



عنوان دستورالعمل:

نحوه انجام آزمایش های که در آزمایشگاه میکروب شناسی انجام می شود

دامنه:

واحد آزمایشگاه

هدف:

یکپارچه سازی روش ها و دستورالعمل های انجام آزمایشات و کاهش خطاهای فردی در انجام آزمایشات

فرد پاسخگو: روش ارزیابی:

مسئول فنی آزمایشگاه، سوپروایزر و کارکنان آزمایشگاه، ارزیابی از طریق مشاهده، مصاحبه و مستندات

روش اجرا:

این دستورالعمل بایستی توسط پرسنل بخش میکروب شناسی آزمایشگاه با نظارت مسئول فنی مربوطه به صورت زیر انجام شود:

الف: معرفی بخش میکروب شناسی

بخش میکروبیشناسی یکی از جالب ترین و جذاب ترین بخش های هر آزمایشگاه تشخیص پزشکی محسوب می شود. در این بخش، معمولا نمونه های مختلف در محیط های کشت میکروبی مناسب رشد کرده، عوامل بیماری زا جداسازی شده و حساسیت آنها نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف بررسی می شود.

در این آزمایشگاه امکانات ویژه کشت انواع نمونه های هوایی، بی هوایی و باکتری های سخت رشد در حال ارائه بهترین خدمات تشخیصی. در حیطه میکروبیشناسی هستند. در این بخش انواع آزمایش های باکتری شناسی و قارچ شناسی انجام می گیرد. همچنین نمونه گیری موارد مختلف از جمله آزمایش های قارچی نیز در این آزمایشگاه انجام می گیرد.

ب: وظایف کلی بخش میکروب شناسی آزمایشگاه

1. نگهداری صحیح محیط های کشت و دیسک های آنتی بیوگرام
2. کنترل مداوم صحت کاراتوکلاو
3. انجام کنترل کیفی به موقع محیط های کشت، دیسک های آنتی بیوگرام، معرف های میکروب شناسی و رنگ گرم
4. انجام صحیح تست های افتراقی و آنتی بیوگرام
5. نگهداری صحیح سوش های میکروبی و ساب کالچر به موقع آن ها
6. تشخیص صحیح نمونه های بالینی بیماران
7. پایش دمای یخچال، فریزر و انکوباتور
8. سرعت و دقت لازم در انجام وظایف محوله و انجام صحیح مستندسازی های لازم
9. تشخیص صحیح نمونه های کنترل کیفی خارجی

ج: روش انجام کار در بخش میکروب شناسی بطور خلاصه

- بررسی نتایج کشت های میکروبیشناسی



- تهیه اسمیر و رنگ آمیزی گرم از نمونه های مثبت
- گزارش نتایج و موارد بحرانی کشت ها به بخش های بیماران بستری
- انجام تست های آنتی بیوگرام و گزارش آنها
- انجام کشت خون و تهیه اسمیر آنها
- انجام کشت هوازی مایعات و زخم ها
- انجام کشت بی هوازی مایعات و زخم ها
- انجام کشت ادرار و بررسی میکروسکوپی و آنالیز آنها
- انجام کشت خلط و تهیه اسمیر جهت رنگ آمیزی گرم و زیل نلسون
- ساخت انواع محیط های کشت جهت ساب کالچر نمونه ها
- ساخت انواع محیط های تشخیصی و افتراقی جهت بررسی نوع میکروارگانیسم ها
- بررسی کشت های خون BACTEC
- کنترل کیفی تست های انجام شده
- تهیه لیست کار و بررسی نمونه های ارسالی

د: اصول کار در بخش میکروبیشناسی

در این بخش با بهره گیری از دانش حرفه ای، ضمن تحقیق و مطالعه گسترده، به جداسازی و تشخیص میکروارگانیسم ها پرداخته و با ارائه راهکارهای اجرایی و کنترل کیفی دقیق، مسیر را برای تشخیص صحیح، به موقع و موثر بیماری های عفونی هموارتر نماید.

در این بخش ضوابط و قوانین کار بر اساس جدیدترین استانداردهای مربوط به هر کدام از نمونه های ارسالی تعیین می شود و برای دستورالعمل های اجرایی طبق استاندارد SOP تهیه شده است بخش میکروب شناسی دارای قسمتهای مجزای کشت میکروبی- محیط سازی- انکوباسیون و استریلیزاسیون می باشد

ه: انواع محیط کشت

محیط های کشت به دو دسته تقسیم میشوند : محیط مایع و محیط جامد.

برای انجام کشت در محیط مایع کافی است مقداری از نمونه رابه محیط اضافه نماید. باکتری در محیط مایع پس از مدت زمان لازم (حدود چهار ساعت) به صورت کدورت یکنواخت- غیریکنواخت ویا پرده ظریفی در سطح محیط کشت ظاهر میشود. در صورتیکه باکتری در محیط جامد کشت داده شود پس از مدت لازم (حدود شانزده الی هجده ساعت) بجز بعضی- از مایکوباکترها (سه تا شش هفته) به صورت توده های عظیمی در سطح محیط ظاهر میشود که کفی نامیده می شود.

لوله کشت مایع پس از تلقیح به 3 فرم دیده می شود :

الف- غشا نازک Pellicle شامل يك توده ارگانیسم شناور در بالای محیط کشت

ب- مه آلودی Turbidity ارگانیسم همانند ابردر محیط دیده می شود



ج - رسوب Sediment توده ارکانیسم ته نشین طاهر می شود

محیط آگار خون دار:

محیط کشت آگار خونداری یکی از محیطهای کشت مغذی است که رشد بسیاری از باکتریها را تامین می کند و همچنین ایجاد همولیز بر روی این محیط به راحتی قابل بررسی است. برای تهیه این محیط پس از تهیه آگار پایه لازم است محیط تا درجه چهل تا پنجاه درجه سانتیگراد خنک شود. در این مرحله پنج میلی لیتر خون تازه به ازای هر صد میلی لیتر محیط افزوده و در پلیت های استریل تقسیم کنید.

محیط شکلاتی:

محیط کشت آگار شکلاتی که در آن گلبولهای قرمز به صورت لیز وجود دارد از محیطهای کشت مغذی است که رشد اغلب باکتریها را تامین میکند. برای تهیه این محیط پس از تهیه آگار پایه گه همان پایه آگارخونداری است کافی است که خون در درجه حرارت هشتاد درجه سانتیگراد به محیط اضافه شود.

محیط مولر هینتون:

این محیط به عنوان یک محیط مغذی پایه برای بررسی آنتی بیوگرام مناسب است برای تهیه این محیط پس از حل نمودن پودر دهیدراته محیط در آب مقطر و اتوکلاو نمودن محیط را در پلیت های استریل تقسیم نمایید

محیط EMB:

این محیط از رشد باکتریهای گرم مثبت جلوگیری می کند و به عنوان یک محیط انتخابی پایه برای جداسازی باکتری های گرم منفی بسیار مناسب است. کلی کلی باسیل بر روی این محیط به صورت جلای فلزی یا درخشندگی متالیک ظاهر میگردند.

محیط مک کانکی آگار:

در این محیط از رشد باکتریهای گرم مثبت جلوگیری می شود و به عنوان یک محیط انتخابی پایه برای جداسازی باکتریهای گرم منفی مناسب است. کلی ها بر حسب استفاده باکتری از لاکتوز بصورت لاکتوز مثبت (صورتی) و لاکتوز منفی (بی رنگ) ظاهر می شوند.



مک کانکی (MAC) (محیط انتخابی و افتراقی):

در این محیط ارگانیسم های گرم منفی رشد کرده و گرم مثبت هارشد نمی کنند که به علت وجود بایل نمک و کریستال ویوله است این محیط ، یک محیط انتخابی - افتراقی است که سبب رشد آنتروباکتریاسه و باکتری گرم - میشود. حاوی مواد زیر است : پروتئین، نمک صفراوی، کلرید سدیم، لاکتوز، کریستال ویوله، قرمز خنثی عمل انتخابی محیط مربوط است به کریستال ویوله و نمک صفراوی که مانع رشد گرم + ها می شوند. آنها که لاکتوز + اند به رنگ قرمز صورتی اند که ناشی از تولید اسید از تخمیر لاکتوز و جذب آن توسط نوترال رد و بدنبال آن تغییر رنگ معرف به قرمز می باشد. لاکتوز - ها کلی بی رنگ ایجاد می کنند.

محیط SS آگار:

این محیط از رشد باکتریهای گرم مثبت و بسیاری از باکتریهای گرم منفی جلوگیری می کند و به عنوان یک محیط انتخابی برای جداسازی سالمونلا و شیگلا به خصوص از نمونه مدفوع بسیار مناسب است.

محیط بایل اسکولین آگار:

این محیط به علت دارا بودن اسکولین و صفرا برای شناسایی آنتروکوک از سایر استرپتوکوکها بسیار مناسب است. در این محیط صفرا به برخی از استرپتوکوکها از جمله آنتروکوک اجازه رشد میدهد و باعث لیز بسیاری از استرپتوکوکها می شود و در صورتی که باکتری قادر به هیدولیز اسکولین باشد گلوکز و اسکولتین (یک مولکول الکلی می باشد) آزاد می شود سپس اسکولتین با یون فریک موجود در محیط ایجاد کمپلکس سیاه رنگ می شود.

محیط لیزین آیرون آگار:

از این محیط برای بررسی توانایی باکتری در دکربوکسیلاسیون و دامیناسیون لیزین استفاده میشود. محیط مزبور را پس از تهیه در لوله های استریل تقسیم نموده و لوله را به صورت شیب دار قرار دهید تا محیط به آرامی سرد و منجمد شود.

محیط مانیتول سالت آگار:

در این محیط به علت حضور 7.5% نمک از رشد بسیاری از باکتریها جلوگیری شده ولی اساتفیلوکوکها به خوبی رشد می نماید . این محیط همچنین حاوی قند مانیتول و معرف فنول رد می باشد و در صورتی اساتفیلوکوک مورد نظر قادر به تخمیر مانیتول باشد باعث اسیدی شدن محیط و تغییر رنگ معرف به زرد می شود در PH اسیدی فنل رد از قرمز به زرد تغییر رنگ می دهد.

استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و ساپروفیتیکوس قادر به تولید اسید نیستند ، پس کلی های قرمز تشکیل می دهند. این امر سبب افتراق اورئوس از ساپروفیتیکوس و اپیدرمیدیس می شود .

محیط کلیگر آیرون آگار:

از این محیط برای بررسی توانایی باکتری در تخمیر قند گلوکز و لاکتوز استفاده می شود . پس از تهیه محیط حدود 5 تا 7 میلی لیتر از محیط را در لوله های استریل تقسیم نموده و لوله را به صورت شیب دار قرار دهید تا محیط به آرامی سرد و منجمد شود.

محیط مالونات:

تاریخ اولین ابلاغ : 1395/10/12 تاریخ آخرین بازنگری : 1404/02/27 تاریخ بازنگری بعدی: 1405/02/27 کد سند : IN/LS/08/04	دانشگاه علوم پزشکی اراک مرکز آموزشی درمانی ولیعصر(عج) عنوان دستورالعمل: نحوه انجام آزمایش هایی که در آزمایشگاه میکروبیشناسی انجام می شود	
--	--	---

از این محیط برای بررسی توانایی باکتری در استفاده از مالونات سدیم به عنوان منبع کربن استفاده می شود. تغییر رنگ محیط از سبز به آبی نشانه مثبت بودن تست است.

محیط SIM:

از این محیط برای بررسی حرکت باکتری توانایی احیای گوگرد و تولید SH₂ و تست اندول استفاده می شود.

محیط TSI (Triple Sugar Iron Agar):

sh₂ این محیط برای شناسایی باسیل گرم - بر اساس توانایی تخمیر لاکتوز ، گلوکز و سوکروز و تولید: می باشد محیط حاوی مواد زیر است. 0%/1 گلوکز ، 1% لاکتوز ، 1% سوکروز، منبع سولفور ، کلرید سدیم، پروتئین، معرف SH₂ ، فنل رد تخمیر قندها توسط میکروارگانیسم همراه با تغییر رنگ است .

باکتری تخمیر کننده گلوکز مقادیر فراوانی از اسید را تولید می کند و رنگ محیط را زرد رنگ می کند . مواد قلیایی نیز در اثر دکربوکسیلاسیون اکسیداتیو پپتون تولید می شود . این مواد قلیایی مقدار کم اسید تولید شده در سطح را که در اثر تنفس ایجاد شده خنثی می کند ، اما نمی تواند مقدار فراوان اسید ته لوله را خنثی کند . بنابراین بالای لوله قرمز و ته آن زرد است (K/A).

باکتری هایی که علاوه بر گلوکز می توانند لاکتوز و سوکروز را نیز تخمیر و تولید اسید کنند سبب زرد شدن کل لوله می شوند . (مقدار اسید تولیدی زیاد است (A/A).

عدم تغییر رنگ محیط نشان دهنده عدم تخمیر قندهاست که در این صورت احتمالاً باکتری باسیل روده ای نیست (K/K). تولید گاز همراه با ایجاد ترک و حباب در محیط است SH₂ . در نتیجه احیای تیوسولفات سدیم است. این گاز با سولفات آمونیوم فریک محیط ترکیب شده و رسوب سیاهی را ایجاد می کند . است با این تفاوت که فاقد سوکروز می باشد.

و: انواع کشت باکتری:

1- کشت باکتری در محیط کشت مایع (براث)

2- کشت باکتری در محیط کشت جامد (آگار)

روش کشت باکتری در محیط کشت مایع:

1- ابتدا یک آنس برداشته و آنرا در دست راست بگیرید . بعد آنرا روی شعله کاملاً استرون کنید و بگذارید تا سرد شود.

2- محیط حاوی باکتری (لوله یا پلیت) را در سدت چپ بگیرید و درب آنرا با دست راست در کنار شعله باز کنید . دقت کنید که درب محیط کشت را روی میز کار خود نگذارید.



- 3- اگر محیط کشت در لوله است دهانه آنرا چند بار از روی شعله عبور دهید تا سترون شود همچنین درب لوله را بیش از حد باز نگه ندارید.
- 4- نوک آنس را وارد محیط کرده و یک لوپ از آنرا بردارید. منظور از لوپ سوزن کشت با نوک حلقه ای است .
- 5- دهانه لوله را مجدداً با شعله سترون کرده و درب آنرا بگذارید و محیط کشت را در جای خود قرار دهید.
- 6- لوله حاوی محیط کشت را در دست چپ بگیرید و نوک آنس آلوده به باکتری مورد نظر را داخل محیط فرو برده و به آرامی تکان دهید تا میکروبها در محیط پخش شوند.
- 7- در مواردی که میکروب را از پلیت (محیط کشت جامد) برمی دارید با نوک آنس کمی از پرگنه را برداشته و با رعایت مواردی که گفته شد آنرا داخل محیط مایع فرو برده و به آرامی هم بزنید تا همگن شود.
- 8- دهانه لوله حاوی محیط کشت جدید را با شعله سترون کرده و درب آنرا بگذارید و آنرا در داخل انکوباتور قرار دهید.
- 9- نوک آنس را مجدداً با شعله استریل کرده و در جای خود قرار دهید.

روش کشت باکتری در محیط جامد:

محیط کشت جامد به دو صورت وجود دارد: 1- محیط کشت جامد در لوله 2- محیط کشت جامد در پلیت
در لوله به دو صورت عمودی (Stab Culture) و شیبدار (Slant Culture) دیده می شود که هر کدام از آنها روش کشت خاص خود را دارند.

روش کشت عمقی در لوله:

در این حالت محیط کشت آگاردار (جامد) را با حفظ شرایط استریل در حالت مذاب داخل لوله های آزمایش استریل ریخته و بحالت عمودی آنرا در یک جای ساکن قرار دهید تا سرد شود در این حالت با آنس نوک تیز استریل شده در کنار شعله از پرگنه باکتری مقداری را برداشته و آنرا بصورت عمودی در مرکز این محیط تا انتها فرو برده و بدون هیچگونه تغییر حالتی آنرا از همان مسیر خارج کنید . بعد لوله را در انکوباتور قرار دهید .

این روش کشت دارای خصوصیتی می باشد و آن اینست که هنگامی که نوک آنس را در محیط فرو می برید در ابتدای ورود آنس به محیط تراکم باکتری زیاد است و به ترتیب که به عمق محیط فرو می رود از تعداد باکتریها کاسته می شود تا به انتهای لوله که می رسد تراکم باکتری با حداقل می رسد و از طرفی در انتها محیط کشت لوله ای اکسیژن کمتر از قسمت سطحی آن است و باکتریها به ترتیبی با تراکمی که وارد محیط شده اند براساس نیاز با اکسیژن (هوازی یا بیهوازی بودن) در محیط رشد متفاوتی دارند یعنی اگر باکتری هوازی باشد رشد آن در قسمت سطحی بیشتر است و اگر بیهوازی باشد رشد آن در قسمت عمقی بیشتر می شود.

روش کشت در سطح شیبدار در لوله :

در این حالت محیط کشت آگاردار استریل را در لوله های استریل شده ریخته و قبل از سرد شدن آنها را بحالت شیبدار قرار می دهند تا سرد شوند. در این حالت با آنس نوک تیز با حفظ شرایط استریل از پرگنه باکتری برداشته و در کنار شعله نوک آنس را ابتدا بصورت عمودی وارد قسمت عمودی محیط



کشت کرده بعد به آرامی آنرا از همان مسیر خارج کرده و بدون اینکه نوک آنس از محیط جدا شود آنرا به حالت زیگزاک روی سطح شیبدار بکشید.

این روش هم خصوصیات بسیار زیادی از جهت تشخیص سویه های باکتری دارد و اطلاعاتی در مورد هوازی یا بی هوازی بودن آنها و همچنین خصوصیات منحصر به فرد باکتریها به ما می دهد . مثلا ممکن است درکشت یک نوع باکتری ، رنگ قسمت عمودی محیط کشت تغییر کند که نشانگر بی هوازی یا بیهوازی بودن باکتری است که بعدا در تستهای اختصاصی دیگر را روی آن انجام می دهیم. یا مثلا باکتریها فقط در قسمت شیبدار رشد می کنند و رنگ آن قسمت تغییر می کند که پی به هوازی بودن آن می برید.

روش دیگر کشت روی این محیط از محیط مایع می باشد که یک لوپ از کشت مایع باکتریایی برداشته و در سطح شیبدار بصورت زیگزاک می کشید و کشت می دهید.

یک باکتری در محیط کشت جامد یا مایع به دلایل مختلفی کشت می شود. در شکل سه نوع محیط کشت جامد را مشاهده می کنید.

کشت می تواند برای مشاهده تغییراتی باشد که کلی روی محیط کشت افتراقی ایجاد می کند، یا برای گرفتن کلی تک باشد، یا تنها برای ازدیاد باکتری، تجدید کشت و نگهداری آن باشد. مشاهده حرکت باکتری، رشد آنتاگونیسم دو یا چند باکتری در کنار هم، مشاهده هاله های عدم رشد اطراف ماده ای خاص و بسیاری دلایل دیگر انجام شود. ما در این جا رایج ترین و پرکاربردترین روش های کشت را معرفی می کنیم.

کشت چهار مرحله ای روشی پرکاربرد می باشد که برای به دست آوردن تک کلی و مشاهده تغییرات ناشی از رشد باکتری در محیط کشت (مثل همولیز) روش مناسبی است.

در این روش مطابق شکل، از یک طرف پلیت شروع کرده و چند بار پلیت را به اندازه ی 60 تا 90 درجه می چرخانیم. در این روش از سوآپ استفاده نمی شود، چون با جذب باکتری به درون پنبه، در مقدار باکتری منتقل شونده ایجاد خطا می کند.

برای گرفتن تک کلی پیش از هر مرحله لوپ را می سوزانیم و با گوشه ای از محیط کشت که با باکتری در تماس نیست سرد می کنیم. سپس یک بار از درون خطوط کشت مرحله ی قبل شروع می کنیم و تنها در آخرین مرحله از کشت گرفتن کلی تک از باکتری از این نظر اهمیت دارد که در صورت وجود سویه های دیگر باکتری، می توانیم از خلوص کلی تکی خود مطمئن باشیم. زیرا هر کلی منفرد تنها از یک عدد باکتری ایجاد شده است.

کشت چمنی یک کشت یک نواخت در سطح پلیت به ما می دهد و بیش تر برای آنتی بیوگرام و سنجش هاله های عدم رشد اطراف مواد مهارکننده رشد استفاده می شود. در این روش بیش تر از سوآپ برای پخش یک نواخت باکتری استفاده می شود. استفاده از لوپ نیز در حالت ممکن است. اما یک نواختی کشتی که با سوآپ انجام می شود بیش تر و به تر از زمانی است که باکتری ها با لوپ پخش شده اند. اگر کشت اولیه ی باکتری به صورت مایع باشد، می توان با سمپلر نمونه ی مایع را روی محیط کشت جامد ریخت و بعد با یک پخش کننده (spreader) استریل، سوسپانسیون را در همه جای محیط کشت پخش کرد.

کشت چند بخشی- هم اغلب برای نگهداری سویه های میکروبی متعدد و صرفه جویی در مصرف محیط کشت به مدت کوتاه در یخچال انجام می گیرد.

در این روش پلیت از قسمت کف با مارکر به چند بخش تقسیم شده و سویه های متفاوت بین خطوط کشت داده می شود.



ز: روش های کشت:

یک باکتری در محیط کشت جامد یا مایع به دلایل مختلفی کشت می شود.

کشت می تواند برای مشاهده تغییراتی باشد که کلنی روی محیط کشت افتراقی ایجاد می کند، یا برای گرفتن کلنی تک باشد، یا تنها برای ازدیاد باکتری، تجدید کشت و نگهداری آن باشد. مشاهده حرکت باکتری، رشد آنتاگونیسم دو یا چند باکتری در کنار هم، مشاهده هاله های عدم رشد اطراف ماده خاص و بسیاری دلایل دیگر انجام شود. ما در این جا رایج ترین و پرکاربردترین روش های کشت را معرفی می کنیم.

کشت خطی به کمک لوپ حلقه ای به صورت یک خط ممتد انجام می شود و در بسیاری موارد چند نوع باکتری را به صورت عمود بر هم کشت می دهند. این روش معمولاً برای مشاهده اثر آنتاگونیستی دو یا چند میکروب بر هم انجام می شود. برای مثال در شکل زیر خط وسط یک باکتری مشکوک به تولیدکننده آنتی بیوتیک است که مواد بیرون سلولی تولید می کند. در صورتی که آنتی بیوتیک جزو مواد بیرون سلولی این باکتری جدا شده از محیط باشد، کشت خطی باکتری های استافیلوکوکوس، اشریشیا کلی و میکروکوکوس اطراف آن، در نزدیکی این باکتری متوقف می شود.

کشت عمقی با استفاده از لوپ سوزنی برای مشاهده حرکت باکتری در محیط کشت نیمه جامد با درصد آگار کم درون لوله ای آزمایش انجام می شود.

کشت شیب دار محیط کشت جامدی است که در لوله ای آزمایش مطابق شکل برای ایجاد شرایط کم هوا در ته لوله ای آزمایش و مشاهده کارکرد باکتری در شرایط کم هوا (**میکروآنروفیل**) انجام می شود. معمولاً محیط کشت های جامد مورداستفاده در این حالت دارای **معرف های شیمیایی** هستند که انجام **تخمیر و تولید اسید** توسط باکتری های که می توانند شرایط کم هوا را تحمل کنند، نشان می دهد.

عفونت خونی و نمونه برداری از خون و کشت خون

اندیکاسیون:

انجام کشت خون در تشخیص بیماران تب دار با علائم حاد و بدون شکایت موضعی و نیز در تشخیص قطعی اندوکاردیت عفونی نقش ارزنده ای دارد. باکتریایی یکی از ویژگیهای عفونتهایی مانند تب مالت، لپتوسپیروز و حصبه میباشد. باکتریایی دایمی از مشخصات عفونتهای داخل عروقی مانند شوک سمی، اندوکاردیت، آنوریسم عفونی و ترومبوفلیت های چرکی است. عفونت های خونی حاصل از باکتریهای فرصت طلب یکی از مشکلات عمده بیماران بستری شده در بیمارستانها و افراد ایمنوساپرسیو است و بدلیل مقاومت دارویی بالای عوامل ایجادکننده باکتریایی بیمارستانی، مرگ و میر بالاتری دارند. خون هر فرد سالم، استریل و عاری از هرگونه میکروارگانیسم است. وجود میکروارگانیسم در خون معمولاً بیماریزا است. اما چند مورد استثنا نیز موجود میباشد، مانند باکتریایی گذرای بعد از کشیدن دندان، انجام اعمال جراحی تهاجمی در غشاهای مخاطی، برونکوسکوپي و کاتتریزاسیون ادراری که منجر به باکتریایی گذرا شده و اغلب بدون علامت و غیر بیماریزا هستند.



نمونه گیری:

به علت اینکه میزان مرگ و میر در عفونتهای خون بالا است (حدود 20% تا 50%) لذا نمونه گیری، جداسازی و تشخیص دقیق عامل بیماری از اهمیت خاصی برخوردار است.

الف (وسایل مورد نیاز:

فرم درخواست آزمایش ، برچسب ، شیشه های کشت خون هوازی و بی هوازی ، محلول آنتی سپتیک ، پنبه، سر سوزن ، سرنگ و تورنیکه (گازو).

ب (روش انجام کشت خون :

1- فرم درخواست آزمایش تکمیل شده و با شماره بیمار تطبیق گردیده و به بیمار در مورد چگونگی اخذ خون توضیحات لازم داده میشود .

2- شیشه کشت خون آماده شده و درپوش آن برداشته می شود .

3- بعد از انتخاب رگ مناسب برای خو نگیری (معمولاً ورید بالای ساعد antecubital) ، گارو از بازو بسته میشود.

4- ضد عفونی پوست : برای این منظور ابتدا با پنبه آغشته به محلول آنتی سپتیک محلی را که برای خو نگیری انتخاب شده است به مدت یک دقیقه پاک میشود . سپس اجازه داده میشود تا آنتی سپتیک در پوست خشک شود . با پنبه دیگر آغشته به محلول آنتی سپتیک محل خو نگیری مجدداً بشکل دایره ، از مرکز به طرف خارج پاک میشود و اجازه داده میشود تا آنتی سپتیک روی پوست خشک گردد .

5- در صورت لزوم قبل از وارد نمودن سر سوزن سرنگ ، محل خو نگیری لمس میشود. لازم به تذکر است که انگشتی که برای لمس استفاده میشود قبلاً با روش ذکر شده برای پوست ضد عفونی گردد و نباید محل خو نگیری را با دست غیر ضد عفونی شده لمس نمود. از لحظه ای که پوست محل خو نگیری ضد عفونی شد تا لحظه ای که سر سوزن وارد رگ میشود ، ناحیه ضد عفونی شده را حتماً با گاز استریل بپوشانید. توجه شود تا با روش ذکر شده برای ضد عفونی پوست ، درب شیشه کشت خون نیز ضد عفونی می شود.

6- سر سوزن سرنگ را در داخل ورید وارد نموده و حجم مورد نیاز از خون برای کشت خون اخذ می شود.

7- بعد از آزاد نمودن گارو ، سر سوزن سرنگ از ورید خارج میگردد.

8- بلافاصله مقداری پنبه تمیز و استریل را در محل خو نگیری قرار داده و از بیمار خواسته میشود تا چند دقیقه آنرا تحت فشار نگه دارد. با دقت شیشه های کشت خون بوسیله خون اخذ شده تلقیح میگردد . لازم به ذکر است که هرگز نباید هوای داخل سرنگ به داخل شیشه کشت خون تزریق گردد. بعد از کشیدن خون از ورید ، سوزن سرنگ را تعویض نکرده و نمونه را بلافاصله در محیط کشت خون تلقیح گردد .

9- برچسب که شامل شماره بیمار ، نام بخش و زمان اخذ خون است در روی شیشه های کشت خون چسبانده میشود . در چسباندن برچسب توجه شود تا بر روی قسمتی از شیشه کشت خون که محتوی محیط کشت است الصاق نگردد.

10- نباید فراموش کرد که حتی در بهترین شرایط نیز ممکن است بعضی- از باکتریهای موجود در پوست وارد خون شوند. در ایزولاسیون مکرر بعضی- از میکرو ارگانیسمهای غیر معمول از خون مانند بورخولدريا سپاسیا و انتروباکتر آگلومرانز و سر اشیاء ، بایستی به عفونتهای بیمارستانی شک کرد و اقدامات مقتضی- جهت حذف آنها انجام گیرد . منبع آلودگی شاید در اثر تماس سرنگ با مواد شیمیایی مختلف، ویالهای آلوده و مایعات آلوده ایجاد شود.



جدول 1: عوامل رایج باکتری (باکتریهای شایع ایزوله شده از کشت خون)	
باکتریهای گرم منفی	باکتریهای گرم مثبت
اشرشیا کلي کلبسیلا ها انتروباکترها پروتئوس ها سالمونلا تیغی و سایر گونه ها سودوموناس آئروجینوزا مننگوکوک هموفیلوس انفلونزه و افروفیلوس باکترئیدس فراجیلیس و سایر گونه ها (بی هوازیها) بروسلاها بورخولدریا سودومالئی (در برخی مناطق) اسینتوباکترها سیتروباکترها سریشیاها	استافیلوکوکوس اورئوس استافیلوکوکوس اپیدرمیدس استرپتوکوکهای آلفاهمولیتیک (ویریدانس) استرپتوکوکوس پنومونیه (پنوموکوک) انتروکوکوس فکالیس استرپتوکوکوس پیوژنز (گروه A) استرپتوکوکوس آگالاکتیه (گروه B) لیستریا مونوسیتوژنز کلسترییدیوم پرفرنجنس پیتواسترپتوکوکوس (بی هوازی)

1) کاندیدا آلبیکانس و سایر قارچهای مخمري شکل نظیر کریپتوکوکوس نئوفورمنس نیز از عوامل شایع عفونت های قارچی خون به شمار میروند .

2) سایر عوامل باکتریائی که بندرت سبب باکتری می میشوند عبارتند از : پروویدانسیا ، آئروموناس، مورگانلا، یرسینیا، ادواردسیلا، آکتینوباسیلوس، کامپیلوباکتر فتوس، باسیلوس، لپتوسپیرا، بورلیا، پاستورلا مولتی سیدا ، فرانسیسلا تولارنسیس، استرپتوباسیلوس مونیلی فورمیس، کورینه باکتریوم، پروپیونی باکتریوم، گونوکوکوس، استنوتروفوموناس، فوزوباکتریوم نوکلئاتوم (بی هوازیها)، کاردیوباکتریوم هومینیس و کاپنوسیتوفاگا .

3) ارگانیسم هایی که غالبا سبب باکتری به دنبال استفاده از کاتترهای داخل رگی می شوند عبارتند از : استافیلوکوکوس اورئوس ، انتروباکتریاسه ها ، سودوموناس آئروجینوزا ، کاندیداها ، کورینه باکتریوم ها و سایر باسیل های گرم منفی .



تعداد کشت:

در بیماران مبتلا به اندوکاردیت که آنتی بیوتیک دریافت نمی کنند در يك كشت منفرد خون 90% تا 95% از آنها مثبت میشود و در صورت انجام كشت دوم از این بیماران ، این میزان به 98% و یا بیشتر افزایش مییابد . در بیمارانی که قبلا آنتی بیوتیک دریافت کرده اند: 3 بار نمونه گیری جداگانه و هر کدام به مقدار 10 تا 20 میلی لیتر و در صورت نیاز يك نمونه دیگر در روز دوم میتواند اغلب عوامل بیماریزا را مشخص کند .

توضیحات:

- 1) استرپتوکوک ها و انتروکوک ها مسئول 40% تا 50% اندوکاردیت عفونی محسوب می شوند که اغلب ساکن حفرات دهان و مجاری تنفسی فوقانی انسان هستند.
 - 2) انتروکوکوس فکاليس و استرپتوکوکوس بوویس اغلب به دنبال عفونتهای دستگاه ادراری تناسلی ، به جریان خون راه پیدا می کنند .
 - 3) استرپتوکوکوس پیوژنز خیلی بندرت موجب اندوکاردیت می گردد.
 - 4) استافیلوکوکوس او رئوس دومین عامل رایج اندوکاردیت پس از استرپتوکوک ها و انتروکوک ها است که با حمله سریع بیماری و مرگ و میر بالا همراه بوده و در معتادان تزریقی رایجتر است .
 - 5) استافیلوکوک های کوآگولاز منفي معمولا به دنبال جراحی قلب سبب اندوکاردیت می گردند .
- عوامل قارچی نیز غالبا دریچه های مصنوعی قلب معتادان را تحت تاثیر قرار می دهند.

ایزوله کردن چند میکروب:

جداسازی و تشخیص دو یا چند عامل میکروبی از خون بیمار ممکن است نشانگر باکتریی چند میکروبی باشد که چنین مواردی را می توان در نزد بیماران ضعیف و ناتوان و همچنین بعد از جراحی های مازور یافت . ولی در عین حال ممکن است در اثر آلودگی اتفاق افتاده باشد . باکتریی "پی هوازی" نیز میتواند در اثر چندین عامل بیماریزا ایجاد شده باشد به عنوان مثال در باکتریی های حاد و وخیم که معمولا به دنبال ترومای شدید یا جراحیهای کولون روی میدهند ممکن است يك یا چند عامل باکتریایی پی هوازی به همراه يك یا چند عامل باکتریایی هوازی از خون بیمار جدا شوند.

مقدار خون دریافتی لازم از بزرگسالان 10 الي 20 میلی لیتر میباشد . بایستی متذکر شد که تحقیقات مختلف نشان میدهد به ازای افزایش هر میلی لیتر خون ، امکان مثبت شدن نمونه تا 3/2 % افزایش میابد. از کودکان و نوزادان 1 الي 5 میلی لیتر خون دریافت میشود. محیط های كشت خون در داخل بطري های شیشه ای در اندازه های متفاوت بصورت هوازی و میکرو آئروفیلیك و پی هوازی توسط شرکتهای مختلف تولید میشوند . مقدار تلقیح نمونه خون باید به نسبت يك به پنج تا يك به ده در نظر گرفته شود.

دستورالعمل روش انجام آزمایش آنتی بیوگرام:

هدف:

اطمینان از صحت و دقت روش انجام آزمایش تعیین حساسیت دارویی باکتریهای بیماریزای شناخته شده بر اساس روش انتشار دیسک در آگار Disk Diffusion

دامنه کاربرد:

این دستورالعمل جهت انجام صحیح آزمایش آنتی بیوگرام در بخش میکروبیولوژی و آنالیز ادرار آزمایشگاه کاربرد دارد.



ذخیره سازی و نگهداری دیسکهای آنتی بیوتیکی:

دیسکها باید در یخچال 8 درجه سانتیگراد و پایین تر، یا در فریزر 14- درجه سانتیگراد و پایین تر تا زمان مصرف نگهداری شوند.

تمامی دیسکهای گروه بتالاکتام مانند پنی سیلین، آمپی سیلین، کربنی سیلین، تیکارسیلین، آگراسیلین و نسل اول، دوم و سوم سفالوسپورین ها و ... باید در فریزر نگهداری شوند و فقط می توان مقداری از آن را بر اساس کار روزانه آزمایشگاه حداکثر به مدت یک هفته در یخچال نگهداری نمود.

بعضی- آنتی بیوتیکهای حساس مثل ایمپینم، سفاکر و ترکیبات کللوانیک اسید یا سولباکتام اگر تا هنگام مصرف در فریزر نگهداری شوند، پایداری بیشتری خواهند داشت.

دیسکها باید در ظروف دارای درپوش محکم و حاوی مواد جاذب رطوبت نگهداری شوند. دیسکهای آنتی بیوتیکی باید یک تا دو ساعت قبل از استفاده از یخچال یا فریزر خارج شوند تا به درجه حرارت اتاق برسند.

تجهیزات و لوازم مورد نیاز:

محیط کشت مولر هینتون آگار، خط کش، دیسک های آنتی بیوگرام، چراغ الکی، پنس استریل

روش انجام آزمایش:

در شرایط استریل توسط سواب پنبه ای مقداری از کشت میکروبی (که باید میزان کدورت سوسپانسیون باکتری با کدورت نیم مک فارلند مطابقت داشته باشد) را در تمام سطح پلیت مغزی تلقیح کنید. دیسک های آنتی بیوگرام را بوسیله پنس استریل در سطح پلیت قرار داده و با کمی فشار آنها را کاملاً بر سطح آگار بچسبانید.

پلیت ها را به صورت وارونه در گرمخانه 37 درجه به مدت 24 ساعت نگهداری کنید.

پس از طی دوره انکوباسیون، بوسیله خط کش، قطرها در عدم رشد را در اطراف دیسک ها اندازه گیری و ثبت کنید و با توجه به جدول همراه دیسک ها، گزارش تست آنتی بیوگرام را برای هر یک از آنتی بیوتیک ها به صورت حساس (Sensitive)، مقاوم (Resistant) یا نیمه حساس (Intermediate) گزارش کنید.

نکات مهم در انجام تست آنتی بیوگرام:

برای تلقیح نمونه، ابتدا با سواب استریل سوسپانسیون میکروبی را مخلوط کرده، سواب را با قدرت به دیواره لوله تکیه داده و فشار دهید تا آب اضافی آن گرفته شود، سپس آن را به محیط مولر هینتون انتقال داده و تماس سطح محیط را به چمنی تلقیح کنید.

دیسک های آنتی بیوگرام را نیم ساعت قبل از کاشت در محیط کشت، بیرون از یخچال قرار دهید. قبل از استفاده از محیط کشت آنها را از یخچال خارج نموده و به مدت 20-10 دقیقه در انکوباتور 37 درجه قرار دهید تا رطوبت موجود در سطح آگار خشک گردد.

دیسک ها را به صورت دایره ای و به فاصله 1/2 سانی متر از یکدیگر بکارید.

ضخامت محیط کشت مولر هینتون آگار باید به طور یکنواخت در تماس پلیت ها 5 میلیمتر باشد.



باید توجه داشت که دیسک های مورد استفاده متناسب با نوع باکتری انتخاب شود، برای مثال: هیچگاه برای باکتری گرم منفی دیسک پنی سیلین استفاده نکنید، زیرا نسبت به آن مقاوم است و یا برای کشت ادرار از دیسک کلرامفنیکل استفاده نکنید، برای اینکه این آنتی بیوتیک نمی تواند وارد مجاری ادراری شود. هنگام خواندن نتیجه دقت کنید که همواره امتداد خط کش از وسط دیسک عبور کند. همیشه قطر هاله عدم رشد را اندازه گیری کنید.

همیشه نگاه بدبینانه داشته و کوتاهترین مسیر را برای تعیین حساسیت انتخاب کنید. اگر در اطراف دیسک حتی یک کلنی هم باشد، باید از همانجا تا دیسک را اندازه گیری کرد. قطر هاله عدم رشد را در زیر نور بررسی و تعیین کنید.

پس از تلقیح باکتری به محیط آنتی بیوگرام، در فاصله حداکثر 15 دقیقه باید دیسک ها در سطح آگار کاشته شوند. در برخی از باکتریهای سخت رشد برای انجام تست آنتی بیوگرام، از محیط های کشت اختصاصی استفاده می شود

جهت تلقیح حتماً از ایزوله خالص استفاده شود. اگر نمونه مورد استفاده خالص نباشد، تست کاملاً اشتباه خواهد بود.

تا زمانی که دیسک را روی محیط فشار نداده اید، می توانید جای آن را تغییر دهید، اما بعد از فشار دادن دیسک و تثبیت آن، به هیچ عنوان دیسک را جابجا نکنید.

قبل از کاشت دیسک ها بررسی کنید که حاوی مشخصات باشد.

اگر نمونه تلقیح شده پس از انکوباسیون به صورت یک دست رشد نکرده باشد، نشان دهنده این است که مقدار کلنی برداشت شده کمتر از استاندارد مک فارلند بوده است.

اگر در اطراف تمام دیسک ها هاله تشکیل شود و یا در اطراف هیچ یک از دیسک ها هاله ای تشکیل شود، باید تست تکرار شود.

اگر PH محیط مولر هینتون آگار مناسب نباشد نتایج اشتباه بدست می آید.

نگهداری غلط دیسک ها و استفاده از محیط های کشت تاریخ گذشته موجب خطا می شود.

بسیاری از باکتریها کم کم به آنتی بیوتیک های مختلف مقاوم می شوند، که این می تواند عمر آنتی بیوتیکها را به سوی افول هدایت کند.

استفاده زیاد از سولفونامیدها باعث بیماریهای عصب شنوایی و یا بیماریهای کلیوی خواهد شد. مصرف زیاد پنی سیلین باعث ترومبوسیتوپنی و مصرف زیاد تتراسایکلین موجب گرانولوسیتوپنی می شود. دیسک ها باید حداکثر به مدت یک ماه در یخچال و بیش از یک ماه در فریزر نگهداری شوند.

آمینوگلیکوزیدها بر روی باکتریهای بی هوازی بی هوازی بی تأثیر هستند.

کلرامفنیکل در نمونه ادراری استفاده نمی شود، زیرا وارد مجاری ادراری نمی گردد.

تتراسایسکلین آنتی بیوتیک وسیع الطیفی است و معمولاً به صورت موضعی استفاده می شود.

امکانات و تسهیلات مورد نیاز:

تجهیزات آزمایشگاه



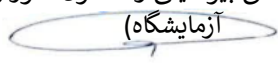
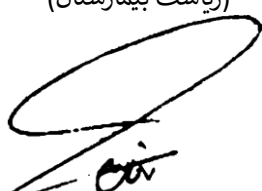
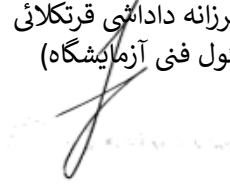
دانشگاه علوم پزشکی اراک
مرکز آموزشی درمانی ولیعصر (عج)
عنوان دستورالعمل: نحوه انجام آزمایش هایی که در آزمایشگاه میکروبیشناسی
انجام می شود

تاریخ اولین ابلاغ: 1395/10/12
تاریخ آخرین بازنگری: 1404/02/27
تاریخ بازنگری بعدی: 1405/02/27
کد سند: IN/LS/08/04

منابع:

جزوات منتشر شده و الزامات مربوط به مستندسازی آزمایشگاه مرجع سلامت

الزامات مستندسازی و کتاب جامع آزمایشگاهی

تهیه کننده/ تهیه کنندگان		
فاطمه مهری (پرسنل بخش میکروبیشناسی آزمایشگاه)	مهرداد نحوی (سوپروایزر آزمایشگاه) 	دکتر فرامرز دارابی (مسئول فنی بیوشیمی و مسئول آموزش آزمایشگاه) 
ابلاغ کننده	تصویب کننده	تأیید کننده
دکتر رضا شجاعی (ریاست بیمارستان) 	دکتر فرزانه داداشی قرتکلانی (مسئول فنی آزمایشگاه) 	دکتر احسان ا... غزنوی راد (مسئول فنی میکروبیشناسی آزمایشگاه)