مانند فیلتراسیون هوای محل جراحی، ضدعفونی پوست محل جراحی و استفاده از مواد ضدعفونی‌کنندهٔ مناسب.

میزان عفونت‌های جراحی در جراحی‌های مناطق آلوده(کثیف) ۲۷ درصد تخمین زده‌می‌شود که به‌علت کثرت میکروب‌های اندوژن در محل جراحی است. برای مثال دربارهٔ جراحی‌های رودهٔ بزرگ و سر و گردن که احتمال آلودگی با باکتری‌های اندوژن وجوددارد، احتمال ابتلا به عفونت‌های زخم بالا است.

به‌جز جراحی‌های مناطق تمیز، عفونت‌های زخم اغلب عامل پلی‌میکروبیال(چندمیکروبی) دارند که شامل آلودگی با میکروارگانیسم‌های هوازی و بی‌هوازی است. به‌طور متوسط آلودگی با پنج گونهٔ مختلف در عفونت‌های محل جراحی کولورکتال[2] دیده‌می‌شود.

به‌طور کل، عفونت‌های محل جراحی(SSI)[3] در سه گروه طبقه‌بندی می‌شوند:

1. Exogen
2. Colorectal
3. Surgical Site Infection
4. Superficial incisional SSI
5. Deep Incisional SSI
6. Organ / deep SSI

۱. عفونت‌های سطحی[۴]؛
۲. عفونت‌های عمقی[۵]؛
۳. عفونت اعضا و فضاهای داخلی و عمقی[۶].

در بیماران بستری در بیمارستان، عفونت‌های جلدی و زیرجلدی، آبسه‌ها و سینوس‌های عفونی در محل Instrumentation (به‌استثنای برش محل جراحی) همچنین، عفونت‌های نواحی آسیب‌پذیر مثل زخم‌های بستر عفونی‌شده و عفونت زخم‌های دیابتیک را نیز باید درنظر گرفت.

عفونت‌های سطحی را معمولاً یک یا بیش از یک ارگانیسم ایجادمی‌کنند که از انواع بیماری‌زای قوی، فرصت‌طلب یا ضعیف هستند و کانون اصلی سطح پوست، دستگاه تنفسی، دستگاه گوارش یا ارگانیسم‌های پراکنده در محیط است. درحالی که عفونت‌های عمقی و آبسه‌های اعضا و فضاهای داخلی را معمولاً یک ارگانیسم بیماری‌زای واحد ایجادمی‌کند.

تعریف دقیق عفونت(Infection) و تفکیک آن از کلنیزاسیون(Colonization) و همچنین آلودگی(Contamination) دشوار است.

Contamination : زخم‌ها و سایر ضایعه‌های باز بدن به آلودگی بسیار حساس هستند و توسط میکروارگانیسم‌های متنوع سطح بدن و محیط آلوده‌می‌شوند. این میکروارگانیسم‌ها ابتدا به تعداد کم در محل وجوددارند و معمولاً پس از استقرار و ایجاد آلودگی با همان تراکم اولیه باقی‌می‌مانند و ممکن‌است تکثیریابند.

Colonization: اگر ارگانیسم از انواع بیماری‌زای ضعیف(Commensal) باشد، تکثیر آن در محل کلنیزاسیون اولیه به بافت میزبان آسیب نمی‌زند یا میزان آسیب نسجی خفیف است.

Infection : وقتی بروزمی‌کند که یک یا چند ارگانیسم آلوده‌کننده بر مکانیسم‌های دفاعی و پاکسازی‌کنندهٔ میزبان غلبه‌کنند و به تعداد زیاد تکثیرشوند و بافت‌های میزبان را مورد تهاجم قراردهند(جدول ٤-١).

عوامل اصلی تعیین‌کنندهٔ سیر بالینی ضایعه:

١. بیماری‌زایی ارگانیسم؛

٢. توان دفاعی موضعی و سیستمیک میزبان.

بنابراین، آگاهی از وضعیت دفاعی موضعی و سیستمیک میزبان در تفسیر یافته‌های باکتریولوژیک و میزان اهمیت بالینی آنها ضروری است.

جدول ۴-۱

	ویرلانس ارگانیسم	نوع ارگانیسم	پرولیفراسیون در محل	آسیب نسجی	علائم آماس
Contamination	کم	mixed	−/+	−	−
Colonization	متوسط	Commensal (low Pathogen)	+	−/+	−
Infection	زیاد	Potent Pathogen	++	++	+

از آنجا که ارگانیسم‌های بالقوهٔ پاتولوژن(PP)[1] بسیار وسیع هستند، کسب آگاهی از مشخصات بالینی عفونت جلدی، زیرجلدی و شرح حال بیمار برای قضاوت و تفسیر صحیح یافته‌های باکتریولوژیک در آزمایشگاه ضروری است. برای مثال، ارتباط قوی و مشخصی بین *استافیلوکوک اورئوس*، پیدایش پوستول، جوش‌های چرکی و کاربانکل[2] و آبسه‌های لوکالیزه وجوددارد. به‌همین شکل، *استرپتوکوکوس پیوژن* عموماً باعث بروز ضایعات رو به گسترش مثل باد سرخ[3] می‌شود.

1. Potentially Pathogen
2. Carbuncle
3. Erysipelas

عفونت‌های محل جراحی باید طی ۳۰ روز پس از عمل جراحی اتفاق افتاده‌باشد و اگر ایمپلنت[1] در محل عمل جراحی قرار داده‌شود، این زمان به یک سال افزایش‌می‌یابد.

وجود یکی از معیارهای زیر برای تأیید تشخیص ضروری است:

۱. ترشح چرک از محل زخم و خروج ترشح چرکی از درن؛
۲. جداشدن ارگانیسم از ترشح چرکی(کشت مثبت)؛
۳. تأیید رادیولوژیک یا هسیتولوژیک؛
٤. تشخیص بالینی پزشک معالج.

توجه:

۱. عفونت محل ختنه را نباید به‌عنوان عفونت گزارش‌کرد.
۲. آماس و ترشح مختصر محل بخیه را نباید به‌عنوان عفونت گزارش‌کرد.
۳. التهاب محل زخم را نباید به‌عنوان عفونت گزارش‌کرد.

جدول ۴-۲: بیماری‌زاهای اصلی در عفونت زخم‌های جراحی

Major Pathogens in Surgical Wound Infections	
Pathogen	**Percent of Infections***
Staphylococcus aureus	20
Coagulase-negative Staphylococci	14
Enterococci	12
Escherichia coli	8
Pseudomonas aeruginosa	8
Enterobacter spp.	7
Proteus mirabilis	3
Klebsiella pneumoniae	3
Other Streptococcal spp.	3
Candida albicans	2
Group D Streptococci	2
Bacteroides fragilis	2
Other gram-positive aerobes	2

1. Implant

Citrobacter spp.	1
Serratia marcescens	1
Candida spp.	1
Gram-positive anaerobes	1
Group B Streptococci	1
Acinetobacter spp.	1

* From a total of 17671 isolated, as reported by the National Nosocomial Infections Surveillance System, January 1990 to March 1996.

From Hospital Infections Program, National Center for Infectious Disease, Centers for Disease Control and Prevention, National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) report, data summary from October 1986-April 1996, issued May 1996: A report from the NNIS system, Am J Infect Control, 1996: 24: 380-388.

روش نمونه‌گیری زخم

عموماً از دو روش کمّی[1] و کیفی[2] برای نمونه‌برداری از بافت یا ترشحات زخم استفاده‌می‌شود.

روش کمّی

برای تعیین بار میکروبی منطقه استفاده‌می‌شود. در این روش، بافت به‌صورت آسپتیک تهیه‌می‌شود و پس از توزین و هموژن‌کردن، از آن رقت‌های سریال تهیه‌می‌شود و روی محیط‌های انتخابی و غیرانتخابی در شرایط هوازی و بی‌هوازی کشت داده‌می‌شود تا اطلاعات کمّی و کیفی لازم برای شناسایی عامل مهاجم به‌دست آید. البته در این روش درصورت وجود بافت‌های مردهٔ سطحی، برداشت این بافت‌ها به‌وسیلهٔ کورتاژ آنها به‌خصوص در زخم‌های دیابتیک ضروری است. **مفیدترین روش نمونه‌برداری از ترشحات چرکی و آبسه‌های جلدی آسپیراسیون آن توسط سرنگ است.** در زخم‌های عمقی که باعث تشکیل حفره می‌شود(آبسه)، شستشو با نرمال‌سالین استریل

1. Quantitative
2. Qualitative

غیرباکتریوستاتیک و ماساژ آرام موضع برای جمع‌شدن و آسپیراسیون مایع لازم به‌نظر می‌رسد.

روش نیمه‌کمّی و کیفی

استفاده از سواب زخم: اغلب به‌وسیلهٔ سواب‌های پنبه‌ای انجام‌می‌شود و برای نمونه‌برداری زخم‌های سطحی و دبری‌های بافتی برای ارزیابی نیمه‌کمّی و کیفی فلور میکروبی زخم به‌کار می‌رود. **درصورت استفاده از سواب آلژینات می‌توان ارزیابی را کاملاً کمّی انجام‌داد؛ زیرا سواب در مایع حل‌می‌شود و همهٔ میکروارگانیسم‌ها را آزادمی‌کند.**

اصولاً **آسپیراسیون مایع چرکی برای جداسازی بیماری‌زاها، به‌خصوص بی‌هوازی‌ها، بر نمونه‌برداری با سواب ارجحیت دارد.** باوجود کم‌ارزش بودن سواب‌های سطحی برای نمونه‌برداری، این روش ارزان، غیرتهاجمی و در دسترس است. اما استفاده از آن در زخم‌های سطحی درصورت تمیزنکردن زخم و برداشت دبری‌های سطحی، ممکن‌است فقط نشان‌دهندهٔ آلودگی‌های سطحی باشد و موجب تشخیص نادرست شود. **سواب می‌تواند به‌صورت نیمه‌کمّی میزان فلور میکروبی را تخمین‌بزند(برای مثال Light Growth، Moderatle Growth و Heavy Growth) که آسان‌تر از روش کاملاً کمّی است.**

نحوهٔ نمونه‌برداری

باوجود آنکه اغلب نمونه‌ها در اتاق عمل و توسط پزشک و کادر پزشکی گرفته‌می‌شود، اما اطلاع از نحوهٔ نمونه‌گیری و شرایط آماده‌سازی بیمار برای تهیهٔ دستورالعمل و ارسال به بخش‌های بیمارستانی **ازجمله وظایف بخش میکروب‌شناسی محسوب‌می‌شود.**

الف) زخم سطحی

۱. آسپیراسیون با سرنگ بر نمونه‌برداری با سواب ارجحیت دارد.
۲. سطح زخم را به‌وسیلهٔ شستشو با سرم فیزیولوژی استریل یا الکل ۷۰ درصد تمیزکنید و بگذارید خشک شود.
۳. از سرنگ ۵-۳ سی‌سی با سرسوزن ۲۲ یا ۲۳ برای جمع‌آوری نمونه استفاده‌کنید. پزشک باید تاحد امکان آسپیراسیون را عمقی انجام‌دهد. درضمن، درصورت وجود وزیکول دو نمونه یکی از مایع داخل وزیکول و یکی از قاعدهٔ آن جمع‌کنید.
٤. درصورتی که آسپیراسیون اولیه ناموفق باشد، می‌توان با تلقیح مقداری سرم فیزیولوژی غیرباکتریوستاتیک در زیرجلد مجدد نمونه گرفت.
۵. اگر آسپیراسیون را دوباره تکرارکردید و موفق نشدید هیچ مایعی بردارید، سوزن و سرنگ را با کشیدن مقداری محیط مایع به داخل آن شستشو دهید و مایع را در محیط‌ها تلقیح کنید.

ب) زخم‌ها و ندول‌ها

۱. منطقه را با الکل ۷۰ درصد تمیزکنید.
۲. ابتدا لایهٔ دبری را بردارید.
۳. سپس، از قسمت پایهٔ زخم یا ندول نمونه بگیرید.
٤. درصورت وجود اگزودا آن را به‌وسیلهٔ سرنگ یا سواب استریل جمع‌کنید.

ج) بافت زیرجلدی و نمونه‌های پوست(جدول ۴-۳)

۱. پانچ بیوپسی‌های پوست:
- سطح پوست را با الکل ۷۰ درصد ضدعفونی کنید.
- ٤mm-۳ از قسمت درم را پانچ کنید.

در لولهٔ استریل بدون فرمالین و یا دارای سرم فیزیولوژی استریل غیرباکتریوستاتیک به بخش میکروب‌شناسی ارسال‌کنید.

۲. آسپیـراسیـون بـافت نـرم:

- سطح پوست را با الکل ۷۰ درصد ضدعفـونی کنیـد.
- عمیق‌ترین قسمت زخم یا مجرای سینوس را آسپیره کنید.
- مراقب آلودگی سطحی باشیـد.

جدول ۴-۳: بافت زیرجلدی و نمونه‌های پوست

نوع کشت	ملاحظات
باکتری	آسپیراسیون به‌وسیلهٔ سرنگ یا بیوپسی نمونه بر نمونه‌برداری با سواب ارجحیت دارد.
بی‌هوازی	در سـوختـگی‌هـا، زخم‌هـا، ندول یـا عفونت‌هـای سطحی پـوست رایـج نیست، امـا در گازگرفتگی‌ها و ضربـه‌ها مفید است.
قارچ	در تشخیص درماتوفیت‌هـا، مخمر و قارچ‌های دوشکلی مفید است.
مایکوباکتریا	در تشخیص مایکوباکتریوم مارینوم[1]، فورتیتوم[2] و چلونی[3] مفید است.
ویروس	در تشخیص HSV و واریسلا- زوستر[4] مفید است.

د) زخم‌های عمیق، آسپیراسیون و نمونه‌های بافتی عمیق(جدول ۴-۴)

۱. سطح را با الکل ۷۰ درصد ضدعفونی کنید.

۲. عمیق‌تـرین قسمت زخم را آسپیره کنید تا از آلودگی سطح پوست اجتناب‌شود. درصورتی که نمونه به‌وسیـلهٔ جـراحی گرفته‌می‌شود، قسمتی از دیوارهٔ زخم نیز بایـد برای کشت ارسـال‌شـود.

جدول ۴-۴: زخم‌های عمیق، آسپیراسیون و نمونه‌های بافتی عمیق

نوع کشت	ملاحظات
باکتری	نمونه‌های بیوپسی یا آسپیراسیون بر نمونه‌برداری با سواب ارجحیت دارد.
بی‌هوازی	در تشخیص آکتینومایکوزیس مفید و ارسال در سیستم انتقالی بی‌هوازی است.
قارچ	در تـشخیص پسـودالشریـا بویـدی[1]، گونه‌هـای *بـای‌پولاریس*[2]، *اگـزوفیالا*[3] و *فوزاریوم*[4] مفید است.

1. M. Marinum
2. M. Fortuitum
3. M. Chelonei
4. Varicelle-Zoster

مایکوباکتریا	در تشخیص مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، *M.bovis* و *M. kansasii* مفید است.

روش انتقال نمونه

پس از نمونه‌برداری، انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه بسیار مهم است. این مطلب به‌ویژه دربارهٔ بی‌هوازی‌ها اهمیت فراوانی دارد. آسپیراسیون مایع چرکی و نمونه‌های بافتی از نمونه‌گیری با سواب صحیح‌تر است؛ زیرا استفاده از این روش موجب حفظ شرایط طبیعی بدون تغییر میکروبی درحین انتقال می‌شود(رطوبت و شرایط احیای محیط). استفاده از محیط‌های انتقالی از قبل احیاشده(Prereduced) تجاری در مواردی که انتقال نمونه ۲-۱ ساعت طول بکشد، مناسب‌ترند. بنابراین، از آنجا که نمونه‌های سواب به خشکی و فشار اکسیژن حساس‌اند، برای حفظ میکروارگانیسم‌های هوازی و بی‌هوازی همراه سواب‌های پنبه‌ای یک محیط انتقالی از قبل احیاشده و غیرمغذی مفید است(جدول ٤-۵).

اغلب باکتری‌های بی‌هوازی در کشت‌های مخلوط بهتر زنده می‌مانند. انتقال سواب مرطوب در محیط از قبل احیاشدهٔ انتقالی به آزمایشگاه به‌عنوان روش مؤثر و ارزان برای کشت هوازی و بی‌هوازی و حفظ هر دو نوع ارگانیسم‌ها مناسب است. ممکن‌است نگهداری در دمای بالا موجب اختلاف رشد یا مرگ برخی ارگانیسم‌ها شود و دمای پایین موجب افزایش نفوذ اکسیژن خواهدشد. برای نمونه‌برداری و انتقال هوازی نمونه‌ها، انواع مختلفی سواب وجوددارد(جدول ٤-۵) که استفاده از هر

1. Pseudoallescheria boydii
2. *Bipolaris*
3. *Exophiala*
4. *Fusarium*

کـدام در مناطق خاص باتوجه به ارگانیسم‌هـای مـوجـود در آن محل توسط ASM[1] تـوصیـه شـده‌است.

جدول ۴-۵: Transport systems for aerobic specimens

System and supplier (references)	Comments
Swab Transport System (example: Culturette) BBL Microbiology Systems Cockeysville, Md.	Sterile, disposable culture collection and transport system consisting of plastic tube containing two rayon-tipped swabs and transport medium to prevent drying of bacteria and maintain pH.
	☞ **Note:** Many other such transport system from other manufacturers are available.
Calcium alginate swabs	Can be toxic for some strains of *N. gonorrhoeae*, HSV, and *Ureaplasma urealyticum* and may be toxic for some cell cultures. Useful for collection of *Chlamydia* cultures.
Cotton swabs	Residual fatty acids may inhibit some bacteria and *Chlamydia* spp. If cotton is glued or spun to wooden applicator stick, wooden stick may inactivate HSV and interfere with some *Ureaplasma* identification tests.
Dacron swabs	Useful in collection of viral and group A streptococcus specimens.

همچنین، سیستم‌های انتقال بی‌هـوازی مختلف تجـاری نیـز وجوددارند که در جدول ٤-٦ نشان‌داده شده‌است.

جدول ۴-۶: Transport systems for anaerobic specimens

System and supplier	Desription

۱. انجمن میکروب‌شناسی امریکا

Anaswab system Scott Laboratories, Inc. Fiskeville, R.I.	Two-tube system. Both tubes have been evacuated oxygen, and air within tubes has been replaced with oxygen-free CO_2. One tube includes swab attached to rubber stopper. After specimen is obtained, swab is removed from first tube and quickly placed into second tube. with stopper attached swab handle becoming final seal for second tube.
Port-a-Cult Vial or Port-a-Cult Swab BBL Microbiology Systems Cockeysville, Md.	Tube is used for transporting swabs, and sealed vial is used for transporting fluid specimens. Both contain semisolid transport medium with reducing agent and redox indicator. Any purple discoloration of medium indicates exposure to air.
Bio-Bag Environmental System BBL Microbiology Systems Cockeysville, Md.	Specimen is collected with any swab or tube desired and then placed in gas-impermeable environmental chamber that contains ampoules of indicator, catalyst, and hydrogen-CO_2 generator. After bag is sealed, each ampoule is crushed to produce anaerobic conditions.
Syringe or needle aspirates	**Express excess air from syringe, and cap needle or stick needle with rubber stopper. If fairly large vol is collected (2 ml or more), anaerobic bacteria survive for 24 h at room*.**
BD Anaerobic Specimen Collector BD, Div. Of Becton Dickinson and Co. Rutherford, N.J.	Sealed, gassed, oxygen-free outer glass tube that contains an inner glass vial fixed within rubber stopper. Inoculated swab is placed into inner glass vial, and plunger is depressed. Inner vial detaches from rubber stopper and drops into lower portion of outer tube so that tip of swab is exposed to oxygen-free atmosphere during transport. Redox indicator is contained in bottom of outer tube to indicate exposure to oxygen.

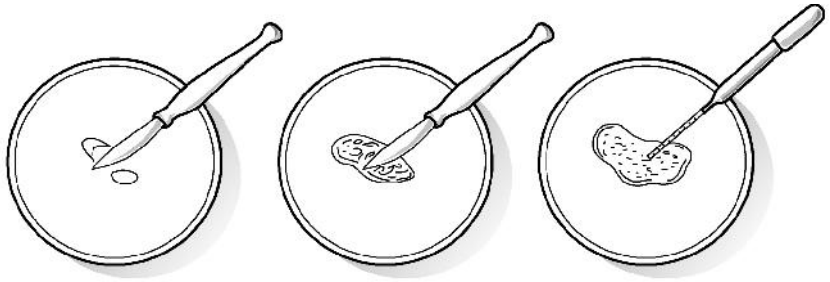
* Specimens obtained by a physician using needle aspiration should be transferred to a sterile tube or anaerobic vial prior to transport of the specimen to the laboratory. If there is little material in the syringe, the physician should draw a small amount of sterile nonbacteriostatic 0.85% NaCl or sterile broth through the syringe and then transfer the specimen to a sterile tube. Alternatively, and only if the specimen will be compromised by transferring it from the syringe, a small amount of sterile 0.85% NaCl or broth may be drawn into the syringe prior to removal of the needle. The physician should use a protective device while removing the needle to avoid injury and should cap the syringe with a sterile cap prior to transporting it to the laboratory.

نحوهٔ آماده‌سازی نمونه

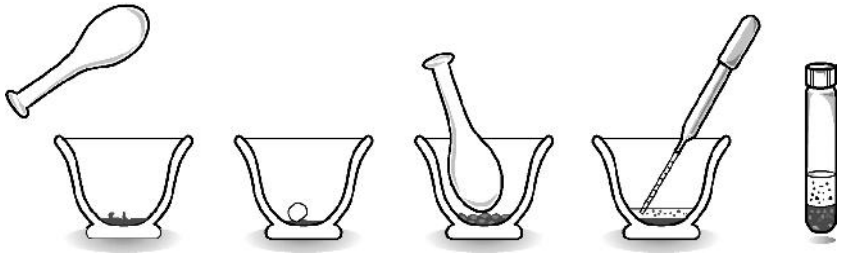
۱. هموژن و یکنواخت‌کردن بافت

روش‌های مختلفی برای یکنواخت‌کردن بافت وجوددارد. برای مثال، روش اسکالپل استریل(شکل ٤-١)، روش Mortar & Pastle با استفاده از پودر کربوراندوم(شکل ٤-٢)، روش خردکردن بافت در لوله(شکل ٤-٣) و روش

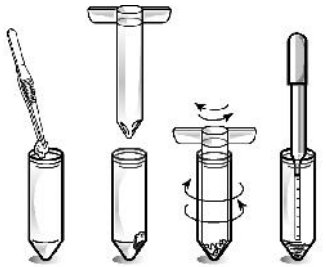
Stomacher بـا استفاده از کیسـهٔ خـردکننده(شکل ٤-٤). **در دسـترس‌تـرین روش برای هموژن‌کـردن نمونه استفاده از اسکالپل استریل است.** ابتدا نمونـه را داخـل یک ظرف استریل می‌گذاریم و بافت را توسط اسکالپل استریل خرد و یکنواخت می‌کنیم. سپس، توسط پیپت پاستور استریل یا سواب استریل نمونه را کشت‌می‌دهیم. ممکن‌است برای مرطوب نگهداشتن نمونه به یک محیط مایع مانند Nutrient broth نیـاز داشتـه‌بـاشیم.



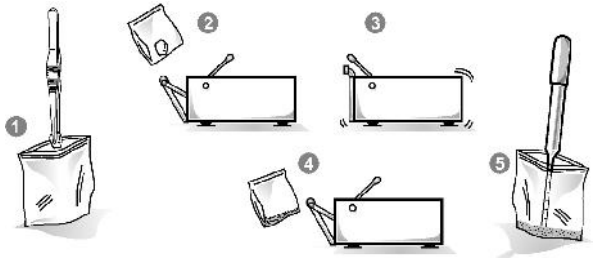
شکل ۴-۱: روش اسکالپل استریل



شکل ۴-۲: روش Mortar & Pastle



شکل ۴-۳: روش Grinding

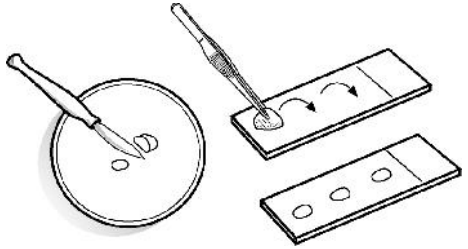


شکل ۴-۴: روش استفاده از کیسهٔ خردکنندهٔ Stomacher

۲. آماده‌سازی اسمیر

الف) بافت را در ظرف استریل قراردهید و قسمت کوچکی از آن را با اسکالپل جراحی ببرید.

ب) نمونه را با پنس استریل بردارید و آن را به چند قطعه تقسیم‌کنید و روی لام نو برای رنگ‌آمیزی گرم و دیگر رنگ‌آمیزی‌های لازم قراردهید(شکل ٤-۵).



شکل ۴-۵: روش تهیهٔ اسمیر از بافت

۳. آماده‌سازی اسمیر نازک

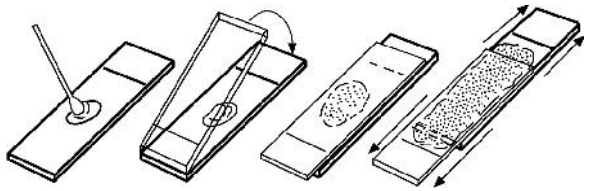
وقتی نمونه نسج نرم یا اگزودای ضخیم است، برای مثال خلط یا مواد چرکی، یک اسمیر نازک تهیه‌کنید(شکل ٤-٦):

الف) قسمت کوچکی از اگزودای ضخیم را بردارید و آن را با استفاده از سواب یا قیچی استریل ببرید و روی لام تمیز قراردهید.

ب) سپس دومین لام تمیز را بالای نمونه بگذارید و دو لام را روی یکدیگر فشاردهید.

ج) لام‌ها را به‌وسیلهٔ کشیدن برخلاف جهت هم از یکدیگر جداکنید.

د) ممکن‌است مرحلهٔ ب و ج با استفاده از چند لام تازه برای تهیهٔ اسمیر نازک تکرارشود.



شکل ۴-۶: آماده‌سازی اسمیر نازک

روش تلقیح نمونه‌ها در محیط کشت

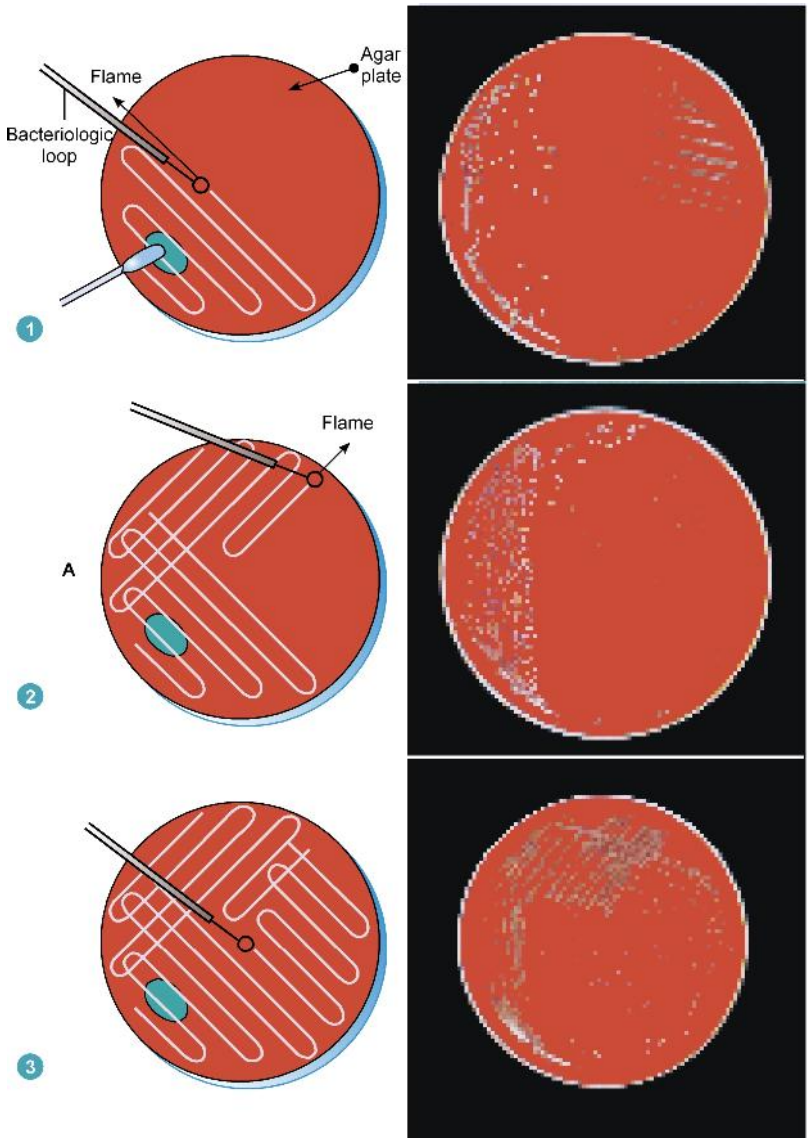
انتخاب محیط کشت مناسب براساس نمونهٔ بالینی در جدول ٤-٧ آمده‌است. برای تلقیح محیط‌های جامد مانند آگار خونی، آگار شکلات و آگار مکانکی باید از یک روش استاندارد استفاده‌نمود تا بتوان آنالیز نیمه‌کمّی را روی آن انجام‌داد. روش کشت خطی برای جداسازی نیمه‌کمّی کلنی‌ها در شکل ٤-٧ نمایش‌داده شده‌است. براساس این روش رشد ضعیف و محدود کلنی‌ها در منطقهٔ اول($\frac{۱}{٤}$ پلیت) به‌صورت Light Growth(۱+)، رشد متوسط تا منطقهٔ دوم رشد

به‌صورت Moderate Growth(۲+) و بالاخره رشد زیاد که کل پلیت توسط کلنی‌ها پوشیده شده‌باشند به‌صورت Heavy Growth(+ 4 to 3 +) گزارش می‌شود.

جدول ۴-۷: انتخاب محیط کشت مناسب براساس
نمونهٔ بالینی

نمونه	ظرف انتقال	آماده‌سازی بیمار	دستورالعمل‌های ویژه	انتقال به آزمایشگاه	محیط‌های کشت اولیه	بررسی میکروسکوپی	توضیحات
آبسه (زخم، پوستول و زخم‌های سطحی)	سواب انتقالی در محیط استوارت° یا ایمیس°°	تمیزکردن محل با نرمال‌سالین استریل یا الکل ۷۰ درصد	نمونه‌گیری با سواب از لبهٔ زخم	حداکثر تا ۲۴ ساعت در دمای اتاق در محیط نگهدارنده	*BA **CA +Mac ++Thio	رنگ‌آمیزی گرم	درصورتی‌که اسمیر مخلوطی از باکتری‌های گرم مثبت و منفی را نشان‌می‌دهد، محیط CNA•• را اضافه‌کنید
زخم عمیق	محیط انتقالی بی‌هوازی	تمیزکردن محل با نرمال‌سالین استریل یا الکل ۷۰ درصد	آسپیراسیون از دیواره و بافت‌ها	حداکثر تا ۲۴ ساعت در دمای اتاق در محیط نگهدارنده	BA CA Mac •Ana Thio	رنگ‌آمیزی گرم	شستشوی گرانول‌ها (درصورت وجود) و داخل‌کردن آن در سرم فیزیولوژی
بافت	محیط انتقالی بی‌هوازی یا لولهٔ درپیچ‌دار استریل	ضدعفونی پوست	از خشک‌شدن نمونه جلوگیری کنید(با مرطوب‌کردن آن با آب مقطر استریل درصورتی که خونی نباشد)	حداکثر تا ۲۴ ساعت در دمای اتاق در محیط نگهدارنده	BA CA Mac Ana Thio	رنگ‌آمیزی گرم	درصورت نیاز آن را همژنیزه و یکنواخت کنید

° Stuart * Blood Agar + MacConkey Agar • Anaerobic agars as appropriate
°° Amies ** Chocolate Agar ++ Thioglycollate Medium •• Columbia agar with colistin and nalidixic acid



شکل ۴-۷:

A, Dilution streak technique for isolation and semiquantitation of bacterial colonies. **B,** Actual plates show sparse, or 1+, bacterial growth that is limited to the first quadrant. **C,** Moderate, or 2+ bacterial growth that extends to the second quadrant. **D,** Heavy, or 3+ to 4+, bacterial growth that extends to the fourth quadrant.

زمان و دمای انکوباسیون

محیط‌های تلقیح‌شده باید در دمای ۳۵°C نگهداری‌شوند. محیط شکلات آگار را باید در جو ۵-۳ درصد CO_2 (Candle Jar) نگهداری‌نمود. به‌طور کل، انکوباسیون محیط‌های کشت هوازی به‌مدت ۷۲ ساعت برای موارد معمول و درصورت شک به باکتری‌های سخت‌رشد مانند *نوکاردیا* ادامهٔ انکوباسیون به‌مدت ۷-۵ روز ضروری است. سطح پلیت‌ها باید روزانه ازنظر رشد کلنی‌های مشکوک بررسی‌شوند و درصورت شک به وجود قارچ‌های دوشکلی، کشت در دو پلیت هم‌زمان(محیط بلاد آگار یا BHI آگار) و نگهداری آنها در دو دمای ۳۵°C و ۲۲°C توصیه‌می‌شود.

کشت بی‌هوازی

از آنجا که بخش وسیعی از عفونت‌های زخم و جراحی توسط میکروب‌های بی‌هوازی ایجادمی‌شوند، ضرورت کشت صحیح یادآوری می‌شود. درصورت استفاده از روش‌های نمونه‌گیری مناسب برای کشت بی‌هوازی، میزان عفونت با میکروب‌های بی‌هوازی در زخم‌های دیابتیک حدود ۹۵ درصد تخمین زده‌می‌شود که بیشترین میزان جداسازی مربوط به *پپتواستریپتوکوکوس*[1]، *باکتروئیدس*[2] و *پرووتلا*[3] است. میزان عفونت‌های بی‌هوازی در زخم‌های بستر و زخم‌های فشاری حدود ۳۰ درصد از کل ایزوله‌ها را تشکیل می‌دهد.

1. *Peptostreptococcus*
2. *Bacteroides* spp.
3. *Prevotela* spp.

نحوهٔ کشت

۱. نمونه‌ها باید تاحدامکان بلافاصله پس از رسیدن به آزمایشگاه کشت داده‌شونـد.

۲. کشت هم‌زمان هوازی نمونه‌ها الزامی است. این عملیات به‌منظور مقایسهٔ رشـد و تشخیص رشد باکتری‌های هوازی ـ بی‌هوازی اختیاری از باکتری‌های بی‌هوازی اجباری انجام‌می‌شود(باکتری‌های هوازی ـ بی‌هوازی در هر دو شرایط رشدمی‌کنند، امـا رشـد باکتری‌هـای بی‌هوازی اجباری در شرایط هـوازی منفی است و رشد فقط در شـرایط بی‌هوازی دیده‌می‌شود).

۳. برای کشت بی‌هوازی نمونه‌ها باید از محیـط‌های از قبل احیاشده استفاده‌نمود. این پلیت‌هـا بـه‌صورت آمـادهٔ مصـرف در بسته‌بندی‌هـای ویژه(فاقد اکسیژن) توسط شرکت‌های مختلف تـولیدکننده محیط‌های کشت عرضه‌می‌شونـد. بـرای تهیـه و آماده‌سازی محیط‌های از قبل احیاشـده در آزمـایشگاه می‌توان پلیت‌هـا را حـداقـل ۲ ساعت قبـل از کشت(یا درصورت امکان همیشه یک دسته پلیت از روز قبل) درون جار بی‌هوازی قـرارداد تا اکسیـژن آن کاملاً خارج‌شود.

مـحیـط‌هـای معمـول شـامـل پـلیت بـلاد آگـار بـی‌هـوازی(CDC بـلاد آگـار یا بروسلا بلاد آگار)[1]، محیط مهارکنندهٔ باکتری‌هـای گـرم مثبت و بـاسیل‌هـای گرم منفـی بی‌هوازی اختیاری مانند KVLB (کـانامـایسین ـ وانکومایسین بـلاد آگار)[2]، یک محیـط افتراقی یا اختصاصی مـانند BBE (بـاکتروئیـدیس ـ بـایـل اسـکولین)[3] و یـک محیـط اختصـاصی برای گرم

1. CDC Blood Agar or Brucella Blood Agar
2. Kanamycin-Vancomycin Blood Agar
3. Bacteroides-Bile Esculin

مثبت‌ها(کلیستین ـ نالیدکسیک اسید بلاد آگار[1] یـا فنیل ـ اتیل الکل بلاد آگار[2]) هستنـد.

محیط‌ها باید بلافاصله پس از کشت در شرایط بـی‌هـوازی قرارگیرنـد(جارهای بی‌هوازی). رشد این باکتری‌ها آهسته‌تر از باکتری‌های هوازی یا بی‌هوازی اختیاری است و به ٤٨ ساعت انکوبـاسیون اولیـه نیاز دارنـد. درصورت منفی‌بـودن پلیت‌هـا انکوباسیون به‌مدت ۵-۳ روز ادامه می‌یابد و سپس گزارش نهایی داده‌می‌شود. بـرای جـداسـازی آکتینومیست‌ها و برخی بی‌هوازی‌های سخت‌رشد زمـان طولانی‌تری لازم است. بنابراین، برای کـشت نمونه‌هـای مشکوک بـه باکتـری‌هـای بـی‌هـوازی حداقل بایـد از یک محیط اختصاصی و یک محیط غیـراختصـاصی استفاده‌نمـود. همچنین، می‌توان یک دیسک مترونیدازول ۵ grμ را روی سطح آگار غیراختصاصی (برای تشخیص بی‌هـوازی‌ها) قـرارداد. **پس از ۷۲-٤٨ سـاعت انکوبـاسیـون تـحت شرایط بی‌هوازی** حضور باکتری‌های بی‌هوازی به‌وسیلهٔ وجود هر هالهٔ عدم رشـد دور دیسک مترونیدازول آشکار می‌شود.

ارزیابی و بررسی نمونه‌های زخم

نمونه در لحظهٔ ورود به آزمایشگاه به‌عنوان بافت[3]، آسپیراسیون[4]، مایع[5] یا سواب[6] معرفی خواهدشـد کـه ممکـن‌است همراه با اطلاعات بالینی بـاشـد. این اطلاعات شامل نـوع نمونه(برای مثال، زخم جـراحی، زخم‌هـای نـاشی از تروما، زخم پا یا زخم‌های فشاری)، محل زخم، علائم بالینی عفونت، وجود نکروز و درمان آنتی‌بیوتیکی است که در پیش‌بینی میکروارگانیسم‌هایی که بیشتر درگیر

1. Colistin-Nalidixic Acid Blood Agar
2. Phenyl-Ethyl alcohol Blood Agar
3. Tissue
4. Swab
4. Aspiration
5. Colorectal
5. Fluid
6. Sacral

هستند به میکروب‌شناس کمک بزرگی خواهدکرد تا در انتخاب نوع کشت و نوع محیط و آنالیزهای تکمیلی استفاده‌شوند. همچنین، توصیف زخم و ذکر محل مانند زخم‌های ناحیهٔ کولورکتال[۵] یا زخم‌های فشاری ناحیهٔ ساکرال[۶] بیان‌کنندهٔ این موضوع است که زخم ممکن‌است با میکروارگانیسم‌های مدفوع همراه باشد. بنابراین، ممکن‌است مخلوطی از باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی وجود داشته‌باشند. از آنجا که نتایج کشت‌های میکروبی و آزمایش حساسیت میکروبی در کمتر از ٤٨ ساعت حاصل‌نمی‌شود، بنابراین، بهتر است تعدادی از روش‌های سریع‌تر معرفی‌شوند.

رنگ‌آمیزی گرم

باوجود پیشرفت‌های فراوان در سال‌های اخیر، رنگ‌آمیزی گرم هنوز مهم‌ترین رنگ‌آمیزی در میکروب‌شناسی است. رنگ‌آمیزی گرم در تشخیص اولیه و درمان مناسب و همچنین، شناسایی عامل بیماری‌زا(برای مثال کوکسی گرم مثبت خوشه‌ای) به‌خصوص در نمونه‌های گرفته‌شده از بیوپسی بافت‌های عمقی باارزش است. **به‌هر حال، در بیشتر انواع زخم‌ها که به‌وسیلهٔ میکروفلور هوازی ـ بی‌هوازی ایجادمی‌شود، رنگ‌آمیزی گرم ارزش کمی دارد.** از طرف دیگر، در عفونت‌های دیابتی و زخم‌های سوختگی به‌علت وجود فلور میکروبی و میکروب بیماری‌زا به‌طور هم‌زمان، نمی‌توان ارتباط مناسبی بین رنگ‌آمیزی گرم و تخمین نتایج کشت برقرارکرد. مشکل دیگر در اتکا به رنگ‌آمیزی گرم، تغییر رنگ باکتری‌های گرم مثبت بی‌هوازی در مواجهه با اکسیژن است که اغلب تشخیص را پیچیده‌تر می‌کند(گرم منفی رنگ می‌گیرند).

یکی از روش‌های رنگ‌آمیزی گرم برای شناسایی باکتری‌های بی‌هوازی در این قسمت توضیح داده‌می‌شود.

رنگ‌آمیزی گرم(روش کوپلوف[1])

این روش اختصاصی برای رنگ‌آمیزی بی‌هوازی‌ها استفاده و توصیه شده‌است.

محلول‌ها

کریستال ویوله قلیایی

الف) محلول کریستال ویوله

کریستال ویوله ۱۰gr

آب مقطر ۱۰۰۰ml

رنگ را در آب مقطر حل و درون ظرف شیشه‌ای قهوه‌ای در حرارت اتاق نگهداری‌کنید. این محلول یک سال پایدار است.

ب) محلول بی‌کربنات سدیم

بی‌کربنات سدیم$_{۳}$(NaHCO) ۵۰gr

آب مقطر ۱۰۰۰ml

بی‌کربنات سدیم را در آب مقطر حل و درون ظرف شیشه‌ای در حرارت اتاق نگهداری‌کنید.

ج) محلول ید(روش کوپلوف)

هیدروکسید سدیم(NaoH) ٤gr

کریستال ید ۲۰gr

یدید پتاسیم ۱gr

آب مقطر ۱۰۰۰ml

1. Kopeloff

۱. NaoH را در ۲۵ml آب مقطر حل‌کنید.
۲. ید و یدید پتاسیم را اضافه و کاملاً حل‌کنید.
۳. ۹۷۵ml آب مقطر را به‌آرامی به آن اضافه و کاملاً مخلوط‌کنید.

د) محلول رنگبری: استون ـ الکل ۳ به ۷

اتانول ۹۵ درصد	۷۰۰ml
استون	۳۰۰ml

اتانول و استون را با هم مخلوط و درون ظرف شیشه‌ای قهوه‌ای در حرارت اتاق نگهداری‌کنید. این محلول یک سال پایدار است.

رنگ سافرانین(روش کوپلوف)

سافرانین O	۲۰gr
اتانول ۹۵ درصد	۵۰ml
آب مقطر	۱۰۰۰ml

روش رنگ‌آمیزی

۱. لام را با حرارت ثابت کنید و بگذارید تا خنک شود.
۲. لام را با محلول A(کریستال ویوله) بپوشانید. تقریباً ۵ قطره از محلول B(بی‌کربنات ۵ درصد) به آن اضافه‌کنید. بگذارید رنگ به‌مدت ۲ تا ۳ دقیقه باقی‌بماند. در این مدت لام نباید خشک شود.
۳. لام را به‌آرامی با محلول ید کوپلوف بشویید.
٤. محلول تازهٔ ید را برای ۲ دقیقه به‌کار ببرید.
۵. لام را مایل نگه‌دارید و روی آن محلول رنگ‌بر بریزید و بلافاصله خالی‌کنید.
٦. حداقل به‌مدت ۳۰ ثانیه با سافرانین کوپلوف رنگ‌آمیزی کنید.

۷. رنگ سافرانین را به‌آرامی با آب معمولی بشویید.

تفسیر کشت نمونه‌های زخم

پس از انکوباسیون در شرایط هوازی و بی‌هوازی برای ۴۸-۲۴ ساعت، غالباً باکتری‌های شایعی چون *استافیلوکوک اورئوس*، *پسودوموناس آئروژنوزا* و *استرپتوکوک بتاهمولیتیک* رشدمی‌کنند که رشد آنها نیمه‌کمّی و به‌صورت Light (+1) تا Heavy (+4 to 3+) گزارش‌می‌شود(شکل ۴-۷). اکثر بی‌هوازی‌ها(**به‌استثنای گونه‌های *کلستریدیوم***) به‌صورت مخلوط با میکروفلور هوازی رشدمی‌کنند. آنتی‌بیوگرام فقط روی باکتری‌هایی انجام‌می‌شود که به‌طور غالب در محیط کشت هوازی رشدکرده‌اند. درصورتی که کشت هوازی منفی بود، اما زخم عفونی به‌نظر می‌رسید، شک به عفونت بی‌هوازی مطرح است و باید کامل بررسی‌شود. بیشتر باکتری‌های بی‌هوازی با منشأ داخلی(اندوژن) طی ۵-۲ روز روی محیط‌های انتخابی رشد می‌کنند. **در کشت مخلوط هوازی‌ها و بی‌هوازی‌ها که مشخصهٔ زخم‌های چندمیکروبه است، بی‌هوازی‌های سخت‌رشد اغلب به‌سادگی رشدمی‌کنند که به‌دلیل دردسترس قرارگرفتن عوامل ضروری برای رشد هم‌زمان باکتری‌های بی‌هوازی اختیاری است.**

به این موارد باید توجه کرد:

۱. رنگ‌آمیزی گرم روی نمونهٔ زخم انجام‌می‌شود و درصورت مشاهدهٔ لکوسیت بالا، باکتری غالب ازنظر شکل مورفولوژیک در لام، به‌صورت گزارش ابتدایی به پزشک اعلام‌می‌شود(برای مثال، کوکسی گرم مثبت زنجیره‌ای).

۲. کشت در موارد شک به بی‌هوازی‌ها(مثل بوی تعفن و گندیدگی که مشخصهٔ عفونت‌های بی‌هوازی است) در شرایط هوازی و بی‌هوازی

انجام‌شود. از انـواع مختلف کلنی که به دیسک مترونیدازول حساس هستند، رنگ‌آمیزی گرم انجام‌شود تا به‌سرعت انواع باکتری‌های بی‌هوازی مورد شناسایی اولیه قرارگیرند(باسیل‌های گـرم منـفی بی‌هـوازی متعلق به گونه‌های *باکتروئیدس*، *پرووتلا* و فوزوباکتریم). بوی تعفن نشان‌دهندهٔ رشد مخلوطی از باکتری‌های بی‌هوازی به‌همراه بی‌هوازی اختیـاری است. در کشت‌هـای مخلوط، آنتـی‌بیـوگـرام روی ارگـانیسم غـالب انجام‌می‌شود. باتوجه به اهمیت نقش بی‌هوازی‌ها و مشکلات جداسازی و شناسایی آنها روش‌هـای اولیه مانند مشاهـدهٔ میکروسکوپی(رنگ‌آمیزی گرم از کلنی‌های رشدیافته)، تولید پیگمان روی بلاد آگار(اغلب در کنار میکروارگانیسم‌هایی مانند *استافیلوکوک اورئوس* ایجادمی‌شود) و حساسیت به دیسک مترونیدازول 5µgr در شناسایی مقدمـاتی بی‌هوازی‌هـا کاربـرد دارد. ممـکن‌است در برخی زخم‌ها میکروارگانیسم‌های غیرمعمول وجود داشته‌باشند. مانند زخم‌های ناشی از گازگرفتگی یـا مخمرهـا در زخم بیمارانی که داروهای سرکوب‌کنندهٔ ایمنی دریافت‌می‌کنند.

گزارش نتایج میکروب‌شناسی

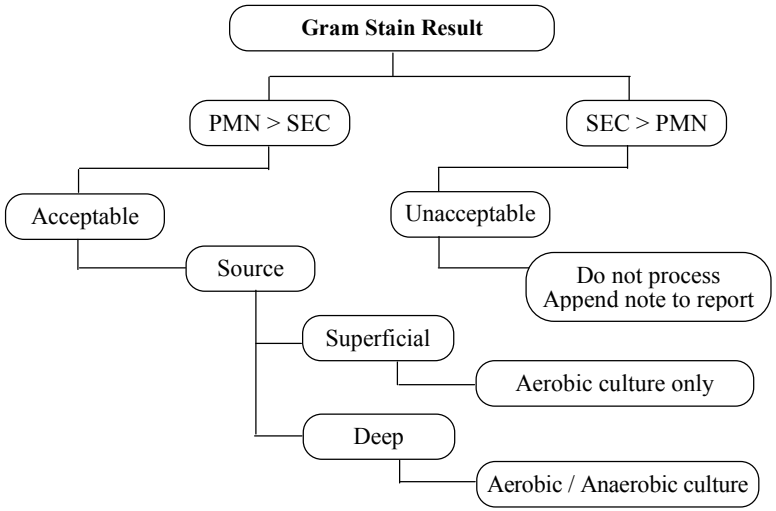
به‌منظور اینکه آزمایشگاه میکروب‌شناسی وظیفهٔ خود را در تشخیص و درمان زخم‌های محل جراحی انجام‌دهـد(به‌خصوص در مواردی که درمان زخم با شکست مـواجـه شده‌است)، نیازمند اطلاعات بالینی است تا تفسیر و گزارش صحیح باشد. برای مثال، نوع زخم، محل آن، شرایط، علائم عفونت و روش نمونه‌گیری. بنابراین، تأکید می‌شود **ارتباط بین آزمایشگاه میکروب‌شناسی و پزشک مـعالـج ضـروری است**. بـرای مثـال، گزارش کشت مخلوط هوازی ـ بی‌هوازی از یک زخم فـشاری در ناحیهٔ ساکرال را نباید بـه‌عنـوان آلـودگی حیـن نمونـه‌برداری و کثیف‌بـودن زخـم تلقی‌کـرد، بلکه ممکن‌است نشان‌دهندهٔ سینرژیسم میکروبی باشـد. گزارش آنـتی‌بیوگرام فقط بـرای *استافیلوکوک اورئوس* به‌تنهایی ممکن‌است موجب شکست درمان شود؛ زیرا باسیل گرم منـفـی بی‌هـوازی موجود در کنـار آن گزارش نشده‌است.

تفسیر و گزارش لام، رنگ‌آمیزی گرم و کشت

سه روش مختلف برای تـعیین دامنـهٔ مـطالعه، نحـوهٔ تفسیر و گزارش نمونه‌های اسمیر و کشت زخم وجوددارد:

۱. براساس ارجحیت نسبی گلبول‌های سفید چندهسته‌ای(PMN)؛
۲. براسـاس شـمارش و تـعیین تعـداد سلول‌هـای PMN و سـلول‌هـای اپـی‌تلیال سنگفرشی(SEC) در LPF(Q-Score)[1]؛
۳. براساس تعداد ارگانیسم‌های بیماری‌زای بالقوه(PP)[2] و سیستم درجه‌بندی Q/ 2, 3, 4.

روش اول: گزارش نتایج



1. Quality score
2. Potential Pathogen

مثال ۱:

۱-۱. نتیجهٔ اسمیر گرم(با فرض قابل قبول بودن)

Many neutrophils, no epithelial cells
Many gram positive cocci in clusters
Many gram negative bacilli
Few morphotypes resembling skin flora

۱-۲. دامنهٔ مطالعه:

تعیین هویت(ID) و آزمون تعیین حساسیت ضدمیکروبی برای ارگانیسم‌های زیر انجام‌می‌شود:

Gram positive cocci in clusters
Gram negative bacilli

۱-۳. نحوهٔ گزارش‌دهی:

Heavy growth of *S. aureus*
Heavy growth of *klebsiella pneumonia*
Light growth of aerobic bacteria resembling skin flora

مثال ۲:

۲-۱. نتیجهٔ اسمیر گرم(نمونهٔ قابل قبول):

Many neutrophils, few epithelial cells
Gram positive cocci in clusters
Gram positive cocci in chains

۲-۲. نتیجهٔ کشت:

Heavy growth of Streptococcus group A & *S. aureus*, few colonies of enteric bacilli

۲-۳. نحوهٔ گزارش‌دهی:

S. aureus

بدون تعیین حساسیت ضدمیکروبی: Group A *Streptococci*

ID محدود بدون تعیین حساسیت ضدمیکروبی: Enteric bacilli

مثال ۳:

۳-۱. نتیجهٔ اسمیر گرم:

Many neutrophils, few epithelial cells, multiple morphotypes

۳-۲. کشت:

More than three potential pathogens

نکته‌های مهم تصمیم‌گیری دربارهٔ دامنهٔ تشخیص میکروبیولوژیک:

- نوع نمونه چیست؟ سواب، آسپیره یا بافت
- آیا احتمال آلودگی مطرح است؟
- تابلوی بالینی بیمار چیست؟
- با پزشک معالج یا سرویس عفونی مشورت‌کنید.

روش دوم: گزارش نتایج

Q-Score = # of Potential Pathogens(PP) to work up

			Squamous Epithelial Cells			
			No Cells	1-9/lpf	10-24/lpf	≥ 25/lpf
		Score	0	-1	-2	-3
Neutrophils	No Cells	0	3	0	0	0
	1-9/lpf	+1	3	0	0	0
	10-24/lpf	+2	3	1	0	0
	≥ 25/lpf	+3	3	2	1	0

نحوهٔ تفسیر در سیستم Q-Score:

۱. اگر Q=۳ باشد:

تا سه ارگانیسم بیماری‌زای بالقوه تلقی و بررسی کامل می‌شود(ID/AST).

۲. اگر Q=۲ یا Q=۱ باشد(اگر بیماری‌زاهای بالقوه کمتر یا مساوی Q-Score باشد):

تعداد ارگانیسم کمتری ارزیابی می‌شود.

۳. اگر Q-Score ≥ PP باشد(اگر بیماری‌زاهای بالقوه بیشتر از Q-Score باشد):

تمام ارگانیسم‌های PP بررسی‌می‌شوند.

٤. اگر Q-Score < PP باشد:

باتوجه به یافته‌های اسمیر گرم:

- تمام بیماری‌زاهای بالقوهٔ موجود در اسمیر گرم بررسی کامل می‌شوند.
- سایر ارگانیسم‌ها فقط توصیف مورفولوژیک می‌شوند.
- اگر تمام ارگانیسم‌های PP در اسمیر گرم وجود داشته‌باشند، تمام ارگانیسم‌ها فقط توصیف مورفولوژیک می‌شوند.

روش سوم: گزارش نتایج

سیستم درجه‌بندی Q / 2, 3, 4

دامنهٔ ارزیابی‌ها به تعداد ارگانیسم‌های بیماری‌زای بالقوه بستگی‌دارد.

۱. دو ارگانیسم بیماری‌زای بالقوه: ID/AST

۲. سه ارگانیسم بیماری‌زای بالقوه.

باتوجه به یافته‌های اسمیر گرم:

۲-۱. دو ارگانیسم بیماری‌زای بالقوه بررسی کامل می‌شود به شرط آنکه در اسمیر گرم وجود داشته‌باشند.

۲-۲. اگر هر سه ارگانیسم در اسمیر گرم وجود داشته‌باشند، تشخیص مرفولوژیک کفایت می‌کند.

۳. بیشتر از سه ارگانیسم بیماری‌زای بالقوه:

- تشخیص مرفولوژیک کفایت می‌کند.

مثال:

اسمیر گرم:

Many neutrophils, few epithelial cells, gram positive cocci in clusters

gram positive cocci in chains

کشت:

Heavy growth of S.aureus, Heavy growth of Group A Streptococci few colonies of enteric bacilli

تفسیر:

Q-Score: 2[PMN(+3), few epithelial(-1)]
Q/ 2-3-4: 3 PP

دامنهٔ مطالعه:

ID/ AST: S. aureus
ID: Streptococcus Group A
Morphologic ID: enteric bacilli

نمونه‌های زخم با Q-Score = 0

به‌صورت زیر گزارش‌کنید:

Squamous epithelial cells in this specimen indicate the presence of superficial material which may contain contamination or colonizing bacteria unrelated to infection.
Please consult microbiology service if clinical considerations warrant complete processing of the specimen (Specimen will be held 5 days).

توجه: عملیات لازم در مواردی که نمونه قابل پذیرش نباشد.

۱. درخواست مشاورهٔ تلفنی فوری و توضیح دلیل به‌روشنی و همچنین توضیح جنبه‌های آزمایشگاهی؛
۲. ارسال یک نوشته یا گزارش رایانه‌ای به واحد پرستاری؛
۳. ثبت اطلاعات زیر در آزمایشگاه(نام و مشخصات بیمار و نمونه به‌طور کامل، نوع نمونه، تاریخ نمونه‌گیری، آزمایش مورد درخواست، دلیل مشاوره، نام فردی که مذاکرهٔ تلفنی با او انجام‌شده، زمان و تاریخ تماس تلفنی)؛
٤. قراردادن نمونه‌ها در یخچال به‌مدت ۵-۳ روز تا مشاوره به نتیجه برسد.

References

1. Isenberg D. Henry: *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, American Society for Microbiology, 1992 & 2004.
2. Murray R. Patrick: *Manual of Clinical Microbiology*, 8 TH editions, American Society for Microbiology, 2003.
3. Forbes A. Betty: *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*, 11 TH editions, Mosby, 2002.
4. Mahon R. Connie: *Textbook of Diagnostic Microbiology*, 2 ED editions, W.B. Saunders, 2000.
5. Mandell L. Gerald: *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 6 TH editions, Elsevier Churchill Livingstone, 2005.
6. Karen C. Carroll & Punam Verma: *Advanced Specimen Collection and Culture Work-up* The Johns Hopkins Hospital, Baltimore, MD & Rush University Medical Center, Chicago, IL, 2004.
7. P.G. Bowler, B. I. Duerden, and D.G. Armstrong, *Wound Microbiology and Associated Approaches to Wound Management*, Clinical Microbiology Reviews, Apr. 2001, p. 244-269.
8. Collee J. Gerald, Fraser G. Andrew, Marmion P. Barrie Simmons Anthony: *Mackie & Mc Cartney practical Medical Microbiology*, 13 TH and 14 TH editions, Churchill Livingstone, 1989 & 1996.

فصل پنجم

کشت خون، کاتترهای خونی و فرآورده‌های بانک خون

بخش اول

کلیات

جداسازی عوامل میکروبی از کشت خون به عوامل متعددی بستگی‌دارد که مهم‌ترین آنها عبارت‌اند از:

- نوع باکتریمی و ارگانیسم عامل؛
- روش نمونه‌گیری؛
- حجم خون گرفته‌شده؛
- تعداد و دفعات خون‌گیری و زمان آن؛
- روش کشت و امکانات آزمایشگاهی.

باکتریمی به سه گروه تقسیم‌می‌شود:

۱. گذرا(Transient)،

۲. پیوسته(Continuous)،

۳. متناوب(Intermittent).

۱. **گذرا**: باکتریمی به‌صورت تصادفی در مواقعی چون مسواک‌زدن و جویدن غـذا، دستکاری بافت‌های عفونی، Instrumentation سـطوح مخـاطی آلـوده و جراحی بافت‌های غیراستریل به‌وجود می‌آید که در بعضی موارد به سپتی سمی منجرمی‌شود.

۲. **پیوسته:** در مـواردی که منشـأ عفـونت داخل عروقی[1] باشد، مانند اندوکاردیت و کاتترهای خونی، باکتری بـه‌طور پیـوسته بـه داخل خون آزاد می‌شود. همچنین، در مراحل ابتدایی تیفوئید و بروسلوز نیـز این حالت دیده‌می‌شـود.

۳. **متناوب:** در مواردی که عفونت خارج عروقی[2] باشد، مانند آبسه، زخم، پنومونی، منـژیت، استئومیلیت، UTI، آرتریـت عفـونی و عفونت‌های مـجاری صـفراوی دیده‌می‌شود. در بیشتر مـوارد باکتری ازطریق سیستم لنفاوی و از موضع عفونی به جریان خون واردمی‌شود که معمولاً ۴۵ دقیقه قبل از شروع تب است. همچنین، در بیش از ۲۵ درصد موارد منشأ عفونت مشخص نیست.

عامل ایجادکنندهٔ باکتریمی اکثراً یک ارگانیسم است، ولی در ۵-۳ درصد موارد ممکن‌است چند میکروب عامل آن باشد؛ به‌ویژه در معتادان تـزریقـی، افـراد دچار سوختگی وسیع و عفونت‌های با منشأ دستگاه گوارش(جدول‌های ۵-۱ و ۵-۲).

در بهترین شرایط به‌طور معمول حدود ۳ درصد کشت‌های خون دچار آلودگی می‌شوند که مهم‌ترین عوامل آن استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی(شایع‌ترین)، کُرینه باکتریـوم‌هـا، میکروکوک‌ها، باسیلوس‌های غیرگونه *آنتـراکس* و *Propionibacterium* است. این باکتری‌ها فلور پوست هستند.

جداسازی *Clostridium perfringens* به احتمال ۷۷ درصد نشانهٔ آلودگی است، ولی دربارهٔ سایر کلستریدیوم‌ها به احتمال ۸۰ درصد عفـونت واقـعی رخ داده‌است. باید توجه داشت کـه اگر میزان آلودگی کـشت خـون را ۳ درصد درنـظر بگیـریم، احتمال جداشدن دو آلوده‌کنندهٔ یکسان و شـایـع از دو شیشهٔ کـشت خـون بـرابـر ۰/۰۰۰۹=۰/۰۳×۰/۰۳ یـا بـه عبـارتی کمتـر از ۱ در ۱۰۰۰

1. Intravascular
2. Extravascular

خواهدبود. به این دلیل، تعداد کشت خون در رد آلودگی یا تعیین یک عفونت غیرمعمول با آلوده‌کننده‌ها، در کنار علائم بالینی بسیار بااهمیت است.

جدول ۵-۱: Bacteria Commonly Isolated from Blood Cultures

Coagulase-negative Staphylococci
Staphylococcus aureus
Viridans Streptococci
Enterococcus spp.
Beta-hemolytic Streptococci
Streptococcus pneumoniae
Escherichia spp.
Klebsiella spp.
Pseudomonas spp.
Enterobacter spp.
Proteus spp.
Anaerobic bacteria-*Bacteroides and Clostridium* spp.

منبع: ۱

جدول ۵-۲: Agents of Infective Endocarditis

Viridans Streptococci*
Nutritionally deficient Streptococci
Enterococci*
Streptococcus bovis
*Staphylococcus aureus**
Staphylococci (coagulase-negative)
Enterobacteriaceae
Pseudomonas spp. (usually in drug abusers)
Haemophilus spp. particularly *H. aphrophilus*
Unusual gram-negative bacilli (e.g., *Actinobacillus*, *Cardiobacterium*, *Eikenella*)
Yeast
Other (including polymicrobial infectious endocarditis)

∗ Most common organisms associated with native valve endocarditis in nondrug-abusing adults.

منبع: ۳

مواد ضدعفونی‌کننده برای نمونه‌گیری

۱. بتادین ۱۰ درصد Povidone - Iodine،

۲. محلول الکلی ۲ درصد کلرهگزیدین(Chlorhexidine).

درحال حاضر، کلرهگزیدین بهترین مادهٔ ضدعفونی‌کننده توصیه شده‌است. به‌ویژه در نمونه‌گیری از کاتترها، این ماده در بخش‌های کودکان نتایج بهتری دارد(آلودگی کمتر) و عوارض پوستی که در کودکان با مصرف ترکیبات یددار ایجادمی‌شود در مصرف کلرهگزیدین کمتر است.

نمونه‌گیری با Povidone – Iodine 10%

۱. ورید موردنظر را انتخاب‌کنید.

۲. در ابتدا پوست ناحیه را با الکل ۷۰ درصد با حرکت محکم دورانی از داخل به خارج به قطر تقریبی 5cm ضدعفونی کنید.

۳. پس از خشک‌شدن الکل همین کار را با بتادین(۱۰ درصد Povidone - Iodine) تکرار و حداقل **یک** دقیقه(ترجیحاً ۲-۱/۵ دقیقه) صبرکنید تا محل ضدعفونی شود. **برای جلوگیری از آلودگی رعایت زمان توصیه‌شده بسیار اهمیت دارد.**

٤. درصورت لزوم به لمس مجدد ورید باید نوک انگشت درحالی که با دستکش پوشیده شده‌است با بتادین ضدعفونی شود.

۵. پس از نمونه‌گیری، خون را مستقیماً و بدون تعویض سوزن به درون شیشهٔ کشت خون که درپوش لاستیکی آن قبلاً با الکل ۷۰ درصد ضدعفونی و خشک شده‌است، تلقیح‌کنید و شیشه را با ملایمت تکان‌دهید تا خون با مادهٔ ضدانعقاد(SPS[1]) مخلوط‌شود.

در گذشته روش استفاده از دو سوزن، یعنی تعویض سوزن اول پس از خروج از رگ و جایگزینی با سوزن استریل نو، توصیه‌می‌شد. اما درحال حاضر، با توجه به احتمال خطر این کار برای کارکنان این روش توصیه‌نمی‌شود.

1. Sodium Polyanethol Sulfonate

باید توجه‌داشت که احتمال آلودگی کشت‌های خون در روش دو سوزن حدود ۲ درصد و در روش یک سوزن حدود ۳/۷ درصد است.

٦. محل نمونه‌گیری را مجدداً با الکل ۷۰ درصد تمیز می‌کنیم تا از واکنش پوستی در افراد حساس به ترکیبات ید جلوگیری شود.

تعداد کشت خون، زمان نمونه‌گیری و حجم خون مورد نیاز

بسته به نوع باکتریمی احتمالی، سن و مصرف قبلی آنتی‌بیوتیک متفاوت است. به‌طور کل، تعداد باکتری در مراحل حاد عفونت، در زمان تب و در کودکان بالاتر است.

درصورتی که حجم مناسبی از خون به درون محیط کشت تلقیح شود، بسته به تعداد نمونهٔ گرفته‌شده:

- در باکتریمی متناوب(Intermittent): با یک کشت خون ۸۰ درصد و با سه کشت خون ۹۹ درصد عامل مشخص‌می‌شود.
- در موارد غیراندوکاردیت کشت خون اول ۹۲–۸۲ درصد، کشت خون دوم ۹۹–۹۰ درصد و در کشت خون سوم ۹۹/٦ درصد عامل مشخص‌می‌شود.
- در موارد اندوکاردیت با یک نمونه خون ۹۰ درصد و با دو نمونه خون ۹۵ درصد عامل مشخص‌می‌شود. در کسانی که آنتی‌بیوتیک دریافت‌کرده‌اند بیش از ۳ کشت خون نیاز است.

تعداد و زمان خون‌گیری

۱. **تب حاد:** قبل از شروع درمان، ۲ نمونه از ۲ رگ در ۱۰ دقیقه گرفته‌شود.
۲. **بیماری غیرحاد:** قبل از شروع درمان، ۳–۲ نمونه از رگ‌های جداگانه طی ۲٤ ساعت گرفته‌شود. فاصلهٔ بین نمونه‌ها نباید کمتر از ۳ ساعت باشد.
۳. **اندوکاردیت حاد:** قبل از شروع درمان، ۳ نمونه از ۳ رگ جداگانه در مدت ۲–۱ ساعت گرفته‌شود.

٤. **اندوکاردیت تحت حاد:** ۳ نمونه از ۳ رگ با فاصلهٔ زمانی حداقل یک ساعت طی ٢٤ ساعت گرفته‌شود. اگر کشت بعد از ٢٤ ساعت منفی بود، ۳-۲ نمونهٔ دیگر با همین روش گرفته‌شود.

۵. **اندوکاردیت تحت درمان:** ۲ نمونه در روز اول و ۳ نمونه در سه روز متوالی گرفته‌شود.

٦. **غیراندوکاردیت تحت درمان:** ٦ نمونه در ٤٨ ساعت باید گرفته‌شود. نمونه‌گیری باید قبل از شروع دُز بعدی آنتی‌بیوتیک انجام‌شود.

در موارد ۵ و ٦ استفاده از محیط‌های تجاری حاوی Resin ارجحیت دارد، به‌ویژه برای گرم مثبت‌ها.

۷. **تب با منشاء ناشناخته(FUO):** ۳-۲ نمونه از قسمت‌های مختلف با فاصلهٔ زمانی حداقل یک ساعت و طی ٢٤ ساعت گرفته‌شود. درصورت منفی‌بودن کشت در مدت ٤٨-٢٤ ساعت، ۳-۲ نمونهٔ دیگر گرفته خواهدشد.

حجم نمونه

در افراد بزرگسال در هر نوبت حداقل ۱۰ سی‌سی خون گرفته‌شود.

باید توجه داشت به‌ازای هر ۱ سی‌سی خون احتمال جداسازی ۳/۲ درصد زیاد می‌شود.

در کودکان کمتر از ۱۰ سال تقریباً به‌ازای هر سال حداقل ۱ سی‌سی توصیه‌می‌شود، هر چند اخیراً به معیار وزنی توجه شده‌است(جدول ۵-۳).

جدول ۵-۳: Pediatric bacterial blood cultures: recommended blood volume

Patient Wt (lb)	Recommended blood vol/culture (ml)	Total blood Vol for 2 Cultures(ml)	Vol of blood equal to 1% of patient's total blood vol(ml)**
< 19	1	2	2
18-30	3	6	6-10
30-60	5	10	10-20
60-90	10	20	20-30
90-120	15	30	30-40
> 120	20	40	> 40

** Blood volume calculated by assuming 85 ml/kg in newborns and 73 ml/kg in other patients. Two 20 ml blood specimens collected from an 80 kg adult (40ml total) represent approximately 0.7% of the patient's total blood volume.

منبع: ۲

انتقال

در مدت ٤-۲ ساعت در حرارت RT[1] ارسال‌شود. نمونه را نباید در یخچال گذاشت.

کشت

با توجه به تعداد کم عفونت‌های بی‌هوازی این کشت به‌طور معمول نباید انجام‌شود و درصورت درخواست باید از محیط‌های مخصوص کشت بی‌هوازی استفاده‌کرد. برای کشت مایکوباکتریوم‌ها به محیط کشت مایع Middlebrook 7H9 و محیط‌های دوفازی اختصاصی نیاز است.

روش‌های کشت به دو دسته تقسیم‌می‌شوند:

۱. متعارف(Conventional)،

۲. خودکار(Automated).

- در نوع مرسوم و متعارف در شیشهٔ کشت خون اغلب از محیط‌های کشت مایع TSB[2] و BHI[3] استفاده‌می‌شود.
- در نوع دوفازی Biphasic یا Castaneda از فرم آگار محیط‌های فوق برای فاز جامد استفاده‌می‌شود. **محیط‌های دوفازی بهترین محیط برای جداسازی بروسلا و قارچ‌ها هستند.**

برای جلوگیری از انعقاد خون و ایجاد لخته که احتمال جداسازی را کم‌می‌کند، باید SPS با غلظت ۰/۰۵-۰/۰۲۵ درصد به محیط اضافه‌شود که علاوه‌بر خاصیت ضدانعقادی با عمل ضدکمپلمان و ضدفاگوسیتوز به رشد باکتری‌ها کمک‌می‌کند. **SPS بهترین ضدانعقاد موجود است** و نباید از سدیم سیترات که باعث مهار رشد تعدادی از گرم مثبت‌ها می‌شود یا EDTA و هپارین استفاده‌کرد. در موارد

1. Room temperature
2. Trypticase Soy Broth
3. Brain- Heart Infusion

نمونه‌گیری از سوندهایی که از مجرای آن مادهٔ تزریقی حاوی هپارین عبورمی‌کند، باید قبل از نمونه‌گیری جریان هپارین قطع‌شود و سرنگ اول نمونه دور ریخته و از سرنگ دوم استفاده‌شود.

نسبت خون به محیط کشت

بهترین نسبت توصیه‌شده ۵:۱ است. با توجه به حداقل نمونه در بزرگسالان که ۱۰ سی‌سی است، نباید از محیط‌های کشت که کمتر از ٤٠ سی‌سی محیط مایع دارند در این موارد استفاده‌کرد.

اتمسفر

پس از دریافت شیشهٔ کشت خون، توصیه‌می‌شود که با یک سرسوزن استریل در کنار شعله در زیر هود، پس از ضدعفونی با الکل و خشک‌شدن درپوش لاستیکی، یک مجرای تبادل هوای موقتی(Vent) ایجادشود تا خلاء موجود در شیشه کشت خون جبران یا فشار هوای اضافی درون آن خارج‌شود و شرایط مناسب برای رشد ارگانیسم‌هایی که به شرایط هوازی نیاز دارند، مانند سودوموناس، مخمرها و N. meningitidis ایجادشود. **پس از چند ثانیه سرسوزن را از درپوش لاستیکی خارج‌می‌کنیم.**

انکوباسیون

- در ۳۵°C و **حداقل به‌مدت یک هفته؛**
- در موارد شک به اندوکاردیت حداقل **به‌مدت دو هفته** و قارچ‌ها **بیش از دو هفته؛**
- در موارد شک به بروسلا **به‌مدت ٦-٤ هفته؛**
- ترجیحاً در ٢٤ ساعت اول شیشه‌های کشت خون چندبار تکان داده‌شوند.

پس از ۱۸-٦ ساعت اولین کشت از محیط کشت خون(حدود ۰/۲۵ سی‌سی) روی محیط chocolate blood agar انجام‌می‌شود. محیط را در CO_2 گذاشته و **برای**

مدت ۵-۳ روز ازنظر رشد بررسی‌می‌شود. مـی‌توان در زمـان کشت یک قـطره از مـحیط را روی لام نـو قرارداد و پـس از خشک‌شدن در زیر هـود و کنـار شعله با متانول فیکس کرد و با رنگ گـرم یا متیلن بـلو رنگ‌آمیـزی نمـود. درصـورت مثبت‌بودن و رد احتمال آلودگی لام، نتیجه تلفنی به پـزشک اطلاع داده‌شـود.

- نوبت دوم کشت(Subculture) بین ۷۲-۴۸ ساعت بسته به شرایط بیمار توصیه‌می‌شود.
- کشت پـس از ۷ روز در بعضی از منـابع تـوصیه‌نمی‌شود، **ولی انجـام‌دادن آن ارجـح است و احتـمال جداسـازی باکتری‌هـای دیـررشـد، سخت‌رشد و قارچ‌ها را زیادمی‌کـند.**

طی مدت ۷ روز و پس از آن شیشه‌های کشت خون باید به‌صورت ماکروسکوپی ازنظر علائم رشد شامل کدورت، لیزشدن، ایجاد گاز و ایجاد کلنی‌های باکتری(اغلب در گرم مثبت‌ها) بررسی‌شود. در میان این موارد، **کدورت قابل اعتمادترین مشخصه است** و سایر موارد مانند لیزشدن بـه‌علت سـرعت تخلیهٔ خون از سـوزن یـا ایجـاد گـاز در شیشه‌های vent نشده که ممکن‌است به فشار اولیهٔ محیط مـربـوط بـاشـد، چندان قابل اعتماد نیست. همچنیـن تعدادی از ارگانـیسم‌ها مانند *N.meningitides* و *همـوفیـلوس* معمـولاً کدورت ایجـادنمـی‌کنند.

- در موارد شک به گرم منفی‌های روده‌ای یا غیرتخمیرکننده‌ها مانند سودوموناس می‌توان برای subculture از محیط مکانکی در کنار محیط شکلات استفاده‌کرد.
- در زمان استفاده از محیط‌های دوفازی باید در روز اول ۲ بار و در روزهای بعد با فواصل ۳-۱ روز به‌آرامی با کج‌کـردن بطری برای چند لحظه، فاز مایع را بـا تمام سطح جامد تماس داد و پس از ۷۲-۲۴ ساعت، سطح محیط جامد

را ازنظر وجود کلنی بررسی‌کرد. با این عمل subculture در خود محیط انجام‌می‌شود.

روش Lysis - Centrifugation (ISOLATOR)

در این روش، خون گرفته‌شده از بیمار در مجاورت Saponin و ... لیز می‌شود و پس از سانتریفوژ شدن به‌مدت ۳۰ دقیقه در ۳۰۰۰g، و دورریختن مایع سطحی، رسوب به‌طور مستقیم روی محیط‌های کشت جامد تلقیح‌می‌شود که بسته به ارگانیسم مشکوک متفاوت است. این روش برای جداسازی سریع و کلنی کانت مناسب است. همچنین، برای جداسازی ارگانیسم‌های داخل سلولی مانند بروسلا و قارچ‌ها، مایکوباکتریوم‌ها و عفونت‌های چندمیکروبی بسیار مناسب است. از موارد مهم استفادهٔ این روش کلنی کانت نمونه‌های خون گرفته‌شده از کاتتر و ورید است که در قسمت بعد توضیح داده‌می‌شود. این سیستم تجاری است.

سیستم‌های خودکار

درصورت امکان تهیه و بودجهٔ مناسب، فقط نسل جدید این سیستم‌ها توصیه‌می‌شود

که به‌طور پیوسته شیشه‌های کشت خون را ازنظر رشد بررسی‌می‌کنند(در بخش کاتترها توضیح‌داده خواهدشد).

بسته به نوع سیستم برای سنجش از روش‌های سنجش کلریمتریک و فلورسنت برمبنای تشخیص CO_2 غیررادیواکتیو استفاده‌می‌شود و در انواع هوازی، بی‌هوازی، مایکوباکتریوم‌ها و برای رشد قارچ وجوددارد. معروف‌ترین این سیستم‌ها عبارت‌اند از:

1. Bactec System(Becton Dickinson)

2. Bact / Alert(bio Merieux)

خوانندگان می‌توانند برای اطلاعات کامل‌تر به منابع ۲، ۳ و ٤ مراجعه‌نمایند.

گزارش و تفسیر

۱. گزارش شفاهی(Verbal Report): هر زمان که کشت خون مثبت شد، نتیجه باید تلفنی به پزشک اعلام‌شود. باید توجه‌داشت میزان مرگ‌ومیر موارد سپتی سمی حاد که به Septic Shock منجرمی‌شود، ٤٠-۲۰ درصد است.

۲. گزارش کتبی(Written Report): جواب کشت مثبت یا منفی پس از مدت معین است، مانند:

No growth after 7 days
or
No growth in 1 week

۳. در موارد کشت خون مثبت **زمان جداشدن قید شود، به‌خصوص کشت‌های مثبت با *استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی***؛ زیرا سرعت جداسازی علاوه‌بر سیستم مورد استفاده مانند سیستم‌های خودکار که در جداسازی تعداد کم این باکتری حساسیت بالایی دارند با تعداد باکتری در ارتباط است و در مواردی که تعداد باکتری در خون **بالاتر** باشد و کشت **سریع‌تر** مثبت شود، **عفونت واقعی محتمل‌تر است. باید توجه‌داشت که درحال حاضر استاف‌های کواگولاز منفی شایع‌ترین باکتری‌های جداشده از کشت‌های خون و در عین حال شایع‌ترین آلوده‌کننده‌های کشت خون هستند.**

٤. در شرایط استاندارد و استفاده از نمونه‌گیرهای ورزیده در حدود ۳ درصد کل کشت‌های خون گرفته‌شده از بیماران آلوده‌می‌شوند(۳ مورد آلودگی در هر

۱۰۰ شیشه کشت خون گـرفته شـده‌است). **همچنین، حدود نصف کل کشت‌های خون که مثبت شده‌اند، بـه‌علت آلـودگی است.**

۵. در مواردی که فقط یک بار کشت خون انجام‌شود یا در یک نوبت کشت از چند نـوبت کشت خـون انجام‌شـده آلوده‌کننده‌هـای شایع جداشود، احتمال آلـودگی زیاد است و پس از گزارش باکتری جمله **A Probable Contaminant** قیدمی‌شود. در این موارد به آزمایش تعیین حساسیت میکروبی نیاز نیست، مگر به درخواست پزشک.

٦. دو کشت خون مثبت در طـول ٤٨ سـاعت با استـرپتـوکوک گـروه ویـریـدانس بـاارزش است.

۷. دربارهٔ استاف‌های کواگولاز منفی، باتوجه به وضعیت بالینی بیمـار، گـاهی برای تأیید عفونت واقعی به ٤-۳ کشت خون مثبت نیاز است.

منابع بخش اول: ۲، ۳، ٤، ۵، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۲۰ و ۲۱.

بخش دوم

کاتترهای عروقی و عفونت‌های بیمارستانی

حدود ۱۵ درصد عفونت‌های بیمارستـانـی را عفونت‌های خونی بیمارستانی(NBI)[1] تشکیل‌می‌دهند. حدود ۱ درصد تمام افراد بستری در بیمارستان به این نوع عفونت مبتـلا می‌شوند. میزان ایـن عفـونت‌هـا ۲۵۰,۰۰۰-۲۰۰,۰۰۰ مورد در سال گزارش شده‌است(۱۵ و ۱۸).

NBI حدود ٤٠ درصد کل موارد باکتریمی‌ها را تشکیل‌می‌دهند که ۹۰-۵۰ درصد آنها در ارتبـاط بـا Intravascular Devices هستـنـد(۱، ٦، ۷، ۸، ۱٦ و ۲٤). در دهـهٔ ۱۹۸۰ تعداد عفونت‌های خونی بیمارستانی چند بـرابـر شـده کـه علت

1. Nosocomial Bloodstream Infections

آن استفادهٔ بیشتر از کاتترها است. میزان مرگ‌ومیر NBI ۲۵-۱۰ درصد گزارش شده‌است(۱، ٦، ۱۰، ۱٦ و ۲٤).

سالانه در ایالات متحده بین ۲۰۰-۱۵۰ میلیون Intravascular Device استفاده‌می‌شود که ۷-۵ میلیون آن از نوع CVC[1] است. **نوع nontunneld CVC مهم‌ترین عامل ایجاد عفونت‌های خونی وابسته به کاتتر است**(۷، ۱٤، ۱۵ و ۱۸).

باتوجه به احتمال مرگ‌ومیر بسیار، عفونت‌های خونی مهم‌ترین عفونت بیمارستانی محسوب‌می‌شوند(۹) و ازنظر شیوع پس از سوندهای ادراری و عفونت‌های ناشی از Ventilator، مقام سوم را در میان عفونت‌های در ارتباط با Devices دارند(٦). خوشبختانه در آخرین مطالعهٔ انجام‌شده و با توجه به رعایت بسیاری از توصیه‌ها، شیوع عفونت‌های وابسته به کاتتر در یک مطالعهٔ ٤ ساله کاهش یافته‌است(٦).

تشخیص عفونت‌های خونی وابسته به کاتتر مشکل است(۲٤). وجود تب از حساسیت بالا، ولی ویژگی کم برخوردار است(۱). باوجودی که تب اولین علامت است، ولی مشخص شده‌است که در بیش از ۸۰ درصد افرادی که پس از نصب CVC دچار تب می‌شوند، علت تب عفونت خونی نیست(۱ و ۲٤). در ۸۵-۷۵ درصد مواردی که کاتتر خارج‌شده، این کار غیرضروری بوده‌است(۱ و ۲٤) و فقط در ۲۵-۱۵ درصد مواردی که CVC برداشته‌شده، عامل عفونت کاتتر بوده‌است(۱۹ و ۲۳). باید توجه‌داشت که کاتترهای نوع محیطی Peripheral کمتر عفونت ایجادمی‌کنند. در جدول‌های ۵-٤ و ۵-۵ انواع IVD[2] و در جدول ۵-٦ عفونت‌های در ارتباط با انواع IVD توضیح‌داده شده‌است.

1. Central Venous Catheter
2. Intra Vascular Device

جدول ۵-۴: Catheters used for venous and arterial access

Catheter type	Entry site	Length	Comments
Peripheral venous catheters (short)	Usually inserted in veins of forearm or hand	< 3 inches; rarely associated with bloodstream infection	Phlebitis with prolonged use; rarely associated with bloodstream infection
Peripheral arterial catheters	Usually inserted in radial artery; can be placed in femoral, axillary; brachial, posterior tibial arteries	< 3 inches associated with bloodstream infection	Low infection risk; rarely associated with bloodstream infection
Midline catheters	Inserted via the antecubital fossa into the proximal basilic or cephalic veins; does not enter central veins, peripheral catheters	3 to 8 inches	Anaphylactoid reactions have been reported with catheters made of elastomeric hydrogel; lower rates of phlebitis than short peripheral catheters
Nontunneled central venous catheters	Percutaneously inserted into central veins (subclavian, internal jugular, or femoral)	≥ 8 cm depending on patient size	Account for majority of CRBSI
Pulmonary artery catheters	Inserted through a Teflon introducer in a central vein (subclavian, internal jugular, or femoral)	≥ 30 cm depending on patient size	Usually heparin bonded; similar rates of bloodstream infection as CVCs; subclavian site preferred to reduce infection risk
Peripherally inserted central venous catheters (PICC)	Inserted into basilic, cephalic, or brachial veins and enter the superior vena cava	≥ 20 cm depending on patient size	Lower rate of infection than nontunneled CVCs
Tunneled central venous catheters	Implanted into subclavian, internal jugular, or femoral veins	≥ 8 cm depending on patient size	Cuff inhibits migration of organisms into catheter tract; lower rate of infection than nontunneled CVC
Totally implantable	Tunneled beneath skin and have subcutaneous port accessed with a needle; implanted in subclavian or internal jugular vein	≥ 8 cm depending on patient size	Lowest risk for CRBSI; improved patient self-image; no need for local catheter-site care; surgery required for catheter removal
Umbilical catheters	Inserted into either umbilical vein or umbilical artery	≤ 6 cm depending on patient size	Risk for CRBSI similar with catheters placed in umbilical vein versus artery

منبع: ۱۵

جدول ۵-۵: Types of intravascular devices and comments on their use

Type of intravascular device	Comments
Peripheral venous catheter	Usually inserted into the veins of the forearm or the hand; most commonly used short-term intravascular device; rarely associated with bloodstream infection
Peripheral arterial catheter	For short-term use; commonly used to monitor hemodynamic status and to determine blood gas levels of critically ill patients; risk of bloodstream infection may approach that of CVCs
Midline catheter	Peripheral catheter (size, 7.6-20.3cm) is inserted via the antecubital fossa into the proximal basilic or cephalic veins, but it does not enter central veins; is associated with lower rates of phlebitis and infection than are CVCs
Nontunneled CVC	Most commonly used CVC; accounts for an estimated 90% of all catheter-related bloodstream infections; increased risk of infection with internal jugulr vein site of insertion
Pulmonary artery catheter	Inserted through a Teflon introducer and typically remains in place for an average duration of only 3 days; most catheters are heparin bonded to reduce catheter thrombosis and microbial adherence to the catheter
Pressure-monitoring system	Used in conjunction with arterial catheter; associated with both epidemic and endemic nosocomial bloodstream infections; source is often the fluid column in the tubing between the patient's intravascular catheter and the pressure-monitoring apparatus, contaminated infusate, or nondisposable transducers
Peripherally inserted central catheter	Provides an alternative to subclavian or jugular vein catheterization; is inserted via the peripheral vein into the superior vena cava, usually by way of cephalic and basilar veins; is easier to maintain and is associated with fewer mechanical complications(e.g. hemothorax) than are nontunneled CVCs
Tunneled CVC	Surgically implanted CVC(e.g., Hickman, Broviac, Groshong, or Quinton catheter) with the tunneled portion exiting the skin and a Dacron cuff just inside the exit site, the cuff inhibits migration of organisms into the catheter tract by stimulating growth of surrounding tissue, thus the sealing catheter tract; used to provide vascular access to patients who require prolonged iv chemotherapy, home-infusion therapy, or hemodialysis
Totally implantable device	A subcutaneous port or reservoir with self-sealing septum is tunneled beneath the skin and is accessed by a needle through intact skin; low rates of infection

NOTE: CVC, central venous catheter

منبع: ۱۸

جدول ۵-۶: Commonly used definitions of intravascular catheter-related infections

Infection	Definition
Catheter colonization	Significant growth of a microorganism in a quantitative or semiquantitative culture of the catheter tip, subcutaneous catheter segment, or catheter Hub
Phlebitis	Induration or erythema, warmth, and pain or tenderness around catheter exit site
Exit-site infection	
Microbiological	Exudate at catheter exit site yields a microorganism with or without concomitant bloodstream infection
Clinical	Erythema, induration, and/or tenderness within 2 cm of the catheter exit site; may be associated with other signs and symptoms of infection, such as fever or pus emerging from the exit site, with or without concomitant bloodstream infection*
Tunnel infection	Tenderness, erythema, and/or induration> 2cm from the catheter exit site, along the subcutaneous tract of a tunneled catheter(e.g., Hickman or Broviac catheter), with or without concomitant bloodstream infection*
Pocket infection	Infected fluid in the subcutaneous pocket of a totally implanted intravascular device; often associated with tenderness, erythema, and/or induration over the pocket; spontaneous rupture and drainage, or necrosis of the overlying skin, with or without concomitant bloodstream infection, may also occur*
Bloodstream infection	
Infusate related	Concordant growth of the same organism from infusate and cultures of percutaneously obtained blood samples with no other identifiable source of infection
Catheter related	Bacteremia or fungemia in a patient who has an intravascular device and ≥ 1 positive result of culture of blood samples obtained from the peripheral vein, clinical manifestations of infection (e.g., fever, chills, and/or hypotension), and no apparent source for bloodstream infection (with the exception of the catheter). One of the following should be present: a positive result of semiquantitative(≥ 15 CFU per catheter segment) or quantitative (≥ 10^2 CFU per catheter segment) catheter culture, whereby the same organism (species and antibiogram) is isolated from a catheter segment and a peripheral blood sample; simultaneous quantitative cultures of blood samples with a ratio of ≥ 5:1 (CVC vs. peripheral); differential time to positivity (i.e.,a positive result of culture from a CVC is obtained at least 2 h earlier than is a positive result of culture from peripheral blood)

* For surveillance purposes, patients with positive results of blood culture would be classified as having catheter-related bloodstream infection.

منبع: ۱۸

CDC عفونت‌های خونی بیمارستانی را به دو گروه تقسیم‌می‌کند:

۱. عفونت‌هایی که با روش‌های میکروب‌شناسی تأیید شده‌اند؛

۲. عفونت‌هایی که تأیید میکروب‌شناسی ندارند و به‌عنوان Clinical Sepsis تقسیم‌می‌شوند(۸).

ایجاد عفونت‌های وابسته به کاتتر به سه عامل بستگی‌دارد:

۱. وابسته به بیمار،

۲. وابسته به کاتتر،

۳. وابسته به بیمارستان.

در عوامل **وابسته به کاتتر** که با ارگانیسم‌های مسئول نیز در ارتباط است، جنس کاتترها اهمیت دارد.

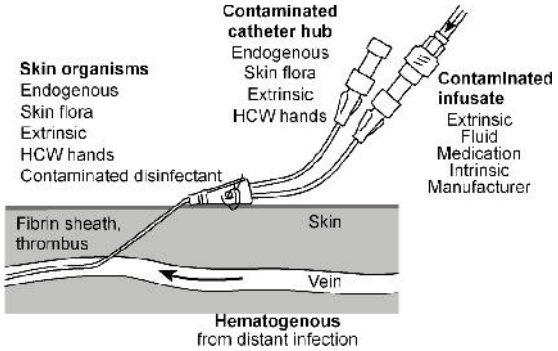
پس از نصب کاتتر، پلاکت‌ها، فیبرینوژن، فیبرونکتین و لامینین به سطح کاتتر می‌چسبند و Film ایجادمی‌کنند و ارگانیسم‌های متعددی ازطریق اتصال به این مواد تولید بیوفیلم(Biofilm) و کلنیزاسیون می‌کنند. ایجاد بیوفیلم باعث‌می‌شود که ارگانیسم در مقابل مواد ضدمیکروبی حفاظت شود. بیوفیلم معمولاً طی ۳ روز از زمان نصب کاتتر تولیدمی‌شود و برای همین در CVC که زمان بیشتری در عروق می‌ماند، بیشتر مطرح است. انواع کاتترهای محیطی طبق توصیهٔ CDC هر ۹۶-۷۲ ساعت تعویض می‌شوند که این کار درمورد CVC عملی نیست(۱ و ۱۷). در انواع CVC که برای مدت ۱۰-۸ روز(short-term) نصب شده‌باشند، بیشتر سطح خارجی کاتتر ازطریق پوست کلنیزه می‌شود و در مواردی که زمان سوندگذاری ۳۰-۱۰ روز است(long-term)، کلنیزه‌شدن در مجرای ورودی(Hub) و سطح داخلی کاتتر(Intraluminal) دیده‌می‌شود.

جنس کاتتر مهم است. به‌عنوان مثال *استافیلوکوک‌ها* و کاندیداها به چسبیدن به کاتترهای از جنس Polyvinyl Chloride تمایل بیشتری دارند تا جنس Teflon.

اخیراً سعی‌می‌شود که کاتترهایی از جنس Antithrombogenic Polyurethane تولیدشود(۱۰ و ۱۵). همچنین، سوندهایی تولیدشده‌اند که

سطح آنها با مواد ضدمیکروبی مانند Cholerhexidine یا Sulfadiazine ـ Silver یا Minocycline آغشته شده‌است(۱٤).

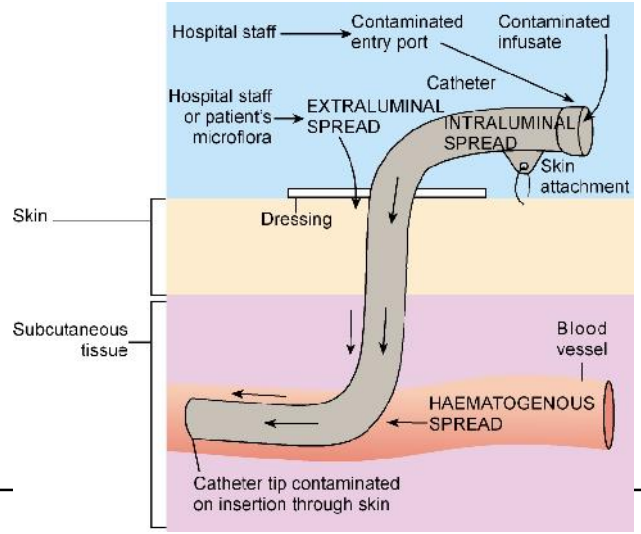
مسیرهای ورود ارگانیسم در شکل‌های ۵-۱، ۵-۲ و ۵-۳ نشان‌داده شده‌است، پوست و Hub مهم‌ترین مسیر و پس از آن مسیر خونی است(۱).



شکل ۵-۱:

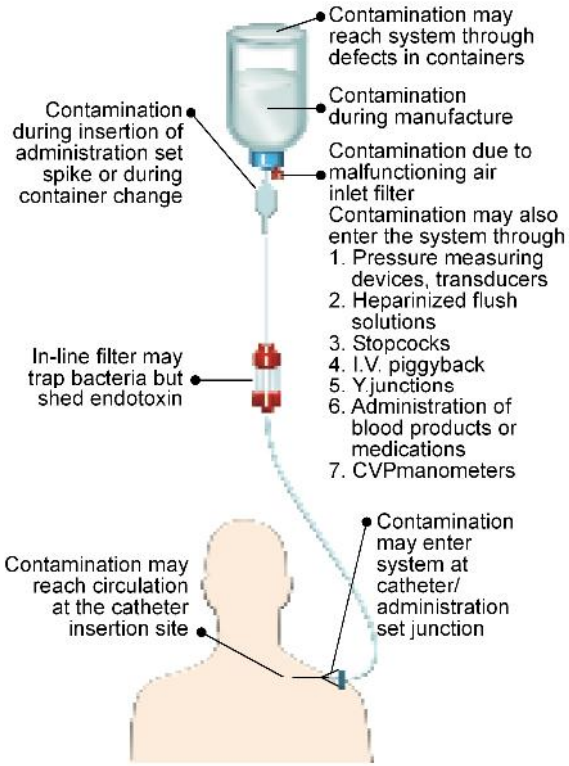
Potential sources of infection of a percutaneous intravascular device(IVD): the contiguous skin flora, contamination of the catheter Hub and lumen, contamination of infusate , and haematogenous colonization of the IVD from distant, unrelated sites of infection[1]. HCW, health care worker.

منبع: ۱٦



شکل ۵-۲

منبع: ۳



شکل ۵-۳: Points of access for microbial contamination in infusion therapy

منبع: ۱

آلودگی ازطریق مواد تزریقی(Infusate)

شروع علائم این آلودگی معمولاً سریع و حاد است(۱۸). غالب ارگانیسم‌های درگیر گرم منفی‌ها هستند، مانند *Entrobacter agglumerans*، *Serratia* spp.، *Citrobacter freundii*، *Acinetobacter* spp.، *Flavobacterium* spp.، *Pseudomonas aeruginosa*، *Pseudomonas fluorescens*، *Burkholderia cepacia* که در دو مورد B.c و P.a می‌توانند ازطریق آب مقطر نیز آلودگی ایجادکنند.

در نوزادانی که از محلول‌های حاوی Lipid استفاده‌می‌کنند، قارچ چربی دوست Malassezia furfur یا استاف کواگولاز منفی می‌تواند عامل باشد(۱ و ۱۸).

— **آلودگی ازطریق Catheter Hub and lumen:**

$\frac{۲}{۳}$ موارد آلودگی در افرادی که برای مدت طولانی کاتتر دارند از این طریق است.

— **آلودگی ازطریق پوست در محل ورود کاتتر:**

در افرادی که برای کوتاه‌مدت(کمتر از ۱۰ روز) سوند دارند، این راه مهم‌ترین مسیر است(۱، ۱۷ و ۱۸).

میکروب‌شناسی

در بیماران دارای کاتترهای خونی در طول دو دهۀ گذشته *استافیلوکوک‌های* کواگولاز منفی مهم‌ترین عامل بوده‌اند. به‌خصوص در بیماران با مشکلات سیستم ایمنی و در افرادی که سوندهای طولانی‌مدت داشته‌اند(جدول ۵-۷).

جدول ۵-۷: Most common pathogens isolated from hospital acquired bloodstream infections

Pathogen	1986-1989 (%)	1992-1999 (%)

Coagulase-negative staphylococci	27	37
Staphylococcus aureus	16	13
Enterococcus	8	13
Gram-negative rods	19	14
Escherichia coli	6	2
Enterobacter	5	5
Pseudomonas aeruginosa	4	4
*Klebsiella pneumonia*e	4	3
Candida spp.	8	8

منبع: ۱۵

با توجه به جدول مزبور، عامل $\frac{۲}{۳}$ عفونت‌ها *استافیلوکوک‌ها* هستند که مهم‌ترین علت آن در توان ذاتی این باکتری در چسبیدن به سطح کاتترهاست(۱).

میزان مرگ در عفونت‌های وابسته به کاترها ۱۹-۱٤ درصد است(۱۸) و ***استافیلوکوک اورئوس* با ۸/۹ درصد مهم‌ترین عامل در میان سایر عوامل است.**

بیش از **۵۰** درصد ***استافیلوکوک** اورئوس‌های* جداشده از کاترها مقاوم به oxacillin هستند(MRSA). این باکتری‌ها ازطریق fibronectin، fibrinogen و laminin به سطح کاترها می‌چسبند(۱، ۱۷ و ۱۸). **در مقابل *استافیلوکوس کواگولاز منفی* که شایع‌ترین عامل جداشده از کاترها هستند، کمترین مرگ را ایجادمی‌کنند(۰/۷ درصد).** این باکتری ازطریق Fibronectin به کاتتر متصل‌می‌شود. همچنین، توانایی تولید پلی‌ساکارید خارج سلولی به نام Slime را دارد که در چسبندگی و مقاومت نسبت به سیستم دفاعی و داروهای ضدمیکروبی نقش مهمی را ایفامی‌کند(۹، ۱۷ و ۱۸).

سایر عواملی که در جدول ۵-۷ ذکر نشده‌است:

Corynebacterium jeikeium: در بیماران با ضعف شدید ایمنی و تحت درمان با آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف عفونت ایجادمی‌کند.

- باسیلوس و استرپتوکوک‌های غیرهمولیتیک و همولیتیک،
- قارچ‌ها شامل کاندیدا، آسپرژیلوس، فوزاریوم، M.furfur(۹ و ۱۲). بعضی از کاندیداها در حضور محلول‌های حاوی گلوکز موادی مشابه Slime تولیدمی‌کنند که در مقاومت آنها نسبت به درمان مؤثر است. مانند C.albicans و C.tropicalis که در افراد تحت درمان مایعات TPN[1] عفونت ایجادمی‌کند(۱، ۹، ۱۲ و ۱۵).
- دربارهٔ کاندیداها مقاومت دارویی درحال افزایش است، به‌خصوص نسبت به داروی Fluconazole.

٤٨ درصد کاندیداهای جداشده از کشت خون، گروه Nonalbicans هستند که مقاومت نسبت به Fluconazole و Itraconazole در میان آنها شایع است مانند C.glabrata، C.krusei و C.parapsilosis(۱۲ و ۲٦).

روش‌های تشخیص

در ۳۰ سال گذشته بیش از ۱٦ روش مختلف برای تشخیص عفونت‌های وابسته به کاتتر استفاده شده‌است(۲٤) که تعدادی از آنها قابل اجرا در شرایط معمول در آزمایشگاه نیست و برای هر کدام باید به امکانات موجود و ارزش تشخیصی توجه‌کرد. در بیشتر منابع نتایج بسیار متغیر و درمجموع چند روش پیشنهاد شده‌است:

۱. کشت کیفی از خون و کاتتر،
۲. کشت نیمه‌کمّی از نوک کاتتر،
۳. کشت کمّی از نوک کاتتر،
٤. کشت‌های کمّی و زمانی از خون و کاتتر.

1. Total Parental Nutrition

۱. کشت کیفی[1] از خون و کاتتر

در این روش، کشت از خون ورید و Hub کاتتر انجام‌می‌شود. پاسخ‌های مثبت در این روش به‌ویژه نمونهٔ گرفته‌شده از Hub همیشه دلیل عفونت نیست. پاسخ‌های منفی این روش باارزش‌تر است(۱ و ۲۲). **یک مورد کشت خون مثبت از سوند با یک ارگانیسم پوستی نمی‌تواند نشان‌دهندهٔ یک عفونت واقعی باشد** و ممکن‌است نشان‌دهندهٔ کلنیزه‌شدن باشد.

برای افزایش دقت، باید درهنگام نمونه‌گیری از Hub، در ابتدا محل ضدعفونی شود و با یک سرنگ مقداری از خون(تا حداکثر ۱۰ سی‌سی) کشیده و دور ریخته‌شود و با سرنگ دوم نمونه برای کشت تهیه‌شود.

برای تشخیص صحیح در کشت کیفی علاوه‌بر علائم بالینی باید به این موارد توجه‌کرد:

۱. یک ارگانیسم در چند نوبت از کشت خون جداشود.

۲. زمان مثبت‌شدن کشت خون ۴۸-۲۴ ساعت باشد(نشانهٔ زیادتربودن باکتری) (۱ و ۲۲).

۲. کشت نیمه‌کمّی[2] از نوک کاتتر

کشت نوک کاتتر(tip) یا Roll ـ Plate: بیشترین روشی است که استفاده‌می‌شود(۱ و ۱۸) و **با توجه به امکانات موجود در ایران در زمان حال، عملی‌ترین روش است**. این روش اولین بار در سال ۱۹۷۷ ابداع‌شد(۲۷) و دربارهٔ ارزش آن اختلاف نظر زیادی هست. حساسیت آن تا ۸۵ درصد گزارش شده‌است، ولی ویژگی آن کم است.

در این روش نوک(tip) سوند روی محیط غلتانده‌می‌شود. باید توجه‌داشت در مواردی که کلنیزاسیون در سطح خارجی سوند باشد، مانند

1. Qualitative
2. Semiquantitative

سوندهـای کمتر از ۱۰ روز که منشأ آلودگی از سطح پوست است، این روش ارزش بیشتری دارد.

هـمـچنین، محـدودهٔ بـا ارزش cut off ≥ ۱۵CFU/ tip دربـارهٔ *استـافیـلوکوک‌هـا* باارزش‌تر است تا مواردی که عفونت با گرم منفی‌ها، قـارچ‌ها و استرپتوکوک گروه A ایجاد شـده‌باشد که ممکن‌است در آن تعداد کمتر از CFU/ ۱۵tip باشد درحالی که بیمار واقعاً دچار عفونت است(۱۸ و ۲۶). در بعضی مطالعات برای بالابردن حساسیت محـدودهٔ بـاارزش ۵CFU/ tip درنظر گرفته شـده‌است، ولی در ایـن حـالت ویژگی روش کاهش‌می‌یابد.

حساسیت تشخیصی(Diagnostic Sensitivity) که در این روش در مقالات مختلف متغیر ۸۶ درصد(۱۴)، ۲۰ درصد(۲۳) و ۶۰ درصد(۱۸) است.

ویـژگـی تـشخیصـی(Diagnostic Specificity) ۷۶ درصـد(۱) و ارزش اخـبـاری مثبت(PPV)[1] درجهت ثابت‌کردن عفونت ۳۳ درصد(۱۴) و ۳۱-۱۶ درصد(۱) است.

کشت خون هم‌زمان از رگ جداگانه برای مقایسه توصیه‌می‌شود.

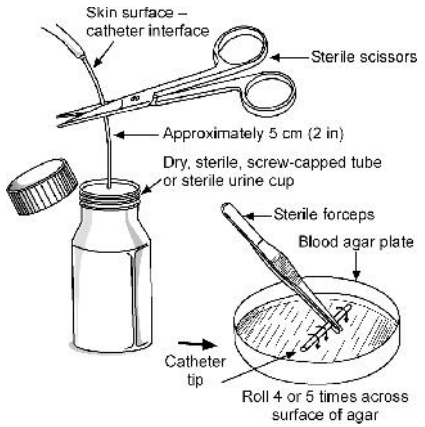
روش:

۱. محل ورود سونـد بـه پـوست را با الکل ضدعفونی و پس از خشک‌شدن سوند را خارج می‌کنیم.

۲. ۵cm-۴ آخر سوند کوتاه یا بلند را با قیچی استریل جدامی‌کنیم و در لولهٔ استریل قرارمی‌دهیم و در زمانی کمتر از ۱۵ دقیقه و قبل از خشک‌شدن به آزمایشگاه می‌رسانیم. سوند نبایـد در سـالین یـا محیـط ترانسپورت قرار گرفته‌باشد. در سوندهای بلند درصورت نیاز پزشک می‌تـوان سونـد نزدیک به پوست را نیز به‌طور جداگانه کشت داد.

1. Positive Predictive Value

۳. درصورت رعایت‌نکردن زمان، می‌توان نمونه را تا ۲ ساعت در یخچال ۴°C نگهداری‌کرد.
۴. نوک سوند را به‌وسیلهٔ پنس استریل(forceps) چندبار روی یک محیط بلاد آگار یا شکلات آگار با حرکت رفت و برگشت و غلتشی حرکت می‌دهیم(شکل ۵-۴).
۵. اندازهٔ کوتاه‌تر یا بلندتر از ۵-۴ cm در نتیجهٔ آزمایش تأثیر می‌گذارد و عدد ۱۵ ≥ برای این اندازه استاندارد شده‌است.
۶. محیط را در انکوباتور ۳۵°C و در جو CO_2 برای مدت ۹۶-۷۲ ساعت انکوبه و روزانه بررسی‌می‌کنیم. درصورت مثبت‌شدن و وجود چند نوع کلنی، هریک را جداگانه می‌شماریم و گزارش‌می‌دهیم(۲ و ۹).
۷. نیاز به تعیین حساسیت میکروبی نیست، مگر به درخواست پزشک یا مثبت‌شدن هم‌زمان کشت خون با همان باکتری.



شکل ۵-۴

۳. کشت کمّی از نوک کاتتر

این روش در بین سه روش توضیح داده‌شده دقیق‌ترین است(۲٤)، ولی انجام آن مشکل‌تر از سایر روش‌هاست. در این روش از محیط مایع استفاده‌می‌شود و بسته به روش آزمایش محدودهٔ قضاوت تعداد کلنی باارزش $۱۰^{۲}$CFU/ tip ≤ یا CFU/ $۱۰^{۳}$tip ≤ است. در این روش بهتر است از Vortex یا Sonication استفاده‌شود($۱۰^{۲}$ ≤). حساسیت و ویژگی بالاتر از ۹۰ درصد، ارزش اخباری مثبت(PPV) ۷۳ درصد و ارزش اخباری منفی(NPV)[1] ۹۸ درصد است(۱، ۱۷، ۱۸، ۲۳ و ۲٤).

با یک پنس استریل، نوک کاتتر را در یک لولهٔ استریل درپیچ‌دار قرارمی‌دهیم و روی آن محیط مایع استریل مانند TSB می‌ریزیم تا کاملاً غوطه‌ور شود. با یک پیپت پاستور استریل چند بار محیط را با فشار از درون tip عبورمی‌دهیم(pumping) یا از Soniction یا Vortex برای بهبود جداسازی استفاده‌می‌کنیم. مایع را که حاوی ارگانیسم‌های سطح داخل و خارج سوند است به روش کمّی کشت می‌دهیم(۲ و ۵).

در روش‌های بعدی که توضیح داده‌می‌شوند به خارج‌کردن کاتتر نیاز نیست(۱۰، ۱۸، ۱۹ و ۲۳).

۱-۴.کشت از نمونه خون گرفته‌شده از کاتتر و خون وریدِ محیطی و مقایسهٔ زمان مثبت‌شدن

این روش به دستگاه‌های کشت خون خودکار از نسل جدید نیاز دارد که پیوسته شیشه‌های کشت خون را ازنظر رشد بررسی‌می‌کنند، مانند سیستم‌های Bactec و Bact/Alert. بدیهی است **هرچه تعداد باکتری تلقیح‌شده بیشتر باشد،**

1. Negative Predictive Value

کشت سریع‌تر مثبت می‌شود و باارزش‌تر است. زمان قضاوت در اینجا **۱۲۰ دقیقه** درنظر گرفته‌می‌شود. به‌عبارتی، اگر کشت خون از کاتتر ۲ ساعت زودتر از نمونه خون گرفته‌شده از خون محیطی مثبت شود، باارزش است.

حساسیت = (۱۸) ۹۱ درصد یا (۲۳) ۹۶/٤ درصد

ویژگی = (۱۸) ۹٤ درصد یا (۲۳) ۱۰۰ درصد

این روش می‌تواند برای مراکز درمانی بزرگ با تعداد کشت خون بالا در ایران روش بسیار مناسبی باشد. درصورت امکان تهیهٔ سیستم‌های فوق، باتوجه به نیازنداشتن به خروج سوند از بدن، سهولت و سرعت توصیه‌می‌شود.

۲-۴ کشت کمّی خون گرفته‌شده از کاتتر و خون ورید محیطی

در این روش باید از سیستم lysis centrifugation استفاده‌کرد و نمونه پس از آماده‌سازی مستقیم روی محیط جامد در پلیت تلقیح شود و پس از زمان ۷۲-۲٤ ساعت تعداد کلنی شمارش شود.

مواردی که نسبت تعداد باکتری در خون گرفته‌شده از سوند به خون گرفته‌شده از ورید **۵:۱ تا ۱۰:۱ باشد(۱= ورید و ۱۰= سوند)** منشأ عفونت، سوند خونی است و مشخص‌کنندهٔ سپتی سمی وابسته به کاتتر است(۱، ۷، ۱۰، ۱۸ و ۲۳).

NPV برابر ۹۹ درصد است و درصورت منفی‌شدن، عفونت خون رد می‌شود.

PPV ۷۳-۶۳ درصد گزارش شده‌است. کشت خون مثبت باید با بالین بیمار مقایسه‌شود.

در مواردی که کشت خون از کاتترهای نوع Tunneld انجام‌شود، به کشت خون از ورید نیاز نیست و تعداد $\geq 10^2$ نشانهٔ عفونت وابسته به سوند است.

سواب و رنگ‌آمیزی گرم

در مواردی که به عفونت در محل ورود سوند مشکوک شویم، این روش با ارزش است. همچنین، از رنگ‌آمیزی گرم و رنگ فلورسنت Acridine Orange در روش Touch preparation از نوک سوند استفاده‌می‌شود که ارزش آن به‌ویژه دربارهٔ رنگ‌آمیزی گرم محدود است.

درصورت مثبت‌شدن کشت از محل ورود سوند، کشت خون هم‌زمان برای تفسیر لازم است(۹).

عامل عفونت در مادهٔ تزریقی[1]

نمونه در محیط کشت مایع تلقیح و به‌صورت هوازی و بی‌هوازی به‌مدت **۱۰ روز** در حرارت **۳۰–۳۲°C** نگهداری‌می‌شود. هم‌زمان کشت خون از ورید بیمار انجام‌می‌شود.

۵. کشت فرآورده‌های بانک خون

آلودگی باکتریال فرآورده‌های خونی نادر، ولی بااهمیت است. در جدول ۵–۸ عوامل باکتریال نشان داده شده‌است.

جدول ۵–۸: Bacterial organisms implicated in transfusion reations

Organism(s)

1. Infusate

Coagulase-negative Staphylococci ……
Enterobacter agglomerans ……
Enterobacter cloacae ……
Escherichia coli ……
Flavobacterium meningosepticum ……
Klebsiella pneumoniae ……
Propionibacterium acnes ……
Pseudomonas aeruginosa ……
Pseudomonas cepacia ……
Pseudomonas fluorescens ……
Pseudomonas putida ……
Salmonella choleraesuis ……
Staphylococcus aureus ……
Staphylococcus epidermidis ……
Yersinia enterocolitica ……

منبع: ٤

تعدادی از گرم منفی‌ها توانایی رشد و تکثیر در حرارت ۰-۶°C را دارند، مانند Yersinia entrocolitica، *Pseudomonas* fluoressens ، *Pseudomonas* putida و *Enterobacter* spp. حتی تعداد کم این باکتری‌ها می‌توانند در فرآورده‌های خونی در مدت ۳-۲ هفته مقادیر زیادی اندوتوکسین تولیدکنند که به شوک‌های خطرناک پس از تزریق منجرمی‌شود. گرم مثبت‌ها رشد ضعیفی در سرما دارند و ازطریق محصولات نگهداری‌شده به مدت طولانی در سرما، به‌ندرت باعث ایجاد آلودگی و عفونت می‌شوند. لیستریا، باسیل گرم مثبتی است که توان رشد در سرما را دارد، ولی جزء عوامل معمول جداشده از این طریق نیست.

فرآوردهٔ پلاکت که در حرارت ۲۲°C نگهداری‌می‌شود محیط مناسبی برای باکتری‌هایی چون *استافیلوکوک‌ها*، *دیفتروئیدها*، *سودوموناس* و *Enterobacter cloacae* است و بیشتر عفونت‌ها در ارتباط با این باکتری‌ها، ازطریق تزریق پلاکت است.

عفونت‌های پس از تزریق فرآورده‌های خونی ممکن‌است به‌علت تلقیح باکتری از پوست بیمار یا محیط در هنگام تزریق باشد. همچنین، آلودگی آب بن‌ماری[1]

1. Water bath

که برای ذوب محصولات خونی یخ‌زده(مانند FFP) استفاده‌می‌شود، یکی از منابع آلودگی است.

روش

برای تعیین عوامل آلودگی از شیشه‌های کشت خون استفاده‌می‌شود:

۱. ۲۰ml از خون کیسه یا فرآورده‌های خونی مشکوک را برمی‌داریم و در چهار شیشه کشت خون تلقیح‌می‌کنیم، ۵ml-۳ برای هر بطری. حجم نهایی فرآوردهٔ تلقیح‌شده به محیط باید ۱:۱۰ باشد. بطری‌ها را در ۳۵°C و حرارت اتاق ۲۵°C قرارمی‌دهیم(هوازی و بی‌هوازی).

۲. ۱ml-۰/۵ از فرآورده را برای رنگ‌آمیزی گرم استفاده‌می‌کنیم و درصورت مثبت‌شدن ۰/۵ سی‌سی از فرآورده را مستقیماً روی محیط شکلات تلقیح‌می‌کنیم.

۳. تا یک هفته رشد شیشه‌های کشت خون را بررسی‌می‌کنیم. پس از ۱۸ ساعت و ٤٨ ساعت ۰/۵-۰/۲ سی‌سی از محیط مایع را روی محیط شکلات و مکانکی ساب‌کالچر می‌دهیم و هم‌زمان رنگ گرم تهیه‌می‌کنیم.

کشت‌ها را **حداقل** به مدت ٤٨ ساعت(ترجیحاً ۵-۳ روز) در حرارت مناسب انکوبه‌می‌کنیم. درصورت منفی‌شدن نتایج کشت احتمال آلودگی فرآورده‌های خونی بسیار کم است و درصورت مثبت‌شدن برای تأیید، ارگانیسم باید به‌طور هم‌زمان از کشت خون وریدی بیمار نیز جدا شده‌باشد و به‌این دلیل، کشت هم‌زمان از بیمار ضروری است. درصورتی که بیمار کاتتر عروقی داشته‌باشد، کشت باید از کاتتر و سایر مایعات تزریقی نیز انجام‌شود تا بتوان منشأ واقعی عفونت را مشخص‌نمود.

References

1. 1-Mandell L. Gerald: *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 6 TH editions, Elsevier Churchill Livingstone, 2005.

2. Murray R. Patrick: *Manual of Clinical Microbiology*, 8 TH editions, American Society for Microbiology, 2003.
3. Forbes A. Betty: *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology,* 11 TH editions, Mosby, 2002.
4. Mahon R. Connie: *Textbook of Diagnostic Microbiology*, 2 ED editions, W.B. Saunders, 2000.
5. Isenberg D. Henry: *Clinical Microbiology Procedures Handbook,* American Society for Microbiology, 1992 & 2004.
6. Reduction in Central Line-*Associated Bloodstream Infections among Patients in Intensive Care Units*-Pennsylvania, April 2001-March 2005: MMWR October 14, 2005 / Vol. 54 /No. 40.
7. Nasia Safdar, MD, MS; Jason P. Fine, PhD; and Dennis G. Maki, MD: Meta-Analysis: *Methods for Diagnosing Intravascular Device-Related Bloodstream Infection,* Ann Intern Med. 2005, 142:451-466.
8. Stéphane Hugonnet, Hugo Sax, Philippe Eggimann, Jean-Claude Chevrolet, and Didier Pittet: *Nosocomial Bloodstream Infection and Clinical Sepsis*, Emerging Infectious Diseases, Vol. 10, No. 1, January 2004, CDC.
9. Investigation of Intravascular Cannulae and Associated Specimens, BSOP 20, 2004*, Health Protection Agency*, HPA.org.uk.
10. Issam Raad, MD; Hend A. Hanna, MD, MPH; Badie Alakech, MD; Ioannis Chatzinikolaou, MD; Marcella M. Johnson, MS; and Jeffrey Tarrand, MD: *Differential Time to Positivity: A Useful Method for Diagnosing Catheter-Related Bloodstream Infections*; *Ann Intern Med.* 2004;140:18-25.
11. Joan Barenfanger, Cheryl Drake, Jerry Lawhorn, and Steven J. Verhulst: *Comparison of Chlorhexidine and Tincture of Iodine for Skin Antisepsis in Preparation for Blood Sample Collection,* Journal of Clinical Microbiology, 2004. 42: 2216-2217.
12. Rana A. Hajjeh, Andre N. Sofair, Lee H. Harrison, G. Marshall Lyon, Beth A. Arthington-Skaggs, Sara A. Mirza, Maureen Phelan, Juliette Morgan, Wendy Lee-Yang, Meral A. Ciblak, Lynette E. Benjamin, Laurie Thomson Sanza, Sharon Huie, Siew Fah Yeo, Mary E. Brandt, and David W. Warnock: *Incidence of Bloodstream Infections Due to Candida Species and In Vitro Susceptibilities of Isolates Collected from 1998 to 2000 in a Population-Based Active Surveillance Program Collection*, Journal of Clinical Microbiology, 2004. 42: 1519-1527.

13. Melvin P. Weinstein: *Blood Culture Contamination: Persisting Problems and Partial Progress,* Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41: 2275–2278.
14. David C. McGee, M.D., and Michael K. Gould, M.D.: *Preventing Complications of Central Venous Catheterization*, N Engl J Med 2003; 348:1123-33.
15. Guidelines for the Prevention of Intravascular Catheter-Related Infections: *MMWR, August 9*, 2002 / Vol. 51 / No. RR-10, CDC.
16. Christopher J. Crnich and Dennis G. Maki: *The Promise of Novel Technology for the Prevention of Intravascular Device–Related Bloodstream Infection. I. Pathogenesis and Short-Term Devices*, Clinical Infectious Diseases 2002, 34:1232–42.
17. Rodney M. Donlan and J. William Costerton: *Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms***,** Clinical Microbiology reviews, 2002, 15. 167–193.
18. Leonard A. Mermel,Barry M. Farr, Robert J. Sherertz, Issam I. Raad, Naomi O'Grady, JoAnn S. Harris, and Donald E. Craven: *Guidelines for the Management of Intravascular Catheter–Related Infections*, Clinical Infectious Diseases 2001, 32:1249–72.
19. Veronique Bussy Malgrange, Marie Christine Escande, and Serge Theobald *Validity of Earlier Positivity of Central Venous Blood Cultures in Comparison with Peripheral Blood Cultures for Diagnosing Catheter-Related Bacteremia in Cancer Patients,* Journal of Clinical Microbiology, 2001, 39: 274–278.
20. Stanley Mirrett, Melvin P. Weinstein, Larry G. Reimer, Michael L. Wilson, and L. Barth Reller: *Relevance of the Number of Positive Bottles in Determining Clinical Significance of Coagulase-Negative Staphylococci in Blood Cultures*, Journal of Clinical Microbiology, 2001, 39: 3279–3281.
21. Atul Humar, Aileen Ostromecki, Judy Direnfeld, John C. Marshall, Neil Lazar, Patricia C. Houston, Paul Boiteau, and John M. Conly: *Prospective Randomized Trial of 10% Povidone-Iodine versus 0.5% Tincture of Chlorhexidine as Cutaneous Antisepsis for Prevention of Central Venous Catheter Infection***,** Clinical Infectious Diseases 2000, 31:1001–7.
22. Issam I. Raad: *Management of intravascular catheter-related infection***,** Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2000 45: 267- 270.

23. Francois Blot, Eric Schmidt, Gerard Nitenberg, Cyrille Tancrede, Bernard Leclercq, Agnes Laplanche, and Antoine Andremont: *Earlier Positivity of Central-Venous-versus Peripheral-Blood Cultures Is Highly Predictive of Catheter-Related Sepsis,* Journal of Clinical Microbiology, 1998, 36; 105–109.
24. Yardena Siegman-Igra, Anne M. Anglim, David E. Shapiro, Karim A. Adal, Barbara A. Strain, and Barry M. Farr: *Diagnosis of Vascular Catheter-Related Bloodstream Infection: a Meta-Analysis*, Journal of Clinical Microbiology, 1997, 35: 928–936.
25. Robert J. Sherertz, Stephen O. Heard, and Issam I. Raad: *Diagnosis of Triple-Lumen Catheter Infection: Comparison of Roll Plate, Sonication, and Flushing Methodologies*, Journal of Clinical Microbiology, 1997, 35; 641–646.
26. David P. Dooley, Alfredo Garcia, J. William Kelly, Robert N. Longfield, and Linda Harrison: *Validation of Catheter Semi quantitative Culture Technique for Nonstaphylococcal Organisms*, Journal of Clinical Microbiology, Feb. 1996, 34: 409–412.
27. Maki DG, Weise CE, Sarafin HW: *A semi quantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection*, N Engl J Med. 1977 Jun 9, 296(23):1305-9.

فصل ششم

ارزیابی میکروب‌شناسی و نمونه‌برداری از محیط‌هـای بیمارستانی و وسایل پزشکی

قبل از سال ۱۹۷۰، نمونه‌برداری دوره‌ای از سطوح در محیط‌های بیمـارسـتـانی مانند کف اتاق‌ها، دیـوارهـا و سـطوح میـزهـا امـری معمول بـود. ولـی در بـررسی‌های انجام‌شده مشخص‌شـد:

۱. **میزان بروز عفونت‌های بیمارستانی در ارتبـاط مستقیم با میـزان آلـودگی میکروبی سطوح محیطی نمی‌باشد.**

۲. **استانـدارددهـای قابل اعتمادی برای ارزیابی و ارتباط نتایج کشت از سطوح محیطی و میزان بروز عفونت‌های بیمارستانی وجودندارد.**

۳. **روش‌هـای نمـونـه‌برداری از سـطوح محیـطی بسیـار زمـان‌بـر و پـرهزینه است. به‌خصوص در آزمایشگاه‌هـای میکروب‌شنـاسی بـالینی کـه روش‌های آن براساس شنـاخت ارگانیسم‌هـای مـوجـود در نمونـه‌هـای بـالینی طراحی شـده‌است و نه میـکروب‌شنـاسی محیطی.**

از حدود ۳۰ سال پیش بنـا به توصیهٔ CDC نمونه‌بـرداری و کشت دوره‌ای(روتین) از محیط‌های بیمارستانی کنار گذاشته شده‌است.

باید توجه داشت که سطوح و محیط‌های آلودهٔ میکروبی در مراکز بهداشتی ـ درمانی و بیمارستانی به‌عنوان مخزن بالقوهٔ عفـونت‌های بیمـارستانی اهمیت

دارند. بنابراین، ضدعفونی و تمیزکردن مرتب این سطوح جزء اصلی کنترل عفونت‌های بیمارستانی است. ولی این سطوح آلوده به‌طور مستقیم باعث انتقال عفونت نمی‌شوند و مهم‌ترین راه انتقال عفونت از سطوح محیطی به بیماران ازطریق تماس دست آلوده با بیمار است. بنابراین، شستشوی مرتب و نظافت دست‌ها جزء اصول ابتدایی پیشگیری از عفونت‌های بیمارستانی است.

سطوح محیطی به ۲ دسته تقسیم‌می‌شوند:

۱. سطوح ساختمانی و مبلمان؛

۲. سطوح وسایل پزشکی.

تعداد ارگانیسم‌های سطوح محیطی با عوامل زیر در ارتباط است:

۱. تعداد افراد حاضر در محیط؛

۲. میزان فعالیت افراد؛

۳. میزان رطوبت؛

٤. وجود موادی که رشد میکروبی را تسهیل می‌کند؛

۵. تعداد ارگانیسم‌های موجود در هوا و میزان تهویه؛

٦. تعداد موارد تماس با سطوح؛

۷. نوع سطح و جهت آن(عمودی یا افقی):

- کوکسی‌های گرم مثبت مانند *استافیلوکوک‌ها* و *انتروکوک‌ها* نسبت به شرایط خشک مقاوم‌اند و در غبار روی سطوح تا مدت‌ها زنده‌می‌مانند و می‌توانند از راه قطرات کوچک در هوا(Droplet) نیز به بیمار منتقل‌شوند.
- باکتری‌های گرم منفی در شرایط مرطوب و سطوح مرطوب بهتر باقی‌می‌مانند و از راه Droplet به‌ندرت منتقل‌می‌شوند.
- قارچ‌ها در شرایط و سطوح مرطوب و الیاف رشته‌ای پایدار می‌مانند و تکثیر می‌شوند.

استافیلوکوک‌ها

استافیلوکوک‌ها و گونه‌های مقاوم *استافیلوکوک اورئوس* (MRSA)[1]

در اتاق‌های عمل، بخش‌های سوختگی و نوزادان اهمیت ویژه‌ای دارد. این ارگانیسم‌ها می‌توانند ازطریق قطرات تنفسی جداشده از ابتدای مجرای بینی افراد کلنیزه در محیط و روی سطوح پخش شوند و به‌این علت افراد مخزن اصلی و پایدار به‌شمار می‌آیند. *استافیلوکوک‌ها* از سطوح مختلفی مانند گوشی پزشکی، کف اتاق‌ها، چارت‌های پزشکی، مبلمان، تی شستشوی زمین، مخزن‌های آب‌درمانی جدامی‌شوند که به‌جز مخزن‌های آب‌درمانی در سایر موارد تأثیر محیط‌های آلوده در انتقال باکتری کم‌اهمیت است. این باکتری روی سطوح خشک به‌مدت ۲۷-۲۶ روز زنده‌می‌ماند.

انتروکوک‌ها

انتروکوک‌های مقاوم به وانکومایسین (VRE)[2]

E.faecium شایع‌ترین گونهٔ جداشده در میان انواع VRE از محیط‌های بیمارستانی است. بیماران کلنیزه مهم‌ترین مخزن بیماری محسوب‌می‌شوند. به‌ویژه بیماران با ضعف سیستم ایمنی مانند بیماران پیوندی، بیماران بستری در ICU، کسانی که سابقهٔ بستری داشته‌اند و آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف به‌خصوص وانکومایسین دریافت‌کرده‌اند. این بیماران اگر دچار اسهال باشند، بیشتر محیط را آلوده‌می‌کنند. ممکن‌است تعداد زیادی از سطوح محیطی آلوده‌شوند، به‌خصوص سطوحی که بیشتر لمس می‌شوند، مانند میلهٔ تخت بیمار، دستگیره‌های در، گان، کاف دستگاه فشار خون، میز و صفحه‌کلید رایانه، میز کنار تخت بیمار و وسایل پزشکی مختلف. آلودگی با VRE در سطوح آزمایشگاهی در بیمارستان نیز دیده شده‌است.

1. Methicillin Resistant Staphylococcus aureus
2. Vancomycin Resistant Enterococci

انتروکوک‌ها بسیار مقاوم هستند و می‌توانند در سطوح خشک به‌مدت طولانی پایدار بمانند(۷ روز تا ٤ ماه). درصورت آلوده‌شدن دست یا دستکش با این باکتری تا ٦۰ دقیقه می‌توان آن را از روی این سطوح جداکرد. **تمیزکردن دقیق اتاق بیماران و وسایل پزشکی در کنترل سوش‌های VRE و MRSA اهمیت دارد، ولی در این موارد به ضدعفونی‌کننده‌های قوی‌تر نیاز نیست. این باکتری‌ها در مقابل آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم است، نه مواد ضدعفونی‌کننده.** وجود VRE و MRSA در سطوح محیطی به معنی آن نیست که بیمار با این باکتری‌ها آلوده خواهدشد. **نمونه‌برداری دوره‌ای برای تشخیص VRE و MRSA توصیه‌نمی‌شود، ولی در مواقعی که بخواهیم اثربخشی روش‌های تمیزکردن و ضدعفونی را ارزیابی کنیم، توصیه‌می‌شود.**

اسینتوباکترها[1]

باکتری‌های گرم منفی در محیط‌ها و سطوح مرطوب پایدار می‌مانند و به‌ندرت از راه هوا منتقل‌می‌شوند. ولی *اسینتوباکتر* استثنا است و از راه قطره‌های کوچک در هوا نیز قابل انتقال است که یکی از دلایل عمدهٔ شیوع باکتری در سال‌های اخیر است. این باکتری در بخش‌های ICU و سوختگی شایع است و بروز آن در ماه‌های گرم سال(تیر تا آبان) بیشتر می‌شود. می‌توان *اسینتوباکتر* را از سطوح خشک محیطی مانند میلهٔ تخت بیمار، پیشخوان، دستشویی و ظرفشویی، کابینت تخت بیمار، رختخواب، تشک، ملحفه، لحاف، تلفن و کف اتاق‌ها، چارت‌های پزشکی و سطوحی که بیشتر لمس‌می‌شوند، جداکرد. همچنین، *اسینتوباکتر* از سطوح و فضای محیط‌های مرطوب مانند وانتیلاتورهای تنفسی و دستگاه‌های بخور سرد و گرم جدامی‌شود. *اسینتوباکتر* مانند *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم است و روی سطوح خشک حدود ۲۷-۲٦ روز زنده می‌ماند. از آنجا که *اسینتوباکتر* از منابع مختلفی

1. Acinetobacter

جدامی‌شود، نقش آزمایشگاه در مواردی که ضرورت داشته‌باشد، در پیداکردن منبع اصلی عفونت مهم است. **ولی باید توجه‌داشت فقط جداسازی باکتری اهمیت ندارد و برای پیداکردن منبع عفونت به روش‌های بیوتایپینگ و ژنوتایپینگ(روش‌های مولکولی) نیاز است.**

نمونه‌برداری میکروب‌شناسی از سطوح محیطی

موارد کاربرد نمونه‌برداری از محیط:

۱. پیداکردن مخزن‌های عوامل بیماری‌زای بالقوه در محیط(کاربرد تحقیقاتی دارد)؛
۲. ارزیابی زمان زنده‌ماندن ارگانیسم‌ها در محیط(کاربرد تحقیقاتی دارد)؛
۳. پیداکردن منشاء آلودگی محیط(کاربرد تحقیقاتی دارد)؛
٤. درصورت بروز اپیدمی بیمارستانی و در مواردی که شواهد اپیدمیولوژیک بر انتشار عامل عفونت از سطوح محیطی و وسایل پزشکی به‌عنوان منبع ـ مخزن عفونت بیمارستانی دلالت کند، **برای تأیید ارتباط بین عوامل جداشده از محیط و بیمار به روش‌های مولکولی نیاز است؛**
۵. ***کنترل کیفی و ارزیابی روش‌های ضدعفونی و تمیزکردن در زمانی که نیاز باشد.***

از آنجا که نمونه‌گیری و کشت دوره‌ای(روتین) از سطوح توصیه‌نمی‌شود، زمانی که به این کار نیاز باشد باید هدف، برنامه و روش مشخص باشد و قبل از نمونه‌گیری به این موارد توجه‌شود:

۱. اطلاعات اولیه و دلایل اپیدمیولوژیک؛
۲. محل نمونه‌گیری، روش، وسایل مناسب و تعداد دفعات نمونه‌گیری و کشت.

مجموعهٔ این عوامل باید با همکاری کمیتهٔ کنترل عفونت‌های بیمارستانی و در هر بیمارستان با توجه به بخش‌های آن تعیین‌شود.

روش‌های آزمایشگاهی

باتوجه به نبود دستورالعمل‌های استاندارد برای کشت و تفسیر نتایج آن از سطوح محیطی، بسته به نیاز واحد بهداشتی ـ درمانی، موارد زیر باید تعریف‌شوند:

۱. محل و روش نمونه‌گیری شامل روش فیزیکی نمونه‌برداری؛
۲. تعداد نمونه‌های گرفته‌شده شامل زمان و ارزش بالینی؛
۳. روش ارزیابی کشت و نمونه‌گیری شامل روش کمّی وکیفی، حجم نمونه، نوع محیط کشت، محلول‌های مورد نیاز، میزان رقت‌ها و مواد خنثی‌کننده(در مواردی که نمونه‌برداری از سطوحی باشد که قبلاً ضدعفونی شده‌اند)؛
٤. زمان انکوباسیون، فاصلهٔ بین نمونه‌گیری و انتقال آن به آزمایشگاه، تشخیص و تفسیر.

محیط‌های کشت برای روش‌های کمّی و کیفی

۱. محیط جامد(آگار) مغذی و غیرانتخابی شامل TSA[1] یا محیط پایهٔ بلاد آگار یا BHI[2] یا ٪5 SBA[3] یا شکلات آگار؛
۲. محیط‌های مایع TSB[4] یا BHI؛
۳. محیط‌های انتخابی جامد و مایع شامل مکانکی آگار برای گرم منفی‌ها، Cetrimide Agar برای *Pseudomonas aeruginosa*، سابرودکستروز برای قارچ‌ها و ... .

1. Tryptic Soy Agar
2. Brain-Heart Infusion Agar
3. Sheep Blood Agar
4. Tryptic Soy Broth

محلول‌ها

برای نمونه‌برداری و رقیق‌سازی از سطوح محیطی و ابزارهای پزشکی محلول‌های مختلفی به‌کار می‌رود که پرمصرف‌ترین آن سرم فیزیولوژی استریل سالین Nonbacteriostatic است.

نمونه‌برداری به‌وسیلهٔ سواب استریل یا اسفنج استریل انجام‌می‌شود. روش نمونه‌گیری در قسمت‌های بعد توضیح داده خواهدشد. پس از نمونه‌گیری سواب را برای استخراج ارگانیسم در محلول‌های شستشو مانند سالین استریل یا محیط مایع TSB قرارمی‌دهند. همچنین، به‌جای این روش می‌توان از محیط‌های کشت آماده استفاده‌کرد و سطح محیط آگار را به‌طور مستقیم با سطح محل نمونه‌برداری تماس‌داد. این نوع محیط‌ها RODAC[1] نامیده‌می‌شوند.

- محلول‌های شستشو برای سطوحی که ضدعفونی نشده‌اند شامل سالین یا TSB است.
- محلول‌های شستشو برای سطوحی که ضدعفونی شده‌اند و احتمال باقی‌ماندن مواد ضدعفونی‌کننده وجوددارد باید حاوی مواد خنثی‌کننده مانند Lecithin + Tween 80 (برای آمونیوم چهارظرفیتی) یا Glycine(برای گلوتاروئید و فرمالدئید) یا Sodium Thiosulfate (برای یُد و کلرین) باشد.

برای سادگی کار و در مواردی که نوع مادهٔ ضدعفونی‌کننده مشخص نیست، می‌توان از محیط‌های مایع TSB یا BHI استفاده‌کرد که با غلظت دو برابر حالت عادی تهیه‌شده‌اند.

BHI یا TSB × ۲[2]، برای مثال، برای ۱۰۰ سی‌سی محیط مایع DS-TSB، دو برابر حالت عادی محیط پایه را به ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر اضافه‌می‌کنیم.

1. Replicate Organism Direct Agar Contact
2. Double-Strength Broth

کشت سطوح محیطی

روش کمّی

۱. از محلولی که سواب داخل آن قرار گرفته‌است رقت ۱/۱۰ و ۱/۱۰۰ تهیه‌می‌کنیم و ۰/۱ml از محلول اولیه و رقت‌های ۱/۱۰ و ۱/۱۰۰ را روی سطح آگارمانند کشت ادرار کشت‌می‌دهیم. پس از انکوباسیون، پلیتی را که بین ۳۰۰-۳۰ کلنی دارد، می‌شماریم و با توجه به ضریب رقت و حجم برداشت‌شده، تعداد باکتری را محاسبه و در واحد سطحی که نمونه‌گیری‌شده گزارش می‌کنیم.

۲. روش فیلتر: در این روش حجم مشخصی از محلول حاوی ارگانیسم را که در مراحل قبل تهیه‌شده از فیلتر ۰/۴۵ یا ۰/۲۲ عبورمی‌دهیم و سپس فیلتر حاوی باکتری را مستقیم روی آگار می‌گذاریم و کشت‌می‌دهیم. این روش برای سطوحی که ضدعفونی شده‌اند مناسب است؛ چون به مواد خنثی‌کننده نیاز نیست. در این روش پلیتی شمرده می‌شود که بین ۲۰۰-۲۰ کلنی دارد.

۳. روش Pour plate: روشی دقیق، ولی سخت و زمان‌بر است. ۳-۲ سی‌سی محلول اولیه یا رقیق‌شده را با محیط کشت جامد ذوب‌شده در حرارت ۴۶°C-۴۴ (مانند اضافه‌کردن خون به محیط بلاد آگار) مخلوط‌می‌کنیم و در پلیت می‌ریزیم. پس از جامدشدن، انکوبه می‌کنیم و باکتری‌های رشدکرده را می‌شماریم. باید توجه‌داشت که کلنی‌های عمقی به زمان بیشتری برای رشد نیاز دارند.

روش کیفی

روش انتخابی: درصورتی که به‌دنبال ارگانیسم‌های خاص درمیان مجموعه‌ای از عوامل میکروبی باشیم می‌توانیم از محیط TSB استفاده‌کنیم. ۰/۵ml از محلول TSB را روی محیط‌هایی مانند مکانکی آگار یا ستریمید آگار یا محیط‌های انتخابی جهت کشت *استافیلوکوک‌ها*، *انتروکوک‌ها* یا ... کشت دهیم.

محیط TSB اولیه را به‌مدت ۲۴-۴ ساعت انکوبه می‌کنیم تا درصورتی که تعداد اولیه باکتری کم باشد، تکثیرشود و درصورت کدورت، TSB را برای بار دوم روی محیط‌های جدید ساب‌کالچر می‌دهیم.

نمونه‌برداری از سطوح محیطی

روش سواب

سواب استریل را با محیط مایع استریل یا سالین استریل آغشته‌می‌کنیم. مایع اضافی را با فشردن سواب به قسمت داخلی لوله می‌گیریم و از سطح موردنظر با حرکت گردشی و یک‌طرفهٔ سواب نمونه برمی‌داریم. بهتر است این سطح اندازهٔ مشخصی داشته‌باشد تا هنگام گزارش، تعداد کلنی در واحد سطح گزارش‌شود. پس از کوتاه‌کردن و دورانداختن قسمت چوبی که در تماس با دست بوده‌است، سواب را داخل مایع شستشو(سالین یا TSB) با حجم مشخص(۱۰-۵ سی‌سی) می‌گذاریم. درپوش لوله را می‌بندیم و ۵۰ بار آن را سروته یا به‌مدت ۳۰ ثانیه با دور بالا ورتکس می‌کنیم. از این محلول برای کشت‌های توضیح داده‌شده استفاده‌می‌کنیم.

روش غوطه‌ورکردن

می‌توان محلول شستشوی استریل را(سالین یا TSB) در ظرف بزرگ‌تر و استریل ریخت(مانند ظرف‌های ۵۰ سی‌سی جمع‌آوری نمونه BAL). درصورتی که نمونهٔ موردنظر به‌اندازه‌ای کوچک باشد که در این ظرف جاشود، آن را درون ظرف حاوی محلول می‌گذاریم و به‌مدت ۱ دقیقه به‌شدت تکان‌می‌دهیم. از محلول حاصل به روش‌های گفته‌شده کشت می‌دهیم. همچنین، می‌توان محلول TSB یا سالین استریل را مستقیم درون ظرف‌ها یا لوله‌های کوچکی که مشکوک به آلودگی هستند، بریزیم. به‌این صورت که ۵۰-۱۰ سی‌سی از محلول سالین یا

TSB را داخل ظرف می‌ریزیم و آن را ۵۰ بار سروته می‌کنیم. سپس حجم معینی از آن را کشت‌می‌دهیم یا از فیلتر عبور و فیلتر را کشت می‌دهیم.

روش RODAC

روشی ساده، ولی بسیار پرهزینه است. محیط‌های کشت آمادهٔ مصرف روی صفحه‌های پلاستیکی انعطاف‌پذیر قراردارند. محیط‌ها می‌توانند عمومی مانند TSA ساده یا دارای مواد خنثی‌کننده یا انتخابی مانند مکانکی باشند.

در این روش، پس از برداشتن پوشش محافظ سطح آگار، آگار پلیت را به‌طور مستقیم با سطح نمونه‌برداری تماس می‌دهیم. پس از گذاشتن مجدد محافظ، پلیت‌ها را ٤٨ ساعت در انکوباتور قرارمی‌دهیم و تعداد کلنی‌ها را می‌شماریم. باید توجه داشت اگر بخواهیم از یک اتاق بیمارستانی نمونه برداریم، برای ازبین بردن خطای انتخاب محل نمونه‌گیری حداقل به ۱۵ عدد محیط RODAC نیاز داریم.

برای تفسیر کشت محیط‌های RODAC جدول زیر پیشنهاد می‌شود.

Colonies per Rodac plate			
0 = excellent	0-25= good	26-50 = fair	50 and over - poor

در اتاق عمل در شرایط مطلوب کمتر از ۵ کلنی روی محیط رشد می‌کند.

تشخیص

حداقل روی ۲ کلنی از مجموع کلنی‌های با مورفولوژی مشابه کارهای تشخیصی انجام‌می‌دهیم. میزان کار تشخیصی انجام‌شده به اهداف ابتدایی، امکانات موجود و اهداف اپیدمیولوژیک درجهت ارزیابی شیوع یک بیماری خاص بستگی دارد. در بررسی‌های اپیدمیولوژیک تشخیص تاحد گونه اجباری است. لازم به‌ذکر است که **درحال حاضر، دقیق‌ترین روش برای تشخیص منبع**

آلـودگی و راه انتقـال، روش‌های تأییدی مولکولی روی بـاکتری‌های جداشـده است.

تفسیر

۱. لوازم پزشکی Critical: مانند وسایل جراحی و وسایلی کـه در بافت‌هـای استریل نفوذ می‌کنند؛ هیچ باکتری یا اسپوری نباید وجود داشته‌باشد.

۲. لوازم پزشکی Semicritical: مانند آندوسکوپ که با غشاهای مخاطی تماس دارد؛ هیچ باکتری نباید وجود داشته‌باشد، به‌جز باکتری‌های غیربیماری‌زای اسپوردار مانند *باسیلوس* و *کلستریدیوم* که گاهی دیده‌می‌شود.

۳. لوازم پزشکی Noncritical: مانند گوشی پزشکی که بـا پوست سـالم تماس دارد؛ باکتری‌های بیماری‌زا نباید وجود داشته‌باشد. **باید توجه‌داشت کـه ایـن معیـار از جنبهٔ میـکروب‌شناسی است و از دیـدگاه اپیدمیولوژیک، چنـانکه در مبـاحث قبل گفته‌شد، فقط جداسازی یک باکتری بیماری‌زا بـر راه انتقال دلالت نمی‌کند و برای تأیید به روش‌های بیوتایپینگ و مولکولی نیاز است.**

٤. سطوح محیطی Noncritical: شامل سطوحی است که در تماس مستقیم با بیمار نیستند، مـانند سطوح کف و دیوارهـا یـا دستگاه‌هـایی مانند X-ray و همودیالیز؛ اصولاً این سطوح در انتقال عوامل عفونی تـأثیر کمـی دارنـد و برای این سطوح تمیزی ظاهری و نبودن بیماری‌زاهای شناخته‌شده کافی است.

برای تشخیص میـزان رعـایت اصول بهـداشتی در این سطوح محیطی جدول ذیل پیشنهاد می‌شود.

Gram Stain Results	
Excellent Sanitation	No growth
Good Sanitation	Free of gram negative rods and gram positive cocci
Fair Sanitaion	Free of gram negative rods but containing some gram positive cooci

Poor Sanitaion	Gram negative rods present

باید توجه‌داشت که رشد بیماری‌زاهای خاص همیشه نشانهٔ آلـودگی سطوح نیست و ممکن‌است با نمونه‌گیـری نامناسب، خطا درحین کار و مراحل پس از آن در ارتباط باشد. برای جلوگیری از گزارش اپیـدمی کاذب، انجـام‌دادن روش‌هـای فوق نیازمند کارکنانی دقیق، با حوصله و آموزش‌دیده است که تمام مراحل را به‌نحو احسن انجام‌دهند. توصیه‌می‌شود آزمایشگاه به‌منظور جلوگیری از آلودگی درحین کار، کشت را در زیر کابینت بیولوژیک کلاس ۲ انجام‌دهد.

References

1. Isenberg D.Henry: *Clinical Microbiology Procedures Handbook,* Second editions, American Society for Microbiology, 2004.
2. *Guidelines for Environmental Infection Control in Health-Care Facilities,* Recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee, 2003.
3. Murray R. Patrick: *Manual of Clinical Microbiology,* 8 TH editions, American Society for Microbiology, 2003.
4. Forbes A. Betty: *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology,* 11 TH editions, Mosby, 2002.

فصل هفتم

نمونه‌برداری از هوا

آلوده‌کننده‌های بیولوژیک هوا که به‌عنوان آئروسل شناخته‌می‌شوند شامل باکتری‌ها، قارچ‌ها، ویروس‌ها و پولن‌ها هستند. آئروسل‌ها ذرات جامد، مایع یا ذرات معلق در هوا هستند. ۵ دقیقه صحبت‌کردن و سرفه‌کردن هر کدام ممکن‌است ۳۰۰۰ قطره تولیدکند. همچنین، عطسه‌کردن حدوداً ٤۰۰۰۰ قطره ایجادمی‌کند که سپس بخار و به ذراتی حدود ۱۲-۰/۵ میکرومتر تبدیل‌می‌شوند. به‌طور معمول، اندازهٔ ذرات تشکیل‌دهندهٔ آئروسل‌های بیولوژیک متفاوت‌اند(کمتر از ۱ میکرومتر تا بیشتر از ۵۰ میکرومتر). ممکن‌است این ذرات شامل یک نوع ارگانیسم به‌صورت جدا از هم یا یک مجموعهٔ به‌هم چسبیده مرکب از تعدادی باکتری باشد. این مجموعه‌ها معمولاً شامل ذرات گردوغبار، مواد آلی و غیرآلی خشک هستند. شکل‌های رویشی باکتری‌ها و ویروس‌ها نیز ممکن‌است در هوا وجود داشته‌باشند. همچنین، اسپور باکتری‌ها یا قارچ‌ها نیز به میزان کمتر در هوا وجوددارند.

عوامل تعیین‌کنندهٔ پایداری میکروارگانیسم در یک بیوآئروسل به‌شرح زیر است:

۱. محیط معلق در آن؛

۲. دما؛

۳. رطوبت مناسب؛

٤. حساسیت به اکسیژن؛

۵. تماس با U.V. یا پرتوهای الکترومگنتیک.

بیشتر سلول‌های رویشی برای مدت طولانی در هوا زنده نمی‌مانند مگر آنکه رطوبت مناسب و عوامل دیگر مورد نیاز برای ادامهٔ حیاتشان وجود داشته‌باشد و یک پوشش محافظ ارگانیسم را بپوشاند(مواد آلی خشک یا غیرآلی). بیماری‌زاهایی که در مقابل خشکی مقاومت می‌کنند(مانند گونه‌های *استافیلوکوک*، *استرپتوکوک* و *اسپورهای قارچی*) می‌توانند برای مدت طولانی‌تر زنده بمانند و در فاصله‌های زیاد توسط هوا جابه‌جا شوند. همچنین، آنها می‌توانند روی سطوح بنشینند و همراه جریان هوا دوباره به‌عنوان آئروسل ثانوی طی فعالیت‌های روزانه(مانند جاروکردن و مرتب‌کردن رختخواب‌ها) منتقل‌شوند.

نمونه‌برداری میکروبیولوژیک هوا

در اتاق‌های عمل و محیط‌هایی که غذاهای مخصوص یا مواد دارویی آماده‌می‌شود و در بخش‌های بیمارستانی که احتمال ایجاد اپیدمی و عفونت‌های انتقالی از محیط وجوددارد، برای شناسایی بیماری‌زاهای موجود آزمایش هوا توصیه‌می‌شود. تعداد باکتری‌های هوا در هر زمان به عوامل مختلفی بستگی دارد که مهم‌ترین آنها تعداد افراد حاضر در محیط و میزان فعالیت بدنی آنهاست. **پس از تخلیهٔ اتاق، میزان باکتری هوا پس از حدود ۳۰ دقیقه به حداقل ممکن کاهش‌می‌یابد.**

از دیگر عوامل مؤثر در تعداد باکتری‌ها دما، زمان خاصی از روز، فصل، سال، رطوبت، غلظت باکتری و کارآیی سیستم تهویهٔ هوا است.

برای ارزیابی صحیح نمونه‌برداری از هوا، نتایج باید با سایر نتایج به‌دست آمده از مناطق دیگر و با شرایط یا دورهٔ زمانی مختلف مقایسه شوند.

ملاحظات اولیه برای نمونه‌برداری از هوا

۱. درنظر گرفتن مشخصات و شرایط آئروسل:

- محدودهٔ اندازهٔ ذرات، **ذرات بزرگ‌تر از ۵ میکرومتر به‌طور کامل در دستگاه تنفسی فوقانی به دام می‌افتد و با عمل اولیهٔ مژه‌ها برگردانده می‌شوند. ذرات کوچک‌تر از ۵ میکرومتر به ریه می‌رسند، اما فقط ذرات با اندازهٔ ۲-۱ میکرومتر در آلوئل‌ها به دام می‌افتند؛**
- غلظت میکروارگانیسم؛
- عوامل محیطی.

۲. تعیین نوع وسیلهٔ نمونه‌برداری، زمان و مدت نمونه‌برداری.

۳. تعیین تعداد نمونه‌هایی که باید برداشته‌شوند.

٤. اطمینان از متناسب‌بودن ابزار در دسترس.

۵. تعیین روش سنجش که میزان جداسازی میکروارگانیسم‌ها را به‌طور مطلوب تضمین خواهدکرد.

٦. تعیین آزمایشگاه مرجع که بتواند پشتیبانی‌های لازم برای بررسی‌های میکروبیولوژی را تدارک ببیند.

۷. اطمینان از اینکه نمونه‌ها در یخچال نگهداری‌می‌شوند(درصورتی که نتوان آن را بلافاصله در آزمایشگاه بررسی‌کرد).

در جدول ۷-۱ روش‌ها و وسایل شناسایی و نمونه‌برداری و شمارش مشخص شده‌اند که موارد زیرا را شامل می‌شوند:

۱. عبور هوا از مایعات[1]،

۲. برخورد در سطوح جامد[2]،

1. Impingement in liquids
2. Impaction on solid surfaces

۳. رسوب دادن[1]،
٤. فیلتراسیون[2]،
۵. سانتریفوژ کردن[3]،
٦. پرسیپیتاسیون الکتروستاتیک[4]،
۷. پرسیپیتاسیون گرمایی[5].

از بین این روش‌ها عبور هوا از مایعات، برخورد در سطوح جامد و سدیمانتاسیون(به‌وسیلهٔ قراردادن پلیت‌ها) برای مقاصد نمونه‌برداری هوا در مرکز بهداشتی استفاده شده‌است. چند وسیله برای نمونه‌برداری از باکتری‌های منتقله از هوا و قارچ‌ها معرفی شده‌اند. برخی وسایل نمونه‌برداری امکانات کاملی دارند که فقط به یک منبع مولد و محیط جمع‌آوری‌کنندهٔ مناسب نیاز دارند. اما سایر دستگاه‌ها به تجهیزات کمکی مانند پمپ مکش و یک وسیلهٔ اندازه‌گیری جریان هوا(فلومتر یا آنومتر) نیازمند است.

سدیمانتاسیون با استفاده از قراردادن پلیت‌ها انجام می‌شود؛ بنابراین، به وسایل یا تجهیزات ویژه نیاز ندارد. انتخاب وسیلهٔ نمونه‌برداری هوا، نیارمند شناخت دقیق شرایط و داشتن اطلاعات کافی ذیل است:

۱. ارگانیسم ویژه یا ارگانیسم‌هایی که ممکن‌است در هوا وجود داشته‌باشند؛
۲. غلظت ارگانیسم‌های زنده؛
۳. تغییر غلظت ارگانیسم‌ها متناسب با زمان؛
٤. دامنهٔ توزیع اندازهٔ ذرات جمع‌آوری‌شده؛
۵. برای ارزیابی صحیح لازم است مقایسه‌ای بین تعداد میکروارگانیسم‌های محل نمونه‌گیری با هوای خارج از محل نمونه‌گیری انجام‌شود.

1. Sedimentation
2. Filteration
3. Centrifugation
4. Electrostatic precipitation
5. Thermal precipitation

همکاری متخصص اپیدمیولوژی، بهداشت کار صنعتی، فرد آموزش‌دیده‌ای از آزمایشگاه و میکروبیولوژیست‌های محیطی در انتخاب روش و وسیلهٔ مناسب مفید خواهدبود.

جدول ۷-۱: Air sampling method and examples of equipment

Method	Principle	Suitable for measuring	Collection media or surface	Rate of collection (L/min)	Auxilliary equipment needed	Points to consider	Prototype samplers
(A) Impingement in liquids	Air drawn through a small jet and directed against a liquid surface	Viable organisms, and concentration over time. Example use: sampling water aerosols to *Legionella* spp.	Buffered gelatin tryptose saline peptone nutrient broth	12.5	Yes	Antifoaming agent may be needed. Ambient temperature and humidity will influence length of collection time	Chemical Corps All Glass Impinger (AGi)
(B) Impaction on Solid Surfaces	Air drawn into the sampler, particles deposited on a dry surface	Viable particles; viable organisms(on non – nutrient surfaces limited to organisms that resist drying and spores); size measurement, and concentration over time. Example use: sampling air for *Aspergillus* spp., fungal sporcs	Dry surface coated surfaces and agar	28 (sieve) 30 – 800 (slit)	Yes	Available as sieve impactors or slit impactors Sieve impactors can be set up to measure particle size Slit impactors have a rotating support stage for agar plates to allow for measurement of concentration over time	Andersen Air Sampler (sieve impactor): TDI, Cassella MK – 2 (slit impactors)
(C) Sedimentation	Particles and micro organisms settle on to surfaces via gravity	Viable particles. Example uses: sampling air for bacteria in the vicinity of and during a medical procedure: general measurements of mirobial air quality.	Nutrient media (agars) on plates or slides	—	No	Simple and inexpensive: best suited for qualitative sampling: significant airborne fungal spores are too buoyant to settle efficiently for collection using this method	Settle plates

روش‌ها

الف) عبـور هوا از مایعات(Impingement in liquids): اصول این روش بر مکش هوا از میان یک موتور کـوچک و خروج آن در مقابل یک سطح مایع است. کاربرد آن برای تعیین ارگانیسم‌هـای زنـده و غلظت آنها در مدت زمان معین است(مانند نمونه‌برداری آئروسل‌هـای آب برای گونه‌های *لژیونلا*).

ب) برخورد در سطوح جامد(Impaction on Solid Surfaces): اصول این روش مکش هوا به‌وسیلهٔ سیستم جمع‌کنندهٔ ذرات و رسوب دادن آنها روی سطح جامد است و کاربرد آن در این موارد است:

۱. ارگانیسم‌های زنده‌ای که روی سطوح غیرمغذی وجوددارند؛

۲. ارگانیسم‌های مقاوم به شـرایط خـشک، مـانند اسپـورهـا(نمونه‌برداری هوا برای *آسپرژیلوس* و *اسپورهای قارچ*).

ج) رسوب‌دادن(Sedimentation): ذرات و میکروارگانیسم‌ها براساس سنگینی‌شان روی سطوح می‌نشینند. کاربرد آن در نمونه‌برداری از ذرات زنده مانند نمونه‌برداری هوا برای باکتری‌ها است که باید در کنار سایر روش‌ها استفاده شود.

در انتخاب وسایل نمونه‌برداری عوامل زیر باید درنظر گرفته‌شود:

۱. نوع ارگانیسمی که باید نمونه‌برداری شود؛

۲. انطباق با روش انتخابی سنجش؛

۳. حساسیت ارگانیسم‌ها به روش نمونه‌برداری؛

٤. غلظت‌های احتمالی و اندازهٔ ذرات؛

۵. درصورتی که نوع باکتری به‌گونه‌ای باشد که احتمال کلامپینگ[1] وجود داشته‌باشد، باید شکسته‌شود؛

٦. حجم هـوا و مدت زمان نمونه‌برداری؛

۷. میزان آلودگی پایه؛

1. Clumping

۸. شرایط محیط؛

۹. کارایی دستگاه نمونه‌برداری برای جمع‌آوری؛

۱۰. دانش و مهارت فردی که با دستگاه کار می‌کند؛

۱۱. قیمت تمام‌شدهٔ تجهیزات و کیفیت خدمات پشتیبانی پس از فروش.

نمونه‌بردارهای عبور هوا از مایعات و برخورد در سطح جامد کاربرد بیشتری برای نمونه‌برداری باکتری‌ها، ذرات و اسپورهای قارچی دارند؛ زیرا می‌توانند حجم بالایی از هوا را در زمان نسبتاً کوتاه جمع کنند. سیستم نمونه‌برداری که ازطریق سطح جامد است به‌صورت غربالی و شکافی طراحی شده‌است.

در نوع شکافی از یک صفحهٔ دوار استفاده‌می‌شود و امکان تعیین غلظت را در طی زمان مشخص فراهم می‌آورد. نوع غربالی از صفحاتی استفاده‌می‌کند که دارای سوراخ‌ها و حفره‌های کالیبره‌شده با قطرهای مختلف است.

برخی انواع نمونه‌بردارهای سطح جامد از نیروی سانتریفوژ برای به دام انداختن ذرات روی سطح آگار استفاده‌می‌کنند که واجد سوراخ‌ها و حفره‌های کالیبره‌شده با قطرهای مختلف هستند. داخل هر وسیله نیز باید استریل شود تا از آلودگی‌های ناخواستهٔ دستگاه نمونه‌بردار اجتناب شود. نتیجه‌های به‌دست آمده باید به‌صورت تعداد ارگانیسم‌ها یا ذرات در واحد حجم هوا(CFU/m^3) گزارش‌شود.

نمونه‌برداری برای ارزیابی باکتری‌ها به توجهات ویژه نیاز دارد. از آنجا که باکتری‌ها ممکن‌است به‌صورت تک‌تک، مجتمع، مخلوط با غبار، پوشیده‌شده از لایهٔ محافظ مواد آلی خشک یا غیرآلی باشند، استفاده از انواع خاصی از نمونه‌بردارها لازم‌است(برای مثال عبور از مایعات) که به‌طور کامل یا نسبی موجب متلاشی‌شدن تجمعات و ذرات بزرگ می‌شوند. نتیجهٔ نمونه‌برداری نشان‌دهندهٔ تعداد کل ارگانیسم‌های منفرد موجود در هوا است.

اندازه‌گیری آئروسل‌های زنده(بیوآئروسل‌ها) با استفاده از انواع غربالی یا شکافی ساده است؛ زیرا این نمونه‌بردارها ذرات و میکروارگانیسم‌ها را براساس دامنهٔ اندازهٔ آنها جدا می‌کنند. این نمونه‌بردارها باید در ابتدا کالیبره شوند.

روش قراردادن پلیت(برای مثال سدیمانتاسیون یا روش ته‌نشینی) برای سنجش اسپورهای قارچ توصیه‌نمی‌شود. در روش پلیت‌گذاری[1]، جداسازی ارگانیسم‌ها صرفاً براساس سنگینی آنها انجام‌می‌پذیرد و از سرعت جریان هوا متأثر نیست. این روش چند ساعت زمان می‌برد تا کامل شود و ممکن‌است در برخی مناطق قابل استفاده نباشد.

نمونه‌بردارهای هوا بسته به نیازمندی‌های مختلف طراحی شده‌اند و برخی نمونه‌بردارها برای یک نوع نمونه‌برداری و سنجش بر انواع دیگر برتری دارند. به‌هر حال، هیچ نوع نمونه‌برداری و روش سنجشی نمی‌تواند ۱۰۰ درصد تمام ارگانیسم‌های منتقله از هوا را شمارش کنند.

نمونه‌بردار یا روش نمونه‌برداری انتخاب‌شده باید بتواند به‌میزان کافی هوا جمع کند تا تعداد مناسب ذرات در مدت زمان مناسب به‌دست آید و ارزیابی بیولوژیک هوا صحیح باشد.

کشت هوا برای قارچ‌ها

انواع قارچ‌ها از منابع مختلف مانند محیط‌های ساخت‌وساز ساختمان یا محیط‌های گرم مرطوب به سهولت توسط جریان هوا جابه‌جا می‌شوند. استنشاق انواع مختلف قارچ‌های منتقله از هوا پدیده‌ای روزمره و شایع است. در شرایطی که سیستم ایمنی از سلامت کامل برخوردار باشد، این ارگانیسم‌ها

1. Settle Plate

عـارضـه ایجـادنمـی‌کنند. ضعف شدید سیستم ایمنی به‌ویژه در بیماران بستری در بیمارستان، عامل ابتلا به عفونت‌های قـارچی است. بنـابـراین، اتاق‌های تمیز(Clean room) بـایـد از فـشار مثبت سیستم‌های فیلتراسیون و تهویهٔ مناسب برخوردار باشد. **پایش مستمر فعالیت‌های منـدرج در دستورالعمل‌های کنترل شرایط محیطی و شناسایی و ارزیابی منشاء هرگونه قارچ بیماری‌زا یا فرصت‌طلب نوظهور باید در دستور کار کمیتهٔ کنترل عفونت بیمارستانی قرار داشته‌باشـد.** بـروز این‌گونـه عفونت‌هـا ممکن‌است از رعایت‌نکردن روش‌های اجرایی کنترل محیط از یک‌سو یا انجام نـاقص روش‌های کنتـرلی از سـوی دیگر ناشی شود(برای مثال: انتقـال بیمار بـدون ماسک به خارج از محیط تحت کنترل). تفکیک این دو وضعیت اهمیت ویـژه‌ای دارد.

یکی از روش‌های کنترل فعالیت‌های توصیه‌شده، مقایسهٔ میزان آلودگی هوا در محیط‌های ایزوله با محیط‌های معمولی ازنـظر تراکم انواع قارچ‌ها است. نتایـج مقایسهٔ این دو گـروه از یـافته‌هـا، مبنـای پـایش و سنجش‌های بعدی را تشکیل‌می‌دهد. هـر چند نمونه‌برداری دوره‌ای از هوای محیط بیمارستان توصیه‌نمی‌شود، بااین حال، موارد زیر از این قاعده مستثنی هستند:

۱. دریافت گزارش‌های مکرر مبنی بر شناسایی مـوارد عفـونت نـاشی از یک یا چند گونهٔ قارچی محدود و مشابه.
۲. هرگونه فعالیت ساختمانی و ساخت‌وساز که در مجـاورت محل بستری بیماران حساس یا مستعد انجـام‌می‌شود.
۳. پیش از بستری‌کردن بیمار حساس در اتاق جدید یا نوسـاز که تخمینی از میزان تراکم قارچی در آن وجودندارد.
٤. وقتـی روش‌هـای ضـروری بـرای تـمـیـزکـردن هـوا درحـال پـایـه‌ریـزی و انـجـام است.

در پروتکل‌های حفاظت از بیماران پیوندی توصیه شده‌است تا ارزیابی میکروبیولوژیک هوای محیط به فضاهایی محدود شود که بیماران دچار ضعف سیستم ایمنی بستری شده‌اند. چنانچه اتاق یا فضای دیگری در سایر بخش‌ها به سیستم تولید جریان خطی هوا[1] یا تجهیزات فیلتراسیون اتاق‌های تمیز مجهز شده‌باشد(اتاق‌های عمل جراحی، اتاق‌های آماده‌سازی فرآورده‌های تزریقی و ...)، استفاده از شمارش‌گرهای الکترونیکی ذرات معلق در محیط[2] قویاً توصیه‌می‌شود.

ملاحظات پیش از آزمایش[3]

نمونه

۱. انتخاب محل نمونه‌برداری

در عمل برای تعیین میزان اثربخشی فیلتراسیون باید تراکم عناصر قارچی در محیط‌های مختلف تحت کنترل و ایزوله با دیگر محیط‌های محافظت‌نشده مثل اتاق‌های عادی، راهروها و فضاهای عمومی مقایسه شود و نتیجهٔ آن در یک سیستم Scoring به‌صورت کمّی یا کیفی سطح‌بندی شوند. برای مثال، درصورت بروز عفونت‌های مکرر و مشابه که در مقطع زمانی محدود بروزکرده‌اند، مقایسهٔ مذکور باید بین نمونه هوای اتاق‌های آلوده با اتاق‌هایی انجام‌شود که عفونتی در آن گزارش نشده‌است.

۲. حجم نمونه و انکوباسیون

حجم هوای لازم برای نمونه‌برداری براساس پیش‌بینی آلودگی قارچی در محیط تحت بررسی است و به‌وسیلهٔ حجم هوا در واحد زمان تعیین‌می‌شود.

---

1. laminar flow
2. Anerometer
3. Preanalytical Considerations

حجم نمونه باید به‌اندازهٔ کافی باشد تا بتوان اطلاعات لازم را برای شمارش به‌دست آورد. باید توجه داشت که دمای نگهداری کشت‌ها(حرارت اتاق و دمای ۳۷°C) در رشد و شمارش نهایی قارچ‌ها بسیار مؤثر است. برای مثال، طی فصل رشد گیاهان در هوای بیرون تقریباً ۱۰۰۰CFU/m^3 و در بالاترین حد ۱۰۰۰۰۰CFU/m^3 قارچ رشد می‌کند. این تعداد در شرایطی است که کشت‌ها در دمای اتاق نگهداری‌شوند. اما وقتی کشت‌ها در ۳۷°C انکوبه می‌شوند، فقط ۱–۲۰۰CFU/m^3 قارچ رشدمی‌کنند. در فضاهای داخلی با حداقل فیلتراسیون، میزان قارچ حدود $\frac{۱}{۳}$ میزان آن در محیط خارج است. در این مناطق پس از فیلتراسیون با کارایی بالا، تعداد قارچ حداقل به $\frac{۱}{۱۰}$ کاهش‌می‌یابد.

اگر فیلترها مناسب کار گذاشته و نگهداری‌شوند، سیستم‌های فیلتراسیون قسمت اعظم قارچ‌ها را فیلتر می‌کنند و برای ارزیابی، نمونه-ای با حجم بالا(بیشتر از ۱ متر مکعب) لازم است. به‌هرحال، وقتی برف یا یخ محیط بیرون را برای زمان طولانی پوشانده‌باشد، میزان قارچ در محیط خارج بسیار کاهش‌می‌یابد.

۳. وسایل نمونه‌برداری از هوا

براساس اطلاعات موجود، انواع مختلفی از دستگاه‌های نمونه‌برداری در دسترس‌اند که مزایا یا معایب آنها در جدول ۷–۳ آورده شده‌است. بسیاری از دستگاه‌های نمونه‌برداری هوا برای ذرات مختلف به‌غیر از قارچ‌ها استفاده می‌شوند.

نمونه‌بردارهای حجم کم در حد $۱\frac{ft^3}{min}$ یا کمتر عمل‌می‌کنند. بنابراین، زمان نمونه‌برداری ۳۵ دقیقه یا بیشتر طول خواهدکشید

تـا حـجـم کافی هـوا نـمـونـه‌بـرداری شـود. رفـت‌وآمـد زیـاد کـارکـنـان در یـک قـسـمت و زیـاد بودن پـرستاران در بـخش نـمونه‌برداری‌شـده ممـکن‌است نـمونـه‌بـرداری را بـی‌تـأثـیر نمـایـد.

۴. پلیت‌گذاری

این روش در گذشته بیشتر استفاده‌می‌شد، اما اغلب اطلاعات باارزشی به‌دست نمی‌آمد. ذرات منتقله از هوا به‌طور مختلف روی سطوح قرارمی‌گیرند و **از آنجا که کوچک‌ترین ذرات قارچی اغلب مهم‌ترین بیماری‌زاها هستند، در این روش ممکن‌است عوامل بیماری‌زا را ازدست داد.** برای مثال، اسپورهای آسپرژیلوس فومیگاتوس ۳/۵-۲ میکرومتر قطر دارند و توان شناوری آنها در هوا در حضور سطوح ناصاف افزایش‌می‌یابد. بنابراین، فقط روش‌های حجم‌سنجی اطلاعات قابل اعتمادی به‌دست می‌دهند.

۵. نمونه‌برداری از سطوح

درصورتی که تعداد زیادی از ارگانیسم‌های مشابه طی نمونه‌برداری از هوا جداشوند، نمونه‌برداری‌های متوالی از سطوح مشکوک ممکن‌است مفید باشد. چنین نمونه‌برداری‌هایی ممکن‌است برای مرتبط‌ساختن محل‌هایی مانند سینک، کابینت یا مجاری تهویهٔ هوای با قارچ منتقله از هوا مفید باشد. نمونه‌برداری ساده توسط سواب از منطقهٔ مشکوک و انتقال و کشت سواب روی محیط کشت برای بررسی این موارد کافی است.

جدول ۷-۲ فهرست منابع محیطی قارچی را در بیمارستان‌ها نشان‌می‌دهد.

زمانی که هدف فقط تعیین تعداد کلنی‌های قارچی است و انکوباسیون در دمای اتاق انجام شده‌است، گزارش تعداد کلنی‌ها بدون شناسایی گونهٔ قارچ کافی است. وقتی منبع عفونت قارچی

در دمای ۳۷°C بهتر رشد می‌کند، درصورت نیاز بررسی میکروسکوپی و تجدید کشت برای شناسایی بیشتر انجام‌می‌شود.

جدول ۷-۲: منابع محیطی قارچی در بیمارستان‌ها

عفونت بیمار	منبع
زخم‌های جراحی	سیستم هواکش
بله	مواد ضدحریق
بله	سیستم تهویهٔ هوا
بله	عایق‌بندی
بله	پروژه‌های ساختمانی
بله	جاده‌سازی
بله	کبوتر
کلنیزه شدن	مواد غذایی

۶. محیط‌های کشت

توصیه‌می‌شود از محیط‌های کشت قارچ استفاده‌شود که حاوی کلرامفنیکل است(هر پلیت برای یک نمونه). سایر محیط‌های انتخابی موجب تمایز هر چه بیشتر قارچ‌ها خواهدشد. بسیاری از قارچ‌ها روی سایر محیط‌ها نیز جدامی‌شوند.

ملاحظات حین آزمایش[1]

۱. نمونه‌برداری

با اغلب نمونه‌بردارهای هوا می‌توان نمونه‌برداری کرد. دستگاه‌های نمونه‌بردار محیط‌ها را تلقیح می‌کنند. دستورالعمل‌های استفاده از این وسایل در ادامه آمده‌است.

1. Analytical Considerations

۲. دمای انکوباسیون

- **دمای اتاق:** انتخاب دمای انکوباسیون با توجه به اهداف نمونه‌برداری

  تعیین‌می‌شود. تمیزترین محل اتاق باید برای انکوباسیون در دمای اتاق استفاده‌شود. این روش برای تعیین کارآیی فیلتراسیون در محیط‌های تحت کنترل مختلف مفید است، اما برای شناسایی قارچ‌های بیماری‌زا مفید نیست.
- **انکوباسیون در ۳۷°C:** شرایط انتخابی را برای جداسازی قارچ‌های منتقله از هوا که شامل بیماری‌زاهای فرصت‌طلب است، برای مثال گونه‌های *آسپرژیلوس* ایجادمی‌نماید. قارچ‌هایی که در دمای اتاق بهتر رشدمی‌کنند، ۱۰ برابر بیشتر از آنهایی هستند که در دمای ۳۷°C رشدمی‌کنند.

۳. کنترل کیفی

وسایل نمونه‌برداری هوا باید دوره‌ای کالیبره شوند که شامل سنجش میزان هوای ورودی و کالیبراسیون پمپ است. برای روش‌های مناسب کالیبراسیون باید با شرکت‌های سازندهٔ نمونه‌بردار تماس گرفت.

ملاحظات پس از آزمایش

محاسبات

۱. عوامل تبدیل

$۱ft^3 = ۲۸/٤liters$

$۱m^3 = ۳۵/۳ft^3$

$۱ft^3/min = ۰/۰۲۸۳m^3/min$

۲. انجام محاسبات

تعداد کلنی‌ها را در کل نمونه به حجم هوای نمونه‌برداری تقسیم و تعداد CFU را در هر مترمکعب محاسبه‌نمایید.

تفسیر اطلاعات

به‌علت پراکندگی قارچ‌ها تعداد کم قارچ در محیط اهمیت ندارد. روش‌هایی که قارچ‌ها را بدون شناسایی تفکیک می‌کنند، نباید استفاده‌شوند. روش‌هایی مانند پلیت‌گذاری که حساسیت آن برای شناسایی بیماری‌زاهای قارچی ناکافی است، مفید نیستند. مقایسهٔ تعداد قارچ‌ها در محیط خارجی و محیط داخلی ایزوله می‌تواند برای تعیین خرابی دستگاه‌های فیلتراسیون، وقفه در فشار مثبت، نشت به خارج یا شناخت منابع اصلی اسپورهای قارچی مناسب باشند.

همچنین، تفسیر باید با توجه به محیط، تأثیر شرایط جوی(برای مثال، وجود برف در محیط خارج) و دمای انکوباسیون انجام‌شود.

اگر فقط یک کلنی از یک قارچ بیماری‌زا جداشود، تکرار نمونه‌برداری لازم است. رشد چند کلنی از یک قارچ بیماری‌زا باارزش‌تر از جداسازی یک کلنی است که ممکن‌است تصادفی روی محیط رشد کرده‌باشد. در مکان‌های حفاظت‌شده(کارآیی فیلتراسیون معادل ۹۹/۹۷ درصد برای ذرات ۰/۳ میکرومتر، بیش از ۱۲ بار تعویض هوا در ساعت، اختلاف فشار ۰/۰۱ اینچ و فشار آب ۲/۵ پاسکال) میزان کل بیماری‌زاهایی مانند *آسپرژیلوس فومیگاتوس*، *فلاووس*، *ترئوس*، گونه‌های *فوزاریوم* یا دیگر بیماری‌زاهای قارچی بالقوه، باید کمتر از ۰/۱CFU/m^3 باشد. اگر میزان آلودگی به دلایل متعدد به ۱CFU/m^3 افزایش‌یابد، سیستم‌های هوارسانی و یا روش‌های اجرایی در مکان بستری بیماران به ارزشیابی مجدد نیاز دارد. در مناطق با فیلتراسیون بالا، شمارش

کل کلنی‌های قارچ‌های بیماری‌زا که در دمای اتاق رشدمی‌کنند، نباید بیش از ۱۵CFU/m^3 و برای کشت‌هایی که در دمای ۳۷°C رشدمی‌کنند، نباید بیش از ۲CFU/m^3 باشد.

رشد یک‌دست از یک نوع ارگانیسم نشان‌دهندهٔ منبع آلودگی داخلی است که چنین مشکلاتی عموماً ناشی از مکان‌هایی است که رطوبت کنترل‌شده دارند یا آنکه علت رطوبت نشت آب است.

شمارندهٔ ذرات(مدل نوری یا تغلیظ) برای پیگیری‌های صحت فیلتراسیون و تضمین نصب صحیح فیلتر مناسب است. شمارندهٔ تغلیظی، ذرات ناشی از نشت‌های کوچک را شناسایی خواهدکرد که ممکن‌است به‌دلیل شکاف در فیلتر باشد. این عمل با وسایل نمونه‌بردار هوا برای ذرات زندهٔ قارچی امکان‌پذیر نیست. اما باید به‌خاطر داشت که شمارش ذرات فقط به‌عنوان یک شاخص برای شناسایی مشکل استفاده‌می‌شود. در نتایج تعیین میزان آلودگی مناطق با فیلتراسیون بالا، پایین‌ترین تعداد ذرات قابل قبول است. این بررسی‌ها قبل از راه‌اندازی مناطق جدید تحت محافظت مفید است و راهنمایی برای رفع مشکل قبل از استفاده از آزمایش‌های میکروب‌شناسی گران‌قیمت خواهدبود. تضمین مقدار فشار هوا در اتاق‌های حفاظت‌شده و میزان تعویض هوای اتاق، قبل از انجام آزمایش شناسایی ذرات زنده و غیرزندهٔ هوا ضروری است.

پیوست

ویژگی‌های وسایل نمونه‌برداری حجمی مکانیکی

۱. مکنده‌های آبکشی[1]

این دستگاه‌ها برای جمع‌آوری ذرات استفاده‌می‌شوند و در انواع تجاری در دسترس هستند(جدول ۷-۳). نمونه‌بردار Andersen رایج‌ترین وسیلهٔ حجمی است. این نمونه‌بردار با فشردن هوا روی سطح آگار موجب جداسازی ذرات زنده می‌شود. ذرات در هر مرحلهٔ نمونه‌برداری از میان ۴۰۰-۲۰۰ حفره عبورمی‌کنند و به‌تدریج سوراخ‌ها کوچک‌تر می‌شوند تا تعداد ذرات در هر مرحله کاهش‌یابد. این روش اساس تمایز ذرات با اندازه‌های مختلف است. مکنده‌های آبکشی ذرات زنده قابل انتقال به عمق ریه را(کمتر از ۵ میکرومتر) از ذرات غیرقابل انتقال(بیشتر از ۵ میکرومتر) جدامی‌کند(حداقل پس از دو مرحله نمونه‌برداری). این نمونه‌بردار، ٦ مرحله دارد. ذرات عبوری قبل از مرحلهٔ ۳ بیش از ۵ میکرومتر و ذرات مرحلهٔ ٦ کمتر از ۵ میکرومتر هستند.

به‌دلیل طراحی و طبیعت آیرودینامیک ذرات منتقله از هوا در مرحلهٔ ۳، ذراتی که قطر بزرگ‌تر از ۵ میکرومتر دارند برگردانده و اجازهٔ عبور به ذرات کوچک‌تر داده‌می‌شود تا به مرحلهٔ ٦ داخل شوند. این توانایی به دستگاه نمونه‌بردار اجازه‌می‌دهد تا به‌طور صحیح از مناطق دارای غلظت بالای قارچ نمونه‌برداری کند.

معایب: نمونه‌بردار با سرعت $۱ \frac{ft^3}{min}$ عمل‌می‌کند و در یک محیط بسته نسبتاً تمیز برای تعیین ۱CFU از بیماری‌زاها در هر مترمکعب ۳۵ دقیقه زمان نیاز است(برای جمع‌آوری $۳۵/۳ft^3$ یا ۱ متر مکعب هوا). مکنده‌های

1. Sieve impactor

آبکشی کـه اغلب مانند یک پمپ مکش عمل می‌کند، صدای زیـادی در اتـاق بیمار تولیدمی‌کنـد.

۲. مکنده‌های شکافی[1]

این دستگاه نمونه‌برداری مناسب است که از نیروی اینرسی برای مکش ذرات زنده روی سطح آگار استفـاده‌می‌کند و ذرات را بـراسـاس انـدازهٔ آنـها تفکیک نمی‌کند. دستگاه یک صفحهٔ چرخنـده دارد کـه بـه انـدازهٔ پلیت است(۱۵۰mm یا ۱۵cm) و چرخش پلیت در زیر محل شکاف شرایط و زمان مناسب تغلیظ را ایجـادمی‌کنـد.

این وسیله برای نمونه‌برداری حجم‌های ۷۰۰-۳۰ لیتر در دقیقه تنظیم شده‌است و اختلاف زمان نمونه‌برداری، شـمارش کـمّی را ممـکن می‌سـازد. از آنجـا کـه سرعت نمونه‌بـردار تا ۲۵ft^3/min است، نمونـه‌بـرداری در چنـد دقیقه انجام‌می‌شـود و در تعیین تغییرات غلظت ذرات در زمـان‌هـای کوتاه کاربرد دارد.

معایب: صحت عملکرد آن محدود بـه غلظت پـاییـن اسپورهای قارچی است و برای غلظت‌های بالا مناسب نیست.

۳. نمونه‌برداری‌های سانتریفوژی[2]

مانند سایر مکنده‌هـا عمـل می‌کنند. نواری با حفره‌های حاوی آگار در قسمت سـر دستـگاه نمونـه‌بـردار قـراردارد و دستگاه بـه‌راحتی حمـل می‌شود.

معایب: کالیبراسیون و تنظیم میزان حجم هوای نمونه‌برداری فقط توسط سازنده امکان‌پذیر است؛ بنابراین، فقط بـرای مقـایسهٔ آلـودگی بیـن منـاطق

1. Slit impactor
2. Centrifugal impactor

مختلف کاربرد دارد. کارکردن با یک نوار چندخانه محیط کشت، تشخیص را مشکل می‌سازد و به تجدید کشت نیاز است.

۴. Impingers

به‌علت حجم پایین این نمونه‌بردارها و تمایل به‌دام انداختن تجمع ذرات زنده، به‌کار بردن این وسیله به مناطقی محدودمی‌شود که به وجود غلظت بالایی از آلودگی مشکوک است.

۵. فیلتراسیون

این روش در ابتدا برای پیگیری گرد و غبار ذرات معدنی و قابل استنشاق به‌کار می‌رفت. به‌علت کوچکی فیلترها فقط میزان کمی از حجم نمونه(تقریباً ۱ لیتر در دقیقه) فیلتر می‌شود. این روش برای نمونه‌برداری میکروب‌های زنده مناسب نیست.

۶. پلیت‌گذاری

این وسیلهٔ مکنده برای جمع‌آوری نمونه در محیط داخل قابل استفاده نیست و عموماً برای تجزیهٔ هوا ازنظر اسپورها و گرده‌ها برای بررسی عوامل آلرژن در محیط خارج به‌کار می‌رود.

جدول ۷-۳: Air samplers for quantitation of viable fungal spores[1]

Sampler type	Principle	Rate (liters/min)	Comment(s)
(۱) Sieve impactor[2]	Impaction on agar plate	28	Low volume precludes short-term collections that might relate to specific activities; effective for high concentrations of spores.

1. For additional information, see reference 3
2. Anderson Samplers Inc., 4215 Wendell Dr., Atlanta. GA 30336

(۲) Slit impactor[1]	Impaction on rotating agar plate	30-700	High volume allows short- term collections that might relate spore aerosols to specific activities; effective for low concentrations of spores. Quantification may be compromised at high levels of spores.
(۳) Centrifugal impactor[2]	Impaction on plastic strips containing agar media	40	Calibration difficult, thus limited to relative determinations.
(۴) Impingers(glass)	Impingement into liquids	12.5	Low-volume sampling rates and tendency to disrupt clumps limits application to nonclinical sampling.
(۵) Filters(cassette)	Filtration of air through 0.2-um-pore-size filters	1-2	Not practical for viable microbes.
(۶) Settling plates	Gravity		Most significant spores are too small and buoyant to settle. Lack of quantification severely limits utility.

۱. این نمونه‌برداری با برداشت حجم پایین نمونه موجب طولانی‌شدن زمان نمونه‌برداری می‌شود و در غلظت‌های بالای اسپور روش مؤثری است.

۲. حجم بالای نمونه‌برداری در این روش موجب کاهش زمان نمونه‌برداری می‌شود. این روش برای غلظت‌های پایین اسپورهای قارچی مؤثر است و درصورتی که اسپورهای قارچی در منطقه زیاد باشند، ممکن‌است شمارش کلنی‌ها اشتباه شود.

۳. کالیبراسیون آن مشکل است؛ بنابراین، فقط به‌طور نسبی(در تعیین مقایسه‌ای تعداد اسپورها) در منطقه مؤثر است.

٤. این روش بیشتر در نمونه‌برداری‌های غیربالینی به‌کار می‌رود؛ زیرا برای به‌دام انداختن توده‌های قارچی مؤثر است.

۵. برای میکروب‌های زنده به‌کار نمی‌رود.

٦. بیشتر اسپورهای بااهمیت به‌قدری کوچک و شناورند که نمی‌توانند رسوب کنند. نداشتن توان شمارش کمّی در این روش موجب می‌شود که استفاده از آن محدود شود.

References

1. Isenberg D. Henry: *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, American Society for Microbiology, 2 ED editions, 2004.
2. Glen Mayhall C. *Hospital Epidemiology and Infection Control*, Lippincott Williams & Wilkins, 3D editions, 2004.

1. New Brunswick Scientific Co., Inc., P.O. Box 4005, 44 Talmadge Rd., Edison. NJ 08818; asella London Ltd., Regent House, Britannia Walk, London NI 7ND. United Kingdom: or Cassella CEL Inc., 17 Old Nashva Rd. #15. Amherst, NH 03031
2. Biotest Diagnostics Corp., 6 Daniel Rd. East, Fairfield, NJ 07006

3. *Guidelines for Environmental Infection Control in Health-Care Facilities*, Centers for Disease Control and Prevention Health Care Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC), 2004. , CDC.
4. *Guidelines on prevention and control of hospital Associated infections*, WHO, Januory 2002 «Regional office for South East Asia».
5. Arnow PM, Sadigh M, Costas C, et al. *Endemic and epidemic aspergillosis associated with in-hospital replication of Aspergillus organisms*, J Infect Dis 1991; 1964: 998-1002.
6. Fox BC, Chamberlin L, Kulich P, et al. *Heavy contamination of operating room by Penicillium species*: *identification of the source and attempts at decontamination*, Am. J Infect Control 1990; 18:300-306.
7. Aisner J, Schimpff SC, Bennett JE, et al. *Aspergillus infections in cancer patients: association with fireproofing materials in a new hospital*, JAMA 1976; 235:411-412.
8. Noble WC, Clayton YM. *Fungi in the air of hospital wards*, J Gen Microbiol 1963; 32: 397-402.
9. Lentino JR, Rosenkranz MA, Michaels JA, et al. *Nosocomial aspergillosis*: *a retrospective review of airborne disease secondary to road construction and contaminated air conditioners*, Am J Epidemiol 1982; 116:430-437.
10. Wadowsky RM, Benner SM. *Distribution of the genus Aspergillus in hospital room air conditioners*, Infect Control 1987; 8:516-518.
11. Krasinski K, Holzman RS, Hanna B, et al. *Nosocomial fungal infection during hospital renovation*, Infect Control 1985; 6:278-282.
12. Streifel AJ, Lauer JL, Vesley D, et al. *Aspergillus fumigatus and other thermotolerant fungi generated by hospital building demolition*, Appl Microbiol 1983; 46:375-378.
13. Arnow PM, Anderson RL, Mainous PD, et al. *Pulmonary aspergillosis during building renovation*, AM. Rev Respir Dis 1978; 118:49-53.
14. Staib F, Tompak B, Thiel D, et al. *Aspergillus fumigatus and Aspergillus niger* in *two potted ornamental plants, cactus* (*Peiphyllum truncatum*) *and clivia* (*Clivia miniata*). *Biological and epidemiological aspects*, Mycopathologia 1978; 66:27-30.
15. Kyriakides GK, Zinneman HH, Hall WH, et al. *Immunologic monitoring and aspergillosis renal transplant patients*, Am J Surg 1976; 13:246-252.
16. Falken MC, Streifel AJ, Marx SS, et al. *Food does not appear to be a source of fungal disease in marrow transplant recipients (abstract)*, American Society for Microbiology 86th annual meeting, Washington DC, March 1986.
17. Rhame FS. The inanimate environment. In: Bennet JV, Brachman PS, eds. *Hospital infections*, 3rd ed. Boston: Little, Brown and Company, 1992.
18. Streifel AJ, Stevens PP, *Rhame RS. In-hospital source of airborne penicillium species spores*, J Clin Microbiol 1987; 25:1-4.

فصل هشتم

کشت آب بیمارستان برای جداسازی *لژیونلا*

اصول کار

الف) نحوهٔ انتقال و اکولوژی *لژیونلا*

۱. *لژیونلا* در همه‌جا به‌خصوص محیط‌های آبی وجوددارد. به‌طور معمول گونه‌های *لژیونلا* در بخش وسیعی از منابع طبیعی و صنعتی آب ازجمله سیستم‌های آب‌خوری، سیستم خنک‌کننده، کندانسورهای تبخیری، سیستم‌های گرمازا با آب داغ و تجهیزات درمانی تنفسی یافت‌می‌شوند.

۲. گونه‌های *لژیونلا* می‌توانند مانند یک مخزن اپیدمیولوژیک عفونت‌های بیمارستانی از سیستم‌های توزیع آب بیمارستان به‌ویژه منابع آب گرم ایزوله شوند.

۳. *لژیونلا* بعد از تنفس آئروسل‌های آلوده با باکتری منتقل‌می‌شود و دلیلی وجودندارد که منبع محیطی عفونت‌های انسانی *لژیونلایی* به‌ویژه نوع انفرادی آن(اسپورادیک) یک منبع معمولی باشد.

٤. افراد خاصی هستند که نسبت به سایرین برای ابتلا به عفونت‌های *لژیونلا* حساسیت بیشتری دارند، شامل سالمندان، سیگاری‌ها، کسانی که بیماری‌های زمینه‌ای نظیر نقص ایمنی دارند و بیماران جراحی‌شده.

ب) معیارهای جداسازی و تأیید لژیونلا از منابع

۱. وجودداشتن گونه‌های *لژیونلا* در یک منبع محیطی دلیلی بر عفونت‌زایی منبع نیست. *لژیونلا* اغلب از منابع آبی غیرمرتبط با بیماری‌های انسان جدا می‌شود.

۲. در ارتباط با منابع یک عفونت بیمارستانی ناشی از *لژیونلا* ٤ معیار به‌شرح ذیل وجوددارد:

- رابطهٔ بین یک منبع بالقوهٔ عفونت‌زا و مدت زمان تماس؛
- تعیین مکانیسم تولید آئروسل(آلوده به *لژیونلا*)؛
- مستندسازی دقیق و کامل عوامل اتیولوژیک *لژیونلا*؛
- جداسازی هم‌زمان گونه‌های *لژیونلا* از بیماران و منابع محیطی مرتبط(به‌عبارت دیگر، یک گونه *لژیونلا* در همه‌جا وجود داشته‌باشد)، شاید برای تأیید ارتباط یک منبع محیطی با بیماری *لژیونلا* تعیین زیرشاخه‌های *لژیونلا* ضرورت پیدانماید.

معرف‌ها، محیط کشت و مواد مصرفی مورد نیاز

الف) ظرف‌ها و سواب‌های لازم برای جمع‌آوری نمونه

۱. ظرف‌های دهان‌گشاد پلاستیکی یا شیشه‌ای از جنس پلی‌پروپیلین با حداقل حجم معادل ۳۰ سی‌سی؛

۲. اپلیکاتور استریل از جنس پنبه یا پلی‌استر مانند اپلیکاتور داکرون استریل.

ب) فیلترها و ضمائم آنها

۱. فیلترهای غشای پلی‌کربنات با اندازهٔ سوراخ ۰/۲ میکرومتر(نوکلی‌پور)؛
۲. فیلتر پلاستیکی با اندازهٔ ٤٧mm(مانند فیلتر پلاستیکی ژلمن)؛
۳. نگه‌دارندهٔ فیلتر(مانند نگه‌دارندهٔ سه‌شاخهٔ فانل)؛
٤. پنس(فورسپس) استیل ضدزنگ(مخصوص فیلترها).

ج) محیط کشت

محیط‌هایی که بیشتر استفاده‌می‌شوند شامل محیط استامیدو آمینواتان سولفونیک اسید(ACES)[1] و محیط آگار حاوی عصارهٔ مخمر، زغال بافری‌شده در pH = ٦/٩ و مکمل‌های اضافی نظیر سیستین، پیروفسفات و آلفاکتوگلوتارات(محیط کشت BCYEα)[2] است. بسته به شرایط باید از محیط‌های انتخابی خاصی استفاده‌کرد که مانع رشد بیش از حد ارگانیسم‌های غیر*لژیونلا* می‌شود. نمونه‌هایی از محیط‌های انتخابی رایج عبارت‌اند از:

۱. محیط GPVA : محیط BCYEα حاوی مکمل‌های گلیسین، پلی‌میکسین، وانکومایسین و آنیزومایسین است.
۲. محیط DGVP: محیط BCYE حاوی مکمل‌های رنگدانه‌ای، گلیسین، وانکومایسین و پلی‌میکسین B است.
۳. سایر محیط‌های انتخابی نیز برای *لژیونلا* مناسب هستند و ممکن‌است سازندگان مختلف تغییرات جزئی در ترکیب آنتی‌بیوتیک‌ها و مکمل‌ها ایجادکنند.

1. Acetamido Aminoethansolfonic acid
2. Buffered Charcoal Yeast Extract agar with α-Ketoglutarate

د) معرف‌ها

۱. معرف اسیدی با pH = ۲ : این معرف اسیدی با تغییر pH سایر ارگانیسم‌های غیر*لژیونلا* را مهارمی‌کند. اکثر ارگانیسم‌ها قدرت مقاومت در pH اسیدی شدید(pH = ۲) را ندارند.

۲. معرف فیلترهای غشایی: فیلتراسیون غشایی با معرف حاوی آنتی‌بادی فلوئورسنس مستقیم برای جداسازی گونه‌های *لژیونلاها* از ارگانیسم‌های مشابه توصیه‌می‌شود. این معرف‌ها می‌توانند نتایج مثبت کاذب واکنش سنجش مستقیم فلوئورسنس را کاهش‌دهند.

معرف‌هایی که این ارگانیسم از آنها قابل جداشدن است:

- فسفات بافر سالین استریلیزه‌شده با فیلتر(pH = ۷/٦)؛
- آب مقطر دیونیزه و استریلیزه‌شده با فیلتر.

۳. سدیم تیوسولفات که مانند خنثی‌کنندهٔ کلر در ظرف‌های جمع‌آوری آب به‌کار می‌رود.

٤. مایع مانته‌کنندهٔ گلسیرین بافری(pH = ۹).

۵. محلول پلی‌کلونال آنتی‌بادی مورد استفاده در روش فلوئورسنس مستقیم(برای *لژیونلا*) که به‌طور تجاری در دسترس است. مانند کنژوگه پلی‌کلونال پلی‌والان که می‌تواند سروگروپ‌های ۱ تا ٦ *لژیونلا* را شناسایی نماید.

ه) میکروسکوپ و ابزارهای مرتبط

۱. میکروسکوپ فلوئورسنس با یک سیستم فیلتر شناسایی فلوئورسئین ایزوتیوسیانات و فیلترهایی که در طول موج ۵۲۰-٤۹۰ نانومتر حداکثر ارتقای الکترونی را صورت‌می‌دهند.

۲. میکروسکوپ استرئوسکوپیک؛

۳. روشن‌کننده یا ایلومیناتور(برای نوردهی مایل) مانند روشن‌کننده با کندانسور ثابت؛
٤. اسلایدهای میکروسکوپ فلوئورسنس که حداقل ۲ دایرهٔ ۱۰ میلی‌متری داشته‌باشد.

ملاحظات پیش از آزمایش

نمونه‌های برداشت‌شده

الف) مکان برداشت نمونه و انتخاب آن

۱. مکان‌های نمونه‌برداری باید براساس اطلاعات اپیدمیولوژیک انتخاب‌شود که به‌طور عمده شامل منابع بالقوهٔ آب و بیماران است.
۲. فهرست منابع آبی که ممکن‌است حاوی گونه *لژیونلا* برای انتخاب محل نمونه‌برداری باشند، عبارت‌اند از:

- سیستم‌های عمومی آب آشامیدنی در بیمارستان:
  - گرم‌کننده‌های آب،
  - مخازن نگاه‌دارندهٔ آب؛
- خروجی‌های پایانی توزیع آب آشامیدنی(نواحی در تماس با بیمار):
  - خروجی دوش آب،
  - شیر آب سرد و گرم،
  - آب ورودی به سیستم همودیالیز؛
- تجهیزات:
  - تجهیزات مرتبط با سیستم تنفسی،
  - مرطوب‌کننده‌ها،
  - یخ و یخ‌سازها،

— سیستم‌های چرخش آب حاوی رسوب، مانند رادیاتورهای آبی.

ب) جمع‌آوری نمونه‌ها

دو نوع نمونه که در مراحل ابتدایی باید از سیستم‌های آب آشامدنی جمع‌آوری شود، شامل یک سواب و یک لیتر نمونه آب در هر مکان است. در نمونه‌های آبی که تعداد بسیار پایینی *لژیونلا* دارد ممکن‌است به برداشت حجم‌های بیشتری از آب(۱۰-۱ لیتر) نیاز باشد.

بهتر است سواب‌ها برای ارگانیسم‌های کلنیزه‌شده در بخش‌های انتهایی سیستم توزیع آب استفاده و نمونه‌ها از مناطق مختلف سیستم لوله‌کشی داخلی یا سطوح برج‌های خنک‌کننده گرفته‌شوند. درصورت لزوم، برداشت از مخزن ذخیرهٔ آب گرم به‌شرح ذیل انجام‌شود:

۱. نمونه‌های سواب

- پس از جداکردن دوش یا سیستم هوادهنده(بخور) سواب‌های استریل را داخل منافذ دوش یا خروجی بخور می‌برید و در مقابل سطح قدامی حاشیه‌های بیرونی منافذ می‌چرخانید(تقریباً چهار بار سواب را به سمت داخل دریچه حرکت‌می‌دهید).
- سواب‌های برداشت‌شده را مستقیم روی محیط انتخابی *لژیونلا* ازطریق استریک متقاطع کشت‌می‌دهیم(می‌توانید استریک متقاطع را با یک سواب استریل تازه ادامه‌دهید).
- نگهداری و حفظ رطوبت سواب‌ها برای کارهای تکمیلی ضروری است. بنابراین، قراردادن سواب‌های برداشت‌شده در حجم کمی از نمونهٔ آب اصلی برداشت‌شده(در همان زمان) بسیار مفید است. درضمن، می‌توان سواب‌ها را در یخچال نگهداری نمود.

۲. نمونه‌های آب

- پس از برداشت نمونه‌ها توسط سواب، باید ۱ لیتر نمونه آب موردنظر را در ظرف استریل جمع‌نمود(تکنیک جمع‌آوری آسپتیک باشد).
- ظرف‌های جمع‌آوری نمونهٔ آب باید دهان‌گشاد و استریل باشند و جنس آنها می‌تواند از پلاستیک یا شیشه باشد. در برداشت از نمونه‌های آب کلردار بهتر است از یک خنثی‌کنندهٔ کلر مانند سدیم تیوسولفات در ظرف استفاده‌کرد(۰/۸۳ سی‌سی سدیم تیوسولفات ۰/۱ نرمال به‌ازای هر لیتر آب کلردار).
- برای حمل نمونه‌ها به آزمایشگاه باید از ظرف‌های عایق‌بندی برای جلوگیری از مجاورت با حرارت بسیار بالا استفاده‌کرد.
- اگر نمونه‌های آب در همان روز انجام کشت آماده‌سازی نمی‌شوند، بهتر است نمونه در یخچال و دمای ٤°C نگهداری‌شود تا از رشد بی‌رویهٔ سایر باکتری‌ها و سوش‌های *لژیونلا* ممانعت شود. آماده‌سازی نمونه برای آزمایش باید در سریع‌ترین زمان ممکن صورت‌گیرد(حداکثر ٤٨ ساعت پس از نمونه‌گیری).

۳. نمونهٔ مخزن‌های ذخیرهٔ آب

- ۱۰-۵ سی‌سی اول آب این مخزن‌ها باید به‌سرعت داخل یک ظرف استریل مناسب جمع شود. این نمونه منعکس‌کنندهٔ آب راکد داخل لوله‌ها است.
- پس از خروج آب به‌مدت ۳۰ ثانیه، نمونهٔ دیگری از آب را(۵۰-۱۰ سی‌سی) در یک ظرف استریل مناسب جمع‌می‌کنیم. این نمونه آب منعکس‌کنندهٔ آب داخل مخزن است.
- هر دو نمونهٔ بالا باید مستقیم روی پلیت‌ها کشت داده‌شود.

ملاحظات حین آزمایش

کنترل کیفی و اطمینان کیفیت

الف) محیط‌های کشت تجاری و آمادهٔ استفاده

براساس توصیهٔ زیرکمیتهٔ بین‌المللی استانداردهـای آزمایشگاهی(NCCLS)[1]، آزمایش مجدد کنترل کیفی روی محیط‌های تجاری آمادهٔ مصرف لازم نیست و این استانداردها باید تـوسط شرکت سازنـده رعـایت شود.

ب) محیط‌های کشت ساخته‌شده در آزمایشگاه

هر ردیف ساخت این محیط‌های کشت باید ازنظر pH و توانایی رشد *لژیونلا* کنترل کیفی شود. مـوارد قابـل کنترل شامل موارد ذیل هستند:

۱. اندازه‌گیری pH

- pH محیط کشت باید حدود ۰/۰۵± ۶/۹ باشد(بسیار اهمیت دارد).
- pH محیط‌های کشت جامد با استفاده از الکتـرودهـای سـطحی کنتـرل می‌شـود (درصورت در دسترس‌بودن). می‌توان مقـداری از آگـار محیط را با آب مقطر در یک پلیت به‌صورت امولسیفیه درآورد و سپس، pH را با pH متر اندازه‌گیری نمود.
- اگر pH محیط در محـدودهٔ قابـل‌قبـول نبـود، pH محیط‌ها باید مجدد تنظیم شود(با اسید کلریدریک ۱ نرمال یا پتاس ۱ نرمال).

۲. کنترل رشد *لژیونلا* روی محیط کشت غیرانتخابی

- سوش *لژیونلا پنوموفیلا* داخل آب مقطر استریل برده‌شود تا کـدورتی مـعـادل استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند به‌دست آید. NCCLS برای کنترل کیفی

۱. از سال ۲۰۰۵ نام NCCLS به CLSI(Clinical and Laboratory Standard Institute) تغییر یافته‌است.

محیط‌های کشت انتخابی، *لژیونلا پنوموفیلا*(ATCC-۳۳۱۵۲) یا *لژیونلا بوزمانی*[1](ATCC-۳۳۲۱۷) را پیشنهاد می‌کند.

- با مخلوط‌کردن باکتری در فسفات بافر سالین استریل یک سوسپانسیون رقیق‌شده تهیه و سپس هر پلیت به میزان ۱۰ لاندا(توسط لوپ کالیبره) تلقیح‌شود تا کلنی معادل کانت ۱۰.۰۰۰-۱.۰۰۰ باکتری در پلیت به‌دست آید. پلیت‌ها در انکوباتور ۳۵ درجه(**با رطوبت محیطی حدود ۵۰ درصد**) انکوبه شود. اگر کلنی‌های ایزوله‌شده روی محیط کشت حاصل‌نشد، سوسپانسیون را ۱۰ برابر رقیق‌تر کرده و پلیت‌ها مجدد تلقیح شود.
- بررسی روزانهٔ محیط کشت، درصورتی که غلظت بالایی از باکتری به داخل پلیت تلقیح شده‌باشد. رشد اولیه پس از ٢٤ ساعت قابل مشاهده است و کلنی‌های ایزوله در طول ۳-۲ روز پس از کشت به‌طور ماکروسکوپی قابل تفکیک خواهندبود. درصورتی که سوسپانسیون اولیه منجمد یا در یخچال نگهداری‌شود، قابلیت رشد آن کاهش خواهدیافت.

۳. محیط کشت انتخابی مناسب

NCCLS در ارتباط با کنترل کیفی محیط‌های کشت انتخابی با هدف سنجش توانایی مهاری محیط انتخابی *لژیونلا* هیچ‌یک از ارگانیسم‌های ATCC را پیشنهاد نکرده‌است و روش استانداردی در این ارتباط وجودندارد. درصورت امکان محیط انتخابی *لژیونلا* را باید با استفاده از نمونه آب محیطی کنترل کرد که حاوی *لژیونلا* باشد.

٤. کنترل عدم آلودگی

پلیت محیط کشت تلقیح‌نشده برای کنترل استریلیتی انکوبه(۳۵°C) و عدم رشد باکتری را بررسی‌کنید.

1. Legionella Bozemanii

ج) کنترل کیفی معرف‌ها

معرف آنتی‌بادی فلوئورسنت

۱. باید با کنترل مثبت و منفی روزانه بررسی شود تا عدم آلودگی معرف رنگ‌آمیزی و سایر معرف‌ها با *لژیونلا* تأییدشود.
۲. اسمیر کنترل مثبت باید جداگانه تهیه‌شود تا احتمال انتقال آلودگی ناشی از مجاورت(carryover) کنترل مثبت به نمونه‌ها کاهش‌یابد(مثبت کاذب).

د) اطمینان کیفی(QA)[1]

گزارش تمام موارد جداشدهٔ *لژیونلا* در بیمارستان باید به اطلاع ICC (کمیتهٔ کنترل عفونت بیمارستان) رسانده‌شود.

آماده‌سازی نمونه‌ها

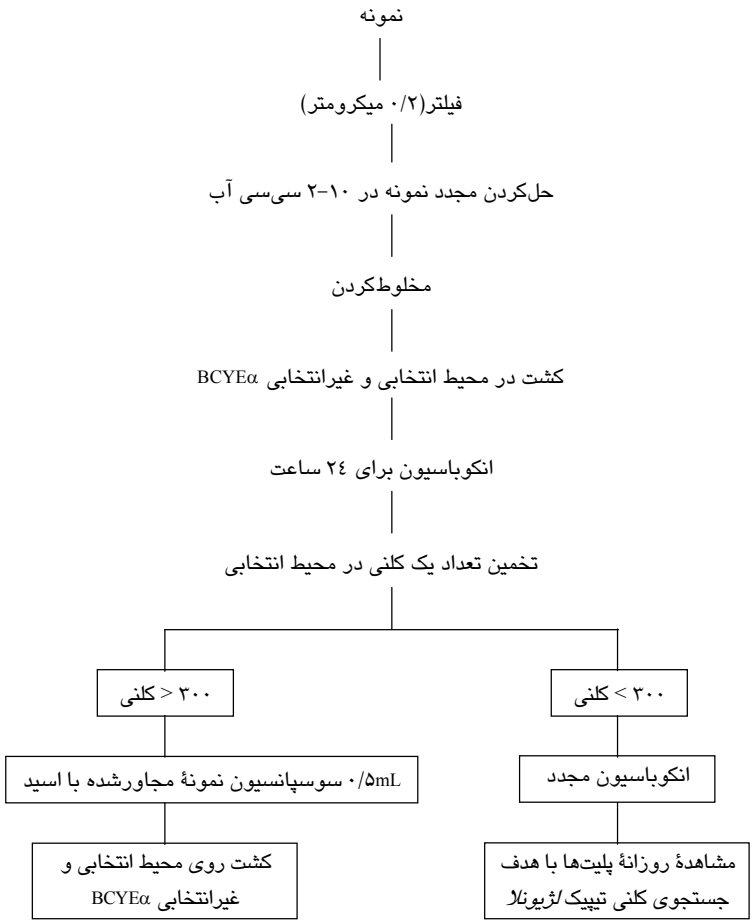
الف) تغلیظ ازطریق فیلتراسیون(آب آشامیدنی)

نمونه‌هایی نظیر آب آشامیدنی که تعداد کمی باکتری دارد، معمولاً به تغلیظ ازطریق فیلتراسیون نیاز دارند تا بتوان سوش‌های *لژیونلا* را از نمونه جدانمود.

۱. توسط یک فیلتر(٤٧mm) استریل قیفی با اندازهٔ سوراخ ۰/۲ میکرومتر نمونه آب را فیلتر می‌نماییم. غشاهای دارای منافذ موئینه ارجحیت دارند، مانند فیلتر نوکلی‌پور(Nuclepore) از جنس پلی‌کربنات که به‌علت منافذ ظریف یکسان بسیار مناسب است.

نمودار ۸-۱: تغلیظ با فیلتراسیون

1. Quality assurance



۲. فیلتر را به‌سرعت با پنس استریل خارج‌می‌کنیم و از سمت آغشتهٔ آن داخل یک لولهٔ استریل سانتریفوژ با حجم ۵۰ سی‌سی قرارمی‌دهیم که حاوی ۱۰-۲ سی‌سی از نمونهٔ اصلی است.
۳. اگر بیش از یک فیلتر برای تغلیظ یک نمونه نیاز باشد، همهٔ فیلترها را داخل یک لوله قرارمی‌دهیم.

ب) پلیت‌گذاری مستقیم[1] برای آب و رسوبات غیرآشامیدنی

نمونه‌هایی به‌جز آب آشامیدنی نظیر آب غیراستریل سیستم‌های رطوبت‌زا به تغلیظ نمونه نیازی ندارد. ۱۰ سی‌سی نمونه آب را داخل لولهٔ سانتریفوژ ۵۰ سی‌سی می‌ریزیم و آب را آماده‌می‌نماییم.

ج) یکنواخت‌کردن نمونه‌های آب تغلیظ‌شده و تغلیظ‌نشده

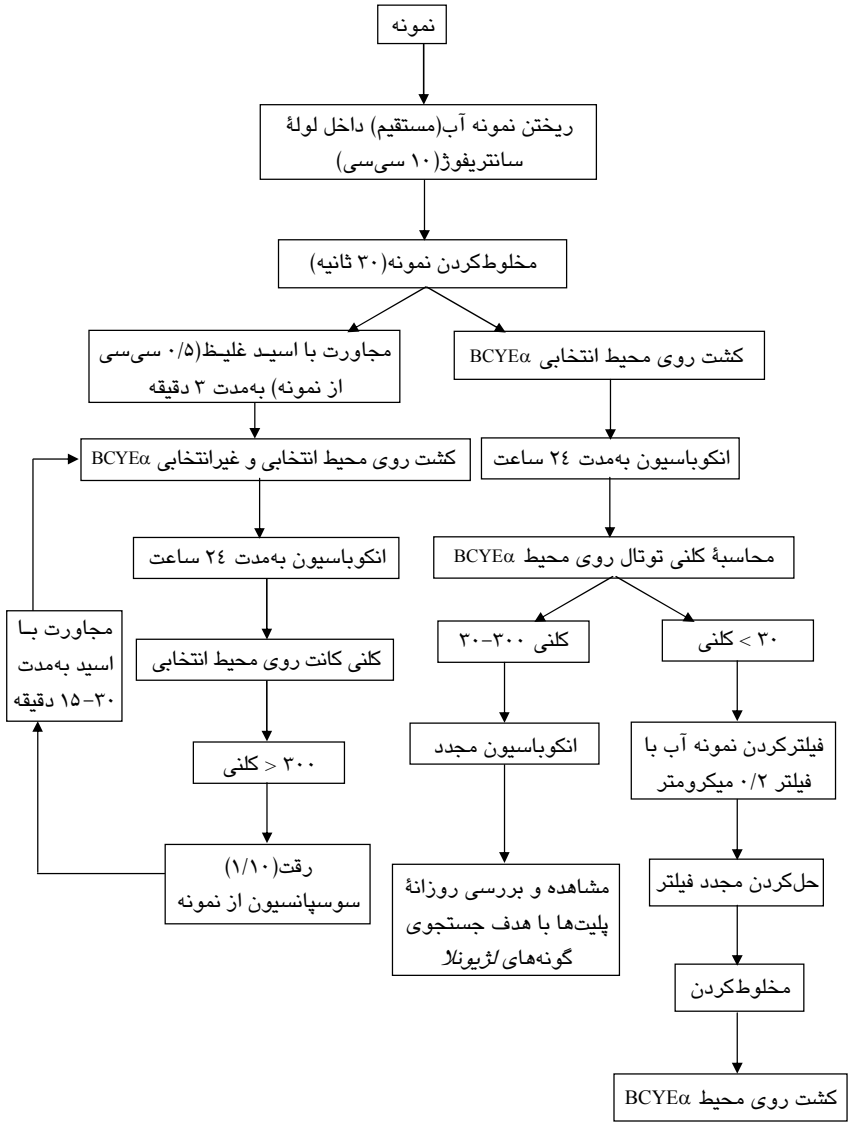
سرپیچ لوله‌های سانتریفوژ حاوی نمونه آب را محکم و سپس به‌مدت ۳۰ ثانیه خوب مخلوط‌می‌کنیم تا ارگانیسم‌های موجود در نمونه آب که مجتمع هستند، به‌طور کامل باز و پراکنده‌شوند.

د) نمونه آب حاصل از تغلیظ و اضافه‌کردن اسید

۱. بهتر است نمونه‌های آب حاوی غلظت‌های بالای باکتری پس از پلیت‌گذاری برای بهبود جداسازی گونه‌های *لژیونلا* و جلوگیری از رشد سایر گونه‌ها با اسید غلیظ pH=۲ آماده شوند.
۲. ۰/۵ سی‌سی از آب مرحلهٔ ج را با ۰/۵ سی‌سی معرف اسیدی داخل لولهٔ درپیچ‌دار استریل مخلوط می‌کنیم(pH نهایی باید حدود ۲/۲-۲ باشد).
۳. منتظر می‌مانیم تا مخلوط اسیدی شده به‌مدت ۳ دقیقه در حرارت اتاق بماند. این زمان می‌تواند به‌مدت ۳۰-۱۵ دقیقه ادامه‌یابد، به‌ویژه زمانی که رشد کلنی بالای ۳۰۰ عدد در مجاورت ۳ دقیقه‌ای در مرحلهٔ اول به‌دست آمده‌باشد.

1. Direct plating

نمودار ۸-۲: کشت مستقیم پلیت‌ها



کشت نمونه‌ها روی پلیت

الف) نمونه تغلیظ‌شده به‌طریق فیلتراسیون

این نمونه‌ها را بدون مجاورت با اسید کشت می‌دهیم.

ب) نمونه‌های پلیت‌گذاری مستقیم

هر دو نمونهٔ مجاورشده و نشده با اسید را کشت می‌دهیم.

ج) روش کار

۱. ۰/۱ سی‌سی سوسپانسیون نهایی نمونه آب را در پلیت(BCYE) غیرانتخابی و انتخابی(نظیر GPVA یا DGPV) تلقیح‌می‌کنیم. برای جداسازی ارگانیسم‌هایی با مورفولوژی مشابه کلنی *لژیونلا* از بلاد آگار استفاده‌می‌کنیم. در مواردی که انتظار داریم گونه‌هایی به‌جز *لژیونلا پنوموفیلا* وجود داشته‌باشد، از دو پلیت اضافی(BCYE) (انتخابی و غیرانتخابی) حاوی آلبومین(۱ درصد) استفاده‌می‌کنیم به‌خصوص برای گونه‌های *لژیونلا میکدادی*[1] و *لژیونلا بزمانی* محیط حاوی آلبومین(αABCYE) ارجح است.

۲. آب تلقیح‌شده را با میلهٔ شیشه‌ای یا پلاستیکی استریل در سطح پلیت پخش‌می‌کنیم.

د) ذخیره‌سازی نمونه‌ها

نمونه‌های سوسپانسیون مختلف تغلیظ‌شده، رقیق‌شده یا مجاورشده با اسید باید در یخچال نگهداری شوند.

1. *Legionella Micdadai*

انکوباسیون

همهٔ پلیت‌ها باید در حرارت ۳۵C° و رطوبت بالای ۵۰ درصد به‌مدت حداکثر ۱۰ روز انکوبه و روزانه بررسی‌شوند. جار شمع‌دار یا انکوباتور مرطوب با CO_2 ۵-۲ درصد نیز قابل قبول است.

ارزیابی و تفسیر کشت

الف) شمارش باکتری

پس از ۲٤ ساعت انکوباسیون پلیت‌های اولیه باید بررسی‌شوند تا کیفیت آماده‌سازی هر سری از نمونه‌ها تعیین‌شود. پلیت‌های با تعداد کلنی ۳۰۰-۳۰ عدد مناسب هستند.

۱. نمونه‌های اصلی(پلیت‌گذاری مستقیم)

- اگر در نمونهٔ مجاورشده با اسید و روی محیط انتخابی(BCYE) بیش از ۳۰۰ کلنی غیر از *لژیونلا* رشدکند، باید نمونه آب نگهداری‌شده در یخچال را $\frac{۱}{۱۰}$ رقیق و پروسهٔ مجاورت با اسید(۳۰-۱۵ دقیقه) را تکرارنمود. سپس مجدد کشت داد تا از رشد باکتری‌های غیر*لژیونلا* ممانعت شود.
- اگر شمارش کلی نمونهٔ آب بدون اضافه‌شدن اسید کمتر از ۳۰ عدد کلنی روی محیط(BCYE) باشد، نمونهٔ اصلی اولیه به روش فیلتراسیون تغلیظ و کشت مجدد شود.

۲. نمونهٔ اصلی تغلیظ‌شده به روش فیلتراسیون

- اگر شمارش کلی نمونهٔ تغلیظ‌شده با فیلتر روی محیط انتخابی بیش از ۳۰۰ کلنی باشد، باید نمونهٔ سوسپانسیون که در یخچال نگهداری شده‌است را

مجدداً با اسید(۳۰-۱۵ دقیقه) مجاور و به روش پلیت‌گذاری مستقیم کشت مجدد دهیم.

- اگر شمارش کلی نمونه آب کمتر از ۳۰۰ کلنی(روی محیط BCYE) باشد، انکوباسیون مجدد همان پلیت‌ها توصیه‌می‌شود.

ب) بررسی کشت‌ها از لحاظ *لژیونلا*

۱. پس از انکوباسیون اولیه(۲٤ ساعت اول) همهٔ کشت‌ها روزانه با استرئومیکروسکوپ

ارزیابی می‌شوند تا وجود کلنی‌های سفید خاکستری *لژیونلا* با ظاهر خاص و زمینهٔ شیشه‌خرده تأییدشود.

۲. با استفاده از یک نیدل به‌طور آسپتیک از کلنی‌های مشکوک برمی‌داریم و روی محیط‌های BCYE آگار یا BCYEα بدون سیستین کشت‌می‌دهیم. اگر محیط آگار BCYE بدون سیستین در دسترس نبود، می‌توان در مواردی از محیط بلاد آگار استفاده‌نمود. زیرا برخی انواع *لژیونلا* در نبود سیستین توانایی رشد روی محیط بلاد آگار را دارند، هرچند برای اولین جداسازی به سیستین نیازمند هستند.

۳. هر پلیت را از ناحیهٔ تلقیح‌شده با لوپ استریک و تا ٤۸ ساعت آنکوبه کنید. درضمن، می‌توان یک پلیت را چند قسمت کرد و چند کلنی مشکوک به *لژیونلا* را به لحاظ نیازمندی‌های رشد مورد ارزیابی قرارداد.

ج) تعیین هویت احتمالی *لژیونلا*

ویژگی‌های کلنی *لژیونلا*

- ماکروسکوپی: کلنی‌های دارای رشد آهسته(۵-۳ روز) روی محیط آگار BCYE با رنگ سفید ـ خاکستری درخشنده، محدب با اندازهٔ ٤-۱

میلی‌متر، گرد با حاشیهٔ کامل و ظاهـر شیشه‌خرده‌ای هستند. باکتـری روی محیط BCYE آگار بدون سیستین یا بلاد آگار گوسفند رشد نمی‌کند. کلنی‌های اولیه انعـکاس رنگین‌کمانی سبزآبی یا صورتی دارند و کلنی‌های کهنه بـه رنگ سفیـد مایـل به کـرم و بدون انـعکاس رنگین‌کمانی هستند.

- استرئومیکروسـکوپ: قـادر است با تابـش قوی و مایل نور، کلنی‌های با ظاهـر شیشه‌خـرده‌ای را که از ویژگی‌های *لژیونلا* است، بـه‌خوبی نشـان‌دهـد.
- استحکام کلنی: کلنی‌های رشته‌ای *لژیونلا* به‌سختی از سطح پلیت جدامی‌شوند و درهنگام کشت مجدد یکنواخت استریک نمی‌شوند.

د) فلوئورسنس کلنی

پلیت BCYE با کلنی‌هـای مشکوک *لژیونلا* را در طـول موج ۳٦٦ نانومتر با لامپ اولترا ویـولـه بررسی‌می‌کنیـم. برخی گونه‌های *لژیونلا* کلنی‌هـای با اتوفلوئورسنس رنگ قرمز درخشان یا سفید مایل به آبی درخشان دارند.

> **توجه**: *لژیونلا پنومونیلا* شایع‌ترین گونهٔ جداشده *لژیونلاها* و فاقد فلوئورسنس خودبه‌خودی است.

رنگ‌آمیزی گرم

- برای رنگ‌آمیزی گرم کلنی‌های مشکوک به *لـژیونلا* بهتـر است از رنگ مخالف کاربول فوشین به‌جای سافرانین استفاده‌کرد؛ زیرا سـافرانین رنگ صورتی بسیار ضعیفی ایجادمی‌کند.
- باکتری *لژیونلا* باسیل گرم منفی کـوچک بـه طول ۲-۱ میـکرون و عـرض ۰/۵ میکرون است که بسته به شرایط فیزیولوژیک رشـد بـرخی از این

باکتری‌ها پلئومرفیک(چندشکلی) است و گاهی طول آنها به ۲۰ میکرون هم می‌رسد.

روش‌های تأییدی شناسایی *لژیونلا*

مهم‌ترین روش‌های تأییدی برای *لژیونلای* احتمالی ایمونوفلوئورسنس و آنالیز اسیدهای نوکلئیک است. زمانی‌که این تکنیک‌های تأییدی در آزمایشگاه در دسترس نیست، می‌توان از آزمایش‌های بیوشیمی استفاده‌کرد و سوش *لژیونلای* احتمالی را برای تشخیص نهایی و تعیین ساب‌تایپ به آزمایشگاه مرجع ارسال‌نمود. **برای تأیید منبع شیوع عفونت بیمارستانی ناشی از *لژیونلا پنوموفیلا* و با توجه به تنوع و گستردگی ساب‌تایپ‌های گونهٔ *لژیونلا پنوموفیلا* که از منابع مختلف نظیر بیماران و محیط جدامی‌شوند، تعیین ساب‌تایپ گونهٔ *لژیونلا پنوموفیلا* در آزمایشگاه مرجع ضروری است.**

روش کار ایمونوفلوئورسنس

الف) آزمایش مستقیم آب(آماده‌سازی گسترش)

زمانی که شواهد اپیدمیولوژیک قوی دال بر یک عفونت بیمارستانی *لژیونلایی* ناشی از آب وجوددارد، ولی نتایج کشت آب منفی است، روش ایمونوفلوئورسنس مستقیم روی نمونه آب می‌تواند مفید باشد و قادر است سوش‌های زنده *لژیونلاهای* غیرقابل کشت را شناسایی نماید. روش کار به شرح ذیل است:

۱. با استفاده از سوسپانسیون نمونه آب دو دایرهٔ ۱۰mm روی دو چاهک لام میکروسکوپ فلوئورسنس را پر می‌کنیم.

- اگر تغلیظ مادهٔ اولیه(آب) ضروری باشد، ۱۰۰ سی‌سی از نمونه را در دور ۳۵۰۰g به‌مدت ۳۰ دقیقه در حرارت اتاق سانتریفوژ می‌نماییم.

■ رسوب را در آب مقطر یا آب دیونیزه یا بافر فسفات سالین استریل مجدد حل می‌کنیم(pH ۷/٦).

۲. گسترش نمونه‌ها را در مقابل هوا خشک می‌کنیم.

۳. گسترش‌ها را به‌سرعت از روی شعله عبورمی‌دهیم تا با حرارت ملایم ثابت شود.

٤. لام را با فرمالین ۱ درصد استرلیزه شده با فیلتر، به‌مدت ۱۰ دقیقه مجاور می‌کنیم.

۵. لام را با بافر فسفات سالین استرلیزه شده با فیلتر(pH ۷/٦) می‌شوییم.

ب) تأیید کشت(آماده‌سازی گسترش)

۱. در شرایط آسپتیک کلنی مجزای مشکوک به *لژیونلا* را برداشت و در یک لولهٔ آزمایش محتوی ۱-۰/۵ سی‌سی سالین ـ فرمالین ۱ درصد استریل، کدورتی معادل استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند تهیه‌می‌کنیم. کدورت‌های بیش از ۰/۵ مک‌فارلند باعث کاهش فلوئورسنس می‌شود که به‌دلیل پدیدهٔ پروزون ناشی از تعداد زیاد باکتری است.

۲. با استفاده از پیپت پاستور ۲-۱ قطره از سوسپانسیون را داخل چاهک اسلاید ریخته و سپس دور می‌ریزیم به‌طوری که یک لایهٔ نازک از سوسپانسیون روی چاهک باقی‌بماند.

۳. گسترش‌ها را در مجاورت هوا خشک می‌کنیم.

٤. با عبوردادن سریع از روی شعله، لام‌ها را با حرارت ثابت می‌نماییم.

ج) روش رنگ‌آمیزی فلوئورسنس

۱. معرف آنتی‌بادی فلوئورسنت *لژیونلایی* را روی گسترش می‌ریزیم تا کاملاً آن را بپوشاند. کنژوگه‌های پلی‌کلونال از منوکلونال بهترند؛ زیرا توان شناسایی گونه‌های محیطی *لژیونلا* را دارند.
۲. دستورات سازنده را در ارتباط با زمان انکوباسیون حرارت و شستشو به‌دقت رعایت‌می‌کنیم(آب مورد استفاده توسط فیلتر ۰/۲μm استریلیزه شود).
۳. اسلایدها را در مجاورت هوا خشک‌می‌کنیم.
٤. ۳-۲ قطرهٔ مایع مونته‌کننده را روی اسلاید اضافه‌می‌کنیم و سپس روی آن را با لامل می‌پوشانیم.

د) آزمایش لام‌های رنگ‌آمیزی‌شده

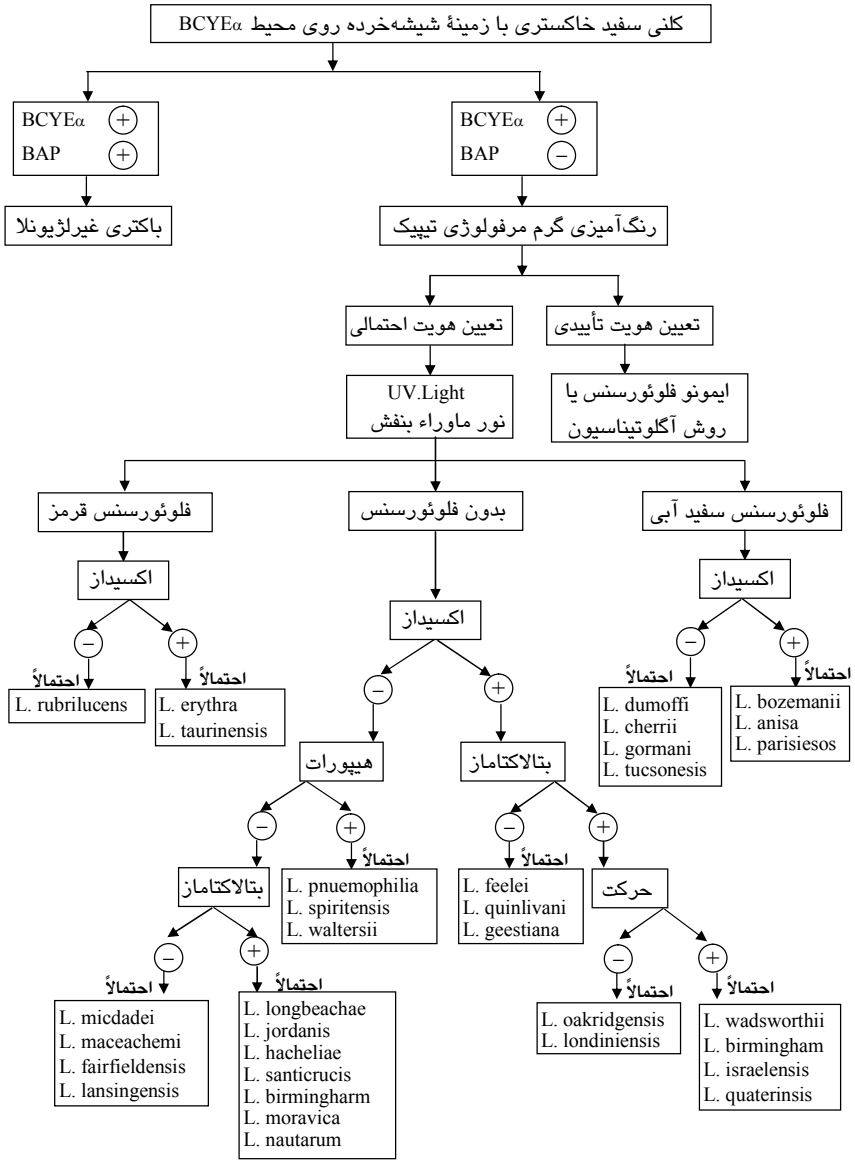
۱. مشاهدهٔ لام‌ها با میکروسکوپ فلوئورسنس با فیلتر شناسایی ایزوتیوسیانات؛
۲. استفاده از عدسی‌های ۱۰X و ٤۰X برای جستجو و غربال باسیل‌های فلوئورسنت در سطح لام؛
۳. استفاده از عدسی‌های ٦۳X و ۱۰۰X(oil) برای تأیید مرفولوژی باکتری‌ها؛
٤. مرفولوژی تیپیک *لژیونلا* با آنتی‌بادی فلوئورسنت: کوکوباسیل کوتاه از نمونهٔ مستقیم آب یا باسیل‌های رشته‌ای طویل از کشت که فلوئورسنت سبز درخشان($^{+}$٤-$^{+}$۳) در دیوارهٔ باکتری و تیره‌تر در نواحی مرکزی دارند.

۵. ارگانیسم‌هایی که شدت فلوئورسنت کمتر از $^{+}$۲ دارند و مرفولوژی تیپیک *لژیونلا* را نشان نمی‌دهند، به‌عنوان نتیجهٔ منفی در آزمایش آنتی‌بادی فلوئورسنت گزارش می‌کنیم.

ه) پیگیری آزمایش‌ها

باکتری *لژیونلا* با مشخصات واضح که توسط کنژوگه پلی‌والان رنگ‌آمیزی شده‌باشند، باید با آنتی‌بادی‌های اختصاصی برای تعیین گونه و سروگروه بررسی‌شوند.

نمودار ۸-۳: شناسایی فامیل *لژیونلاها*



Reference

1. Isenberg D. Henry: *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, American Society or Microbiology, 2 ED editions, 2004.

فصل نهم

کشت و اندازه‌گیری اندوتوکسین مایعات همودیالیز و دیالیز صفاقی

تعداد افرادی که به نارسایی مزمن کلیه دچار می‌شوند و به همودیالیز احتیاج پیدامی‌کنند در سال‌های اخیر افزایش چشمگیری پیدا کرده‌است به‌طوری که در هر سال ۱۰-۷ درصد به تعداد آنها افزوده‌می‌شود. بیمارانی که تحت دیالیز قرارمی‌گیرند سیستم ایمنی ضعیف‌شده دارند که آنها را در مقابل بیماری‌های عفونی مستعد می‌سازد. یک دستگاه همودیالیز از یک منبع تهیهٔ آب، سیستم مخلوط‌کردن آب و مایع دیالیز و یک ماشین تشکیل شده‌است که بتواند مایع دیالیز را به داخل همودیالیز پمپ کند. دستگاه به سیستم گردش خون بیمار متصل‌می‌شود و خون ازطریق آن پمپ شده و پس از عبور از غشای دیالیز مواد زائد خون گرفته‌می‌شوند.

اگرچه پیشرفت‌های زیادی به‌ویژه در اواخر دههٔ ۱۹۶۰ و اوایل دههٔ ۱۹۷۰ در طراحی سیستم دستگاه‌های دیالیز به‌عمل آمده، با این‌همه هنوز هم آلودگی آب همودیالیز یکی از مشکلاتی است که می‌تواند به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم موجب سپتی سمی و تب در بیماران تحت دیالیز شود. باکتری‌های گرم منفی مانند *اسینتوباکتر*، *الکالی ژنز*، *آئرومونا‌س*، *فلاووباکتریوم*، *پسودومونا‌س*، *سراشیا* و

استنوتروفوموناس شایع‌ترین باکتری‌هـایی هستند که می‌توانند در آب رشد و تکثیر نمایند و موجب مشـکلاتی در سیستـم همودیالیـز شـونـد. از باکتری‌های دیگر که می‌توانند موجب آلودگی همودیالیـز شونـد، مایکوباکتریوم‌های غیرسلی(مایکوباکتریوم‌های آتیپیک)

هستند. اگرچه این باکتری‌ها اندوتوکسین تولیدنمی‌کنند، ولی در مقابل عوامل ضدعفونی‌کننده مقاوم هستند.

بیماران تحت دیالیز درمعرض واکنش‌های تب‌زای ناشی از اندوتوکسین، باکتریمی توأم با سپسیس و سندروم‌های مزمن التهابی هستند. این واکنش‌ها ممکن‌است در ارتباط با آلودگی با باسیل‌های گرم منفی در آب همودیالیز باشند. این عوامل موجب شده‌است که دستوالعمل‌هایی برای ارزیابی آلودگی حمام دیالیز و آب دیالیز تدوین‌شوند که شامل دفعات نمونه‌برداری و روش‌های آزمایش کمّی است. در ادامه، درخصوص اندازه‌گیری اندوتوکسین نیز توضیح‌داده خواهدشد که اغلب توسط آزمایشگاه‌های مرجع انجام‌می‌گیرد.

ملاحظات پیش از آزمایش

تعداد و زمان نمونه‌برداری

نمونه‌برداری از آب دیالیز باید برای شمارش تعداد باکتری‌ها انجام‌گیرد. بررسی باکتریولوژیکی آب باید از قسمت‌های مختلف دستگاه همودیالیز انجام‌شود:

۱. منبع آب،
۲. از قسمت انتهایی سیستم سبک‌کنندهٔ آب،
۳. از قسمت انتهایی کارتریج شارکول فعال‌شده،
٤. از قسمت انتهای اسموز معکوس،
۵. آب خروجی از سیستم همودیالیز.

ابتدا محل نمونه‌گیری را ضدعفونی کنید و از آبی که در جریان است نمونه بردارید. حجم نمونهٔ برداشت‌شده نباید از 1ml کمتر باشد و باید در ظرف استریل جمع‌شود. آب را باید سریعاً کشت

داد و درصورت نبود امکان کشت سریع، می‌توان آن را حداکثر تا ۲٤ ساعت در دمای ٤°C نگهداری‌کرد.

الف) نمونه‌برداری روتین(در شرایطی که گزارشی از آلودگی یا عفونت وجود نداشته‌باشد)

نمونه‌ها را برای اهداف پایشی حداقل ماهیانه جمع‌آوری نمایید.

ب) نمونه‌برداری مکرر

کشت‌های مکرر را تا زمانی انجام‌دهید که شمارش تعداد باکتری‌ها از حد استاندارد بیشتر باشد. اگر رشد کشت‌ها از استاندارد مجاز بیشتر شد، از آب سیستم و ماشین دیالیز به‌طور **هفتگی** کشت‌دهید تا نتیجهٔ قابل‌قبول حاصل‌شود.

ج) نمونه‌برداری موردی

زمانی که علائم بالینی بیمار نشان‌دهندهٔ واکنش‌های تب‌زا و عوارض ناشی از سپتی سمی باشد، بنا به درخواست پزشک یا مسئول کنترل عفونت‌های بیمارستانی نمونه‌برداری نمایید.

د) زمان نمونه‌برداری

باید همیشه قبل از ضدعفونی‌کردن **سیستم تصفیهٔ آب** و **ماشین دیالیز** نمونه‌ها جمع‌آوری شوند. اگر سیستم به‌تازگی ضدعفونی شده‌باشد، قبل از نمونه‌برداری آن را به‌خوبی آبکشی کنید. همچنین، **مخزن ذخیرهٔ آب** و **قسمت توزیع‌کننده** را بشویید و آبکشی‌کنید تا هیچ‌گونه مادهٔ ضدعفونی‌کننده باقی‌نماند. کشت آب و مایع دیالیز دستگاه‌هایی که تازه نصب شده‌اند را در ابتدا **هفتگی** و سپس **ماهیانه**

انجام‌دهید؛ مگر آنکه طبق اطلاعات به‌دست‌آمده به تعداد بیشتری نمونه‌برداری نیاز باشد.

جمع‌آوری

الف) آب دیالیز

۱. نمونه را از ناحیهٔ بعد از تصفیهٔ آب(مانند قسمت اسمز معکوس و واحد دیونیزاسیون) برداشت‌نمایید.
۲. اگر از مخزن‌های ذخیرهٔ آب استفاده‌می‌شود، از آب مخزن ذخیره نمونه بردارید.
۳. از آب در محل ورود به ماشین دیالیز یا مخلوط‌کنندهٔ مرکزی نمونه بردارید.
٤. اگر سیستم همودیالیز را برای همان بیمار مجدد استفاده‌می‌کنید، از آبی که برای آبکشی دیالیز یا در تهیهٔ مادهٔ ضدعفونی‌کننده برای دیالیز استفاده‌می‌شود نمونه بردارید.

ب) مایع دیالیز

۱. پس از دیالیز، از فاضلاب خروجی دستگاه دیالیز نمونه بردارید.
۲. در بعضی ماشین‌های دیالیز جدید، جریان دیالیز زمانی متوقف‌می‌گردد که لولهٔ انشعاب فاضلاب از خروجی جدامی‌شود. در این‌گونه موارد، دیالیز به محل نمونه‌برداری خروجی مجهز است که می‌توان با سرنگ نمونه برداشت.

ج) حجم

حداقل ۵۰ml از هر قسمت نمونه بردارید. از ظرف‌های فاقد اندوتوکسین استفاده‌کنید. اغلب ظرف‌های پلاستیکی استریل که به‌صورت تجاری در دسترس هستند، فاقد اندوتوکسین است.

وسایل و مواد لازم جهت شمارش پلیت

۱. محیط TSA[1] را در پلیت‌های به قطر ۱۰۰mm بریزید. محیط‌های کشت بلاد آگار و شکلات آگار مناسب نیستند، زیرا غنی هستند و اجازهٔ رشد به باکتری‌های آسیب‌دیده را نمی‌دهند؛

۲. اتانول ۹۵ درصد؛

۳. انکوباتور ۳۵°C؛

٤. پیپت‌های استریل با حجم‌های ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر(یک سی‌سی).

---

۱. ترکیب محیط پایهٔ بلاد آگار بدون خون شبیه TSA است.

ملاحظات حین آزمایش

روش کار

برای تعیین و شمارش باکتری‌ها در آب همودیالیز باید از روش‌های کمّی استفاده‌کرد. یکی از بهترین روش‌ها روش فیلتر غشایی است؛ چون در این روش می‌توان مقادیر زیادی از حجم آب را از فیلتر عبورداد. ولی چون ابزار و وسایل فیلتر غشایی در بیشتر آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی بالینی وجودندارد، از روش‌های جایگزینی استفاده‌می‌شود. استفاده از لوپ‌هایی که برای کشت ادرار استفاده‌می‌شود برای کشت آب دیالیز توصیه‌نمی‌شود؛ زیرا حساسیت کمتری دارند. استفاده از پیپت که بتواند ۵ml-۱ آب را به محیط کشت انتقال‌دهد مناسب است. **استفاده از محیط‌های خیلی غنی مانند بلاد آگار و شکلات آگار توصیه‌نمی‌شود.** محیط کشت استاندارد برای کشت آب همودیالیز محیط TSA است. پلیت را پس از کشت‌دادن باید در دمای ۳۵°C به‌مدت ٤٨ ساعت انکوباسیون کرد. طولانی‌کردن زمان انکوباسیون به‌مدت یک هفته در دمای اتاق شانس جداسازی باکتری‌ها را بیشتر می‌کند.

با این همه، در مطالعات مختلف کشت در محیط TSA و انکوباسیون در دمای ۳۵°C به‌مدت ٤٨ ساعت روش استاندارد است. ولی این روش برای رشد مایکوباکتریوم‌های غیرسلی که در آب وجوددارند و همچنین، قارچ‌ها و مخمرها مناسب نیست. از سوی دیگر، بیوفیلم‌هایی که در سطوح داخلی لوله‌ها تشکیل‌می‌شود، موجب می‌شود که تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌ها پنهان شوند و در کشت‌های روتین معلوم نشوند. فرآیندهای ضدعفونی‌کردن به‌ندرت موجب حذف بیوفیلم می‌شوند و **افزایش سریع تعداد باکتری‌ها پس از ضدعفونی‌کردن ممکن‌است نشان‌دهندهٔ تشکیل بیوفیلم باشد.**

۱. نمونه‌های آب را ابتدا با استفاده از ورتکس کاملاً مخلوط نمایید. سپس حجم‌های ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر از نمونهٔ آزمایش را روی پلیت‌ها

تلقیح‌کنید(برای مایع دیالیز حجم ۱۰ میکرولیتر را هم کشت دهید) و با استفاده از یک لوپ استریل روی پلیت کشت دهید.

۲. پلیت‌ها را در دمای **۳۵°C** و به‌مدت ٤٨ ساعت انکوبه کنید.

۳. کلنی‌ها را بشمارید و تعداد آنها را در هر میلی‌لیتر نمونه محاسبه‌نمایید. برای این کار پلیت‌های با شمارش کلنی بین ۳۰۰-۳۰ را درنظر بگیرید.

٤. تعیین هویت ارگانیسم‌ها ضرورت ندارد(در بعضی از موارد تعیین هویت مشکل است). می‌توان پلیت‌ها را برای مطالعات بعدی باکتریولوژیک به‌مدت یک هفته نگهداری‌کرد.

۵. تعداد کلنی‌ها را به‌صورت واحد تشکیل‌دهندهٔ کلنی(CFU) در هر میلی‌لیتر گزارش‌نمایید.

٦. **توجه: فیلتراسیون غشایی روشی توصیه‌شده برای آزمایش مایع همودیالیز است.** روش‌های نمونه‌برداری تجاری نیز برای آزمایش وجوددارند، ولی نباید از آنها به‌عنوان جایگزین روش‌های متداول و فیلتراسیون غشایی استفاده‌کرد.

تفسیر

الف) مایع دیالیز

میزان بروز واکنش‌های تب‌زا در بیمارانی که تحت دیالیز هستند به تعداد ارگانیسم‌های حمام دیالیز بیمار بستگی دارد. براساس این مطالعات معیار کمتر از ۲۰۰۰CFU را برای مایع دیالیز درنظر گرفتند. استاندارد مایع دیالیز در سال‌های آینده تغییر خواهدکرد.

ب) آب مورد استفاده در دیالیز

شمارش تعداد باکتری در آب مورد استفادهٔ همودیالیز در مقایسه با مایع دیالیز پایین‌تر و باید کمتر از ۲۰۰CFU در هر میلی‌لیتر باشد. با این‌همه، در استانداردهای جدید پیشنهاد شده‌است معیار ۵۰CFU درنظر گرفته‌شود.

ج) آب‌های مورد استفاده در همودیالیز

باید این آب‌ها از لحاظ وجود اندوتوکسین آزمایش شوند. بررسی وجود اندوتوکسین در حمام دیالیز نیز لازم است.

گزارش کشت

تعداد کلنی را در هر میلی‌لیتر گزارش‌کنید. **وقتی تعداد کلنی‌ها در آب مورد استفاده برای همودیالیز بیش از ۲۰۰CFU و در مایع همودیالیز بیش از ۲۰۰۰CFU باشد، سریعاً به مسئول بخش همودیالیز یا پزشک مسئول کنترل عفونت گزارش‌نمایید.** برای شمارش کلنی بیش از ۵۰CFU در آب به کارکنان فنی درخصوص تصفیهٔ آب تذکردهید. نتایج نهایی آزمایش‌ها را به کمیتهٔ کنترل عفونت بیمارستان و مدیر پرستاری واحد همودیالیز که مسئول تضمین کیفیت است گزارش‌دهید.

آزمایش اندوتوکسین باکتریال

اندوتوکسین‌ها، لیپوپلی‌ساکارید(LPS) غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی هستند که قسمت توکسیک آن لیپید A است. زیرواحد پلی‌ساکاریدی آن به‌علت حلالیت در آب در سمیّت اندوتوکسین دخالت دارد. اندوتوکسین ممکن‌است موجب تب، لکوپنی و در موارد شدید شوک و مرگ شود. آستانهٔ واکنش تب‌زایی اندوتوکسین ۵ واحد توکسین به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن است(تزریق داخل وریدی). اندوتوکسین مایعات همودیالیز در پدیده‌ای که امروزه به‌نام سندروم واکنش التهابی نامیده‌می‌شود دخالت دارد. آزمایش لیمولوس

آمبوسیت لیزات[1] برای تشخیص اندوتوکسین از مشاهدهٔ اثر عفونت‌های باکتری‌های گرم منفی در خرچنگ نعل‌اسبی که به انعقاد داخل عروقی منجرمی‌شود، منشاء گرفته‌است. امروزه مشخص شده‌است که این واکنش به‌واسطهٔ آنزیمی است که توسط اندوتوکسین کاتالیز می‌شود. این پدیده به پیدایش آزمایش‌هایی منجرشد که برای تعیین اندوتوکسین در داروها و مواد بیولوژیک با کاربرد درمانی استفاده‌می‌شود.

درحال حاضر، انواع کیت‌های تجاری با روش ساده، تشکیل لخته ژل در لوله یا روش‌های تعیین کینتیک(کدورت‌سنجی یا رنگ‌سنجی) در دسترس هستند.

ملاحظات پیش از آزمایش اندوتوکسین

نمونه

۱. می‌توان هر مایعی را از لحاظ وجود اندوتوکسین آزمایش‌کرد. بعضی ترکیبات یا محلول‌ها به‌واسطهٔ داشتن املاح فلزات یا قدرت یونی بالا یا اسمولاریتهٔ بالا ممکن‌است نتایج مثبت یا منفی کاذب بدهند یا باعث افزایش سرعت یا مانع واکنش شوند. روش‌های آزمایش و تفسیر نتایج بالینی باید به‌دقت بررسی شوند. بعضی آزمایشگاه‌های بالینی ممکن‌است برای این آزمایش با آزمایشگاه‌های شرکت‌های تجاری قرارداد ببندند.

۲. pH نمونه باید بین ۷/۵–۶ باشد.

۳. نمونه را مانند نمونه‌ای جمع‌کنید که برای کشت استفاده‌می‌شود. درصورت استفاده از ظرف‌های شیشه‌ای، باید عاری از اندوتوکسین باشند؛ بنابراین، می‌توان آنها را به‌مدت ٤ ساعت در دمای ۱۸۰°C در داخل فور قرارداد یا از ظرف‌های پلاستیکی استریل یک‌بارمصرف استفاده‌کرد.

1. Limulus Amebocyte Lysate

٤. نمونه‌ها را می‌توان در دمای ۸°C-۲ به‌مدت ۲٤ ساعت نگهداری‌نمود. برای نگهداری طولانی‌مدت یا ارجاع به آزمایشگاه مرجع می‌توان نمونه‌ها را در ۲۰°C- فریزکرد.

وسایل و مواد لازم

می‌توان معرف‌ها و استانداردهای آزمایش اندوتوکسین را از شرکت‌های تجاری تهیه‌کرد.

ملاحظات حین آزمایش

روش

برای آزمایش از دستورالعمل شرکت سازنده که داخل جعبهٔ کیت قراردارد استفاده یا طبق دستورالعمل روش‌های اندازه‌گیری LAL به روش کینتیک عمل‌کنید.

کنترل کیفی

۱. آزمایش باید هم‌زمان با استانداردهای رقیق‌شده انجام‌شود که نشان‌دهندهٔ حساسیت نقطهٔ نهایی(endpoint) کیت است.
۲. استاندارد کنترل اندوتوکسین می‌تواند دارای نقطهٔ نهایی ۵-۰/۰۰۱ EU/ml باشد که به روش بستگی دارد. روش کینتیک کمّی(کدورت‌سنجی یا رنگ‌سنجی) یا روش‌های نیمه‌کمّی(لخته ژل و رنگ‌سنجی).

ملاحظات پس از آزمایش

گزارش نتایج

۱. اگر نتیجهٔ آزمایش منفی باشد، هر نمونهٔ منفی را باتوجه به مقدار مادهٔ قابل اندازه‌گیری توسط کیت گزارش‌نمایید که به حساسیت کیت به‌کار رفته بستگی دارد؛ مانند 0.03 EU/ml > یا 0.06 EU/ml >.

۲. گزارش نتایج مثبت به روش آزمایش بستگی دارد و اینکه آیا از روش‌های کینتیکی کمّی یا نیمه‌کمّی(تشکیل لختهٔ ژل) یا تک‌لوله‌ای(Single Tube) استفاده‌می‌شود. برای روش‌های کینتیکی EU در هر میلی‌لیتر گزارش‌می‌شود و برای آزمایش لختهٔ ژل EU عیار آخرین لوله‌ای است که لخته شده و به‌صورت breakpoint گزارش‌می‌شود. اولین لوله‌ای که لخته تشکیل نشده‌است در محدودهٔ این دو نقطه قرارمی‌گیرد. برای روش‌های تک‌لوله‌ای نتایج به‌صورت مساوی یا بیشتر از حساسیت لولهٔ منفرد گزارش می‌شود؛ مانند 0.06 ≥ EU/ml یا 0.125 EU/ml ≥.

محدودیت

۱. LAL یک واکنش وابسته به آنزیم است و به تنظیم pH، املاح و یون‌های دوظرفیتی نیاز دارد. نتایج منفی به‌علت عوامل مهاری به‌معنای فقدان اندوتوکسین نیست.

۲. در بعضی موارد ممکن‌است واکنش تسریع‌شود. مانند آلودگی با استات سلولز یا سلولز- دی یا تری‌استات که با LAL واکنش نشان‌می‌دهند.

این موارد مانند واکنش‌دهنده با LAL محسوب‌می‌شوند و ضرورتاً نشان‌دهندهٔ وجود یا فقدان اندوتوکسین نیستند.

۳. در هر قسمتی که برای سنجش اندوتوکسین به‌کار می‌رود، باید استانداردی تعریف‌شود. در دستورالعمل استاندارد ملی امریکا برای آب همودیالیز تعداد کلنی برای آب همودیالیز کمتر از ۲۰۰CFU و میزان مجاز اندوتوکسین ۲ EU/ml با محدودیت ۱ EU/ml به روش LAL تعریف شده‌است. این معیارها اخیراً برای دستگاه‌های همودیالیز بیان شده‌است که همودیالیز را فرآوری مجدد می‌کنند.

کشت مایع دیالیز صفاقی

۱. **گروه بیماران:** یک درصد بیمارانی که در مرحلهٔ نهایی(End-Stage) بیماری‌های کلیوی هستند، ازطریق همودیالیز یا دیالیز صفاقی یا پیوند کلیه تحت درمان قرارمی‌گیرند. در سال ۱۹۹۸، از تعداد ۳٤٦,٤٥۳ بیمار مبتلا به نارسایی کلیه، ۲۹ درصد پیوند کلیه شدند، ٦۱ درصد تحت درمان همودیالیز و ۷/۳ درصد ازطریق نوعی از انواع همودیالیز صفاقی تحت درمان قرارگرفتند. متداول‌ترین نوع دیالیز صفاقی دیالیز صفاقی آمبولاتوری و دیالیز مداوم گردشی است.

۲. **روش:** مایع دیالیز ازطریق یک سوند دائمی وارد صفاق می‌شود. این شیوهٔ درمان در خانه نیز قابل اجرا است. در دیالیز صفاقی آمبولاتوری ۲ لیتر مایع دیالیز همواره در حفرهٔ صفاق وجوددارد به‌نحوی که خون مداوم

صاف‌شده و مایع روزانه عوض می‌شود(APD)[1]. دو روش APD به‌شرح زیر رایج است:

- CAPD[2]: مایع دیالیز در هر روز ٤ نوبت ازطریق تخلیهٔ مایع دیالیز کهنه و جایگزینی آن با مایع جدید عوض می‌شود. این عمل حدود ٤٥ دقیقه طول می‌کشد. تعویض‌ها با فاصله درطی روز انجام‌می‌گیرد.
- CCPD[3]: در دیالیز مداوم گردشی در طول شب یک سیکلر اتوماتیک وصل و تعویض در طول خواب انجام‌می‌شود. وقتی بیمار از ماشین جدا می‌شود، ۲ لیتر از مایع دیالیز در حفرهٔ صفاق باقی‌می‌ماند که این مقدار پس از اتصال مجدد به دستگاه در هنگام شب خارج خواهدشد.

> **توجه**: تمام مراحل کار باید به‌صورت آسپتیک انجام‌گیرد تا شانس آلودگی کیسه‌ها کاهش‌یابد. باوجود استفاده از روش‌های آسپتیک بروز عفونت محتمل است.

نمونه

جمع‌آوری و انتقال

۱. **احتیاط‌های ایمنی**: کیسهٔ دیالیز را داخل کیسهٔ پلاستیکی بزرگ‌تری قراردهید. این کیسه را داخل یک ظرف پلاستیکی غیرقابل نشت قراردهید و به آزمایشگاه منتقل‌کنید.

۲. قسمت اول و کدر نمونه را برای کشت انتخاب‌کنید. در بیمارانی که CCPD انجام‌می‌شود، ممکن‌است نمونه شفاف باشد. در این موارد یک نمونهٔ مجدد پس از یک ساعت جمع‌آوری و شکل ظاهری آن را ارزیابی

1. Ambulatory Peritoneal Dialysis
2. Continuous APD
3. Continuous Cycling Peritoneal Dialysis

کنید. در ٦ درصد از بیماران با کشت مثبت که دچار پریتونیت هستند، مایع دیالیز شفاف است.

شـرایط انتقال

نمونه را سریعاً به آزمایشگاه منتقل‌کنید.

اگـر انتقال نمونـه بیش از یـک سـاعت طول می‌کـشد، آن را در دمـای یـخچـال نگهـداری‌نمایید.

آماده‌سازی

۱. محتوی کیسه را ۲۰–۱۰ بار پشت و رو کنید تا کاملاً مخلوط‌شود.

۲. قسمت ورودی را با بتادین ضـدعفـونی کنیـد و اجازه‌دهید تا خشک‌شود. ۱۰۰ میلی‌لیتر از مایع دیالیز را بکشید و در یک ظرف درپیچ‌دار ۵۰ میلی‌لیتری بریزید.

۳. **شمارش تام و افتراقی سلولی را انجام‌دهید. اگر تعداد گلبول‌های سفید $50/mm^3 \geq$ باشد، ممکن است کشت ضرورت داشته‌باشد. وجود بیش از ۱۰۰ گلبول سفید در میلی‌متر مکعب که حداقل ۵۰ درصد آن PMN باشد، قویاً به نفع پریتونیت است.**

٤. نمـونـه را بـه مـدت ۱۵ دقیقـه در ۳۰۰۰g سـانتـریفوژ کنیـد و مـایـع رویی را بـااحتیاط دور بریزیـد.

۵. از رسوب آن اسمیر گرم تهیه‌کنید.

٦. رسـوب حـل‌شـده را در محیـط‌هـای منـاسب مـانـنـد بـلاد آگـار، شـکلات آگـار، EMB یـا مـکانـکی، BHI، محیط‌هـای اختصاصی قارچ‌ها و شیشهٔ کشت خون کشت‌دهیـد.

آزمایش میکروسکوپی

الف) رنگ‌آمیزی گرم

۱. نمونه را طبق روش فوق سانتریفوژ کنید.
۲. اسمیر گرم را تهیه و درصورت مشاهدهٔ ارگانیسم سریعاً گزارش‌کنید.
۳. **رنگ‌آمیزی گرم در ۴۰-۹ درصد موارد پریتونیت مثبت است و درصورت مثبت‌شدن در ۸۵ درصد موارد کشت نیز مثبت خواهدبود. باوجود آنکه رنگ‌آمیزی گرم درنهایت در ۵۰ درصد موارد مثبت می‌شود، نتایج آن برای شروع درمان بسیار حائز اهمیت است.**

ب) رنگ‌آمیزی اسید فاست

استفادهٔ بالینی از این روش بسیار محدود است. شمارش افتراقی گلبول‌های سفید و بررسی اسمیر اسید فاست عموماً کمک چندانی به تشخیص پریتونیت مایکوباکتریال نمی‌نماید. مایکوباکتریوم‌های غیرسلی(فورتیوتوم، کانزاسی، گوردونه و ...) نیز ممکن‌است موجب پریتونیت شوند. درصورت وجود علائم بالینی و شک به پریتونیت، چنانچه نتایج کشت معمولی منفی باشد، ممکن‌است این میکروارگانیسم‌ها عامل بیماری باشند.

کشت

۱. باکتری‌ها: نمونه را در پلیت هوازی کشت دهید و هم‌زمان از بطری‌های کشت خون استفاده‌کنید. ۵ میلی‌لیتر از نمونه را داخل بطری‌های کشت خون تلقیح‌کنید. پلیت را در شرایط CO_2 ۵ درصد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه کنید.
۲. عفونت بی‌هوازی در پریتونیت ناشی از CCPD و CAPD نادر است و انجام‌دادن کشت بی‌هوازی اختیاری است. درصورت نیاز نمونه را در

محیط‌های کشت غیرانتخابی بی‌هوازی کشت دهید و به مدت ۷ روز در ۳۵°C و در شرایط بی‌هوازی انکوبه نمایید. به‌منظور جداسازی بی‌هوازی‌های کند رشد، محیط مایع کشت نمونه‌ها باید یک هفتهٔ دیگر نگهداری شوند.

کشت موازی

مایع دیالیز سانتریفوژشده هم‌زمان با کشت روتین در محیط مایکوباکتریوم‌ها و قارچ‌ها کشت داده‌می‌شود. **این عمل زمانی اندیکاسیون دارد که اسمیر مستقیم اسید فاست یا دید مستقیم قارچ‌ها با KOH یا کالکوفلور مثبت باشد.**

- مایع دیالیز تغلیظ‌شده به مدت ۵ روز در یخچال نگهداری می‌شود.
- **اگر کشت باکتری‌ها منفی باشد و بیمار به درمان جواب ندهد، کشت از لحاظ مایکوباکتریوم و قارچ ضروری است.**

روش‌های تکمیلی

۱. بیوپسی: در مواردی که کشت مایع دیالیز منفی است، ولی شک بالینی به پریتونیت مطرح است، می‌توان از بیوپسی صفاق و کشت آن استفاده‌نمود.
۲. روش LAL و سایر آزمایش‌ها برای تعیین عوامل عفونی ممکن‌است به اندازهٔ کافی حساسیت و ویژگی نداشته‌باشد.

تفسیر

فلور پوست بیمار *(استافیلوکوک اورئوس* یا سایر گونه‌های مختلف *استافیلوکوک)* از عوامل شایع پریتونیت توأم با دیالیز آمبولاتوری و خودکار هستند. تفسیر نتایج کشت در پریتونیت ناشی از دیالیز به علت تعداد کم ارگانیسم‌های مولد

عفـونت مشکل است و در تفسیر نتایج کشت باید به ارجحیت میکروارگانیسم‌های غیربیماری‌زای و میکروفلورای سطحی تـوجه داشت.

۱. موارد زیر مثبت تلقی‌می‌شوند:

- یک یا چند کلنی از یک یا چند نـوع(برمبنای شکل ظاهری) بدون درنظر گرفتن ماهیت آنها که روی خطوط کشت یا در ناحیهٔ کشت رشدکنند.
- یک یا چند کلنی از یک نوع که در ناحیهٔ کشت یا خطوط کشت رشد کنند و نوع آنها با کلنی‌هایی که در خارج از ناحیهٔ کشت یا خطوط کشت رشد کرده‌اند فرق کند.

۲. موارد زیر را آلودگی درنظر بگیرید:

- کلنی‌هایی که در خارج از ناحیهٔ کشت یا خطوط کشت مشاهده‌می‌شوند.
- کلنی‌هایی که در خارج از ناحیهٔ کشت یا خطوط کشت رشد یافته‌باشند، ولی از لحاظ ظاهر با هم شباهت نـداشته‌باشنـد.

ارزیابی کمّی

تعداد کم ارگانیسم‌ها(کلنی‌ها) می‌تواند باارزش باشد، ولی اغلب بیمـاران مبتـلا بـه پریتونیت تعداد کلنی بالایی دارند. در حالت اول باید از علائم بالینی کمک گرفت.

یافته‌های مکمل بالینی

الف) شمارش سلولی

۱. مایع پریتوان نرمال(CAPD):

- حـاوی ۱۰۰-۵۰ گلبـول سـفیـد در هـر مـیـلی‌مـتـر مـکـعب است کـه اغـلب تک‌هسته‌ای هستنـد.

- از لحـاظ ظاهـری شـفاف است.

۲. مایع دیالیز پریتوان:

- حاوی بیش از ۱۰۰ گلبول سفید در هر میلی‌متر مکعب است.
- از لحاظ ظاهـری کـدر است.

ب) تشخیص افتراقی

۱. پریتونیت باکتریایی: پلی‌مرفونوکلئرها غالب هستند و بیش از ۵۰ درصد سلول‌هـا را تشکیل می‌دهنـد.

۲. پریتونیت مایکوباکتریایی:

- نوتروفیل‌ها گاهی در این نوع پریتونیت دیده‌می‌شوند.
- غالب موارد ارجحیت با سلول‌های تک‌هسته‌ای است.

۳. پریتونیت آلرژیک: هنـگامی کـه بیش از ۱۰ درصـد گلبول‌هـای سفیـد از نـوع انوزینوفیل باشد.

علائم و نشانه‌ها

۱. بیمارانی که مایع پریتوان آنها کدر یا دچار درد شکم یا تب هستند(CAPD).

۲. بیمارانی که دارای مـایع پریتـوان کدر یـا دچار درد شـکم یـا تب در هر مرحله از دیالیز آمبولاتوری گردشی(CCPD) هستند.

۳. در موارد مشکوک مانند درد شکم یا تب چنانچه مایع دیالیز شفاف باشد، از یک مایع تعویضی دیگر بعد از ۲ ساعت، کشت انجـام‌می‌شـود.

پاسخ بالینی

برای بیمارانی که بعد از ۹۶–۴۸ ساعت بهبودی بالینی پیدا نمی‌کنند، یک ارزیابی مجدد ضروری است. در این گونه موارد شمارش سلولی مجدد، رنگ‌آمیزی گرم

و کشت باید تکرار شود. در بیمارانی که علائم آنها مداوم است باید به فکر یافته‌های پاتولوژیک داخل شکم یا ژنیکولوژی بود و ممکن‌است به مداخلهٔ جراحی نیاز باشد، همچنین احتمال دارد که بیمار مبتلا به عفونت‌های قارچی، مایکوباکتریایی یا ارگانیسم‌های سخت‌رشد باشد.

تضمین کیفیت

۱. محیط‌های کشت و معرف‌ها باید کنترل کیفی شوند.
۲. کشت هم‌زمان نرمال سالین و آب مقطر استریل ضروری است.
۳. تمام نتایج مثبت را به کمیتهٔ کنترل عفونت و واحد دیالیز گزارش‌نمایید. درصورتی که میزان عفونت افزایش ناگهانی داشته‌باشد یا تعداد عفونت‌های کاذب افزایش یافته‌باشد، باید تحقیقات بیشتری درخصوص آلودگی دستگاه دیالیز انجام‌شود.

Reference

1. Isenberg D. Henry: *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, American Society for Microbiology.

Laboratory Guide to Diagnosis of Nosocomial Infections

Ministry of Health & Medical Education
Health Department
Center for Diseases Control _ Reference Laboratories of Iran, Research Center

ISBN-978-964-359-105-6

sedapublishing@yahoo.com