

مرکز مدیریت بیماری‌ها

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، 1386.

مشخصات ظاهری: 200 ص: جدول، مصور.

شابک: 3-195-964-978

یادداشت: فیا.

موضوع: عفونت‌های بیمارستانی - تشخیص.

موضوع: دستنامه‌های آزمایشگاهی.

رده‌بندی کنگره: 9/ع7/RA644

رده‌بندی دیویی: 614/44

978-964-359-195-3

مرکز نشر
مهر

تلفن: 88553429 و 88553403

دورنگار: 88713653

مرکز مدیریت بیماری‌ها

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 (1386)

PP

راهنمای آزمایشگاهی

تشخیص عفونت‌های بیمارستانی

نویسندگان (به ترتیب حروف الفبا):

دکتر پیمان تربتی

پاتولوژیست، عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

دکتر سهیلا حکمت‌یزدی

پاتولوژیست، کارشناس مسئول بخش میکروبی‌شناسی آزمایشگاه رفرانس

مژگان دلداری

باکتریولوژیست، کارشناس ارشد بخش میکروبی‌شناسی بیمارستان میلاد

دکتر محمد رهبر

میکروبیولوژیست، عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات آزمایشگاه رفرانس

دکتر افشین صفایی

دکترای علوم آزمایشگاهی MPH، کارشناس مسئول اداره امور آزمایشگاه‌های مرکز مدیریت بیماری‌ها

دکتر محمدجواد کاویانی

دکترای علوم آزمایشگاهی، کارشناس مسئول اداره کل امور آزمایشگاه‌ها

دکتر بابک ولی‌زاده

دکترای علوم آزمایشگاهی، مسئول بخش میکروبی‌شناسی آزمایشگاه بهار

دکتر مهرداد ونکی

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

ویراستار:

دکتر بابک ولی‌زاده

مرکز نشر
مهر

وزارت بهداشت، درمان، و آموزش پزشکی
معاونت سلامت

+

+

شمارگان: 5000 نسخه

شابک: 978-964-359-195-3 ISBN: 978-964-359-195-3

«حق چاپ برای مرکز مدیریت بیماری‌ها محفوظ است.»

سراغاز

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.

مجموعه 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»

+

+

پیش‌گفتار

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 9 فصل است. فصل‌های 2، 3، 4 و بخش اول فصل 5 با تقسیم‌بندی عفونت‌های بیمارستانی براساس استاندارد NNIS در ارتباط است. بخش دوم فصل 5 و فصل‌های 6، 7، 8 و 9 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 ارگانیزم‌های 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»

1386

فهرست فصل‌ها

صفحه	عنوان
19	فصل اول نقش آزمایشگاه میکروپشناسی در کنترل عفونت‌های بیمارستانی
23	فصل دوم عفونت‌های ادراری
45	فصل سوم عفونت‌های تنفسی
71	فصل چهارم عفونت‌های زخم‌های جراحی
101	فصل پنجم کشت خون، کاتترهای خونی و فرآورده‌های بانک خون
131	فصل ششم ارزیابی میکروپشناسی و نمونه‌برداری از محیط‌های بیمارستانی و وسایل پزشکی
143	فصل هفتم نمونه‌برداری از هوا
163	فصل هشتم کشت آب بیمارستان برای جداسازی لژیونلا
183	فصل نهم کشت و اندازه‌گیری اندوتوکسین مایعات همودیالیز و دیالیز صفاقی

فهرست

صفحه	عنوان
	فصل اول
20	نقش آزمایشگاه میکروبی شناسی در کنترل عفونت‌های بیمارستانی
	فصل دوم
24	عفونت‌های ادراری
24	عفونت‌های ادراری بیمارستانی (HAUTI)
25	دستورالعمل جمع‌آوری نمونه‌های ادراری
25	1. شرایط آمادگی بیمار قبل از جمع‌آوری نمونه
25	2. تکمیل فرم درخواست یا دریافت نمونه ادراری
26	3. نمونه‌گیری
26	3-1. بیمارانی که سوند ادراری دارند
28	نحوه نمونه‌گیری و جمع‌آوری ادرار تمیز میانی در زنان، مردان و نوزادان
28	الف) زنان
29	ب) مردان
29	ج) نوزادان
30	روش جمع‌آوری ادرار به طریق Four-glass یا VB1-VB2-EPS-VB3
30	4. وسایل و مواد لازم
31	5. حجم نمونه
31	6. شرایط نگهداری و انتقال
31	7. شرایط رد نمونه
31	8. آزمایش‌های تکمیلی و مرتبط
32	آزمایش نیتريت
33	آزمایش لکوسیت استراز
33	نحوه کشت نمونه ادرار

صفحه	عنوان
34	تعریف انواع سندروم‌های بالینی
36	تفسیر و نحوه گزارش‌دهی نتایج کشت ادرار
37	روش و زمان بررسی نتایج
41	تفسیر نتایج کشت ادرار در نمونه‌های گرفته‌شده به‌وسیله سوند ادراری
43	تفسیر نتایج کشت ادرار حاصل از تکنیک‌های تهاجمی
فصل سوم	
عفونت‌های تنفسی	
49	عفونت‌های تنفسی بیمارستانی
49	تشخیص آزمایشگاهی پنومونی بیمارستانی
53	نمونه‌برداری و انتقال نمونه
54	روش‌های غیرتهاجمی
56	جمع‌آوری خلط
56	جمع‌آوری خلط از طریق روش‌های القایی
57	کشت خون
57	روش‌های تهاجمی
57	آسپیراسیون شیره معده
57	آسپیراسیون آندوتراکئال
58	برونکوسکوپی
61	بیوپسی ریه باز
63	بررسی باکتریولوژیک نمونه‌های دستگاه تنفسی
63	الف) محیط‌های کشت مورد استفاده
63	ب) آزمون میکروسکوپی
64	تفسیر رنگ‌آمیزی گرم در نمونه خلط
66	گزارش نتایج رنگ‌آمیزی گرم
66	کشت و آزمایش نمونه‌های خلط، آسپیراسیون تراشه، شستشوی برنش،
67	براشینگ برنش و نمونه‌های بیوپسی برنش
67	کشت و پیگیری آسپیراسیون داخل‌نای، آسپیراسیون ریه و نمونه‌های
68	بیوپسی ریه
69	براشینگ برنش و مایع BAL در صورتی که برای کشت کمی فرستاده شده‌باشد
70	گزارش میزان رشد

صفحه	عنوان
70	روش نیمه‌کمی
70	روش کمی
71	نکته‌های مهم در تفسیر نتایج
71	کشت نمونه‌های مجاری تنفسی تحتانی
71	الف) نمونه‌های خلط بدون سلول‌های اپی‌تلیال یا با سلول اپی‌تلیال کم
75	ب) نمونه‌های خلط با میزان زیادی سلول‌های اپی‌تلیال و WBC که در رنگ‌آمیزی گرم مشاهده می‌شوند
76	ج) شستشوی برنش‌ها، براشینگ برنش‌ها، نمونه‌های بیوپسی برنش‌ها، مایع BAL، آسپیراسیون ریه و مواد داخل‌نای و نمونه‌های بیوپسی ریه
فصل چهارم	
عفونت‌های زخم‌های جراحی	
78	روش نمونه‌گیری زخم
83	روش کمی
83	روش نیمه‌کمی و کیفی
84	نحوه نمونه‌برداری
84	الف) زخم سطحی
85	ب) زخم‌ها و ندول‌ها
85	ج) بافت زیرجلدی و نمونه‌های پوست
86	د) زخم‌های عمیق، آسپیراسیون و نمونه‌های بافتی عمیق
86	روش انتقال نمونه
89	نحوه آماده‌سازی نمونه
89	1. هموزن و یکنواخت کردن بافت
91	2. آماده‌سازی اسمیر
92	3. آماده‌سازی اسمیر نازک
92	روش تلقیح نمونه‌ها در محیط کشت
96	زمان و دمای انکوباسیون
96	کشت بی‌هوایی
96	نحوه کشت
98	ارزیابی و بررسی نمونه‌های زخم

133	2. کشت نیمه کمی از نوک کاتتر
136	3. کشت کمی از نوک کاتتر
صفحه	عنوان
	1-4. کشت از نمونه خون گرفته شده از کاتتر و خون ورید محیطی و مقایسه زمان مثبت شدن
136	
137	2-4 کشت کمی خون گرفته شده از کاتتر و خون ورید محیطی
138	5. کشت فرآورده های بانک خون
	فصل ششم
	ارزیابی میکروبی شناسی و نمونه برداری از محیط های بیمارستانی و وسایل پزشکی
131	
133	استافیلوکوک ها
133	انتروکوک ها
134	اسینتوباکترها
135	نمونه برداری میکروبی شناسی از سطوح محیطی
135	روش های آزمایشگاهی
136	محیط های کشت برای روش های کمی و کیفی
136	محلول ها
137	کشت سطوح محیطی
137	روش کمی
138	روش کیفی
138	نمونه برداری از سطوح محیطی
138	روش سواب
139	روش غوطه ورکردن
139	روش RODAC
140	تشخیص
140	تفسیر
	فصل هفتم
143	نمونه برداری از هوا
144	نمونه برداری میکروبیولوژیک هوا
148	روش ها
150	کشت هوا برای قارچ ها

99	رنگ آمیزی گرم
99	رنگ آمیزی گرم (روش کاپلوف)
صفحه	عنوان
101	تفسیر کشت نمونه های زخم
103	گزارش نتایج میکروبی شناسی
103	تفسیر و گزارش لام، رنگ آمیزی گرم و کشت
	فصل پنجم
111	کشت خون، کاتترهای خونی و فرآورده های بانک خون
	بخش اول
	کلیات
111	
114	مواد ضد عفونی کننده برای نمونه گیری
114	نمونه گیری با Povidone – Iodine 10%
115	تعداد کشت خون، زمان نمونه گیری و حجم خون مورد نیاز
115	تعداد و زمان خون گیری
116	حجم نمونه
117	انتقال
117	کشت
118	نسبت خون به محیط کشت
118	اتمسفیر
118	انکوباسیون
120	روش (ISOLATOR) Lysis - Centrifugation
120	سیستم های خودکار
121	گزارش و تفسیر
	بخش دوم
122	کاتترهای عروقی و عفونت های بیمارستانی
129	آلودگی از طریق مواد تزریقی (Infusate)
130	میکروبی شناسی
132	روش های تشخیص
132	1. کشت کیفی از خون و کاتتر

177	الف) ظرف‌ها و سواب‌های لازم برای جمع‌آوری نمونه
177	ب) فیلترها و ضمائم آنها
178	ج) محیط کشت
صفحه	عنوان
178	د) معرف‌ها
179	ه) میکروسکوپ و ابزارهای مرتبط
179	ملاحظات پیش از آزمایش
179	نمونه‌های برداشت‌شده
179	الف) مکان برداشت نمونه و انتخاب آن
180	ب) جمع‌آوری نمونه‌ها
181	1. نمونه‌های سواب
181	2. نمونه‌های آب
182	3. نمونه مخزن‌های نخیره آب
182	ملاحظات حین آزمایش
182	کنترل کیفی و اطمینان کیفیت
182	الف) محیط‌های کشت تجاری و آماده استفاده
183	ب) محیط‌های کشت ساخته‌شده در آزمایشگاه
184	ج) کنترل کیفی معرف‌ها
184	د) اطمینان کیفی (QA)
185	آماده‌سازی نمونه‌ها
185	الف) تغلیظ از طریق فیلتراسیون (آب آشامیدنی)
186	ب) پلیت‌گذاری مستقیم برای آب و رسوبات غیرآشامیدنی
186	ج) یکنواخت‌کردن نمونه‌های آب تغلیظ‌شده و تغلیظ‌نشده
187	د) نمونه آب حاصل از تغلیظ و اضافه‌کردن اسید
189	کشت نمونه‌ها روی پلیت
189	الف) نمونه تغلیظ‌شده به طریق فیلتراسیون
189	ب) نمونه‌های پلیت‌گذاری مستقیم
189	ج) روش کار
189	د) نخیره‌سازی نمونه‌ها
190	انکوباسیون
190	ارزیابی و تفسیر کشت
190	الف) شمارش باکتری

152	ملاحظات پیش از آزمایش
152	نمونه
152	1. انتخاب محل نمونه‌برداری
صفحه	عنوان
152	2. حجم نمونه و انکوباسیون
153	3. وسایل نمونه‌برداری از هوا
154	4. پلیت‌گذاری
154	5. نمونه‌برداری از سطوح
155	6. محیط‌های کشت
155	ملاحظات حین آزمایش
155	1. نمونه‌برداری
155	2. دمای انکوباسیون
156	3. کنترل کیفی
156	ملاحظات پس از آزمایش
156	محاسبات
157	تفسیر اطلاعات
158	پیوست
158	ویژگی‌های وسایل نمونه‌برداری حجمی مکانیکی
158	1. مکنده‌های آبکشی
159	2. مکنده‌های شکافی
160	3. نمونه‌برداری‌های سانتریفوژی
160	4. Impingers
160	5. فیلتراسیون
160	6. پلیت‌گذاری
	فصل هشتم
176	کشت آب بیمارستان برای جداسازی لژیونلا
176	اصول کار
176	الف) نحوه انتقال و اکولوژی لژیونلا
177	ب) معیارهای جداسازی و تأیید لژیونلا از منابع
177	معرف‌ها، محیط کشت و مواد مصرفی مورد نیاز

203	تفسیر
203	الف) مایع دیالیز
203	ب) آب مورد استفاده در دیالیز
204	ج) آب‌های مورد استفاده در همودیالیز
صفحه	عنوان
204	گزارش کشت
204	آزمایش اندوتوکسین باکتریال
205	ملاحظات پیش از آزمایش اندوتوکسین
205	نمونه
205	وسایل و مواد لازم
206	ملاحظات حین آزمایش
206	روش
206	کنترل کیفی
206	ملاحظات پس از آزمایش
206	گزارش نتایج
207	محدودیت
207	کشت مایع دیالیز صفاقی
209	نمونه
209	جمع‌آوری و انتقال
209	شرایط انتقال
209	آماده‌سازی
210	آزمایش میکروسکوپی
210	الف) رنگ‌آمیزی گرم
210	ب) رنگ‌آمیزی اسید فاست
211	کشت
211	کشت موازی
211	روش‌های تکمیلی
212	تفسیر
212	ارزیابی کمی
213	یافته‌های مکمل بالینی
213	الف) شمارش سلولی

190	1. نمونه‌های اصلی (پلیت‌گذاری مستقیم)
190	2. نمونه اصلی تغلیظ‌شده به روش فیلتراسیون
191	ب) بررسی کشت‌ها از لحاظ لژیونلا
صفحه	عنوان
191	ج) تعیین هویت احتمالی لژیونلا
177	ویژگی‌های کلنی لژیونلا
192	د) فلوتورسنس کلنی
178	رنگ‌آمیزی گرم
193	روش‌های تأییدی شناسایی لژیونلا
193	روش کار ایمونوفلوتورسنس
193	الف) آزمایش مستقیم آب (آماده‌سازی گسترش)
194	ب) تأیید کشت (آماده‌سازی گسترش)
194	ج) روش رنگ‌آمیزی فلوتورسنس
195	د) آزمایش لام‌های رنگ‌آمیزی شده
195	ه) پیگیری آزمایش‌ها
	فصل نهم
	کشت و اندازه‌گیری اندوتوکسین مایعات همودیالیز
	و دیالیز صفاقی
197	ملاحظات پیش از آزمایش
198	تعداد و زمان نمونه‌برداری
198	الف) نمونه‌برداری روتین
199	ب) نمونه‌برداری مکرر
199	ج) نمونه‌برداری موردی
199	د) زمان نمونه‌برداری
200	جمع‌آوری
200	الف) آب دیالیز
200	ب) مایع دیالیز
200	ج) حجم
201	وسایل و مواد لازم جهت شمارش پلیت
202	ملاحظات حین آزمایش
202	روش کار

◀ 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 خواهد شد 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 سایه 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.

چکیده مهم‌ترین وظایف آزمایشگاه میکروب‌شناسی:

1. جمع‌آوری، انتقال و نگهداری صحیح نمونه‌های بیولوژیک: از آنجا که بسیاری از عفونت‌های بیمارستانی توسط میکروارگانیسم‌های فرصت‌طلب و کم‌ویرولانسی که در سطوح پوستی و مخاطی کلنیزه هستند، ایجاد می‌شود، جمع‌آوری صحیح و دقیق نمونه‌ها از محل تعیین‌شده به شناسایی دقیق عوامل بالقوه بیماری‌زا یا قطعاً بیماری‌زا کمک شایانی می‌نماید. ارزیابی کیفیت نمونه‌ها و تصمیم‌گیری درخصوص قبول یا رد آنها مستقیماً بر صحت نتایج آزمون تأثیر خواهد گذاشت.

2. کشت، جداسازی و شناسایی دقیق میکروارگانسیم‌های بیماری‌زا: امروزه دامنه بیماری‌زاهایی که باعث بیماری‌های خطرناک 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 قرار دارد. بنابراین، در مواردی که ارگانسیم بیماری‌زا از انواع غیرشایع باسیل‌های گرم منفی غیرتخمیری و برخی قارچ‌ها، مایکوباکتریوم‌ها و ویروس‌ها است، نگهداری و انتقال صحیح نمونه به آزمایشگاه مرجع قویاً توصیه می‌شود.
3. گزارش و تفسیر نتایج: برای ارائه یک تفسیر دقیق آگاهی از یافته‌های بالینی، عوامل زمینه‌ساز و اقدام‌های تشخیصی - 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 کمیته عفونت‌های بیمارستانی است. بدیهی است ارائه یک تفسیر جامع که متضمن توصیه‌ها و نظریات مشورتی مناسب باشد، در چارچوب برقراری ارتباطات مؤثر محقق خواهد شد.
4. ایجاد آگاهی و اطلاع‌رسانی به کمیته کنترل عفونت نسبت به امکانات موجود، توانمندی‌ها و محدودیت‌های متدولوژیک، کاربری وسایل و تجهیزات و روش‌های تشخیصی جاری در آزمایشگاه که برای تشخیص ارگانسیم‌های بیماری‌زا به کار گرفته می‌شوند.
5. 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 منجر می‌شوند و دستیابی به آنها را خواستار شود.
6. انجام دادن آزمون تعیین حساسیت میکروبی به روش استاندارد، مطالعه 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 کمیته کنترل عفونت‌های بیمارستانی از دیگر وظایف این واحد است.

7. شناسایی منابع و راه‌های احتمالی انتقال عفونت توسط نمونه‌برداری از ناقلین مشکوک در موارد بروز طغیان (Outbreak). تعیین و انتخاب نوع و محل نمونه‌برداری، نحوه کشت و شیوه گزارش‌دهی باید با دستورالعمل خاص منطبق باشد که در فصول آتی به آن پرداخته می‌شود.
 8. حفظ و پایش شرایط استریلیتی در دستگاه استریلیزاسیون با حرارت خشک و مرطوب.
 9. مشارکت با دیگر اعضای کمیته کنترل عفونت بیمارستانی درخصوص تصمیم‌گیری درباره آزمایش‌های میکروبیولوژیک و اقسام 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 - انسانی و رعایت استانداردهای استخدام و آموزش کارکنان فنی متصور نیست. بنابراین، مدیر اجرایی بیمارستان مسئولیت حسن اجرای اهداف کمیته 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 به دنبال استفاده مستقیم از وسایل و ابزار پزشکی² در سیستم ادراری به وجود می‌آیند. حدود 80 درصد موارد به علت استفاده از کاترهای ادراری³ است؛ به همین دلیل، در برخی موارد به این عفونت‌ها، عفونت‌های ادراری ناشی از کاتتر (CAUTI)⁴ اطلاق می‌شود.

در 10-20 درصد افرادی که سوند ادراری کوتاه‌مدت داشته‌اند باکتریوری دیده می‌شود که فقط 2 درصد آنها علائم ادراری دارند که به صورت عفونت ادراری ظاهر می‌شود.

همچنین، در بیمارانی که سوند ادراری دارند به ازای هر روز، 5 درصد احتمال بروز باکتریوری وجود دارد و در افرادی که بین 4 تا 6 هفته سوند داشته‌اند، احتمال باکتریوری به 100 درصد افزایش می‌یابد.

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

شایع‌ترین میکروارگانیزم‌های مولد عفونت‌های ادراری بیمارستانی عبارت‌اند از:

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

دستورالعمل جمع‌آوری نمونه‌های ادراری¹

1. شرایط آمادگی بیمار قبل از جمع‌آوری نمونه

- در مواردی که بیمار سوند ادراری ندارد، بهترین نمونه اولین ادرار صبحگاهی است که حداقل به مدت 8 ساعت داخل مثانه باقی‌مانده و تغلیظ شده باشد. در غیر این صورت، می‌توان از نمونه‌های ادرار تصادفی² استفاده نمود.
- در نمونه‌های ادرار تصادفی، بیمار ترجیحاً باید از آشامیدن آب و مایعات اضافی به منظور تولید ادرار خودداری نماید؛ زیرا این امر موجب رقیق شدن ادرار و کاهش تعداد باکتری می‌شود.
- بیمار نباید در 48 ساعت گذشته آنتی‌بیوتیک مصرف کرده باشد، مگر با تجویز پزشک معالج. توصیه می‌شود در باکتریوری بدون علامت از سه نمونه ادرار صبحگاهی استفاده شود که در سه روز متوالی جمع‌آوری شده است.

2. تکمیل فرم درخواست یا دریافت نمونه ادراری

نام و شماره 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

1. Specimen Collection
2. Random urine

ذکر عوامل مداخله‌گر احتمالی (بیماری‌های زمینه‌ای، مصرف آنتی‌بیوتیک و ...)

3. نمونه‌گیری

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

1-3. بیمارانی که سوند ادراری دارند

1-3-1. در مواردی که از سوندهای ادراری طولانی‌مدت استفاده می‌شود¹، برای نمونه‌گیری سوند را قبل از محل اتصال به لوله کیسه ادراری با یک پنس یا وسیله مشابه مسدود می‌نماییم. حدود 1-0/5 ساعت بعد لوله کیسه 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 تعویض شده استفاده نمود.

E توجه:

1. نمونه‌گیری ادرار نباید از کیسه سوند ادراری صورت گیرد.
2. نمونه‌گیری و کشت از نوک کاتتر فولی قابل قبول نیست.

1-3-2. سوند نلاتون یا کاتتر Straight: ابتدای مجرای ادرار را با آب و صابون مایع معمولی می‌شوئیم و پس از سوندگذاری قسمت اول ادرار را دور می‌ریزیم و بقیه را در ظرف استریل جمع می‌کنیم.

1-3-3. Ileal Conduit Urine: پس از تمیزکردن Stoma Opening با الکل، نوک کاتتر را به آرامی و به عمق 2/5-5cm داخل می‌بریم و صبر می‌کنیم تا ادرار به تدریج خارج و در ظرف نمونه‌گیری جمع شود.

E توجه: به هیچ وجه نباید از Stomabag نمونه بگیرید.

3-1-4. نمونه ادرار سوپراپوبیک

؛ نمونه‌گیری از نوزادان؛

؛ کشت بی‌هوازی؛

؛ مواردی که نمونه ادرار تمیز میانی¹ CCMS یا² CVMS به دلیل آلودگی حین نمونه‌گیری دارای نتایج تشخیصی و تفسیری مناسبی نیست.

3-1-5. نمونه‌گیری ادرار با سیستم‌سکوپی: گرفتن ادرار به کمک کاتتر ضمن عمل سیستم‌سکوپی در اتاق عمل و توسط متخصص انجام می‌شود. در این روش می‌توان ادرار را جداگانه از دو حالب تهیه و منبع عفونت را مشخص نمود.

نحوه نمونه‌گیری و جمع‌آوری ادرار تمیز میانی در زنان، مردان و نوزادان الف) زنان

1. درپوش ظرف استریل مخصوص جمع‌آوری ادرار را بازکنید و مراقب باشید تا لبه و سطوح داخلی ظرف با انگشتان شما تماس پیدا نکند.
2. در موقعیت ادرار کردن قرار بگیرید و تا آنجا که ممکن است پاها را از یکدیگر بازکنید.
3. با انگشتان یک دست چین‌های پوستی دستگاه تناسلی را از یکدیگر بازنگهدارید و تا پایان جمع‌آوری همین وضعیت را حفظ کنید.
4. 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 استفاده نکنید).

براساس توصیه سازمان بهداشت جهانی (WHO)، می‌توان در صورت دسترسی نداشتن به مواد شوینده، از آب و گاز استفاده کرد.

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

5. 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.
6. توجه کنید که مشخصات کامل شما (نام، جنسیت و ...)، تاریخ و ساعت دریافت نمونه به‌طور صحیح روی برچسب ظرف نوشته شده‌باشد.
7. ظرف کشت ادرار را در محل مخصوص جمع‌آوری نمونه‌ها قرار دهید.

ب) مردان

1. درپوش ظرف استریل مخصوص جمع‌آوری ادرار را باز کنید و مراقب باشید تا لبه و سطح داخلی ظرف با انگشتان شما تماس پیدا نکند.
2. قسمت اول ادرار را بیرون بریزید و بدون توقف جریان ادرار، قسمت میانی ادرار را داخل ظرف استریل جمع‌آوری کنید.
3. درپوش ظرف را روی آن قرار دهید و کاملاً سفت کنید.
4. توجه کنید که مشخصات کامل شما به‌طور صحیح روی برچسب ظرف نوشته شده‌باشد.
5. ظرف کشت ادرار را در محل مخصوص جمع‌آوری نمونه‌ها قرار دهید.

ج) نوزادان

1. کودک را به پشت بخوابانید و پاهای او را با خم کردن زانوهایش به حالت نیمه‌باز درآورید.
2. دستکش بپوشید. ناحیه تناسلی را با پنبه آغشته به صابون مایع و آب تمیز کنید.
3. سپس با آب گرم آبکشی و کاملاً خشک نمایید.
4. توجه کنید که کیسه ادرار به‌کار رفته برای کودکان دختر و پسر متفاوت است.
5. کیسه مخصوص پسر بچه‌ها سوراخ چسب‌دار به‌شکل دایره دارد.
6. کیسه مخصوص دختر بچه‌ها سوراخ چسب‌دار به‌شکل بیضی دارد.
7. آلت تناسلی پسر بچه را با حداقل دستکاری داخل سوراخ کیسه قرار دهید و برچسب آن را محکم کنید.

8. پس از برداشتن برچسب از اطراف دهانه کیسه، دستگاه تناسلی دختر بچه را به آرامی باز کنید و کیسه را از محل سوراخ طوری بچسبانید که مجرای ادرار در داخل کیسه قرار بگیرد و برچسب آن را محکم کنید.
9. حداکثر نیم ساعت اجازه دهید تا ادرار (تقریباً 20 سی سی) در داخل کیسه جمع شود.
10. کیسه ادرار را با دقت از محل اتصال جدا کنید و داخل ظرف استریل مخصوص کشت قرار دهید.

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

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

نحوه نمونه‌گیری:

- VB₁:** 10ml اول ادرار را داخل ظرف استریل کشت ادرار جمع می‌کنیم.
- VB₂:** پس از تخلیه حدود 200ml از ادرار، 10ml از وسط ادرار را داخل ظرف استریل دوم جمع می‌کنیم.
- EPS:** پروستات را ماساژ می‌دهیم و چند قطره ترشحات خارج شده از پیشابراه را داخل ظرف استریل سوم جمع می‌کنیم.
- VB₃:** اولین 10ml ادرار پس از ماساژ را داخل ظرف استریل چهارم جمع می‌کنیم.

4. وسایل و مواد لازم

- ظرف استریل دهان‌گشاد، غیرقابل نشت و با در محکم (برای تمام بیماران)؛
- کیسه ادرار (دخترانه و پسرانه) برای نوزادان و شیرخواران؛
- صابون (ترجیحاً دستمال یا گاز آغشته به صابون مایع برای شستشو)؛
- راهنمای مکتوب نحوه نمونه‌گیری، زمان و شرایط مناسب انتقال (برای ارسال به تمام بخش‌های بیمارستانی).

5. حجم نمونه

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

6. شرایط نگهداری و انتقال

نمونه ادرار تهیه‌شده تا 2 ساعت در حرارت اتاق و تا 24 ساعت در یخچال قابل نگهداری است.
افزودن اسید بوریک با غلظت 1-2 درصد تعداد باکتری را برای 48-96 ساعت در دمای محیط ثابت نگه‌می‌دارد و به‌ندرت روی رشد بعضی ارگانسیم‌ها تأثیر منفی دارد.

7. شرایط رد نمونه

نمونه‌های بدون برچسب مشخصات بیمار؛
نمونه‌هایی که در ظرف‌های نامناسب به آزمایشگاه رسیده‌باشد؛
نمونه ادرار 24 ساعته؛
نمونه ادراری که بیش از 2 ساعت در حرارت اتاق (RT) مانده‌باشد یا نحوه نمونه‌گیری صحیح نباشد؛
کشت از نوک کاتتر ادراری¹.

8. آزمایش‌های تکمیلی و مرتبط

بر اساس پیشنهاد NNIS² توجه به علائم بالینی و همچنین نتایج آزمایش کامل ادرار برای تفسیر و گزارش کشت‌های ادرار و تشخیص عفونت ادراری ضروری است. بنابراین، برای اطمینان از صحت تفسیر باید از صحیح بودن نتایج آزمایش کامل ادرار مطمئن شد. در این رابطه، می‌توان به موارد زیر اشاره نمود:
زمان و دور سانتریفوژ (2000-2500 rpm) به مدت 5 دقیقه؛

1. Foley Catheter Tip
2. National Nosocomial Infection Surveillance

حجم ادرار سانتریفوژ شده نباید کمتر از 10ml باشد (در صورتی که این حجم مثلاً 6ml باشد باید تعداد عناصر مشاهده‌شده را در عدد 2 ضرب کرد)؛
تعداد > 5 لکوسیت در هر HPF (40X) ادرار سانتریفوژ شده به‌عنوان پیوری¹ تلقی می‌شود که معادل > 50 لکوسیت در هر میلی‌متر مکعب است.

E توجه: مقادیر طبیعی لکوسیت در ادرار زنان و مردان متفاوت است:

مردان = 0-3/HPF

زنان = 0-5/HPF

توجه به میزان RBC، سلول‌های اپی‌تلیال و سیلندرهای ادراری، وجود باکتری در ادرار، وزن مخصوص و به‌خصوص آزمایش نیتريت و لکوسیت استراز اهمیت دارد.

آزمایش نیتريت²

بیماری‌زاهای ادراری مانند *E. coli*، کلبسیلا، انتروباکتر، پروتئوس، پseudomonas، استرپتوکوکوس، نیتريت مثبت هستند، ولی استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس و انتروکوکوس نیتريت منفی هستند.

بعضی مؤلفان نتایج آزمایش نیتريت را در ارزیابی عفونت‌های بیمارستانی رضایت‌بخش نمی‌دانند.

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

منفی کاذب در این موارد دیده‌می‌شود:

1. تعداد باکتری کمتر از 10^5 در هر میلی‌لیتر؛
2. pH کمتر از 6؛

1. Pyuria
2. Nitrite Test

3. اسید اسکوربیک بالا؛

4. نمونه‌های ادرار تصادفی یا نمونه‌های گرفته شده از کاتترهای ادراری؛

5. کمبود نیترات در برنامه غذایی بیمار.

آزمایش لکوسیت استراز

در صورت وجود نوتروفیل‌های سالم یا لیز شده در ادرار این آزمایش مثبت می‌شود.

موارد منفی کاذب:

1. افزایش زیاد وزن مخصوص، پروتئین و گلوکز در ادرار؛

2. مقادیر خیلی زیاد اسید اسکوربیک؛

3. مصرف تتراسیکلین، سفالکسین و سفالوتین؛

4. افزودن اسید بوریک به ادرار به عنوان ماده نگهدارنده.

موارد مثبت کاذب:

1. آلودگی شدید با ترشحات واژن به علت WBC زیاد، تعداد زیاد سلول‌های

اپی‌تلیال سنگفرشی¹ و باکتری؛

2. وجود تریکوموناس و ائوزینوفیل؛

3. مواد اکسیدکننده و فرمالین.

نحوه کشت نمونه ادرار

به طور معمول، کشت ادرار روی محیط‌های آگار خون‌دار، EMB یا مکانکی آگار²

انجام می‌شود. زمانی که ادرار را با استفاده از روش‌های جراحی یا سوپراپوبیک

یا با روش سیستم اسکوپ یا ماساژ پروستات جمع‌آوری نموده‌اند یا در مواردی

1. Squamous cell
2. MacConkey Agar

که شک نسبت به ارگانیزم‌های سخت‌رشد در نمونه ادرار وجود دارد، علاوه بر محیط‌های فوق از محیط شکلات آگار¹ نیز استفاده می‌شود.

برای کشت ادرار می‌توان از لوپ کالیبره 0/01 یا 0/001 میلی‌لیتری استفاده کرد.

شمارش کلنی‌ها در محیط‌های کشت ادرار

تعداد کلنی‌های حاصل از رشد باکتری‌ها در محیط کشت را می‌شماریم و در ضریب حجم لوپ ضرب می‌کنیم. نتیجه به صورت واحد شمارش کلنی باکتری در میلی‌لیتر ادرار بیان می‌شود (CFU/ml)².

تعریف انواع سندروم‌های بالینی

1. عفونت ادراری بدون عارضه³: عبارت است از عفونت درحالی که ساختمان و عمل دستگاه ادراری سالم است. در این موارد شایع‌ترین بیماری‌زای جدا شده از کشت‌های ادراری *E.coli* است.

2. عفونت ادراری پیچیده⁴: عبارت است از عفونت در دستگاه ادراری که از نظر 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 انجام شده یا به‌طور مادرزادی ساختمان و عملکرد دستگاه ادراری آنها دچار مشکل خاصی است و معمولاً عفونت‌های مکرر و اغلب بیش از یک نوع میکروارگانیزم دارند.

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

3. سندروم حاد اورتر¹: اغلب در زنان جوان دیده می‌شود که علائم عفونت ادراری و باکتریوری خفیف با کلنی کانت خیلی کم دارند.
4. باکتریوری بدون علامت: در افراد مسن و زنان حامله شایع است و در زنان حامله باید با اهمیت تلقی شود. دیده شده است که عفونت‌های ادراری بدون علامت موجب زایمان زودرس و پارگی کیسه آب و گاهی سقط جنین می‌شود.
5. التهاب مثانه یا سیستیت: التهاب عفونی یا غیرعفونی مثانه.
6. باکتریوری: عبارت است از وجود اوروپاتوژن‌ها (بیماری‌زاهای ادراری) در ادرار که موجب عفونت ادراری می‌شوند.
7. پیوری: عبارت است از وجود گلبول‌های سفید در ادرار و زمانی اطلاق می‌شود که در یک گستره مرطوب (Wet mount) از رسوب ادرار سانتریفیوژ شده تعداد $5 >$ لکوسیت در هر میدان میکروسکوپی با درشت‌نمایی زیاد ($40\times$) دیده شود. این تعداد معادل $50 >$ لکوسیت در هر mm^3 ادرار است.
8. اورتریت²: التهاب پیشابراه یا مجرای خروج ادرار که معمولاً در حین بیماری‌های منتقله جنسی ایجاد می‌شود، مانند اورتریت گونوکوکی.
9. پیلونفریت³: التهاب و عفونت حاد پارانشیم کلیه که معمولاً با درد پهلوها و تب‌ولرز همراه است.
10. حاملگی: به زنان حامله توصیه می‌شود از ابتدای حاملگی چند بار آزمایش کشت ادرار انجام دهند تا در صورت وجود باکتریوری بدون علامت تحت درمان قرار گیرند.

در برخی عفونت‌های دستگاه ادراری مانند سل ادراری یا عفونت با باکتری‌های بی‌هوازی و التهاب مثانه در اثر عفونت‌های کلامیدیای، مایکوپلازما یا برخی ویروس‌ها ممکن است تعداد زیادی گلبول سفید در ادرار دیده شود، در حالی که ارگانیزم مولد عفونت در محیط‌های کشت معمولی رشد نمی‌کند؛ بنابراین، نتیجه کشت ادرار منفی است.

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

1. Acute
2. Uret
3. Pyel

تفسیر و نحوه گزارش دهی نتایج کشت ادرار

در تفسیر نتایج کشت باید به این موارد توجه کرد:

1. عوامل مرتبط با بیمار (نوع نمونه ادرار، سن، جنسیت، علائم بالینی و مصرف آنتی‌بیوتیک)؛
 2. نتیجه آزمون میکروسکوپی رسوب ادرار؛
 3. شرایط باکتری رشد یافته روی پلیت (تنوع کلنی رشد کرده یا خلوص کشت، تعداد باکتری و نوع باکتری رشد یافته)؛
 4. روش نمونه برداری.
- جداول زیادی برای تفسیر نتایج کشت ادرار در کتاب‌های مختلف مرجع آورده شده‌اند که مبنای تفسیر آنها بر سه محور زیر است:
- ؛ 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 میکروبی‌شناسی بالینی انتخاب شده‌اند (جدول‌های 1-2، 2-2، 3-2 و 4-2). می‌توانید با توجه به علائم بیمار و همچنین رشد ارگانیزم در کشت ادرار از این جدول‌ها برای نحوه کار روی نمونه و توصیه لازم به پزشک استفاده نمایید.
- نوع باکتری رشد یافته در تعیین بیماری‌زا بودن یا نبودن، تعیین نوع آزمایش حساسیت ضد میکروبی (انتخاب دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی) و گزارش نهایی به پزشک اهمیت دارد (جدول‌های 2-5 و 2-6).

روش و زمان بررسی نتایج

قرائت ابتدایی را باید روی همه کشت‌هایی انجام داد که قبل از نیمه‌شب دریافت شده‌اند و در صورت رشد نکردن، پلیت‌ها باید حتماً تا 48 ساعت نگهداری شوند. برای کشت‌هایی که بعد از نیمه‌شب پذیرش شده‌اند، می‌توان اولین قرائت را به همراه سایر کشت‌های ارسالی در روز بعد انجام داد.

جدول 2-1: 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 $\geq 10^3$ CFU/ml uropathogens 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 $\geq 10^4$ 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 $\geq 10^5$ CFU/ml uropathogens in CCMS urine
Asymptomatic bacteriuria	No urinary symptoms	$\pm \geq 10$ WBC/mm ³ $\geq 10^5$ CFU/ml in two CCMS cultures > 24 hrs apart

1. یورویاتوزن: ارگانیزمی است که به‌طور معمول باعث عفونت ادراری می‌شود.

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

جدول 2-2: راهنمای تفسیری کشت‌های ادراری

RESULT	SPECIFIC SPECIMEN TYPE/ ASSOCIATED CLINICAL CONDITION, IF KNOWN	WORKUP
$\geq 10^4$ 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
$\geq 10^3$ CFU/ml of a single potential pathogen	CCMS urine/ symptomatic males or catheterized urines or acute urethral syndrome	Complete
\geq 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)
$\geq 10^3$ 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

1. تشخیص ارگانیزم همراه با آزمایش حساسیت میکروبی Complete workup.

2. Predominant growth = 10^4 to $\geq 10^5$ CFU/ml.

جدول 2-3: تفسیر نتایج کشت ادرار و انجام‌دادن عملیات تشخیصی

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

1. برای تعیین تعداد 10^2 کلنی در ادرار باید از لوپ 0/01ml استفاده کرد.

2. CV (Clean Voided): ادرار تمیز.

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

4. 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 ذکر شود) و در صورتی که بیشتر از 10^5 مخمر

در نمونه ادرار رشد کند، گونه آن را نیز باید تعیین کرد.

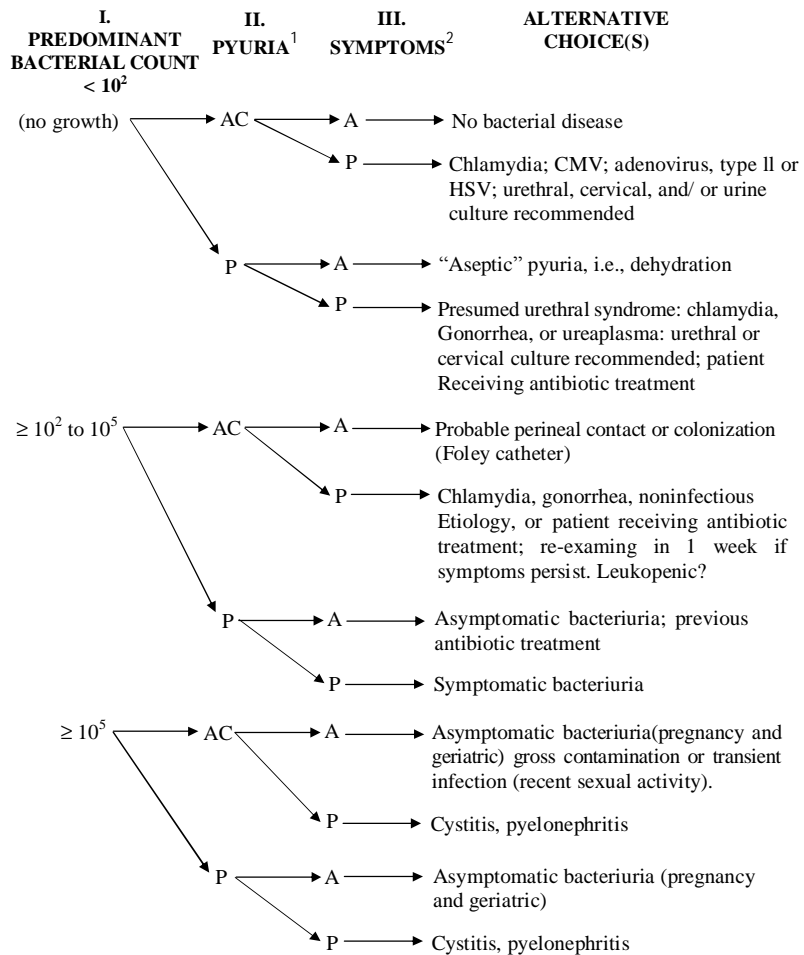
5. با توجه به جدول 2-4 توصیه‌ها و اطلاعات آموزشی مفید را به پزشک پیشنهاد کنید.

ID&AST: شناسایی و آزمایش تعیین حساسیت ضد میکروبی.

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

برای مثال، در صورتی که براساس مورفولوژی کلنی و ظاهر میکروسکوپی به لاکتوباسیل مشکوک شدید، از آزمایش حساسیت ضد میکروبی اجتناب کنید.

جدول 2-4: تفسیر نتایج کشت ادرار براساس تعداد باکتری، پیوری و علائم بالینی



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

2. سوزش ادرار و تکرر.

در صورتی که بیمار تحت درمان با آنتی‌بیوتیک است، رنگ‌آمیزی گرم، شمارش WBC و نتیجه کشت ممکن است قابل قبول نباشد.

تعداد ارگانسیم و شمارش WBC در ادرار سانتیفریوژ شده (سدیمان ادراری) ارزش مقایسه‌ای ندارد. پلیت‌ها برای بررسی و مشورت باید تا 72 ساعت نگهداری شوند.

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

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

Q&GS: شمارش گزارش ظاهری به‌وسیله رنگ‌آمیزی گرم.

جدول 2-5: Urine Cultures-Definitive Identification and Susceptibility Criteria

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

تفسیر نتایج کشت ادرار در نمونه‌های گرفته‌شده به وسیله سوند ادراری

الف) تعداد کلنی رشد یافته بیشتر از 10^4 CFU/ml1. رشد 2 بیماری‌زای ادراری احتمالی در تعداد بیشتر از 10^4 CFU/ml:

؛ شناسایی کامل (ID) و انجام دادن آزمایش حساسیت آنتی‌بیوتیکی (AST) روی هر دو ارگانیزم؛

؛ شناسایی توصیفی گونه‌هایی که در تعداد کمتر از 10^4 رشد کرده‌اند.

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

؛ شناسایی توصیفی ارگانیزم‌های موجود براساس ظاهر آنها. برای مثال، دیفتروئیدها و گروه استرپتوکوک‌های ویریدانس.

نحوه گزارش:

Multiple organisms present, probable contamination, please repeat culture.

3. رشد یک نوع بیماری‌زای ادراری احتمالی و یک نوع باکتری آلوده‌کننده احتمالی:

؛ شناسایی کامل (ID) روی بیماری‌زای احتمالی؛

؛ شناسایی توصیفی: باکتری آلوده‌کننده احتمالی براساس نوع ظاهری کلنی.

4. رشد سه نوع ارگانیزم در نمونه:

؛ شناسایی توصیفی ارگانیزم‌ها براساس شکل ظاهری کلنی.

نحوه گزارش: مانند گزارش بالایی است.

Multiple organisms present, probable contamination, please repeat culture.

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

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

2. برای بیماران دیگر توصیف نوع ظاهری ارگانیزم (شناسایی توصیفی) و درخواست تکرار نمونه‌گیری.

3. کشت ادرار را در دمای اتاق به مدت 72 ساعت نگهداری کنید تا در صورت درخواست انجام کارهای تکمیلی توسط پزشک، کشت در دسترس باشد.

نحوه گزارش:

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

E توجه:

1. در کسانی که Indwelling Catheter دارند، تعداد باکتری بین 100-1000CFU/mL برای پیگیری باارزش است؛ چون ممکن است تعداد باکتری در این افراد در صورتی که تحت درمان با آنتی‌بیوتیک نباشند، در عرض 72 ساعت به بیش از 10^5 برسد.
2. در صورتی که چند گونه باکتری در کشت وجود دارد، باید با احتیاط تفسیر شود؛ زیرا ممکن است این تعداد باکتری نشان‌دهنده بیماری‌زاهای واقعی نباشد.
3. تکرار نمونه‌گیری در طی 2-3 روز در موارد 1 و 2 توصیه می‌شود.

تفسیر نتایج کشت ادرار حاصل از تکنیک‌های ته‌اجمی

1. وجود یک یا دو ارگانسیم:
 ؛ شناسایی ID¹ و انجام دادن AST² در صورتی که ارگانسیم‌های جدا شده بیماری‌زا باشند.
2. وجود سه ارگانسیم:
 ؛ شناسایی کامل ID و نگهداری کشت‌ها به مدت سه روز برای درخواست مشاوره.

نحوه گزارش:

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

3. بدون رشد³:
 ؛ کشت‌ها را پس از 24 ساعت بررسی کنید؛
 ؛ مجدداً کشت‌ها را به مدت 48 ساعت نگهداری کنید.

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

پیوست 1-2: Urinary microbiota

Microbiota	Organism	Extent of workup if count is appropriate
Urogenital	Viridans group streptococci, <i>Neisseria</i> spp. diphtheroids, <i>Lactobacillus</i> spp. anaerobes	Report as urogenital microbiota/ flora
Skin	Diphtheroids. <i>Staphylococcus</i> 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 <i>Staphylococcus</i>	ID to species level and AST ID and AST of <i>S. aureus</i> ; ID of <i>Staphylococcus saprophyticus</i> with novobiocin disk for females of childbearing age; AST generally not needed for <i>S. saprophyticus</i> or other coagulase-negative staphylococci
	Yeasts	ID of <i>C. albicans</i> and <i>Candida glabrata</i> ; ID of others to species level only on request
	Beta-hemolytic <i>Streptococcus</i> <i>Enterococcus</i> spp.	ID especially of group B in women in childbearing years. Check for VRE
	<i>G. vaginalis</i>	ID only if number is 10 times greater than that of all other microbiota
	<i>Aerococcus urinae</i>	ID only if number is 10 times greater than that of all other microbiota
	<i>Corynebacterium</i> (urease positive)	ID and AST, if number is 10 times greater than that of all other microbiota and $\geq 100,000$ CFU

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

جدول 2-6

در مواردی که استافیلوکوک اورئوس¹ به طور خالص در محیط کشت رشد نماید، صرف نظر از تعداد آن به عنوان یک عفونت بارز² تلقی می‌شود که باید برای آن آزمایش حساسیت میکروبی (AST) انجام داد و نتیجه را به پزشک گزارش نمود.

وجود قارچ در کشت ادرار به هر تعداد که باشد باید به پزشک گزارش داده شود (ذکر کلی کانت ضروری است) و در صورتی که کشت‌های ادرار خالص از نظر قارچ داشته باشیم باید گونه آن قارچ را نیز تعیین کرد. لازم به ذکر است که کاندیداها معمولاً پس از 2 روز در محیط‌های کشت معمولی رشد می‌کنند.

استرپتوکوک گروه ب³ به خصوص در زنانی که در سن بارداری قرار دارند علاوه بر ایجاد عفونت ادراری باعث آلودگی نوزاد در ضمن عبور از کانال زایمان و ایجاد تب‌های بعد از زایمان می‌شود. بنابراین، جدا کردن این ارگانیزم از کشت ادرار این افراد باید با اهمیت تلقی شود. همچنین، در افراد مبتلا به دیابت جداسازی این گونه استرپتوکوک ممکن است نشانه عفونت ادراری باشد.

پسودوموناس آئروژنوزا⁴ در بیماران مبتلا به دیابت یا کسانی که به نوعی بیماری زمینه‌ای دارند و به خصوص در بیماران با نقص سیستم ایمنی یا بستری در بیمارستان‌ها یا کسانی که پیوند کلیه دارند از جمله یوروپاتوژن‌ها است.

در بیماران بستری و دارای کاتتر ادراری باکتری‌هایی مانند آسینتوباکترها⁵ و گونه‌های پسودوموناس ممکن است عامل عفونت‌های ادراری بیمارستانی باشند.

جداسازی جنس‌های غیرشایع مانند سالمونلا⁶، آئروموناس⁷، و ویبریو⁸ به هر تعداد از کشت ادرار باید گزارش شود.

بعضی اوقات تکثیر بیش از حد باکتری‌های غیرهوازی⁹ و درگیری ویروسی دستگاه ادراری نیز سندروم اورترا ایجاد می‌کند که در آزمایشگاه‌های معمولی قابل تشخیص و شناسایی نیستند.

- | | |
|------------------------------------|----------------------|
| 1. <i>Staphylococcus aureus</i> | 6. <i>Salmonella</i> |
| 2. Significant | 7. <i>Aeromonas</i> |
| 3. <i>Streptococcus agalactiae</i> | 8. <i>Vibrio</i> |
| 4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 9. Anaerobic |
| 5. Acinetobacter | |

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.

پیوست 2-2: 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 <i>Pseudomonas</i> or <i>Alcaligenes</i> . 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 of the above criteria for gram-negative rods.
Yeast	Morphology consistent with yeast wet mount or "feet" present on plate.
<i>S. aureus</i>	Catalase-positive, gram-positive cocci and slide coagulase positive. <i>Caution: S. saprophyticus</i> can be positive in latex or coagglutination serologic coagulase tests.
Coagulase- negative staphylococci	Catalase- positive, gram-positive cocci and slide coagulase negative
<i>Enterococcus</i>	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 <i>A. urinae</i> (differs by a Gram stain showing tetrads and clusters) prior to reporting, if numbers are significant.
<i>Lactobacillus</i> spp.	Gram-positive rods. Catalase negative, alpha-hemolytic
<i>Corynebacterium</i> spp.	Gram-positive rods. Catalase positive. Rule out uropathogenic <i>Corynebacterium</i> with rapid urease test. if numbers are significant.

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

عفونت‌های متقاطع¹ است که ممکن است از طریق دست آلوده کارکنان بیمارستان و ... ایجاد شود.

برخی ارگانسیم‌ها می‌توانند از طریق انتشار در خون در ریه، پنومونی ایجاد نمایند که در کمتر از 15 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 اسپرومتر آلوده از دیگر راه‌های غیرشایع در انتقال عفونت است.

در دهه اخیر روش‌های تشخیصی با استفاده از برونکوسکوپی همراه با کشت‌های کمی از نمونه‌های لاواژ برونکوآلوئولار (BAL)² یا نمونه PSB³ 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 (5-4 روز اول) آسپیراسیون فلور نرمال اروفارنکس یا عفونت‌های اکتسابی از جامعه مانند هموفیلوس آنفلوانزا، استرپتوکوک پنومونیه، موراکسلا کاتارالیس و ویروس‌ها در اولویت قرار دارند درحالی که در بیماران بستری برای طولانی‌مدت و یا تحت درمان با آنتی‌بیوتیک‌ها و ... استاف ازئوس و باسیل‌های گرم منفی از عوامل شایع ایجاد بیماری هستند.

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

فصل سوم

عفونت‌های تنفسی

عفونت‌های تنفسی بیمارستانی

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

در دهه‌های اخیر شیوع بیماری 1-5/0 درصد با مورتالیتی حدود 50-30 درصد گزارش شده‌است که در بیماران VAP شانس ابتلا به عفونت 20-6 برابر افزایش می‌یابد.

مطالعات متعدد نشان می‌دهد که عامل مهم ایجاد و گسترش پنومونی‌های بیمارستانی کلینزاسیون ناحیه 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 چند دارو نشان‌دهنده کلینزاسیون یا

1. Ventilator Associated Pneumonia

Other viruses	<1-12
Unknown	23-49

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

عفونت‌های پسودومونایی، اسیتوباکتر یا بیماری‌زاهای مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها در بیماران VAP یا تحت درمان با آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف شیوع بیشتری دارند و در این بیماران 20-50 درصد عفونت‌ها پلی‌میکروبیال هستند. جدول‌های 1-3 و 2-3 بیماری‌زاهای شایع پنومونی‌های اکتسابی و جدول 3-3 پنومونی بیمارستانی را نشان می‌دهند.

جدول 3-1: Most Common Etiologies of Community- Acquired Pneumonia in Adults who are Hospitalized

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

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

جدول 2-3: COMMUNITY ACQUIRED PNEUMONIA ETIOLOGIC AGENTS

PATHOGEN	FREQUENCY(%)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	66
<i>Haemophilus influenzae</i>	1-12
<i>M. catarrhalis</i>	10
<i>Legionella</i> species	2-15
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	2-14
<i>Klebsiella</i> species	3-14
Enteric gram negative bacilli	6-9
<i>Staphylococcus aureus</i>	3-14
<i>Chlamydia</i> species	5-15
Influenza viruses	5-12

جدول 3-3: 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

در خصوص تشخیص آزمایشگاهی پنومونی‌های بیمارستانی به خصوص پنومونی مرتبط با ونتیلاسیون (VAP) تردیدهایی وجود دارد. 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 استفاده کرد. روش طلایی¹ آزمایش بافت‌شناسی ریه از نمونه‌های بیوپسی یا اتوپسی است. جداسازی میکروارگانیزم‌های عامل در

1. Gold Standard

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:

1. ممکن است نتایج منفی کاذب موجب اشکال در درمان شود.
2. جداسازی میکروارگانیزم‌هایی 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 وجود دارند که عبارت‌اند از:

1. استفاده از روش‌های تهاجمی برای جمع‌آوری نمونه از محل عفونت مانند برونکوسکوپی و بیوپسی،
2. استفاده از وسایل نمونه‌برداری دارای حفاظ¹ برای پیشگیری از آلودگی نمونه‌ها با فلور طبیعی دستگاه تنفسی فوقانی.

از سوی دیگر، درباره کشت کمی و تعیین آستانه تعداد کلنی برای افتراق بین عفونت و کلنیزاسیون به‌طور گسترده تحقیق و بررسی شده است که از جنبه‌های تشخیصی و اقتصادی مقرون‌به‌صرفه است.

به‌طور کل، روش نمونه‌برداری برای تشخیص پنومونی‌های بیمارستانی به دو دسته غیرتهاجمی و تهاجمی تقسیم می‌شوند (جدول 3-4 روش‌های جمع‌آوری، انتقال و آماده‌سازی نمونه‌های تنفسی را نشان می‌دهد).

1. Protected devices

جدول 3-4: 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 در صورت استفاده از کاتترهای حفاظت‌شده انجام می‌شود	حداکثر 2 ساعت در دمای اتاق	24 ساعت در دمای 4°C	**BA CA Mac	رنگ آمیزی گرم و دیگر رنگ آمیزی‌ها بنا به درخواست برای مثال: DFA برای لژیونلا و AFB****	موارد دیگر: کشت شمارشی BAL, AFB, لژیونلا، نوکاردیا، مایکوپلاسما، پنوموسیستیس، سابیتومگالوویروس
خلط، اسپیراسیون تراشه (ساکشن)	ظرف استریل	خلط؛ شستن یا قرقره آب قبل از جمع‌آوری	خلط را باید بیمار با سرفه عمیق جمع‌آوری کند، نمونه باید از نظر مناسب بودن برای کشت به وسیله رنگ آمیزی گرم آزمایش شود. خلط تحریکی در کودکان یا بیماران تحت عمل گرفته می‌شود. در این بیماران خلط ممکن است آبیکی باشد (به علت استفاده از سرم فیزیولوژی)	حداکثر 2 ساعت در دمای اتاق	24 ساعت در دمای یخچال	BA CA Mac	رنگ آمیزی گرم و دیگر رنگ آمیزی‌ها 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 خلط¹

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 آلوده می‌شود، حتی اگر برای جمع‌آوری نمونه خلط آموزش‌های کافی به بیمار داده شده‌باشد. بیماران باید با یک سرفه عمیق خلط خود را جمع‌آوری و تا حد امکان از آلوده شدن با آب دهان اجتناب کنند. نمونه را داخل یک ظرف استریل جمع‌آوری و سریعاً به آزمایشگاه ارسال نمایند.

جمع‌آوری خلط از طریق روش‌های القایی

بیمارانی که قادر نیستند خلط خود را بگیرند، لازم است به وسیله کارکنان بخش‌های بیمارستان برای نمونه‌گیری یاری‌شوند تا با تحریک بتوانند یک نمونه قابل قبول تهیه کنند. این نوع نمونه برای جداسازی عواملی چون مایکوباکتریوم‌ها و قارچ‌ها مناسب است. همچنین، برای تشخیص پنوموسیستیس کارینی² مفید است.

این نمونه به واسطه استنشاق محلول نمکی حاوی 15 درصد سدیم کلراید و 10 درصد گلیسرین برای حدود 10 دقیقه یا تا شروع سرفه عمیق به دست می‌آید. ترشحات دستگاه تنفسی تحتانی که به این روش تهیه می‌شود شبیه آب دهان و آبکی است؛ زیرا حاوی موادی هستند که مستقیم از فضای کیسه‌های هوایی گرفته می‌شوند. این نمونه‌ها معمولاً برای کشت کافی هستند و در آزمایشگاه باید بدون بررسی مقدماتی پذیرش شوند. گرفتن چنین نمونه‌هایی ممکن است در بیشتر

1. Expectorated

2. *Pneumocystis carini*

موارد پزشک را از استفاده از روش‌های تهاجمی‌تر مانند برونکوسکوپی یا آسپیراسیون به وسیله سوزن، معاف کند.

کشت خون

در 20-8 درصد پنومونی‌های مرتبط با ونتیلاسیون کشت خون مثبت است. مطالعات نشان داده‌است که در بیماران بدحال، باکتری‌ها همیشه مربوط به عفونت‌های ریوی نیست. در صورتی که از کشت خون بیمار مبتلا به عفونت ریوی ارگانیزم مشابه جدا شود، نشان‌دهنده کانون عفونت در ریه است، ولی تحقیقات نشان داده‌اند که در 50 درصد از مواردی که کشت خون آنها مثبت است، منشأ عفونت در قسمت دیگری از بدن وجود دارد. در این موارد، میکروارگانیزم جدا شده از خون و ترشحات دستگاه تنفسی یکسان نیست.

روش‌های تهاجمی

آسپیراسیون شیره معده¹

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

آسپیراسیون آندوتراکئال²

آسپیراسیون آندوتراکئال اغلب برای تشخیص پنومونی در بیمارانی به کار می‌رود که لوله‌گذاری شده‌اند. ترشحات به‌سادگی در ظرف مخصوص (Lukens trap) (شکل 3-1) جمع‌آوری می‌شوند. این ترشحات در آزمایشگاه باید مانند خلط در نظر گرفته شود. بیمارانی که تراکتوستومی



1. Gastric aspiration
2. Endotracheal aspirate or tracheostomy suction

شده‌اند به سرعت با باسیل‌های گرم منفی و دیگر بیماری‌زاهای بیمارستانی کلنیزه می‌شوند.

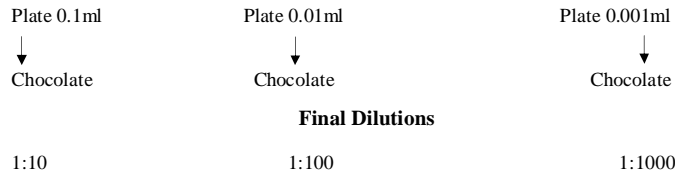
شکل 3-1: Lukens trap

این کلنیزاسیون ممکن است ارتباط بالینی خاصی نداشته باشد، اما این ارگانیزم‌ها ممکن است به داخل ریه آسپیره و موجب پنومونی شوند. به این دلیل، ممکن است تشخیص عفونت از کلنیزاسیون مشکل باشد.

برونکوسکوپی¹

برای تشخیص پنومونی، به‌ویژه در افراد آلوده به HIV و دیگر بیماران دارای نقص سیستم ایمنی، اغلب لازم است از روش‌های تهاجمی‌تر استفاده کرد. با این روش می‌توان ترشحات مخاط برنش را مستقیماً مشاهده کرد و برای بیوسی جمع‌آوری نمود. در هنگام برونکوسکوپی پزشکان می‌توانند نمونه‌هایی از شستشوی برنش‌ها یا آسپیراسیون برنش‌ها (BAL) را به دست آورند. به این صورت که زمانی که ترشحات چرکی قابل مشاهده نیستند، مقداری از سرم فیزیولوژی استریل را داخل برنش‌ها تلقیح و سپس توسط برونکوسکوپ جمع‌آوری می‌کنند. از آنجا که برونکوسکوپ از طریق بینی وارد می‌شود، 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 (100-300ml) به داخل ریه و اجزای آن فرستاده می‌شوند. تخمین زده می‌شود که بیش از 1,000,000 کیسه هوایی در حین عمل، نمونه‌برداری می‌شوند. اخیراً ارزش این تکنیک در کشت کمی برای تشخیص بیماری‌زاهای اصلی دستگاه تنفسی، شامل پنومونی باکتریال اثبات شده است. 5 سی‌سی از BAL برای بررسی‌های میکروبیولوژیکی و سلولی کفایت می‌کند. رنگ‌آمیزی گیمسا و گرم و بررسی میکروسکوپی، روشی

1. Bronchoscopy



وقتی یک نمونه BAL به آزمایشگاه ارسال می‌شود، رنگ آمیزی و کشت باید براساس نوع درخواست انجام شود (به عنوان مثال: باکتری، قارچ، مایکوباکتریوم یا پنوموسیستیس کارینی یا ویروس‌ها). اگر بیمار دچار نقص ایمنی باشد، باید تمام عوامل گفته شده در بالا را جستجو کرد. ممکن است استفاده از روش‌های تعیین آنتی ژن برای تشخیص بیماری‌زاهای اختصاصی مانند *لژیونلا* یا *استرپتوکوکوس پنومونیه* نتایج بهتری از کشت داشته باشد.

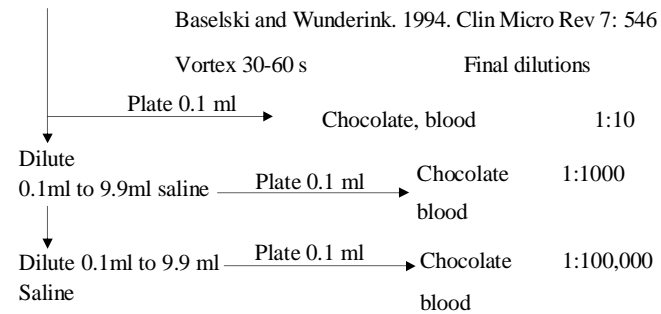
نوع دیگری از نمونه‌های تنفسی که از طریق برونکوسکوپی به دست می‌آید، براشینگ¹ است. نمونه‌های به دست آمده به وسیله این روش نسبتاً تهاجمی، برای مطالعات میکروبی‌شناسی به خصوص در تشخیص پنومونی ناشی از اسپیراسیون مناسب‌تر است. این روش نمونه برداری در شکل 3-2 (از A تا D) نشان داده شده است. محتویات براشینگ برنش بهتر است در 1 ml از محلول مایع ورتکس و سپس با استفاده از لوپ کالیبره 0/01 در محیط کشت تلقیح شود. برخی عقیده دارند که نمونه‌های به دست آمده از کاتترهای دوجداره برای هر دو کشت هوازی و بی‌هوازی مناسب است. شمارش کلنی بیشتر یا مساوی با $1000 (CFU \geq 10^3)$ ارگانسیم در هر میلی لیتر از مایع رقیق شده (10⁶ ml در نمونه اصلی) نشان دهنده عفونت است.

سریع برای شمارش سلول‌ها و افتراق سلول‌های حاوی ارگانسیم‌های داخل سلولی است. وجود بیش از 1 درصد سلول‌های اپی‌تلیال نشان دهنده آلودگی با فلور دهانی - حلقی است. کشت کمی BAL در افتراق بین کلنیزاسیون و عفونت بسیار مهم است. رشد بیش از 10⁴ باکتری در هر میلی لیتر BAL به عنوان معیار برای تعیین عفونت محسوب می‌شود. از مایع BAL رقت‌های متوالی تهیه می‌شود. به این ترتیب که 0/1 ml از مایع لاواژ در 9/9 ml نرمال سالین ریخته (رقت 1/10) و سپس از آن رقت 1/100 تهیه می‌شود (روش اول).

نمودار 3-1: روش اول

Bronchoscopy Samples Quantitative Methods

PSB¹ or BAL



از هر کدام از رقت‌ها 0/1 ml روی بلاد آگار و شکلات آگار کشت داده می‌شود. به جای تهیه رقت بعضی آزمایشگاه‌ها از لوپ‌های کالیبره 0/01 یا 0/001 استفاده می‌کنند (روش دوم).

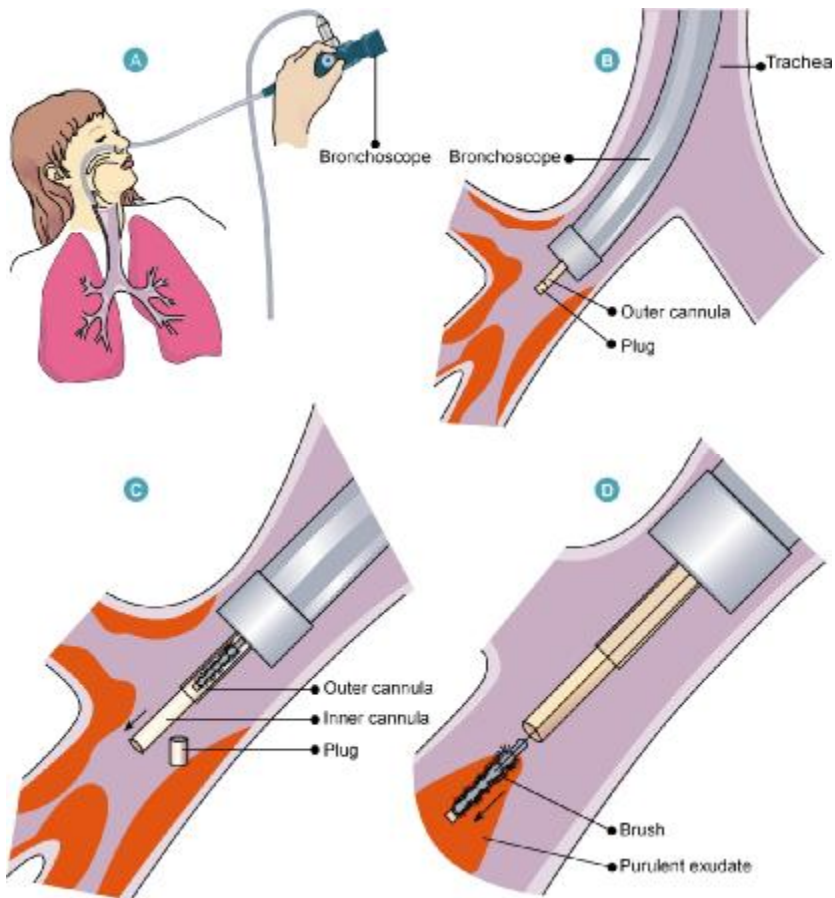
نمودار 3-2: روش دوم

Bronchoscopy Samples Quantitative Methods

Calibrated loop method

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





شکل 3-2: مراحل جمع‌آوری ترشحات برنش توسط کاتتر با حفاظ

معیار هیستوپاتولوژیک در پنومونی ریه در بیماران VAP تجمع بیش از حد لکوسیت‌های پلی‌مورفو نوکلئر در آلونل‌های ریه توأم با آگزودای فیبرین و

بیوپسی ریه باز¹

این روش علاوه بر تشخیص در درمان مواردی کاربرد دارد که از سایر روش‌های کمتر تهاجمی نتوان استفاده کرد (در بیماران مبتلا به پنومونی منتشر). برای نمونه بیوپسی باید کشت کمی انجام شود. در مطالعه انجام شده ارتباط کمی بین نتایج باکتریولوژیک و یافته‌های هیستوپاتولوژیک مشاهده شده است. مقایسه روش‌های تشخیصی VAP نشان داده که بهترین روش کشت از بافت ریه است.

تعدادی اریتروسیت است. معیار باکتریولوژی شامل رشد بیشتر از $(10^3 - 10^4)$ باکتری به ازای هر گرم بافت ریه است.

بررسی باکتریولوژیک نمونه‌های دستگاه تنفسی

آنالیز نمونه‌های تنفسی شامل بررسی میکروسکوپی و کشت کمی استفاده از روش‌های سریع تعیین آنتی‌ژن و روش‌های ملکولی مانند PCR است.

الف) محیط‌های کشت مورد استفاده

1. بلاد آگار (BA)¹،
2. مکانکی آگار (MAC)²،
3. شکلات آگار (CHOC)³،
4. تایوگلیکولات (THIO)⁴ (برای اسپیره‌ها و نمونه‌های بیوپسی حاصل از تکنیک‌های تهاجمی).

ب) آزمون میکروسکوپی

برای همه نمونه‌های دستگاه تنفسی تحتانی یک اسمیر رنگ آمیزی گرم تهیه کنید. شاخص تعیین وجود آلودگی‌های حلقی-دهانی سلول‌های اپی‌تلیال سنگفرشی و شاخص ترشحات دستگاه تنفسی تحتانی WBC است و ارگانسیم غالب در ارتباط با وجود WBC مشخص می‌شود.

E توجه: نمونه‌های خلط برای کشت لژیونلا، نباید از نظر میکروسکوپی غربالگری شوند. زیرا در این مورد خلط رقیق و آبکی است و محتوی WBC نبوده یا تعداد آن بسیار کم است.

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

تفسیر رنگ آمیزی گرم در نمونه خلط¹

الف) شمارش سلول‌های اپی‌تلیال سنگفرشی با بررسی 10 میدان در بزرگنمایی 100 (lpf یا عدسی 10) و استفاده از معیارهای جدول 3-5 (Q-Score) انجام می‌شود.
ب) تعداد WBC و موکوس در بزرگنمایی lpf با استفاده از معیارهای جدول 3-5.

Q-Score

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

جدول 3-5: Squamous Epithelial Cells

		Score	No Cells	1-9/ lpf	10-24/ lpf	$\geq 25/ lpf$
			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
	$\geq 25/ lpf$	+3	3	2	1	0

1. اگر WBC در رنگ آمیزی گرم خلط دیده نشود، اما سلول‌های اپی‌تلیال به صورت غالب وجود داشته باشند، در این صورت اسمیر را از نظر ارگانسیم‌ها بررسی نکنید.

E توجه: نمونه‌های به دست آمده از بیماران پیوند مغز استخوان یا بیماران با ایمنی سرکوب شده WBC ندارند، اما ممکن است محتوی سلول‌های اپی‌تلیال مزکدار باشند.

5. توجه: برای تهیه اسمیر گرم از خلط، نمونه باید در زیر نور مناسب بررسی گردد و توسط لوپ استریل از قسمت چرکی و آغشته به خون برای اسمیر و کشت نمونه برداری شود.

2. اگر نمونه محتوی WBC باشد، اسمیر را با عدسی 100¹ بررسی کنید. بر مناطقی تمرکز کنید که میزان WBC بالا دارد و از مناطقی اجتناب کنید که آلودگی با فلور ناحیه حلقی - دهانی دارد.

؛ ارگانسیم غالب: اگر یک ارگانسیم در نواحی با تعداد زیاد WBC، غالب باشد، آن را گزارش کنید. برای مثال، اگر باسیل گرم منفی غالب است گزارش کنید:

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

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

Mixed bacterial morphotypes also present on Gram stain

؛ بدون ارگانسیم غالب: اسمیرهایی که هیچ ارگانسیم غالبی در نواحی با WBC زیاد نشان نمی‌دهند یا بیشتر از یک نوع ارگانسیم در منطقه وجود دارد، به‌عنوان

Mixed bacterial morphotypes seen on Gram stain

گزارش می‌شود. اگر فقط یک نوع ارگانسیم دیده‌شود، مورفولوژی رنگ‌آمیزی گرم را گزارش و ارگانسیم را شمارش کنید. برای مثال: Many، Moderate و Few.
؛ بدون ارگانسیم: اسمیرهایی که هیچ ارگانسمی در آن دیده‌ نمی‌شود به‌این صورت گزارش شوند:

No organisms seen

3. از نتایج رنگ‌آمیزی گرم برای ارزیابی پلیت‌های کشت استفاده کنید.

برای مثال، اگر دیپلوکک گرم مثبت در رنگ‌آمیزی گرم غالب باشد، پلیت‌های کشت را با دقت برای استرپتوکوکوس پنومونیه بررسی کنید. اگر دیپلوکک گرم منفی در رنگ‌آمیزی گرم غالب باشد، از نظر موراکسلا (برانهاملا) کاتارالیس² بررسی نمایید.

1. OIF: Oil Immersion Field (× 1000)
2. Moraxella (Branhamella) Catarrhalis

گزارش نتایج رنگ‌آمیزی گرم

نتایج رنگ‌آمیزی گرم را با توجه به سلول‌های اپی‌تلیال و WBC گزارش کنید.

1. اگر هیچ سلول اپی‌تلیال سنگفرشی دیده‌نشود، گزارش کنید:

No squamous epithelial cells seen

2. اگر فقط تعداد کمی از سلول‌های اپی‌تلیال سنگفرشی یافت‌شود، گزارش کنید:

Few squamous epithelial cells seen

3. اگر میزان زیادی از سلول‌های اپی‌تلیال سنگفرشی همراه با ارگانسیم غالب

مشاهده‌شوند، گزارش کنید:

Abundant (many) squamous epithelial cells seen indicating oropharyngeal contamination

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

4. اگر سلول‌های اپی‌تلیال سنگفرشی زیادی دیده‌شوند، می‌توانید

همچنین گزارش کنید:

Contaminated with saliva please submit another specimen

E توجه: این گزارش را فقط برای نمونه‌های خلط با سلول‌های اپی‌تلیال بالا و بدون وجود ارگانسیم غالب استفاده کنید.

5. اگر هیچ WBC دیده‌نشود، گزارش کنید:

No WBC_s Seen

کشت و آزمایش نمونه‌های خلط، آسپیراسیون تراشه، سستشوی برنش، برایشینگ برنش و نمونه‌های بیوپسی برنش
 ؛ نمونه‌های خلطی که سلول‌های اپی‌تلیال به میزان بالا دارند کشت ندهید، مگر آنکه WBC دیده شود.

E توجه: رد یا تأیید نمونه BAL:

الف) اگر کمتر از 1% سلول‌های مایع حاوی سلول‌های سنفرشی باشند، نمونه قابل قبول است.

ب) اگر بیشتر از 1% سلول‌های مایع سنفرشی باشند، نمونه غیرقابل قبول است.

؛ نمونه‌ها را روی بلاک آگار، شکلات آگار و Mac (برای باسیل‌های گرم منفی) کشت دهید. شکلات و بلاک را در 35°C در CO_2 در 35°C انکوبه کنید. اگر ظرفیت انکوباتور CO_2 محدود است، محیط BA را تحت شرایط هوایی انکوبه کنید.
 اگر یک نمونه از برایشینگ برنش دریافت‌شده، برس را به‌صورت استریل به‌وسیله یک پنس استریل در سطح پلیت BA بغلتانید و سپس آن را در لبه پلیت آگار قرار دهید.
 ؛ همه پلیت‌ها را پس از 24-48 ساعت انکوباسیون بررسی کنید. پلیت مکانکی را در صورتی که هیچ رشدی وجودداشت، دور بیندازید. پلیت‌های نمونه‌هایی از خلط که حاوی سلول‌های اپی‌تلیال فراوان است، اما ارگانسیم غالب وجودندارد، به پیگیری‌های بعدی نیاز ندارد.
 ؛ اگر رشدی مشاهده‌شد، روش اجرایی توصیفی در این راهنما را دنبال کنید.

کشت و پیگیری آسپیراسیون داخل‌نای، 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 35°C انکوبه نمایید. Thio به CO_2 نیاز ندارد.
 ؛ همه پلیت‌ها را بعد از 24 ساعت انکوباسیون بررسی کنید. در صورتی که هیچ رشدی در Mac مشاهده‌نشده، پلیت‌ها را مجدد انکوبه و پس از 24 ساعت مشاهده کنید.
 ؛ محیط Thio را روزانه تا 5 روز بررسی کنید:
 — اگر محیط شفاف باشد، نشان‌می‌دهد که هیچ رشدی وجودندارد و آن را پس از 5 روز دور بیندازید. در صورت شک به ارگانسیم‌های سخت‌رشد و دیررشد، مدت زمان انکوباسیون را طولانی‌تر کنید.
 — اگر ظاهر محیط مایع کدر باشد، یک اسمیر گرم از مایع تهیه و مشاهده کنید.
 ؛ اگر ارگانسیم‌ها در اسمیر گرم مشاهده‌شوند، آن را با رشد پلیت‌ها مقایسه کنید.
 ؛ اگر ارگانسیم‌های دیده‌شده در رنگ‌آمیزی گرم متفاوت از کلنی‌های رشدیافته در روی پلیت‌ها باشند، 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 ارگانسیم‌های دیگر Mix باشد). محیط‌های مایع محتوی هر دو ارگانسیم گرم

مثبت و گرم منفی را روی Mac یا BA، Choc و فنیل اتیل الکل آگار¹ کشت دهید.

برای انتخاب محیط‌های کشت بی‌هوازی به کتاب‌های مرجع مراجعه کنید.

— کشت هوازی پلیت‌های کشت داده‌شده از Thio را که با رشد پلیت‌های اولیه متفاوت است، بررسی کنید.

— در صورتی که بی‌هوازی‌ها در آسپیراسیون محتویات داخل نای وجود دارند، با پزشک برای شناسایی کامل آن مشورت کنید.

براشینگ برنش و مایع BAL در صورتی که برای کشت کمی فرستاده شده باشد

براشینگ برنش را در آزمایشگاه در 1ml سرم فیزیولوژی قرار دهید و سپس لوله را ورتکس کنید تا مواد از برس جدا شوند و به صورت سوسپانسیون درآیند. سوسپانسیون براشینگ برنش و BAL را روی BA، Choc، Thio و Mac کشت دهید. برای تلقیح پلیت‌ها از یک لوپ کالیبره 0/01 یا از یک

پیت 0/1ml برای تلقیح نمونه در سطح

در شرایط CO₂ در 35°C انکوبه کنید.

پلیت‌ها را پس از 24 ساعت انکوباسیون امتحان کنید و در صورت عدم رشد، انکوباسیون را 24 ساعت دیگر ادامه دهید.

اگر رشد مشاهده شد، تعداد را براساس موارد گفته‌شده در قسمت شمارش کلنی محاسبه کنید.

کشت روی محیط اختصاصی لژیونلا، مخمر، قارچ یا مایکوباکتریوم براساس درخواست پزشک یا شرح حال بیمار است.

1. جهت مهار رشد گرم منفی‌ها: Phenylethyl alcohol agar

گزارش میزان رشد

روش نیمه کمی

اگر هیچ رشدی روی پلیت‌ها یا محیط مایع دیده نشود، گزارش کنید:

No growth

اگر یک یا دو کلنی روی هر پلیت رشد کند، گزارش کنید: Rare

اگر 3-10 کلنی در هر پلیت رشد کند، گزارش کنید: Few

اگر بیشتر از 10 کلنی در هر پلیت و فقط در منطقه اولیه تلقیح مشاهده شود،

گزارش کنید: Moderate

اگر کلنی‌ها در منطقه تلقیح اولیه و ثانویه رشد کنند، گزارش کنید:

Heavy

اگر یک ارگانسم در رنگ آمیزی گرم از محیط مایع (Thio) دیده شود (محیط

مایعی که هنوز تجدید کشت نشده است یا پس از تجدید کشت هیچ رشدی

مشاهده نشود)، گزارش کنید:

Organism observed in Gram stain of broth only

روش کمی

دو روش کمی برای شمارش تعداد باکتری‌ها در نمونه‌های حاصل از دستگاه

تنفسی تحتانی شرح داده شده است:

1. رقیق‌سازی،

2. استفاده از لوپ کالیبره.

تعداد کلنی رشد یافته در پلیت را در ضریب رقت ضرب می‌کنیم. تعداد کلنی

برحسب CFU در هر میلی‌لیتر به دست می‌آید. در نمونه‌های PSB، اگر تعداد

بیشتر از 10^3 CFU/ml باشد، بیماری‌زا محسوب می‌شود و در نمونه‌های BAL، اگر تعداد بیشتر از 10^4 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

1. گونه‌های استرپتوکوکوس:

؛ استرپتوکوک‌های آلفاهمولیتیک:

— در صورتی که رشد بالا یا متوسط (یا غالب) داشته باشد یا هر تعداد استرپتوکوک آلفاهمولیتیک مشابه *S. pneumoniae* دیده شود، باید برای تأیید وجود یا نبود این بیماری‌زا آزمایش‌های تشخیصی انجام شود.

— در صورتی که *S. pneumoniae* جدا نشد، گزارش کنید:

Alpha-hemolytic Streptococci as normal microbiota Isolated

؛ استرپتوکوک‌های بتاهمولیتیک:

— اگر کلنی‌های مشکوک به استرپتوکوک‌های بتاهمولیتیک به صورت مخلوط با میکروارگانیزم‌های دیگر یا میزان رشد کم باشد، ابتدا روی یک پلیت BA کشت مجدد دهید و در قسمت اولیه تلقیح به وسیله لوپ پلیت را به منظور مشاهده همولیز حساس به اکسیژن Stab¹ نمایید. BA را برای 18-24 ساعت در 35°C قرار دهید. همچنین، می‌توانید BA را به صورت بی‌هوای برای افزایش همولیز انکوبه کنید.

1. به وسیله لوپ سطح آگار را در مناطق مختلف کشت شکاف دهید تا باکتری به عمق محیط داخل و شرایط بی‌هوای مهیا شود.

— اگر در کشت اولیه رشد کافی از استرپتوکوک‌های بتاهمولیتیک وجود دارد، برای تشخیص استرپتوکوک‌های بتاهمولیتیک به جدول‌های تشخیصی مراجعه کنید.

؛ اگر نتیجه تست برای استرپتوکوک گروه A مثبت باشد، ارگانیزم را به این صورت گزارش کنید:

Group A Streptococcus (*Streptococcus 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 انجام گیرد.

2. گونه‌های هموفیلوس: اگر باسیل گرم منفی مشابه گونه‌های هموفیلوس به عنوان ارگانیزم غالب در کشت رشد کرده باشد، ابتدا آن را روی یک Choc ایزوله و سپس دیگر تست‌های تشخیصی را بر اساس جدول‌های تشخیصی انتخاب کنید.

3. گونه‌های نایسریا و موراکسلا (برانهاملا): اگر رشد غالبی از گونه‌های نایسریا یا موراکسلا دیده شود یا اگر دیپلوک‌های گرم منفی در رنگ‌آمیزی گرم غالب باشند، از جدول‌های تشخیصی نایسریاها برای ایزوله و شناسایی باکتری استفاده کنید.

4. سایر ارگانیزم‌های گرم منفی: به غیر از نایسریا، موراکسلا (برانهاملا) و هموفیلوس (جدول 3-6).

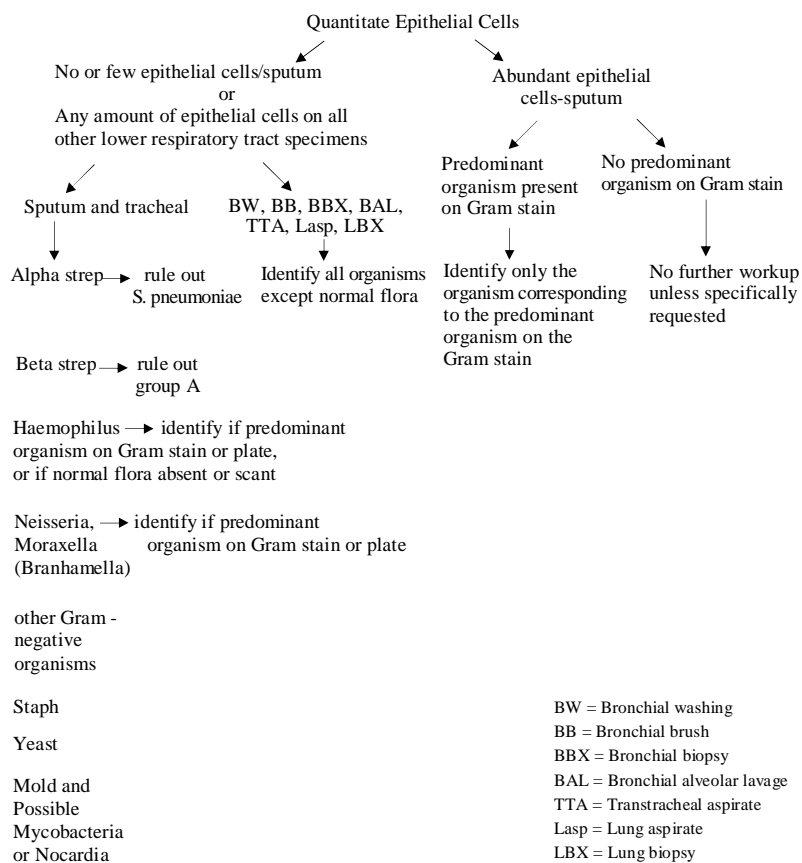
جدول 3-6: ns other than Neisseria and

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

8. مایکوباکتریوم و نوکاردیا: اگر ایزوله مشابه کلنی‌های مایکوباکتریوم یا نوکاردیا باشد، آن را شناسایی و ایزوله کنید (مورفولوژی کلنی بسیار متنوع و به صورت باسیل‌های گرم مثبت Beaded در اسمیر گرم مشاهده می‌شوند).

نمودار 3-3: Flow chart for examining lower respiratory tract specimens



> 2	Few to abundant	Present or absent	ID and AST only if requested
-----	-----------------	-------------------	------------------------------

* ID, identify; AST, perform antimicrobial susceptibility testing

5. گونه‌های استافیلوکوکوس:

جدول 3-7: 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	<i>S. aureus</i>	Moderate to abundant	None	Normal microbiota
Rare to few	<i>S. aureus</i>	Absent to few or gram-positive cocci predominant on Gram stain	ID, AST	<i>S. aureus</i>
Moderate to abundant, or predominant	<i>S. aureus</i>	Present or absent	ID, AST	<i>S. aureus</i>

6. 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 داشته باشد، به عنوان باکتری‌های فلور نرمال گزارش کنید:

Normal microbiota

اگر رشد کم تا متوسط از سلول‌های مخمر وجود داشته باشد، اما هیچ فلور نرمالی رشد نکرده باشد یا رشد آن کم باشد یا اگر سلول‌های مخمر به صورت غالب در رنگ‌آمیزی گرم مشاهده شوند، مخمر را شناسایی کنید.

اگر تعداد زیاد یا رشد غالب از سلول‌های مخمر وجود داشته باشند، مخمر را شناسایی کنید.

7. کپک‌ها: در صورت جداشدن باید شناسایی شوند.

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

اگر هیچ ارگانسیم غالبی در رنگ‌آمیزی گرم مشاهده نشود، تست‌های تشخیصی بعدی یا کشت تکمیلی را انجام ندهید. در مواردی که اطلاعات اضافی درخواست شده باشد، پلیت‌ها را برای 4-7 روز در دمای اتاق نگهداری کنید.

اگر یک ارگانسیم غالب در رنگ‌آمیزی گرم مشاهده شود، BA و Choc به مدت 24-48 ساعت نگهداری و بررسی کنید. پلیت Mac را پس از 24 ساعت در صورت نداشتن رشد دور بیندازید.

— ارگانسیم غالبی را که در اسمیر گرم مشاهده شده است در صورت رشد روی محیط کشت شناسایی کنید و تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی را انجام دهید.

اگر ارگانسیم غالب فلور نرمال قسمت حلقی-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 شناسایی کنید و تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی را انجام دهید.

اگر دو نوع کلنی یا بیشتر از باسیل‌های گرم منفی جدا شود و هیچ‌کدام غالب نباشد، گزارش کنید:

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

کشت فاقد ارگانسیم غالب را گزارش کنید:

Mixed bacterial morphotypes

شناسایی بیشتر لازم نیست.

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

همه ایزوله‌هایی را که در شرایط هوازی رشد کرده باشند شناسایی کنید. برای آسپیراسیون ریه و نمونه‌های بیوپسی، باکتری‌های بی‌هوازی را شناسایی کنید. در صورتی که فلور نرمال قسمت حلقی-دهانی از نمونه جدا شد، نتیجه رشد را گزارش کنید:

Normal Oropharyngeal organisms present

آزمایش‌های شناسایی را براساس توضیحات قبلی روی استرپتوکوک‌های آلفاهمولیتیک و گونه‌های نایسریا و موراکسلا انجام دهید.

اگر هر تعداد سلول مخمر وجود داشته باشد، آن را شناسایی و گزارش کنید.

اگر قارچ جدا شود، آن را شناسایی و گزارش کنید.

اگر ایزوله مشکوک به مایکوباکتریوم یا نوکاردیا باشد، آن را شناسایی و گزارش کنید.

References

- Hall. GS, Abmm SM, *Diagnosis of hospital-acquired pneumonia and the microbiology lab*, Merion publication publisher of advance Newsmayasin 2005, <http://www.advanceweb.com>.
- Chastre. Jand Fagon. JY. *Ventilator-associated pneumonia AM.*, J. Respir. Cret. Care Med 2002; 165:867-903.
- Pan. Z, Xiao hong. WU. Etal. *Diagnostic Value of quantitative of endotracheal aspiration for ventilator-associated pneumonia*, Chin. Med. J. 2002; 115:1-4.
- Ioanas. M, Ferrer. R. Angrill. J, Ferrer M. and Torres A. *Microbial investigation in ventilator-associated pneumonia*, Eur Respir J. 2001; 17: 791-801.
- Carroll.KC. *Laboratory diagnosis of lower respiratory tract infections: Controversy and conundrums*, J. clin Microbial 2002; 40: 3115-3120
- Isenberg D. Henry: *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, American Society for Microbiology, 1992 & 2004.
- Murray R. Patrick: *Manual of Clinical Microbiology*; 8 TH editions, American Society for Microbiology, 2003.
- Forbes A. Betty: *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*, 11 TH editions, Mosby, 2002.
- Mahon R. Connie: *Textbook of Diagnostic Microbiology*, 2 ED editions, W.B. Saunders, 2002.
- Mandell L. Gerald: *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 6 TH editions, Elsevier Churchill Livingstone, 2005.
- 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 جراحی¹

در کشورهای غربی باوجود کوشش‌های فراوان در جهت جلوگیری از بروز عفونت‌های زخم محل جراحی از 34 میلیون جراحی انجام‌شده در سال حدود 300 تا 800 هزار مورد عفونت زخم گزارش شده‌است.

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

- عوامل مرتبط با بیمار؛ مانند ایمنی، وضع تغذیه و ابتلا به دیابت.
 - عوامل مرتبط با روش کار؛ مانند استفاده از وسایل² در محل یا ضربه به بافت میزبان درحین انجام جراحی.
 - عوامل مرتبط با ارگانیسم بیماری‌زا؛ مانند قدرت تهاجم ارگانیسم به بافت، میزان تحمل ارگانیسم در مقابل پاسخ‌های دفاعی میزبان و همچنین تحمل آنتی‌بیوتیک‌ها.
 - پروفیلاکسی ضد میکروبی قبل از جراحی؛ فلور داخلی بیمار یکی از عوامل و منابع عفونت باکتریایی است (عفونت‌های اندوژن³).
- مثلاً افراد مبتلا به دیابت و افراد همودیالیزی در بیش از 50 درصد موارد با استافیلوکوک اورئوس کلنیزه شده‌اند. حتی باوجود استفاده از تکنیک‌های ضد عفونی‌کننده جدید و پروفیلاکسی آنتی‌بیوتیکی، کلنیزاسیون با استافیلوکوک اورئوس بزرگ‌ترین خطر در عفونت‌های زخم است.
- تحقیقات انجام‌شده نشان‌دهنده آنکه میزان عفونت در جراحی قلب برای ناقلین 8 درصد و در افراد غیرناقل 1/1 درصد است. اگرچه روش‌های جدید ضد عفونی

1. Surgical site infection

2. Instrumentation

3. Endogen

می‌توانند موجب کاهش میکروفلورای پوست شوند، اما باعث حذف کامل آنها نمی‌شوند. زیرا حدود 20 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 ضد عفونی کننده از بین نمی‌روند.

حتی در جراحی‌های مناطق تمیز خطر عفونت‌های پس از جراحی 5-1 درصد تخمین زده می‌شود. برای مثال، میزان عفونت‌های زخم حاصل از جراحی‌های ارتوپدی به نسبت پایین است (2-6/8 درصد) و اغلب منبع آلودگی در خارج از بدن قرار دارد (آگزوژن)¹. میزان آلودگی خارجی به میزان استفاده از روش‌های کنترل و پیشگیری بستگی دارد. مانند فیلتراسیون هوای محل جراحی، ضد عفونی پوست محل جراحی و استفاده از مواد ضد عفونی کننده مناسب.

میزان عفونت‌های جراحی در جراحی‌های مناطق آلوده (کتیف) 27 درصد تخمین زده می‌شود که به‌علت کثرت میکروب‌های اندوژن در محل جراحی است. برای مثال درباره جراحی‌های روده بزرگ و سر و گردن که احتمال آلودگی با باکتری‌های اندوژن وجود دارد، احتمال ابتلا به عفونت‌های زخم بالا است.

به جز جراحی‌های مناطق تمیز، عفونت‌های زخم اغلب عامل پل‌میکروبیال (چند میکروبی) دارند که شامل آلودگی با میکروارگانیسم‌های هوایی و بی‌هوایی است. به‌طور متوسط آلودگی با پنج گونه مختلف در عفونت‌های محل جراحی کولورکتال² دیده می‌شود.

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

1. عفونت‌های سطحی⁴؛
2. عفونت‌های عمقی⁵؛
3. عفونت اعضا و فضاهای داخلی و عمقی⁶.

1. Exogen

2. Colorectal

3. Surgical Site Infection

4. Superficial incisional SSI

5. Deep Incisional SSI

6. Organ / deep SSI

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

عفونت‌های سطحی را معمولاً یک یا بیش از یک ارگانیسم ایجاد می‌کنند که از انواع بیماری‌زای قوی، فرصت طلب یا ضعیف هستند و کانون اصلی سطح پوست، دستگاه تنفسی، دستگاه گوارش یا ارگانیسم‌های پراکنده در محیط است. در حالی که عفونت‌های عمقی و آسه‌های اعضا و فضاهای داخلی را معمولاً یک ارگانیسم بیماری‌زای واحد ایجاد می‌کند.

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 آلوده می‌شوند. این میکروارگانیسم‌ها ابتدا به تعداد کم در محل وجود دارند و معمولاً پس از استقرار و ایجاد آلودگی با همان تراکم اولیه باقی می‌مانند و ممکن است تکثیر یابند. **Colonization:** اگر ارگانیسم از انواع بیماری‌زای ضعیف (Commensal) باشد، تکثیر آن در محل کلنیزاسیون اولیه به بافت میزبان آسیب نمی‌زند یا میزان آسیب نسبی خفیف است.

Infection: وقتی برومی‌کند که یک یا چند ارگانیسم آلوده کننده بر مکانیسم‌های دفاعی و پاکسازی کننده میزبان غلبه کنند و به تعداد زیاد تکثیر شوند و بافت‌های میزبان را مورد تهاجم قرار دهند (جدول 4-1).

عوامل اصلی تعیین کننده سیر بالینی ضایعه:

1. بیماری‌زایی ارگانیسم؛
2. توان دفاعی موضعی و سیستمیک میزبان.

E توجه:

1. عفونت محل ختنه را نباید به‌عنوان عفونت گزارش کرد.
2. آماس و ترشح مختصر محل بخیه را نباید به‌عنوان عفونت گزارش کرد.
3. التهاب محل زخم را نباید به‌عنوان عفونت گزارش کرد.

جدول 2-1: بیماری‌زاهای اصلی در عفونت زخم‌های جراحی

Major Pathogens in Surgical Wound Infections	
Pathogen	Percent of Infections*
<i>Staphylococcus aureus</i>	20
<i>Coagulase-negative Staphylococci</i>	14
<i>Enterococci</i>	12
<i>Escherichia coli</i>	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
<i>Enterobacter spp.</i>	7
<i>Proteus mirabilis</i>	3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3
<i>Other Streptococcal spp.</i>	3
<i>Candida albicans</i>	2
<i>Group D Streptococci</i>	2
<i>Bacteroides fragilis</i>	2
<i>Other gram-positive aerobes</i>	2
<i>Citrobacter spp.</i>	1
<i>Serratia marcescens</i>	1
<i>Candida spp.</i>	1
<i>Gram-positive anaerobes</i>	1
<i>Group B Streptococci</i>	1
<i>Acinetobacter spp.</i>	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.

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

جدول 1-4

علائم آماس	آسیب نسجی	پرولیفراسیون در محل	نوع ارگانیسم	وبرلانس ارگانیسم
-	-	-/+	mixed	کم
-	-/+	+	Commensal (low Pathogen)	متوسط
+	++	++	Potent Pathogen	زیاد

از آنجا که ارگانیسم‌های بالقوه 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 کاربانکل² و آبه‌های لوکالیزه وجود دارد. به‌همین شکل، استریپتوکوکوس پیورن³ عموماً باعث بروز ضایعات رو به گسترش مثل باد سرخ³ می‌شود. عفونت‌های محل جراحی باید طی 30 روز پس از عمل جراحی اتفاق افتاده باشد و اگر ایمپلنت⁴ در محل عمل جراحی قرار داده‌شود، این زمان به یک سال افزایش می‌یابد.

وجود یکی از معیارهای زیر برای تأیید تشخیص ضروری است:

1. ترشح چرک از محل زخم و خروج ترشح چرکی از درن؛
2. جدا شدن ارگانیسم از ترشح چرکی (کشت مثبت)؛
3. تأیید رادیولوژیک یا هستیولوژیک؛
4. تشخیص بالینی پزشک معالج.

1. Potentially Pathogen
2. Carbuncle
3. Erysipelas
4. Implant

روش نمونه‌گیری زخم

عموماً از دو روش کمی¹ و کیفی² برای نمونه‌برداری از بافت یا ترشحات زخم استفاده می‌شود.

روش کمی

برای تعیین بار میکروبی منطقه استفاده می‌شود. در این روش، بافت به صورت آسپتیک تهیه می‌شود و پس از توزین و هموژن کردن، از آن رقت‌های سریال تهیه می‌شود و روی محیط‌های انتخابی و غیرانتخابی در شرایط هوازی و بی‌هوازی کشت داده می‌شود تا اطلاعات کمی و کیفی لازم برای شناسایی عامل مهاجم به دست آید. البته در این روش در صورت وجود بافت‌های مرده سطحی، برداشت این بافت‌ها به وسیله کورتاژ آنها به خصوص 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 نرمال سالین استریل غیرباکتریوستاتیک و ماساژ آرام موضع برای جمع شدن و آسپیراسیون مایع لازم به نظر می‌رسد.

روش نیمه‌کمی و کیفی

استفاده از سواب زخم: اغلب به وسیله سواب‌های پنبه‌ای انجام می‌شود و برای نمونه‌برداری زخم‌های سطحی و دبری‌های بافتی برای ارزیابی نیمه‌کمی و کیفی فلور میکروبی زخم به کار می‌رود. در صورت استفاده از سواب آلژینات می‌توان ارزیابی را کاملاً کمی انجام داد؛ زیرا سواب در مایع حل می‌شود و همه میکروارگانیسم‌ها را آزاد می‌کند.

1. Quantitative
2. Qualitative

اصولاً آسپیراسیون مایع چرکی برای جداسازی بیماری‌زها، به خصوص بی‌هوازی‌ها، بر نمونه‌برداری با سواب ارجحیت دارد. با وجود کم‌ارزش بودن سواب‌های سطحی برای نمونه‌برداری، این روش ارزان، غیرتهاجمی و در دسترس است. اما استفاده از آن در زخم‌های سطحی در صورت تمیز نکردن زخم و برداشت دبری‌های سطحی، ممکن است فقط نشان‌دهنده آلودگی‌های سطحی باشد و موجب تشخیص نادرست شود. سواب می‌تواند به صورت نیمه‌کمی میزان فلور میکروبی را تخمین بزند (برای مثال Light Growth، Moderatle Growth و Heavy Growth) که آسان‌تر از روش کاملاً کمی است.

نحوه نمونه‌برداری

با وجود آنکه اغلب نمونه‌ها در اتاق عمل و توسط پزشک و کادر پزشکی گرفته می‌شود، اما اطلاع از نحوه نمونه‌گیری و شرایط آماده‌سازی بیمار برای تهیه دستورالعمل و ارسال به بخش‌های بیمارستانی از جمله وظایف بخش میکروب‌شناسی محسوب می‌شود.

الف) زخم سطحی

1. آسپیراسیون با سرنگ بر نمونه‌برداری با سواب ارجحیت دارد.
2. سطح زخم را به وسیله شستشو با سرم فیزیولوژی استریل یا الکل 70 درصد تمیز کنید و بگذارید خشک شود.
3. از سرنگ 3-5 سی‌سی با سرسوزن 22 یا 23 برای جمع‌آوری نمونه استفاده کنید. پزشک باید تا حد امکان آسپیراسیون را عمقی انجام دهد. در ضمن، در صورت وجود وزیکول دو نمونه یکی از مایع داخل وزیکول و یکی از قاعده آن جمع کنید.
4. در صورتی که آسپیراسیون اولیه ناموفق باشد، می‌توان با تلقیح مقداری سرم فیزیولوژی غیرباکتریوستاتیک در زیرجلد مجدد نمونه گرفت.

5. اگر آسپیراسیون را دوباره تکرار کردید 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

1. منطقه را با الکل 70 درصد تمیز کنید.
2. ابتدا لایه دبری را بردارید.
3. سپس، از قسمت پایه زخم یا ندول نمونه بگیرید.
4. در صورت وجود آگزودا آن را به وسیله سرنگ یا سواب استریل جمع کنید.

ج) بافت زیرجلدی و نمونه‌های پوست (جدول 3-4)

1. پانچ بیوپسی‌های پوست:
 - ؛ سطح پوست را با الکل 70 درصد ضدعفونی کنید.
 - ؛ 3-4mm از قسمت درم را پانچ کنید.
- در لوله استریل بدون فرمالین و یا دارای سرم فیزیولوژی استریل غیرباکتریوستاتیک به بخش میکروبی‌شناسی ارسال کنید.
2. آسپیراسیون بافت نرم:
 - ؛ سطح پوست را با الکل 70 درصد ضدعفونی کنید.
 - ؛ عمیق‌ترین قسمت زخم یا مجرای سینوس را آسپیره کنید.
 - ؛ مراقب آلودگی سطحی باشید.

جدول 3-4: بافت زیرجلدی و نمونه‌های پوست

نوع کشت	ملاحظات
باکتری	آسپیراسیون به وسیله سرنگ یا بیوپسی نمونه بر نمونه برداری با سواب ارجحیت دارد.
بی‌هوازی	در سوختگی‌ها، زخم‌ها، ندول یا عفونت‌های سطحی پوست رایج نیست، اما در گازگرفتگی‌ها و ضربه‌ها مفید است.
قارچ	در تشخیص درماتوفیت‌ها، مخمر و قارچ‌های دوشکلی مفید است.

مایکوباکتريا	در تشخیص مایکوباکتریوم مارینوم ¹ ، فورتیتوم ² و چلونی ³ مفید است.
ویروس	در تشخیص HSV و واریسلا-زوسترا ⁴ مفید است.

د) زخم‌های عمیق، آسپیراسیون و نمونه‌های بافتی عمیق (جدول 4-4)

1. سطح را با الکل 70 درصد ضدعفونی کنید.
2. عمیق‌ترین قسمت زخم را آسپیره کنید تا از آلودگی سطح پوست اجتناب شود. در صورتی که نمونه به وسیله جراحی گرفته می‌شود، قسمتی از دیواره زخم نیز باید برای کشت ارسال شود.

جدول 4-4: زخم‌های عمیق، آسپیراسیون و نمونه‌های بافتی عمیق

نوع کشت	ملاحظات
باکتری	نمونه‌های بیوپسی یا آسپیراسیون بر نمونه برداری با سواب ارجحیت دارد.
بی‌هوازی	در تشخیص آکتینومایکوزیس مفید و ارسال در سیستم انتقالی بی‌هوازی است.
قارچ	در تشخیص پسودالشریا بویدی ⁵ ، گونه‌های بای‌پولاریس ⁶ ، اکزوفیالا ⁷ و فوزاریوم ⁸ مفید است.
مایکوباکتريا	در تشخیص مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، <i>M. bovis</i> و <i>M. kansasii</i> مفید است.

روش انتقال نمونه

پس از نمونه برداری، انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه بسیار مهم است. این مطلب به ویژه درباره 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

1. *M. Marinum*
2. *M. Fortuitum*
3. *M. Chelonei*
4. *Vari cellae-Zoster*
5. *Pseudoallescheria boydii*
6. *Bipolaris*
7. *Exophiala*
8. *Fusarium*

Dacron swabs	Residual fatty acids may inhibit some bacteria and <i>Chlamydia</i> spp. If cotton is glued or spun to wooden applicator stick, wooden stick may inactivate HSV and interfere with some <i>Ureaplasma</i> identification tests. Useful in collection of viral and group A streptococcus specimens.
--------------	---

همچنین، سیستم‌های انتقال بی‌هوایی مختلف تجاری نیز وجود دارند که در جدول 4-6 نشان داده شده‌است.

جدول 4-6: Transport systems for anaerobic specimens

System and supplier	Description
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.

محیط). استفاده از محیط‌های انتقالی از قبل احیاشده (Prereduced) تجاری در مواردی که انتقال نمونه 2-1 ساعت طول بکشد، مناسب‌ترند. بنابراین، از آنجا که نمونه‌های سواب به خشکی و فشار اکسیژن حساس‌اند، برای حفظ میکروارگانیسم‌های هوایی و بی‌هوایی همراه سواب‌های پنبه‌ای یک محیط انتقالی از قبل احیاشده و غیر مغذی مفید است (جدول 4-5).

اغلب باکتری‌های بی‌هوایی در کشت‌های مخلوط بهتر زنده می‌مانند. انتقال سواب مرطوب در محیط از قبل احیاشده انتقالی به آزمایشگاه به‌عنوان روش مؤثر و ارزان برای کشت هوایی و بی‌هوایی 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 خواهد شد. برای نمونه‌برداری و انتقال هوایی نمونه‌ها، انواع مختلفی سواب وجود دارد (جدول 4-5) که استفاده از هر کدام در مناطق خاص با توجه به ارگانیسم‌های موجود در آن محل توسط ASM¹ توصیه شده‌است.

جدول 4-5: 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. F Note: Many other such transport system from other manufacturers are available.
Calcium alginate swabs	Can be toxic for some strains of <i>N. gonorrhoeae</i> , HSV, and <i>Ureaplasma urealyticum</i> and may be toxic for some cell cultures. Useful for collection of <i>Chlamydia</i> cultures.
Cotton swabs	

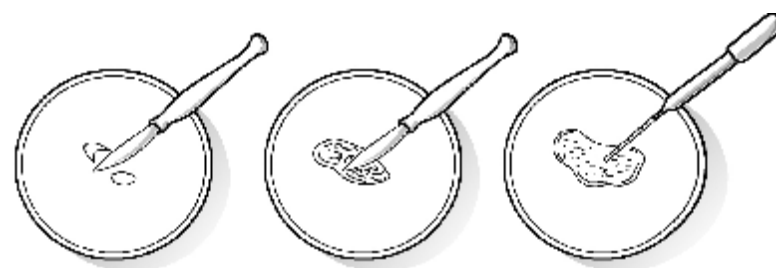
شکل 4-2: روش Mortar & Paste

* 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.

نحوه آماده‌سازی نمونه

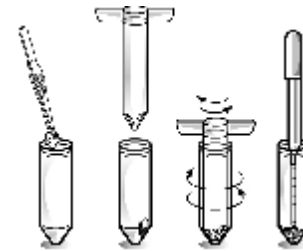
1. هموژن و یکنواخت کردن بافت

روش‌های مختلفی برای یکنواخت کردن بافت وجود دارد. برای مثال، روش اسکالپل استریل (شکل 4-1)، روش Mortar & Paste با استفاده از پودر کربوران‌دوم (شکل 4-2)، روش خرد کردن بافت در لوله (شکل 4-3) و روش Stomacher با استفاده از کیسه خردکننده (شکل 4-4). در دسترس‌ترین روش برای هموژن کردن نمونه استفاده از اسکالپل استریل است. ابتدا نمونه را داخل یک ظرف استریل می‌گذاریم و بافت را توسط اسکالپل استریل خرد و یکنواخت می‌کنیم. سپس، توسط پمپ پاستور استریل یا سواب استریل نمونه را کشت می‌دهیم. ممکن است برای مرطوب نگهداشتن نمونه به یک محیط مایع مانند Nutrient broth نیاز داشته باشیم.

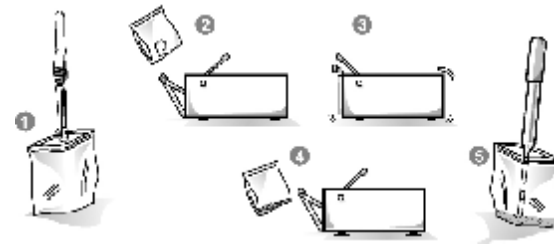


شکل 4-1: روش اسکالپل استریل





شکل 3-4: روش Grinding

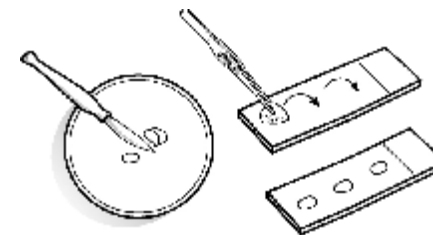


شکل 4-4: روش استفاده از کیسه خردکننده Stomacher

2. آماده‌سازی اسمیر

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

ب) نمونه را با پنس استریل بردارید و آن را به چند قطعه تقسیم کنید و روی لام نو برای رنگ‌آمیزی گرم و دیگر رنگ‌آمیزی‌های لازم قرار دهید (شکل 4-5).



شکل 4-5: روش تهیه اسمیر از بافت

3. آماده‌سازی اسمیر نازک

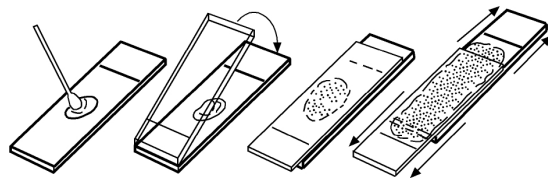
وقتی نمونه نسج نرم یا آگزودای ضخیم است، برای مثال خلط یا مواد چرکی، یک اسمیر نازک تهیه کنید (شکل 4-6):

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

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

ج) لام‌ها را به وسیله کشیدن برخلاف جهت هم از یکدیگر جدا کنید.

د) ممکن است مرحله ب و ج با استفاده از چند لام تازه برای تهیه اسمیر نازک تکرار شود.



شکل 4-6: آماده‌سازی اسمیر نازک

روش تلقیح نمونه‌ها در محیط کشت

انتخاب محیط کشت مناسب براساس نمونه بالینی در جدول 4-7 آمده است. برای تلقیح محیط‌های جامد مانند آگار خونی، آگار شکلات و آگار مکانکی باید از یک روش استاندارد استفاده نمود تا بتوان آنالیز نیمه‌کمی را روی آن انجام داد. روش کشت خطی برای جداسازی نیمه‌کمی کلنی‌ها در شکل 4-7 نمایش داده شده است. براساس این روش رشد ضعیف و محدود کلنی‌ها در منطقه اول ($\frac{1}{4}$ پلیت) به صورت Light Growth (+1)، رشد متوسط تا منطقه دوم رشد به صورت Moderate Growth (+2)

و بالاخره رشد زیاد که کل پلایت توسط کلنی‌ها پوشیده شده باشند به صورت Heavy Growth (+4 to 3) گزارش می‌شود.

+

جدول 4-7: انتخاب محیط کشت مناسب براساس نمونه بالینی

نمونه	ظرف انتقال	آماده سازی بیمار	دستورالعمل های ویژه	انتقال به آزمایشگاه	محیط های کشت اولیه	بررسی میکروسکوپی	توضیحات
آبسه (زخم، پوستول و زخم های سطحی)	سواب انتقالی در محیط استوارت ^۱ یا ایمیس ^{۱۱}	تمیز کردن محل با نرمال سالین استریل یا الکل 70 درصد	نمونه گیری با سواب از لبه زخم	حداکثر تا 24 ساعت در دمای اتاق در محیط نگهدارنده	*BA **CA +Mac ++Thio	رنگ آمیزی گرم	در صورتی که اسمیر مخلوطی از باکتری های گرم مثبت و منفی را نشان می دهد، محیط CNA ^{۱۱} را اضافه کنید
زخم عمیق	محیط انتقالی بی هوازی	تمیز کردن محل با نرمال سالین استریل یا الکل 70 درصد	آسپیراسیون از دیواره و بافت ها	حداکثر تا 24 ساعت در دمای اتاق در محیط نگهدارنده	BA CA Mac Ana ^۱ Thio	رنگ آمیزی گرم	شستشوی گرانول ها (در صورت وجود) و داخل کردن آن در سرم فیزیولوژی
بافت	محیط انتقالی بی هوازی یا لوله در پیچ دار استریل	ضد عفونی پوست	از خشک شدن نمونه جلوگیری کنید (با مرطوب کردن آن با آب مقطر استریل در صورتی که خونی نباشد)	حداکثر تا 24 ساعت در دمای اتاق در محیط نگهدارنده	BA CA Mac Ana Thio	رنگ آمیزی گرم	در صورت نیاز آن را هموژنیزه و یکنواخت کنید

^۱ Stuart

* Blood Agar

+ MacConkey Agar

| Anaerobic agars as appropriate

^{۱۱} Amies

** Chocolate Agar

++ Thioglycollate Medium

|| Columbia agar with colistin and nalidixic acid

+

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 35°C نگهداری شوند. محیط شکلات آگار را باید در جو 3-5 درصد CO₂ (Candle Jar) نگهداری نمود. به‌طور کل، انکوباسیون محیط‌های کشت هوازی به مدت 72 ساعت برای موارد معمول و در صورت شک به باکتری‌های سخت‌رشد مانند نوکاردیا ادامه انکوباسیون به مدت 5-7 روز ضروری است. سطح پلیت‌ها باید روزانه از نظر رشد کلنی‌های مشکوک بررسی شوند و در صورت شک به وجود قارچ‌های دوشکلی، کشت در دو پلیت هم‌زمان (محیط بلاد آگار یا BHI آگار) و نگهداری آنها در دو دمای 22°C و 35°C توصیه می‌شود.

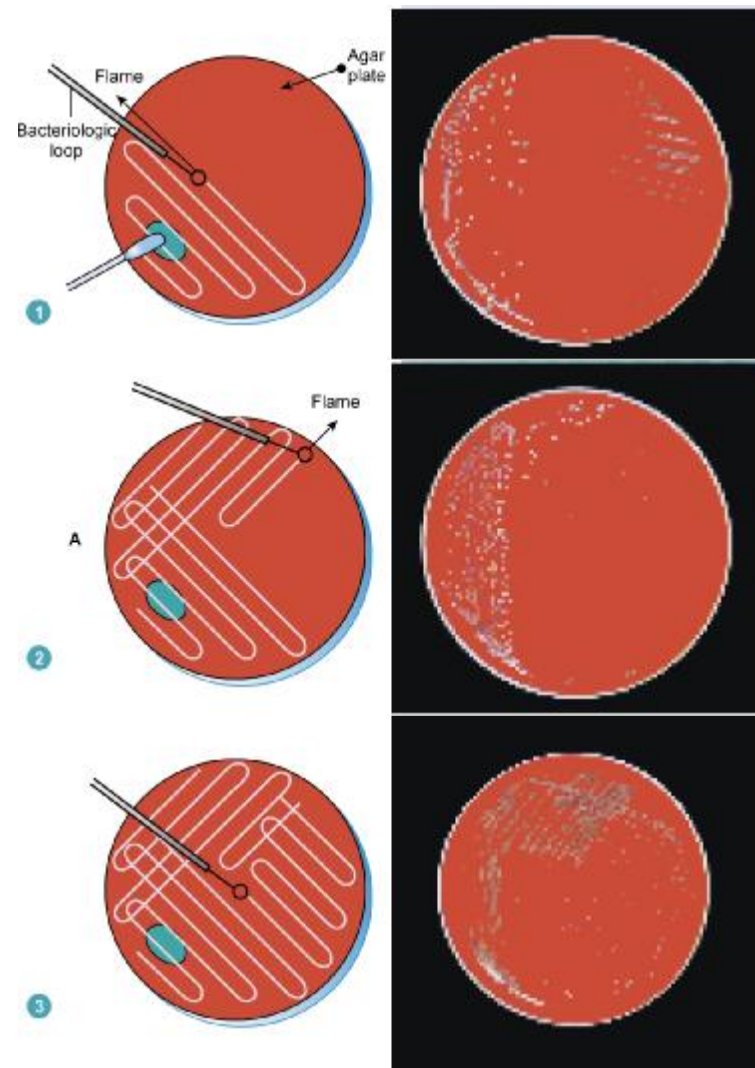
کشت بی‌هوازی

از آنجا که بخش وسیعی از عفونت‌های زخم و جراحی توسط میکروب‌های بی‌هوازی ایجاد می‌شوند، ضرورت کشت صحیح یادآوری می‌شود. در صورت استفاده از روش‌های نمونه‌گیری مناسب برای کشت بی‌هوازی، میزان عفونت با میکروب‌های بی‌هوازی در زخم‌های دیابتیک حدود 95 درصد تخمین زده می‌شود که بیشترین میزان جداسازی مربوط به *پیتوستریپتوکوکوس*¹، *باکترئوئیدس*² و *پرووتلا*³ است. میزان عفونت‌های بی‌هوازی در زخم‌های بستر و زخم‌های فشاری حدود 30 درصد از کل ایزوله‌ها را تشکیل می‌دهد.

نحوه کشت

1. نمونه‌ها باید تا حد امکان بلافاصله پس از رسیدن به آزمایشگاه کشت داده شوند.

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



شکل 4-7:

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

2. کشت هم‌زمان هوازای نمونه‌ها الزامی است. این عملیات به‌منظور مقایسهٔ رشد و تشخیص رشد باکتری‌های هوازای -بی‌هوازی اختیاری از باکتری‌های بی‌هوازی اجباری انجام می‌شود (باکتری‌های هوازای -بی‌هوازی در هر دو شرایط رشد می‌کنند، اما رشد باکتری‌های بی‌هوازی اجباری در شرایط هوازای منفی است و رشد فقط در شرایط بی‌هوازی دیده می‌شود).

3. برای کشت بی‌هوازی نمونه‌ها باید از محیط‌های از قبل احیاشده استفاده نمود. این پلیت‌ها به‌صورت آمادهٔ مصرف در بسته‌بندی‌های ویژه (فاقد اکسیژن) توسط شرکت‌های مختلف تولیدکننده محیط‌های کشت عرضه می‌شوند. برای تهیه و آماده‌سازی محیط‌های از قبل احیاشده در آزمایشگاه می‌توان پلیت‌ها را حداقل 2 ساعت قبل از کشت (یا در صورت امکان همیشه یک دسته پلیت از روز قبل) درون جار بی‌هوازی قرارداد تا اکسیژن آن کاملاً خارج شود.

محیط‌های معمول شامل پلیت بلاد آگار بی‌هوازی (CDC بلاد آگار یا بروسلا بلاد آگار)¹، محیط مهارکنندهٔ باکتری‌های گرم مثبت و باسیل‌های گرم منفی بی‌هوازی اختیاری مانند KVLB (کانامایسین - وانکومایسین بلاد آگار)²، یک محیط افتراقی یا اختصاصی مانند BBE (باکترئیدیس - بایل اسکولین)³ و یک محیط اختصاصی برای گرم مثبت‌ها (کلیستین - نالیدکسیک اسید بلاد آگار⁴ یا فنیل - اتیل الکل بلاد آگار⁵) هستند.

محیط‌ها باید بلافاصله پس از کشت در شرایط بی‌هوازی قرار گیرند (جارهای بی‌هوازی). رشد این باکتری‌ها آهسته‌تر از باکتری‌های هوازای یا بی‌هوازی اختیاری است و به 48 ساعت انکوباسیون اولیه نیاز دارند. در صورت منفی بودن پلیت‌ها انکوباسیون به مدت 3-5 روز ادامه می‌یابد و سپس گزارش نهایی داده می‌شود. برای جداسازی آکتینومیست‌ها و برخی بی‌هوازی‌های سخت‌رشد زمان طولانی‌تری

1. CDC Blood Agar or Brucella Blood Agar
2. Kanamycin-Vancomycin Blood Agar
3. Bacteroides-Bile Esculin
4. Colistin-Nalidixic Acid Blood Agar
5. Phenyl-Ethyl alcohol Blood Agar

+

لازم است. بنابراین، برای کشت نمونه‌های مشکوک به باکتری‌های بی‌هوازی حداقل باید از یک محیط اختصاصی و یک محیط غیراختصاصی استفاده نمود. همچنین، می‌توان یک دیسک مترونیدازول 5 grm را روی سطح آگار غیراختصاصی (برای تشخیص بی‌هوازی‌ها) قرارداد. پس از 48-72 ساعت انکوباسیون تحت شرایط بی‌هوازی حضور باکتری‌های بی‌هوازی به‌وسیلهٔ وجود هر هالهٔ عدم رشد دور دیسک مترونیدازول آشکار می‌شود.

ارزیابی و بررسی نمونه‌های زخم

نمونه در لحظهٔ ورود به آزمایشگاه به‌عنوان بافت¹، اسپیراسیون²، مایع³ یا سواب⁴ معرفی خواهد شد که ممکن است همراه با اطلاعات بالینی باشد. این اطلاعات شامل نوع نمونه (برای مثال، زخم جراحی، زخم‌های ناشی از تروما، زخم یا زخم‌های فشاری)، محل زخم، علائم بالینی عفونت، وجود نکروز و درمان آنتی‌بیوتیکی است که در پیش‌بینی میکروارگانیسم‌هایی که بیشتر درگیر هستند به میکروب‌شناس کمک بزرگی خواهد کرد تا در انتخاب نوع کشت و نوع محیط و آنالیزهای تکمیلی استفاده شوند. همچنین، توصیف زخم و ذکر محل مانند زخم‌های ناحیهٔ کولورکتال⁵ یا زخم‌های فشاری ناحیهٔ ساکرال⁶ بیان‌کنندهٔ این موضوع است که زخم ممکن است با میکروارگانیسم‌های مدفوع همراه باشد. بنابراین، ممکن است مخلوطی از باکتری‌های هوازای و بی‌هوازی وجود داشته باشند. از آنجا که نتایج کشت‌های میکروبی و آزمایش حساسیت میکروبی در کمتر از 48 ساعت حاصل نمی‌شود، بنابراین، بهتر است تعدادی از روش‌های سریع‌تر معرفی شوند.

1. Tissue
2. Aspiration
3. Fluid
4. Swab
5. Colorectal
6. Sacral

+

رنگ آمیزی گرم

با وجود 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 با ارزش است. به‌ر حال، در بیشتر انواع زخم‌ها که به‌وسیله میکروفلور هوازی - بی‌هوازی ایجاد می‌شود، 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 برقرار کرد. 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 داده می‌شود.

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 10gr

1. Kopeloff

آب مقطر 1000ml

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

ب) محلول بی‌کربنات سدیم

بی‌کربنات سدیم (NaHCO_3) 50gr

آب مقطر 1000ml

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

ج) محلول ید (روش کوپلوف)

هیدروکسید سدیم (NaOH) 4gr

کریستال ید 20gr

یدید پتاسیم 1gr

آب مقطر 1000ml

1. NaOH را در 25ml آب مقطر حل کنید.

2. ید و یدید پتاسیم را اضافه و کاملاً حل کنید.

3. 975ml آب مقطر را به آرامی به آن اضافه و کاملاً مخلوط کنید.

د) محلول رنگبری: استون - الکل 3 به 7

اتانول 95 درصد 700ml

استون 300ml

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

رنگ سافرانین (روش کوپلوف)

سافرانین O	20gr
اتانول 95 درصد	50ml
آب مقطر	1000ml

روش رنگ‌آمیزی

1. لام را با حرارت ثابت کنید و بگذارید تا خنک شود.
2. لام را با محلول A (کریستال ویوله) بپوشانید. تقریباً 5 قطره از محلول B (بی‌کربنات 5 درصد) به آن اضافه کنید. بگذارید رنگ به مدت 2 تا 3 دقیقه باقی‌ماند. در این مدت لام نباید خشک شود.
3. لام را به آرامی با محلول ید کاپلوف بشویید.
4. محلول تازه ید را برای 2 دقیقه به کار ببرید.
5. لام را مایل نگه‌دارید و روی آن محلول رنگ‌بر بریزید و بلافاصله خالی کنید.
6. حداقل به مدت 30 ثانیه با سافرانین کاپلوف رنگ‌آمیزی کنید.
7. رنگ سافرانین را به آرامی با آب معمولی بشویید.

تفسیر کشت نمونه‌های زخم

پس از انکوباسیون در شرایط هوازی و بی‌هوازی برای 48-24 ساعت، غالباً باکتری‌های شایعی چون *استافیلوکوک اورئوس*، *پسودوموناس آئروژینوزا* و *استرپتوکوک بتاهمولیتیک* رشد می‌کنند که رشد آنها نیمه‌کمی و به صورت Light (1+) تا Heavy (3+ to 4+) گزارش می‌شود (شکل 4-7). اکثر بی‌هوازی‌ها (به استثنای گونه‌های *کلستریدیوم*) به صورت مخلوط با میکروفلور هوازی رشد می‌کنند. آنتی‌بیوگرام فقط روی باکتری‌هایی انجام می‌شود که به طور غالب در محیط کشت هوازی رشد کرده‌اند. در صورتی که کشت هوازی منفی بود، اما زخم عفونی به نظر می‌رسید، شک به عفونت بی‌هوازی مطرح است و باید کامل بررسی شود. بیشتر باکتری‌های بی‌هوازی با

منشأ داخلی (اندوژن) طی 5-2 روز روی محیط‌های انتخابی رشد می‌کنند. در کشت مخلوط هوازی‌ها و بی‌هوازی‌ها که مشخصه زخم‌های چندمیکروب است، بی‌هوازی‌های سخت‌رشد اغلب به سادگی رشد می‌کنند که به دلیل دردسترس قرارگرفتن عوامل ضروری برای رشد هم‌زمان باکتری‌های بی‌هوازی اختیاری است.

به این موارد باید توجه کرد:

1. رنگ‌آمیزی گرم روی نمونه زخم انجام می‌شود و در صورت مشاهده لکوسیت بالا، باکتری غالب از نظر شکل مورفولوژیک در لام، به صورت گزارش ابتدایی به پزشک اعلام می‌شود (برای مثال، کوکسی گرم مثبت زنجیره‌ای).
2. کشت در موارد شک به بی‌هوازی‌ها (مثل بوی تعفن و گندیدگی که مشخصه عفونت‌های بی‌هوازی است) در شرایط هوازی و بی‌هوازی انجام شود. از انواع مختلف کلنی که به دیسک مترونی‌دازول حساس هستند، رنگ‌آمیزی گرم انجام شود تا به سرعت انواع باکتری‌های بی‌هوازی مورد شناسایی اولیه قرارگیرند (باسیل‌های گرم منفی بی‌هوازی متعلق به گونه‌های *باکترئوئیس*، *پرووتلا* و *فوزوباکتریوم*). بوی تعفن نشان‌دهنده رشد مخلوطی از باکتری‌های بی‌هوازی به همراه بی‌هوازی اختیاری است. در کشت‌های مخلوط، آنتی‌بیوگرام روی ارگانسیم غالب انجام می‌شود. با توجه به اهمیت نقش بی‌هوازی‌ها و مشکلات جداسازی و شناسایی آنها روش‌های اولیه مانند مشاهده میکروسکوپی (رنگ‌آمیزی گرم از کلنی‌های رشد یافته)، تولید پیگمان روی بلاد آگار (اغلب در کنار میکروارگانسیم‌هایی مانند *استافیلوکوک اورئوس* ایجاد می‌شود) و حساسیت به دیسک مترونی‌دازول 5µgr در شناسایی مقدماتی بی‌هوازی‌ها کاربرد دارد. ممکن است در برخی زخم‌ها میکروارگانسیم‌های غیرمعمول وجود داشته باشند. مانند زخم‌های ناشی از گازگرفتگی یا مخمرها در زخم بیمارانی که داروهای سرکوب‌کننده ایمنی دریافت می‌کنند.

گزارش نتایج میکروب‌شناسی

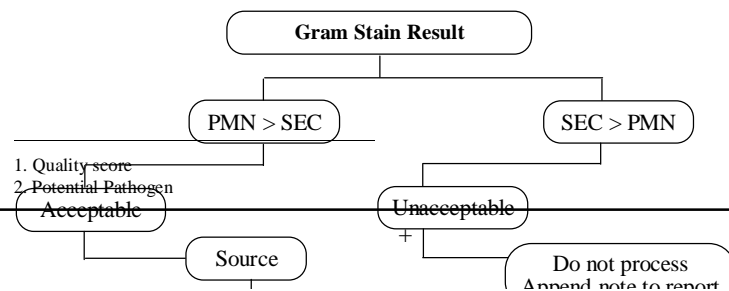
به منظور اینکه آزمایشگاه میکروب‌شناسی وظیفه خود را در تشخیص و درمان زخم‌های محل جراحی انجام دهد (به خصوص در مواردی که درمان زخم با شکست مواجه شده است)، نیازمند اطلاعات بالینی است تا تفسیر و گزارش صحیح باشد. برای مثال، نوع زخم، محل آن، شرایط، علائم عفونت و روش نمونه‌گیری. بنابراین، تأکید می‌شود ارتباط بین آزمایشگاه میکروب‌شناسی و پزشک معالج ضروری است. برای مثال، گزارش کشت مخلوط هوازی-بی‌هوازی از یک زخم فشاری در ناحیه ساکرال را نباید به عنوان آلودگی حین نمونه‌برداری و کثیف‌بودن زخم تلقی کرد، بلکه ممکن است نشان‌دهنده سینرژیسم میکروبی باشد. گزارش آنتی‌بیوگرام فقط برای استافیلوکوک اورئوس به تنهایی ممکن است موجب شکست درمان شود؛ زیرا باسیل گرم منفی بی‌هوازی موجود در کنار آن گزارش نشده است.

تفسیر و گزارش لام، رنگ آمیزی گرم و کشت

سه روش مختلف برای تعیین دامنه مطالعه، نحوه تفسیر و گزارش نمونه‌های اسمیر و کشت زخم وجود دارد:

1. براساس ارجحیت نسبی گلبول‌های سفید چندهسته‌ای (PMN)؛
2. براساس شمارش و تعیین تعداد سلول‌های PMN و سلول‌های اپی‌تلیال سنگفرشی (SEC) در (Q-Score)¹؛
3. براساس تعداد ارگانیسیم‌های بیماری‌زای بالقوه (PP)² و سیستم درجه‌بندی 4، 3، 2، 1

روش اول: گزارش نتایج



مثال 1:

1-1. نتیجه 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

2-1. دامنه مطالعه:

تعیین هویت (ID) و آزمون تعیین حساسیت ضد میکروبی برای ارگانیزم‌های زیر انجام می‌شود:

Gram positive cocci in clusters
Gram negative bacilli

3-1. نحوه گزارش دهی:

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

مثال 2:

1-2. نتیجه اسمیر گرم (نمونه قابل قبول):

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

2-2. نتیجه کشت:

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

3-2. نحوه گزارش دهی:

S. aureus

Group A *Streptococci*

Enteric bacilli

بدون تعیین حساسیت ضد میکروبی:

ID محدود بدون تعیین حساسیت ضد میکروبی:

مثال 3:

1-3. نتیجه اسمیر گرم:

Many neutrophils, few epithelial cells, multiple morphotypes

2-3. کشت:

More than three potential pathogens

نکته‌های مهم تصمیم‌گیری درباره دامنه تشخیص میکروبیولوژیک:

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

روش دوم: گزارش نتایج

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

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

نحوه تفسیر در سیستم Q-Score:

1. اگر Q=3 باشد:

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

2. اگر Q=2 یا Q=1 باشد (اگر بیماری‌زاهای بالقوه کمتر یا مساوی Q-Score باشد):

تعداد ارگانیزم کمتری ارزیابی می‌شود.

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

تمام ارگانیزم‌های PP بررسی می‌شوند.

4. اگر $Q\text{-Score} < PP$ باشد:

باتوجه به یافته‌های اسمیر گرم:

- ؛ تمام بیماری‌زاهای بالقوه موجود در اسمیر گرم بررسی کامل می‌شوند.
- ؛ سایر ارگانسیم‌ها فقط توصیف مورفولوژیک می‌شوند.
- ؛ اگر تمام ارگانسیم‌های PP در اسمیر گرم وجود داشته باشند، تمام ارگانسیم‌ها فقط توصیف مورفولوژیک می‌شوند.

روش سوم: گزارش نتایج

سیستم درجه‌بندی 4, 3, 2, Q

دامنه ارزیابی‌ها به تعداد ارگانسیم‌های بیماری‌زای بالقوه بستگی دارد.

1. دو ارگانسیم بیماری‌زای بالقوه: ID/AST

2. سه ارگانسیم بیماری‌زای بالقوه.

باتوجه به یافته‌های اسمیر گرم:

1-2. دو ارگانسیم بیماری‌زای بالقوه بررسی کامل می‌شود به شرط آنکه در

اسمیر گرم وجود داشته باشند.

2-2. اگر هر سه ارگانسیم در اسمیر گرم وجود داشته باشند، تشخیص

مورفولوژیک کفایت می‌کند.

3. بیشتر از سه ارگانسیم بیماری‌زای بالقوه:

؛ تشخیص مورفولوژیک 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

دامنه مطالعه:

ID/ AST: S. aureus

ID: Streptococcus Group A

Morphologic ID: enteric bacilli

نمونه‌های زخم با 0 Q-Score

به صورت زیر گزارش کنید:

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).

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

1. درخواست مشاوره تلفنی فوری و توضیح دلیل به‌روشنی و همچنین توضیح

جنبه‌های آزمایشگاهی؛

2. ارسال یک نوشته یا گزارش رایانه‌ای به واحد پرستاری؛

3. 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 مذاکره تلفنی با او انجام شده، زمان و تاریخ تماس تلفنی)؛

4. قراردادن نمونه‌ها در یخچال به مدت 3-5 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.

1. گذرا: باکتری‌می به صورت تصادفی در مواقعی چون مسواک‌زدن و جویدن غذا، دستکاری بافت‌های عفونی، Instrumentation سطوح مخاطی آلوده و جراحی بافت‌های غیراستریل به وجود می‌آید که در بعضی موارد به سیتی سمی منجر می‌شود.
 2. پیوسته: در مواردی که منشأ عفونت داخل عروقی¹ باشد، مانند اندوکاردیت و کاتترهای خونی، باکتری به‌طور پیوسته به داخل خون آزاد می‌شود. همچنین، در مراحل ابتدایی تیفوئید و بروسلوز نیز این حالت دیده می‌شود.
 3. متناوب: در مواردی که عفونت خارج عروقی² باشد، مانند آبسه، زخم، پنومونی، مننژیت، استئومیلیت، UTI، آرتريت عفونی و عفونت‌های مجاری صفراوی دیده می‌شود. در بیشتر موارد باکتری از طریق سیستم لنفاوی و از موضع عفونی به جریان خون وارد می‌شود که معمولاً 45 دقیقه قبل از شروع تب است. همچنین، در بیش از 25 درصد موارد منشأ عفونت مشخص نیست.
- عامل ایجادکننده باکتری‌می اکثراً یک ارگانیزم است، ولی در 3-5 درصد موارد ممکن است چند میکروب عامل آن باشد؛ به‌ویژه در معتادان تزریقی، افراد دچار سوختگی وسیع و عفونت‌های با منشأ دستگاه گوارش (جدول‌های 1-5 و 2-5).
- در بهترین شرایط به‌طور معمول حدود 3 درصد کشت‌های خون دچار آلودگی می‌شوند که مهم‌ترین عوامل آن استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی (شایع‌ترین)، کُربنه باکتریوم‌ها، میکروکوک‌ها، باسیلوس‌های غیرگونه آنتراکس و *Propionibacterium* است. این باکتری‌ها فلور پوست هستند.
- جداسازی *Clostridium perfringens* به احتمال 77 درصد نشانه آلودگی است، ولی درباره سایر کلستریدیوم‌ها به احتمال 80 درصد عفونت واقعی رخ داده است. باید توجه داشت که اگر میزان آلودگی کشت خون را 3 درصد در نظر بگیریم، احتمال جداشدن دو آلوده‌کننده یکسان و شایع از دو شیشه کشت خون برابر

1. Intravascular
2. Extravascular

فصل پنجم

کشت خون، کاتترهای خونی و فرآورده‌های بانک خون

بخش اول

کلیات

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

- ؛ نوع باکتری‌می و ارگانیزم عامل؛
- ؛ روش نمونه‌گیری؛
- ؛ حجم خون گرفته شده؛
- ؛ تعداد و دفعات خون‌گیری و زمان آن؛
- ؛ روش کشت و امکانات آزمایشگاهی.

باکتری‌می به سه گروه تقسیم می‌شود:

1. گذرا (Transient)،
2. پیوسته (Continuous)،
3. متناوب (Intermittent).

0/03×0/03=0/0009 یا به عبارتی کمتر از 1 در 1000 خواهد بود. به این دلیل، تعداد کشت خون در رد آلودگی یا تعیین یک عفونت غیرمعمول با آلوده‌کننده‌ها، در کنار علائم بالینی بسیار بااهمیت است.

جدول 1-5: Bacteria Commonly Isolated from Blood Cultures

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

منبع: 1

جدول 2-5: Agents of Infective Endocarditis

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

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

منبع: 3

مواد ضدعفونی کننده برای نمونه‌گیری

1. بتادین 10 درصد Povidone - Iodine.
 2. محلول الکلی 2 درصد کلرهگزیدین (Chlorhexidine).
- در حال حاضر، کلرهگزیدین بهترین ماده ضدعفونی کننده توصیه شده است. به ویژه در نمونه‌گیری از کاتترها، این ماده در بخش‌های کودکان نتایج بهتری دارد (آلودگی کمتر) و عوارض پوستی که در کودکان با مصرف ترکیبات یددار ایجاد می‌شود در مصرف کلرهگزیدین کمتر است.

نمونه‌گیری با Povidone - Iodine 10%

1. ورید موردنظر را انتخاب کنید.
2. در ابتدا پوست ناحیه را با الکل 70 درصد با حرکت محکم دورانی از داخل به خارج به قطر تقریبی 5cm ضدعفونی کنید.
3. پس از خشک شدن الکل همین کار را با بتادین (10 درصد Povidone-Iodine) تکرار و حداقل یک دقیقه (ترجیحاً 2-1/5 دقیقه) صبر کنید تا محل ضدعفونی شود. برای جلوگیری از آلودگی رعایت زمان توصیه شده بسیار اهمیت دارد.
4. در صورت لزوم به لمس مجدد ورید باید نوک انگشت درحالی که با دستکش پوشیده شده است با بتادین ضدعفونی شود.
5. پس از نمونه‌گیری، خون را مستقیماً و بدون تعویض سوزن به درون شیشه کشت خون که درپوش لاستیکی آن قبلاً با الکل 70 درصد ضدعفونی و خشک شده است، تلقیح کنید و شیشه را با ملایمت تکان دهید تا خون با ماده ضدانعقاد (SPS)¹ مخلوط شود.

1. Sodium Polyanethol Sulfonate

در گذشته روش استفاده از دو سوزن، یعنی تعویض سوزن اول پس از خروج از رگ و جایگزینی با سوزن استریل نو، توصیه می‌شد. اما در حال حاضر، با توجه به احتمال خطر این کار برای کارکنان این روش توصیه نمی‌شود. باید توجه داشت که احتمال آلودگی کشت‌های خون در روش دو سوزن حدود 2 درصد و در روش یک سوزن حدود 3/7 درصد است.

6. محل نمونه‌گیری را مجدداً با الکل 70 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 باکتری می‌احتمالی، سن و مصرف قبلی آنتی‌بیوتیک متفاوت است. به‌طور کل، تعداد باکتری در مراحل حاد عفونت، در زمان تب و در کودکان بالاتر است. در صورتی که حجم مناسبی از خون به درون محیط کشت تلقیح شود، بسته به تعداد نمونه گرفته شده:

- ؛ در باکتری می‌متناوب (Intermittent): با یک کشت خون 80 درصد و با سه کشت خون 99 درصد عامل مشخص می‌شود.
- ؛ در موارد غیراندوکاردیت کشت خون اول 92-82 درصد، کشت خون دوم 99-90 درصد و در کشت خون سوم 99/6 درصد عامل مشخص می‌شود.
- ؛ در موارد اندوکاردیت با یک نمونه خون 90 درصد و با دو نمونه خون 95 درصد عامل مشخص می‌شود. در کسانی که آنتی‌بیوتیک دریافت کرده‌اند بیش از 3 کشت خون نیاز است.

تعداد و زمان خون‌گیری

1. تب حاد: قبل از شروع درمان، 2 نمونه از رگ در 10 دقیقه گرفته شود.

2. بیماری غیرحاد: قبل از شروع درمان، 3-2 نمونه از رگ‌های جداگانه طی 24 ساعت گرفته شود. فاصله بین نمونه‌ها نباید کمتر از 3 ساعت باشد.
3. اندوکاردیت حاد: قبل از شروع درمان، 3 نمونه از رگ جداگانه در مدت 2-1 ساعت گرفته شود.
4. اندوکاردیت تحت حاد: 3 نمونه از رگ با فاصله زمانی حداقل یک ساعت طی 24 ساعت گرفته شود. اگر کشت بعد از 24 ساعت منفی بود، 3-2 نمونه دیگر با همین روش گرفته شود.
5. اندوکاردیت تحت درمان: 2 نمونه در روز اول و 3 نمونه در سه روز متوالی گرفته شود.
6. غیراندوکاردیت تحت درمان: 6 نمونه در 48 ساعت باید گرفته شود. نمونه‌گیری باید قبل از شروع دژ بعدی آنتی‌بیوتیک انجام شود.
- در موارد 5 و 6 استفاده از محیط‌های تجاری حاوی Resin ارجحیت دارد، به‌ویژه برای گرم مثبت‌ها.
7. تب با منشأ ناشناخته (FUO): 3-2 نمونه از قسمت‌های مختلف با فاصله زمانی حداقل یک ساعت و طی 24 ساعت گرفته شود. در صورت منفی بودن کشت در مدت 48-24 ساعت، 3-2 نمونه دیگر گرفته خواهد شد.

حجم نمونه

- در افراد بزرگسال در هر نوبت حداقل 10 سی‌سی خون گرفته شود. باید توجه داشت به‌ازای هر 1 سی‌سی خون احتمال جداسازی 3/2 درصد زیاد می‌شود.
- در کودکان کمتر از 10 سال تقریباً به‌ازای هر سال حداقل 1 سی‌سی توصیه می‌شود، هر چند اخیراً به معیار وزنی توجه شده است (جدول 3-5).

جدول 3-5: Pediatric bacterial blood cultures: recommended blood volume

Patient	Recommended blood	Total blood	Vol of blood equal to 1%
---------	-------------------	-------------	--------------------------

Wt (lb)	vol/culture (ml)	Vol for 2 Cultures(ml)	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: 2

انتقال

در مدت 2-4 ساعت در حرارت RT¹ ارسال شود. نمونه را نباید در یخچال گذاشت.

کشت

با توجه به تعداد کم عفونت‌های بی‌هوایی این کشت به‌طور معمول نباید انجام شود و در صورت درخواست باید از محیط‌های مخصوص کشت بی‌هوایی استفاده کرد. برای کشت مایکوباکتریوم‌ها به محیط کشت مایع Middlebrook 7H9 و محیط‌های دوفازی اختصاصی نیاز است.

روش‌های کشت به دو دسته تقسیم می‌شوند:

1. متعارف (Conventional).

2. خودکار (Automated).

؛ در نوع مرسوم و متعارف در شیشه کشت خون اغلب از محیط‌های کشت مایع TSB² و BHI³ استفاده می‌شود.

؛ در نوع دوفازی Biphasic یا Castaneda از فرم آگار محیط‌های فوق برای فاز جامد استفاده می‌شود. محیط‌های دوفازی بهترین محیط برای جداسازی بروسلا و قارچ‌ها هستند.

برای جلوگیری از انعقاد خون و ایجاد لخته که احتمال جداسازی را کم می‌کند، باید SPS با غلظت 0/025-0/05 درصد به محیط اضافه‌شود که علاوه بر خاصیت ضدانعقادی

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

با عمل ضدکمپلمان و ضدفاگوسیتوز به رشد باکتری‌ها کمک می‌کند. SPS بهترین ضدانعقاد موجود است و نباید از سدیم سیترات که باعث مهار رشد تعدادی از گرم مثبت‌ها می‌شود یا EDTA و هپارین استفاده کرد. در موارد نمونه‌گیری از سوندهایی که از مجرای آن ماده تزریقی حاوی هپارین عبور می‌کند، باید قبل از نمونه‌گیری جریان هپارین قطع شود و سرنگ اول نمونه دور ریخته و از سرنگ دوم استفاده شود.

نسبت خون به محیط کشت

بهترین نسبت توصیه‌شده 5:1 است. با توجه به حداقل نمونه در بزرگسالان که 10 سی‌سی است، نباید از محیط‌های کشت که کمتر از 40 سی‌سی محیط مایع دارند در این موارد استفاده کرد.

اتمسفر

پس از دریافت شیشه کشت خون، توصیه می‌شود که با یک سرسوزن استریل در کنار شعله در زیر هود، پس از ضدعفونی با الکل و خشک شدن درپوش لاستیکی، یک مجرای تبادل هوای موقتی (Vent) ایجاد شود تا خلاء موجود در شیشه کشت خون جبران یا فشار هوای اضافی درون آن خارج شود و شرایط مناسب برای رشد ارگانیسم‌هایی که به شرایط هوایی نیاز دارند، مانند سودوموناس، مخمرها و N. meningitidis ایجاد شود. پس از چند ثانیه سرسوزن را از درپوش لاستیکی خارج می‌کنیم.

انکوباسیون

؛ در 35°C و حداقل به مدت یک هفته؛

؛ در موارد شک به اندوکاردیت حداقل به مدت دو هفته و قارچ‌ها بیش از دو هفته؛

؛ در موارد شک به بروسلا به مدت 4-6 هفته؛

؛ ترجیحاً در 24 ساعت اول شیشه‌های کشت خون چندبار تکان داده شوند.

پس از 6-18 ساعت اولین کشت از محیط کشت خون (حدود 0/25 سی‌سی)

روی محیط chocolate blood agar انجام می‌شود. محیط را در CO₂ گذاشته و برای مدت

3-5 روز از نظر رشد بررسی می‌شود. می‌توان در زمان کشت یک قطره از محیط را روی لام نو قرارداد و پس از خشک‌شدن در زیر هود و کنار شعله با متانول فیکس کرد و با رنگ گرم یا متیلن بلو رنگ‌آمیزی نمود. در صورت مثبت بودن و رد احتمال آلودگی لام، نتیجه تلفنی به پزشک اطلاع داده‌شود.

— نوبت دوم کشت (Subculture) بین 48-72 ساعت بسته به شرایط بیمار توصیه می‌شود.
— کشت پس از 7 روز در بعضی از منابع توصیه نمی‌شود، ولی انجام دادن آن ارجح است و احتمال جداسازی باکتری‌های دیررشد، سخت‌رشد و قارچ‌ها را زیاد می‌کند.

طی مدت 7 روز و پس از آن شیشه‌های کشت خون باید به صورت ماکروسکوپی از نظر علائم رشد شامل کدورت، لیز شدن، ایجاد گاز و ایجاد کلنی‌های باکتری (اغلب در گرم مثبت‌ها) بررسی شود. در میان این موارد، کدورت قابل اعتمادترین مشخصه است و سایر موارد مانند لیز شدن به علت سرعت تخلیه خون از سوزن یا ایجاد گاز در شیشه‌های vent نشده که ممکن است به فشار اولیه محیط مربوط باشد، چندان قابل اعتماد نیست. همچنین تعدادی از ارگانیسیم‌ها مانند *N.meningitidis* و هموفیلوس معمولاً کدورت ایجاد نمی‌کنند.

— در موارد شک به گرم منفی‌های روده‌ای یا غیر تخمیرکننده‌ها مانند سودوموناس می‌توان برای subculture از محیط مکانکی در کنار محیط شکلات استفاده کرد.

— در زمان استفاده از محیط‌های دوفازی باید در روز اول 2 بار و در روزهای بعد با فواصل 1-3 روز به آرامی با کچ کردن بطری برای چند لحظه، فاز مایع را با تمام سطح جامد تماس داد و پس از 24-72 ساعت، سطح محیط جامد را از نظر وجود کلنی بررسی کرد. با این عمل subculture در خود محیط انجام می‌شود.

روش (ISOLATOR) Lysis - Centrifugation

در این روش، خون گرفته شده از بیمار در مجاورت Saponin و ... لیز می‌شود و پس از سانتریفوژ شدن به مدت 30 دقیقه در 3000g، و دورریختن مایع سطحی، رسوب به طور مستقیم روی محیط‌های کشت جامد تلقیح می‌شود که بسته به ارگانیسیم مشکوک متفاوت است. این روش برای جداسازی سریع و کلنی کانت مناسب است. همچنین، برای جداسازی ارگانیسیم‌های داخل سلولی مانند بروسلا و قارچ‌ها، مایکوباکتریوم‌ها و عفونت‌های چندمیکروبی بسیار مناسب است. از موارد مهم استفاده این روش کلنی کانت نمونه‌های خون گرفته شده از کاتتر و ورید است که در قسمت بعد توضیح داده می‌شود. این سیستم تجاری است.

سیستم‌های خودکار

در صورت امکان تهیه و بودجه مناسب، فقط نسل جدید این سیستم‌ها توصیه می‌شود که به طور پیوسته شیشه‌های کشت خون را از نظر رشد بررسی می‌کنند (در بخش کاتترها توضیح داده خواهد شد).

بسته به نوع سیستم برای سنجش از روش‌های سنجش کلریمتریک و فلورسنت بر مبنای تشخیص CO₂ غیررادیواکتیو استفاده می‌شود و در انواع هوازی، بی‌هوازی، مایکوباکتریوم‌ها و برای رشد قارچ وجود دارد. معروفترین این سیستم‌ها عبارت‌اند از:

1. Bactec System (Becton Dickinson)
2. Bact / Alert (bio Merieux)

خوانندگان می‌توانند برای اطلاعات کامل‌تر به منابع 2، 3 و 4 مراجعه نمایند.

گزارش و تفسیر

1. گزارش شفاهی (Verbal Report): هر زمان که کشت خون مثبت شد، نتیجه باید تلفنی به پزشک اعلام شود. باید توجه داشت میزان مرگ‌ومیر موارد سپتی سمی حاد که به Septic Shock منجر می‌شود، 40-20 درصد است.
2. 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

3. در موارد کشت خون مثبت زمان جداشدن قید شود، به خصوص کشت‌های مثبت با استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی؛ زیرا سرعت جداسازی علاوه بر 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 توجه داشت که در حال حاضر استاف‌های کوآگولاز منفی شایع‌ترین باکتری‌های جدا شده از کشت‌های خون و در عین حال شایع‌ترین آلوده‌کننده‌های کشت خون هستند.
4. در شرایط استاندارد و استفاده از نمونه‌گیرهای ورزیده در حدود 3 درصد کل کشت‌های خون گرفته شده از بیماران آلوده می‌شوند (3 مورد آلودگی در هر 100 شیشه کشت خون گرفته شده است). همچنین، حدود نصف کل کشت‌های خون که مثبت شده‌اند، به علت آلودگی است.
5. در مواردی که فقط یک بار کشت خون انجام شود یا در یک نوبت کشت از چند نوبت کشت خون انجام شده آلوده‌کننده‌های شایع جدا شود، احتمال آلودگی

- زیاد است و پس از گزارش باکتری جمله **A Probable Contaminant** قید می‌شود. در این موارد به آزمایش تعیین حساسیت میکروبی نیاز نیست، مگر به درخواست پزشک.
6. دو کشت خون مثبت در طول 48 ساعت با استریپتوکوک گروه ویریدانس با ارزش است.
 7. درباره استاف‌های کوآگولاز منفی، با توجه به وضعیت بالینی بیمار، گاهی برای تأیید عفونت واقعی به 4-3 کشت خون مثبت نیاز است.
- منابع بخش اول: 2، 3، 4، 5، 11، 12، 13، 20 و 21.

بخش دوم

کاتترهای عروقی و عفونت‌های بیمارستانی

- حدود 15 درصد عفونت‌های بیمارستانی را عفونت‌های خونی بیمارستانی (NBI)¹ تشکیل می‌دهند. حدود 1 درصد تمام افراد بستری در بیمارستان به این نوع عفونت مبتلا می‌شوند. میزان این عفونت‌ها 200,000-250,000 مورد در سال گزارش شده است (15 و 18).
- NBI حدود 40 درصد کل موارد باکتری می‌ها را تشکیل می‌دهند که 90-50 درصد آنها در ارتباط با Intravascular Devices هستند (1، 6، 7، 8، 16 و 24). در دهه 1980 تعداد عفونت‌های خونی بیمارستانی چند برابر شده که علت آن استفاده بیشتر از کاتترها است. میزان مرگ‌ومیر NBI 25-10 درصد گزارش شده است (1، 6، 10، 16 و 24).

سالانه در ایالات متحده بین 200-150 میلیون Intravascular Device استفاده می‌شود که 5-7 میلیون آن از نوع CVC¹ است. نوع nontunneled CVC مهم‌ترین عامل ایجاد عفونت‌های خونی وابسته به کاتتر است (7، 14، 15 و 18).

باتوجه به احتمال مرگ‌ومیر بسیار، عفونت‌های خونی مهم‌ترین عفونت بیمارستانی محسوب می‌شوند (9) و از نظر شیوع پس از سوندهای ادراری و عفونت‌های ناشی از Ventilator، مقام سوم را در میان عفونت‌های در ارتباط با Devices دارند (6). خوشبختانه در آخرین مطالعه انجام‌شده و با توجه به رعایت بسیاری از توصیه‌ها، شیوع عفونت‌های وابسته به کاتتر در یک مطالعه 4 ساله کاهش یافته‌است (6).

تشخیص عفونت‌های خونی وابسته به کاتتر مشکل است (24). وجود تب از حساسیت بالا، ولی ویژگی کم برخوردار است (1). باوجودی که تب اولین علامت است، ولی مشخص شده‌است که در بیش از 80 درصد افرادی که پس از نصب CVC دچار تب می‌شوند، علت تب عفونت خونی نیست (1 و 24). در 75-85 درصد مواردی که کاتتر خارج‌شده، این کار غیرضروری بوده‌است (1 و 24) و فقط در 15-25 درصد مواردی که CVC برداشته‌شده، عامل عفونت کاتتر بوده‌است (19 و 23). باید توجه داشت که کاتترهای نوع محیطی Peripheral کمتر عفونت ایجاد می‌کنند. در جدول‌های 4-5 و 5-5 انواع IVD² و در جدول 5-6 عفونت‌های در ارتباط با انواع IVD توضیح داده شده‌است.

1. Central Venous Catheter
2. Intra Vascular Device

جدول 4-5: 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: 15

جدول 5-6: 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 ($\geq 10^2$ 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 $\geq 5:1$ (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: 18

جدول 5-5: 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 jugular 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 basilic 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: 18

CDC عفونت‌های خونی بیمارستانی را به دو گروه تقسیم می‌کند:

1. عفونت‌هایی که با روش‌های میکروبی شناسی تأیید شده‌اند؛
2. عفونت‌هایی که تأیید میکروبی شناسی ندارند و به‌عنوان Clinical Sepsis تقسیم می‌شوند (8).

ایجاد عفونت‌های وابسته به کاتتر به سه عامل بستگی دارد:

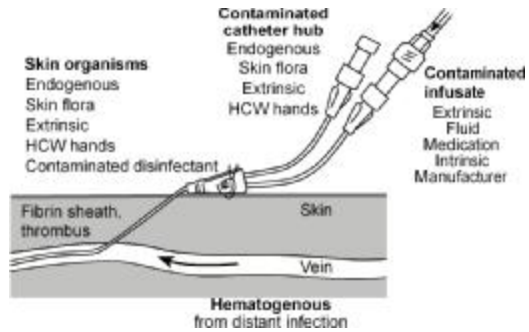
1. وابسته به بیمار،
2. وابسته به کاتتر،
3. وابسته به بیمارستان.

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

پس از نصب کاتتر، پلاکت‌ها، فیبرینوژن، فیبرونکتین و لامینین به سطح کاتتر می‌چسبند و Film ایجاد می‌کنند و ارگانیزم‌های متعددی از طریق اتصال به این مواد تولید بیوفیلم (Biofilm) و کلنیزاسیون می‌کنند. ایجاد بیوفیلم باعث می‌شود که ارگانیزم در مقابل مواد ضد میکروبی حفاظت شود. بیوفیلم معمولاً طی 3 روز از زمان نصب کاتتر تولید می‌شود و برای همین در CVC که زمان بیشتری در عروق می‌ماند، بیشتر مطرح است. انواع کاتترهای محیطی طبق توصیه CDC هر 72-96 ساعت تعویض می‌شوند که این کار در مورد CVC عملی نیست (1 و 17). در انواع CVC که برای مدت 8-10 روز (short-term) نصب شده باشند، بیشتر سطح خارجی کاتتر از طریق پوست کلنیزه می‌شود و در مواردی که زمان سوندگذاری 10-30 روز است (long-term)، کلنیزه شدن در مجرای ورودی (Hub) و سطح داخلی کاتتر (Intraluminal) دیده می‌شود. جنس کاتتر مهم است. به‌عنوان مثال استافیلوکوک‌ها و کاندیداها به چسبیدن به کاتترهای از جنس Polyvinyl Chloride تمایل بیشتری دارند تا جنس Teflon.

اخیراً سعی می‌شود که کاتترهایی از جنس Antithrombogenic Polyurethane تولید شود (10 و 15). همچنین، سوندهایی تولید شده‌اند که سطح آنها با مواد ضد میکروبی مانند Silver-Sulfadiazine یا Minocycline یا Cholerhexidine آغشته شده است (14).

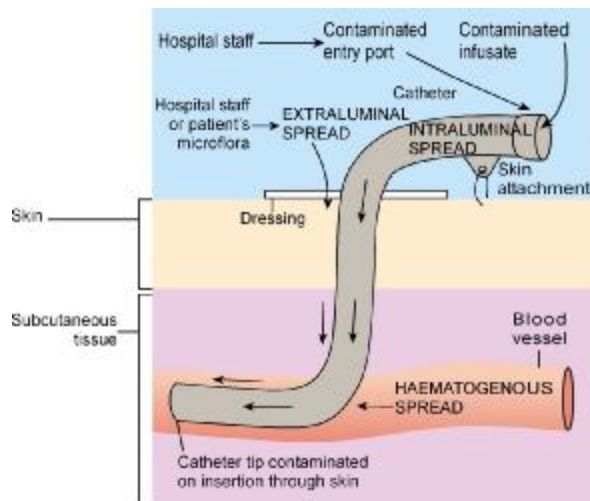
مسیرهای ورود ارگانیزم در شکل‌های 1-5، 2-5 و 3-5 نشان داده شده است، پوست و Hub مهم‌ترین مسیر و پس از آن مسیر خونی است (1).



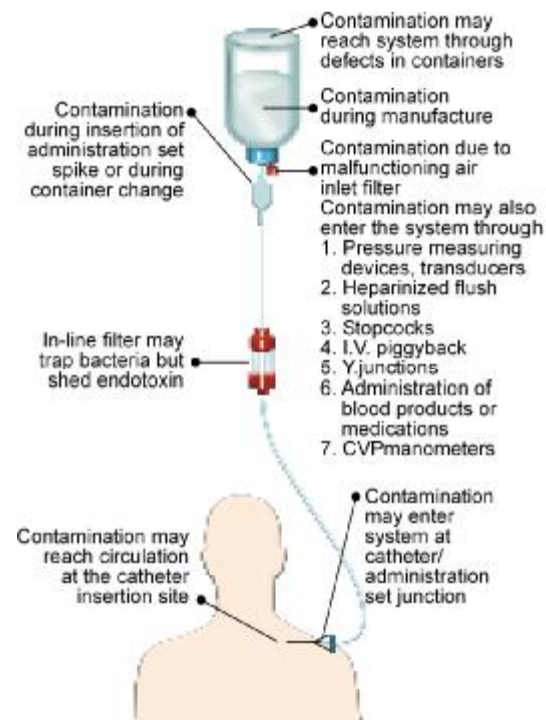
شکل 5-1:

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: 16



شکل 2-5



شکل 3-5: Points of access for microbial contamination in infusion therapy

منبع: 1

آلودگی از طریق مواد تزریقی (Infusate)

شروع علائم این آلودگی معمولاً سریع و حاد است (18). غالب ارگانسیم‌های درگیر گرم منفی‌ها هستند، مانند *Entrobacter agglomerans*، *Serratia* spp.، *Pseudomonas aeruginosa*، *Flavobacterium* spp.، *Acinetobacter* spp.، *Citrobacter freundii*

از طریق آب مقطر نیز آلودگی ایجادکنند. *Pseudomonas fluorescens*، *Burkholderia cepacia* که در دو مورد B.c و P.a می‌توانند

در نوزادانی که از محلول‌های حاوی Lipid استفاده می‌کنند، قارچ چربی دوست *Malassezia furfur* یا استاف کوagulاز منفی می‌تواند عامل باشد (1 و 18).

— آلودگی از طریق Catheter Hub and lumen:

$\frac{2}{3}$ موارد آلودگی در افرادی که برای مدت طولانی کاتتر دارند از این طریق است.

— آلودگی از طریق پوست در محل ورود کاتتر:

در افرادی که برای کوتاه مدت (کمتر از 10 روز) سوند دارند، این راه مهم‌ترین مسیر است (1، 17 و 18).

میکروبی شناسی

در بیماران دارای کاتترهای خونی در طول دو دهه گذشته استافیلوکوک‌های کوagulاز منفی مهم‌ترین عامل بوده‌اند. به‌خصوص در بیماران با مشکلات سیستم ایمنی و در افرادی که سوندهای طولانی مدت داشته‌اند (جدول 5-7).

جدول 5-7: 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 pneumoniae	4	3
Candida spp.	8	8

منبع: 15

با توجه به جدول مزبور، عامل $\frac{2}{3}$ عفونت‌ها/استافیلوکوک‌ها هستند که مهم‌ترین علت آن در توان ذاتی این باکتری در چسبیدن به سطح کاتترهاست (1). میزان مرگ در عفونت‌های وابسته به کاتترها 14-19 درصد است (18) و *استافیلوکوک اورئوس* با $\frac{8}{9}$ درصد مهم‌ترین عامل در میان سایر عوامل است. بیش از 50 درصد *استافیلوکوک اورئوس*‌های جداشده از کاتترها مقاوم به oxacillin هستند (MRSA). این باکتری‌ها از طریق fibrinogen, fibronectin و laminin به سطح کاتترها می‌چسبند (1، 17 و 18). در مقابل *استافیلوکوکس کوآگولاز منفی* که شایع‌ترین عامل جداشده از کاتترها هستند، کمترین مرگ را ایجاد می‌کنند (0/7 درصد). این باکتری از طریق Fibronectin به کاتتر متصل می‌شود. همچنین، توانایی تولید پلی‌ساکارید خارج سلولی به نام Slime را دارد که در چسبندگی و مقاومت نسبت به سیستم دفاعی و داروهای ضد میکروبی نقش مهمی را ایفا می‌کند (9، 17 و 18). سایر عواملی که در جدول 5-7 ذکر نشده‌اند:

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

؛ باسیلوس و استرپتوکوک‌های غیرهمولیتیک و همولیتیک،

؛ قارچ‌ها شامل کاندیدا، اسپرژیلوس، فوزاریوم، *M.furfur* (9 و 12). بعضی از کاندیداها در حضور محلول‌های حاوی گلوکز موادی مشابه Slime تولید می‌کنند که در مقاومت آنها نسبت به درمان مؤثر است. مانند *C.tropicalis* و *C.albicans* که در افراد تحت درمان مایعات TPN¹ عفونت ایجاد می‌کنند (1، 9، 12 و 15).

؛ درباره کاندیداها مقاومت دارویی در حال افزایش است، به‌خصوص نسبت به داروی Fluconazole.

48 درصد کاندیداهاى 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* (12 و 26).

روش‌های تشخیص

در 30 سال گذشته بیش از 16 روش مختلف برای تشخیص عفونت‌های وابسته به کاتتر استفاده شده است (24) که تعدادی از آنها قابل اجرا در شرایط معمول در آزمایشگاه نیست و برای هر کدام باید به امکانات موجود و ارزش تشخیصی توجه کرد. در بیشتر منابع نتایج بسیار متغیر و در مجموع چند روش پیشنهاد شده است:

1. کشت کیفی از خون و کاتتر،
2. کشت نیمه‌کمی از نوک کاتتر،
3. کشت کمی از نوک کاتتر،
4. کشت‌های کمی و زمانی از خون و کاتتر.

1. کشت کیفی¹ از خون و کاتتر

در این روش، کشت از خون ورید و Hub کاتتر انجام می‌شود. پاسخ‌های مثبت در این روش به‌ویژه نمونه گرفته شده از Hub همیشه دلیل عفونت نیست. پاسخ‌های منفی این روش با ارزش‌تر است (1 و 22). یک مورد کشت خون مثبت از سوند با یک ارگانسم پوستی نمی‌تواند نشان‌دهنده یک عفونت واقعی باشد و ممکن است نشان‌دهنده کلنیزه شدن باشد.

برای افزایش دقت، باید در هنگام نمونه‌گیری از Hub، در ابتدا محل ضد عفونی شود و با یک سرنگ مقداری از خون (تا حداکثر 10 سی‌سی) کشیده و دور ریخته شود و با سرنگ دوم نمونه برای کشت تهیه شود.

برای تشخیص صحیح در کشت کیفی علاوه بر علائم بالینی باید به این موارد توجه کرد:

1. یک ارگانیزم در چند نوبت از کشت خون جدا شود.
2. زمان مثبت شدن کشت خون 24-48 ساعت باشد (نشانه زیادتر بودن باکتری) (1 و 22).
2. کشت نیمه کمی¹ از نوک کاتتر

کشت نوک کاتتر (tip) یا Roll - Plate: بیشترین روشی است که استفاده می‌شود (1 و 18) و با توجه به امکانات موجود در ایران در زمان حال، عملی‌ترین روش است. این روش اولین بار در سال 1977 ابداع شد (27) و درباره ارزش آن اختلاف نظر زیادی هست. حساسیت آن تا 85 درصد گزارش شده است، ولی ویژگی آن کم است. در این روش نوک (tip) سوند روی محیط غلظانده می‌شود. باید توجه داشت در مواردی که کلنی‌زاسیون در سطح خارجی سوند باشد، مانند سوندهای کمتر از 10 روز که منشأ آلودگی از سطح پوست است، این روش ارزش بیشتری دارد. همچنین، محدوده با ارزش cut off $\geq 15\text{CFU}/\text{tip}$ درباره استافیلوکوک‌ها با ارزش‌تر است تا مواردی که عفونت با گرم منفی‌ها، قارچ‌ها و استرپتوکوک گروه A ایجاد شده باشد که ممکن است در آن تعداد کمتر از $15\text{CFU}/\text{tip}$ باشد در حالی که بیمار واقعاً دچار عفونت است (18 و 26). در بعضی مطالعات برای بالابردن حساسیت محدوده با ارزش $5\text{CFU}/\text{tip}$ در نظر گرفته شده است، ولی در این حالت ویژگی روش کاهش می‌یابد.

حساسیت تشخیصی (Diagnostic Sensitivity) که در این روش در مقالات مختلف متغیر 86 درصد (14)، 20 درصد (23) و 60 درصد (18) است.

ویژگی تشخیصی (Diagnostic Specificity) 76 درصد (1) و ارزش اخباری مثبت (PPV)¹ در جهت ثابت کردن عفونت 33 درصد (14) و 16-31 درصد (1) است. کشت خون هم‌زمان از رگ جداگانه برای مقایسه توصیه می‌شود.

روش:

1. محل ورود سوند به پوست را با الکل ضد عفونی و پس از خشک شدن سوند را خارج می‌کنیم.
2. 4-5cm آخر سوند کوتاه یا بلند را با قیچی استریل جدا می‌کنیم و در لوله استریل قرار می‌دهیم و در زمانی کمتر از 15 دقیقه و قبل از خشک شدن به آزمایشگاه می‌رسانیم. سوند نباید در سالیان یا محیط ترانسپورت قرار گرفته باشد. در سوندهای بلند در صورت نیاز پزشک می‌توان سوند نزدیک به پوست را نیز به‌طور جداگانه کشت داد.
3. در صورت رعایت نکردن زمان، می‌توان نمونه را تا 2 ساعت در یخچال 4°C نگهداری کرد.
4. نوک سوند را به وسیله پنس استریل (forceps) چندبار روی یک محیط بلاد آگار یا شکلات آگار با حرکت رفت و برگشت و غلظشی حرکت می‌دهیم (شکل 4-5).
5. اندازه کوتاه‌تر یا بلندتر از 4-5cm در نتیجه آزمایش تأثیر می‌گذارد و عدد ≥ 15 برای این اندازه استاندارد شده است.
6. محیط را در انکوباتور 35°C و در جو CO_2 برای مدت 72-96 ساعت انکوبه و روزانه بررسی می‌کنیم. در صورت مثبت شدن و وجود چند نوع کلنی، هریک را جداگانه می‌شماریم و گزارش می‌دهیم (2 و 9).
7. نیاز به تعیین حساسیت میکروبی نیست، مگر به درخواست پزشک یا مثبت شدن هم‌زمان کشت خون با همان باکتری.



شکل 4-5

3. کشت کمی از نوک کاتتر

این روش در بین سه روش توضیح داده‌شده دقیق‌ترین است (24)، ولی انجام آن مشکل‌تر از سایر روش‌هاست. در این روش از محیط مایع استفاده می‌شود و بسته به روش آزمایش محدوده قضاوت تعداد کلنی با ارزش 10^2 CFU/ tip یا 10^3 CFU/ tip \geq است. در این روش بهتر است از Vortex یا Sonication استفاده شود ($\geq 10^2$). حساسیت و ویژگی بالاتر از 90 درصد، ارزش اخباری مثبت (PPV) 73 درصد و ارزش اخباری منفی (NPV) 98^1 درصد است (1، 17، 18، 23 و 24).

با یک پنس استریل، نوک کاتتر را در یک لوله استریل در پیچ‌دار قرار می‌دهیم 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 عبور می‌دهیم (pumping) یا از Sonication یا Vortex برای بهبود جداسازی استفاده می‌کنیم. مایع را که حاوی ارگانیزم‌های سطح داخل و خارج شوند است به روش کمی کشت می‌دهیم (2 و 5).

در روش‌های بعدی که توضیح داده می‌شوند به خارج کردن کاتتر نیاز نیست (10، 18، 19 و 23).

4-1. کشت از نمونه خون گرفته‌شده از کاتتر و خون ورید محیطی و مقایسه زمان مثبت شدن

این روش به دستگاه‌های کشت خون خودکار از نسل جدید نیاز دارد که پیوسته شیشه‌های کشت خون را از نظر رشد بررسی می‌کنند، مانند سیستم‌های Bactec و Bact/Alert. بدیهی است هرچه تعداد باکتری تلقیح شده بیشتر باشد، کشت سریع‌تر مثبت می‌شود و بارزش‌تر است. زمان قضاوت در اینجا 120 دقیقه در نظر گرفته می‌شود.

1. Negative Predictive Value

به عبارتی، اگر کشت خون از کاتتر 2 ساعت زودتر از نمونه خون گرفته شده از خون محیطی مثبت شود، با ارزش است.

$$\text{حساسیت} = 91(18) \text{ درصد یا } 96/4(23) \text{ درصد}$$

$$\text{ویژگی} = 94(18) \text{ درصد یا } 100(23) \text{ درصد}$$

این روش می‌تواند برای مراکز درمانی بزرگ با تعداد کشت خون بالا در ایران روش بسیار مناسبی باشد. در صورت امکان تهیه سیستم‌های فوق، با توجه به نیاز داشتن به خروج سوند از بدن، سهولت و سرعت توصیه می‌شود.

2-4 کشت کمی خون گرفته شده از کاتتر و خون ورید محیطی

در این روش باید از سیستم lysis centrifugation استفاده کرد و نمونه پس از آماده سازی مستقیم روی محیط جامد در پلیت تلقیح شود و پس از زمان 24-72 ساعت تعداد کلنی شمارش شود.

مواردی که نسبت تعداد باکتری در خون گرفته شده از سوند به خون گرفته شده از ورید 5:1 تا 10:1 باشد (=1 ورید و =10 سوند) منشأ عفونت، سوند خونی است و مشخص کننده سپتی سمی وابسته به کاتتر است (1، 7، 10، 18 و 23).

NPV برابر 99 درصد است و در صورت منفی شدن، عفونت خون رد می‌شود. PPV 63-73 درصد گزارش شده است. کشت خون مثبت باید با بالین بیمار مقایسه شود.

در مواردی که کشت خون از کاترهای نوع Tunneld انجام شود، به کشت خون از ورید نیاز نیست و تعداد $\geq 10^2$ نشانه عفونت وابسته به سوند است.

سواب و رنگ آمیزی گرم

در مواردی که به عفونت در محل ورود سوند مشکوک شویم، این روش با ارزش است. همچنین، از رنگ آمیزی گرم و رنگ فلورسنت Acridine Orange

در روش Touch preparation از نوک سوند استفاده می‌شود که ارزش آن به ویژه درباره رنگ آمیزی گرم محدود است.

در صورت مثبت شدن کشت از محل ورود سوند، کشت خون همزمان برای تفسیر لازم است (9).

عامل عفونت در ماده تزریقی¹

نمونه در محیط کشت مایع تلقیح و به صورت هوازی و بی‌هوازی به مدت 10 روز در حرارت 30-32°C نگهداری می‌شود. همزمان کشت خون از ورید بیمار انجام می‌شود.

5. کشت فرآورده‌های بانک خون

آلودگی باکتریال فرآورده‌های خونی نادر، ولی با اهمیت است. در جدول 5-8 عوامل باکتریال نشان داده شده است.

جدول 5-8: Bacterial organisms implicated in transfusion reactions

Organism(s)
<i>Coagulase-negative Staphylococci</i>
<i>Enterobacter agglomerans</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Escherichia coli</i>
<i>Flavobacterium meningosepticum</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Propionibacterium acnes</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Pseudomonas cepacia</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Pseudomonas putida</i>
<i>Salmonella choleraesuis</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Yersinia enterocolitica</i>

منبع: 4

تعدادی از گرم منفی‌ها توانایی رشد و تکثیر در حرارت $0-6^{\circ}\text{C}$ را دارند، مانند *Enterobacter* spp.، *Pseudomonas putida*، *Pseudomonas fluorescens*، *Yersinia enterocolitica*. حتی تعداد کم این باکتری‌ها می‌توانند در فرآورده‌های خونی در مدت 2-3 هفته مقادیر زیادی اندوتوکسین تولیدکنند که به شوک‌های خطرناک پس از تزریق منجر می‌شود. گرم مثبت‌ها رشد ضعیفی در سرما دارند و از طریق محصولات نگهداری شده به مدت طولانی در سرما، به ندرت 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.

فرآورده پلاکت که در حرارت 22°C نگهداری می‌شود محیط مناسبی برای باکتری‌هایی چون *استافیلوکوک‌ها*، *دیفترئوئیدها*، *سودوموناس* و *Enterobacter cloacae* است و بیشتر عفونت‌ها در ارتباط با این باکتری‌ها، از طریق تزریق پلاکت است.

عفونت‌های پس از تزریق فرآورده‌های خونی ممکن است به علت تلقیح باکتری از پوست بیمار یا محیط در هنگام تزریق باشد. همچنین، آلودگی آب بن‌ماری¹ که برای ذوب محصولات خونی یخ‌زده (مانند FFP) استفاده می‌شود، یکی از منابع آلودگی است.

روش

برای تعیین عوامل آلودگی از شیشه‌های کشت خون استفاده می‌شود:

1. 20ml از خون کیسه یا فرآورده‌های خونی مشکوک را برمی‌داریم و در چهار شیشه کشت خون تلقیح می‌کنیم، 3-5ml برای هر بطری. حجم نهایی فرآورده تلقیح شده به محیط باید 1:10 باشد. بطری‌ها را در 35°C و حرارت اتاق 25°C قرار می‌دهیم (هوازی و بی‌هوازی).

2. 0/5-1ml از فرآورده را برای رنگ‌آمیزی گرم استفاده می‌کنیم و در صورت مثبت شدن 0/5 سی‌سی از فرآورده را مستقیماً روی محیط شکلات تلقیح می‌کنیم.

1. Water bath

3. تا یک هفته رشد شیشه‌های کشت خون را بررسی می‌کنیم. پس از 18 ساعت و 48 ساعت 0/2-0/5 سی‌سی از محیط مایع را روی محیط شکلات و مکانیکی ساب‌کالچر می‌دهیم و هم‌زمان رنگ گرم تهیه می‌کنیم. کشت‌ها را حداقل به مدت 48 ساعت (ترجیحاً 3-5 روز) در حرارت مناسب انکوبه می‌کنیم. در صورت منفی شدن نتایج کشت احتمال آلودگی فرآورده‌های خونی بسیار کم است و در صورت مثبت شدن برای تأیید، ارگانسیم باید به‌طور هم‌زمان از کشت خون وریدی بیمار نیز جدا شده‌باشد و به این دلیل، کشت هم‌زمان از بیمار ضروری است. در صورتی که بیمار کاتتر عروقی داشته‌باشد، کشت باید از کاتتر و سایر مایعات تزریقی نیز انجام‌شود تا بتوان منشأ واقعی عفونت را مشخص نمود.

References

- 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.

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 Drenfeld, 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 Andreumont: *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.

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.

ضد عفونی و تمیز کردن مرتب این سطوح جزء اصلی کنترل عفونت‌های بیمارستانی است. ولی این سطوح آلوده به طور مستقیم باعث انتقال عفونت نمی‌شوند و مهم‌ترین راه انتقال عفونت از سطوح محیطی به بیماران از طریق تماس دست آلوده با بیمار است. بنابراین، شستشوی مرتب و نظافت دست‌ها جزء اصول ابتدایی پیشگیری از عفونت‌های بیمارستانی است.

سطوح محیطی به 2 دسته تقسیم می‌شوند:

1. سطوح ساختمانی و مبلمان؛
2. سطوح وسایل پزشکی.

تعداد ارگانسیم‌های سطوح محیطی با عوامل زیر در ارتباط است:

1. تعداد افراد حاضر در محیط؛
 2. میزان فعالیت افراد؛
 3. میزان رطوبت؛
 4. وجود موادی که رشد میکروبی را تسهیل می‌کند؛
 5. تعداد ارگانسیم‌های موجود در هوا و میزان تهویه؛
 6. تعداد موارد تماس با سطوح؛
 7. نوع سطح و جهت آن (عمودی یا افقی):
- ؛ کوسکی‌های گرم مثبت مانند *استافیلوکوک‌ها* و *انتروکوک‌ها* نسبت به شرایط خشک مقاوم‌اند و در غبار روی سطوح تا مدت‌ها زنده می‌مانند و می‌توانند از راه قطرات کوچک در هوا (Droplet) نیز به بیمار منتقل شوند.
 - ؛ باکتری‌های گرم منفی در شرایط مرطوب و سطوح مرطوب بهتر باقی می‌مانند و از راه Droplet به ندرت منتقل می‌شوند.
 - ؛ قارچ‌ها در شرایط و سطوح مرطوب و الیاف رشته‌ای پایدار می‌مانند و تکثیر می‌شوند.

فصل ششم

ارزیابی میکروب‌شناسی و نمونه‌برداری از محیط‌های بیمارستانی و وسایل پزشکی

قبل از سال 1970، نمونه‌برداری دوره‌ای از سطوح در محیط‌های بیمارستانی مانند کف اتاق‌ها، دیوارها و سطوح میزها امری معمول بود. ولی در بررسی‌های انجام شده مشخص شد:

1. میزان بروز عفونت‌های بیمارستانی در ارتباط مستقیم با میزان آلودگی میکروبی سطوح محیطی نمی‌باشد.
 2. استانداردهای قابل اعتمادی برای ارزیابی و ارتباط نتایج کشت از سطوح محیطی و میزان بروز عفونت‌های بیمارستانی وجود ندارد.
 3. روش‌های نمونه‌برداری از سطوح محیطی بسیار زمان‌بر و پرهزینه است. به خصوص در آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی بالینی که روش‌های آن براساس شناخت ارگانسیم‌های موجود در نمونه‌های بالینی طراحی شده‌است و نه میکروب‌شناسی محیطی.
- از حدود 30 سال پیش بنا به توصیه CDC نمونه‌برداری و کشت دوره‌ای (روتین) از محیط‌های بیمارستانی کنار گذاشته شده‌است.

باید توجه داشت که سطوح و محیط‌های آلوده میکروبی در مراکز بهداشتی-درمانی و بیمارستانی به‌عنوان مخزن بالقوه عفونت‌های بیمارستانی اهمیت دارند. بنابراین،

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

در اتاق‌های عمل، بخش‌های سوختگی و نوزادان اهمیت ویژه‌ای دارد. این ارگانیزم‌ها می‌توانند از طریق قطرات تنفسی جداشده از ابتدای مجرای بینی افراد کلنیزه در محیط و روی سطوح پخش شوند و به این 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 به مدت 26-27 روز زنده می‌ماند.

انتروکوک‌ها**انتروکوک‌های مقاوم به وانکومايسين (VRE)²**

E. faecium شایع‌ترین گونه جداشده در میان انواع VRE از محیط‌های بیمارستانی است. بیماران کلنیزه مهم‌ترین مخزن بیماری محسوب می‌شوند. به‌ویژه بیماران با ضعف سیستم ایمنی مانند بیماران پیوندی، بیماران بستری در ICU، کسانی که سابقه بستری داشته‌اند و آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف به‌خصوص وانکومايسين دریافت کرده‌اند. این بیماران اگر دچار اسهال باشند، بیشتر محیط را آلوده می‌کنند. ممکن است تعداد زیادی از سطوح محیطی آلوده شوند، به‌خصوص سطوحی که بیشتر لمس می‌شوند، مانند میله تخت بیمار، دستگیره‌های در، گان، کاف دستگاه فشار خون، میز و صفحه کلید رایانه، میز کنار تخت بیمار و وسایل پزشکی مختلف. آلودگی با VRE در سطوح آزمایشگاهی در بیمارستان نیز دیده شده است.

انتروکوک‌ها بسیار مقاوم هستند و می‌توانند در سطوح خشک به مدت طولانی پایدار بمانند (7 روز تا 4 ماه). در صورت آلوده شدن دست یا دستکش با این

1. Methicillin Resistant Staphylococcus aureus
2. Vancomycin Resistant Enterococci

باکتری تا 60 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 خواهد شد. نمونه‌برداری دوره‌ای برای تشخیص VRE و MRSA توصیه نمی‌شود، ولی در مواقعی که بخواهیم اثربخشی روش‌های تمیزکردن و ضدعفونی را ارزیابی کنیم، توصیه می‌شود.

اسینتوباکترها¹

باکتری‌های گرم منفی در محیط‌ها و سطوح مرطوب پایدار می‌مانند و به‌ندرت از راه هوا منتقل می‌شوند. ولی اسینتوباکتر استثنا است و از راه قطره‌های کوچک در هوا نیز قابل انتقال است که یکی از دلایل عمده 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 میله تخت بیمار، پیشخوان، دستشویی و ظرفشویی، کابینت تخت بیمار، رختخواب، تشک، ملحفه، لحاف، تلفن و کف اتاق‌ها، چارت‌های پزشکی و سطوحی که بیشتر لمس می‌شوند، جداکرد. همچنین، اسینتوباکتر از سطوح و فضای محیط‌های مرطوب مانند وان‌تیل‌تورهای تنفسی و دستگاه‌های بخور سرد و گرم جدامی‌شود. اسینتوباکتر مانند استافیلوکوک اورئوس مقاوم است و روی سطوح خشک حدود 26-27 روز زنده می‌ماند. از آنجا که اسینتوباکتر از منابع مختلفی جدامی‌شود، نقش آزمایشگاه در مواردی که ضرورت داشته باشد، در پیداکردن منبع اصلی عفونت مهم است. ولی باید توجه داشت فقط جداسازی باکتری اهمیت ندارد و برای پیداکردن منبع عفونت به روش‌های بیوتایپینگ و ژنوتایپینگ (روش‌های مولکولی) نیاز است.

1. Acinetobacter

نمونه‌برداری میکروپزشناسی از سطوح محیطی

موارد کاربرد نمونه‌برداری از محیط:

1. پیدا کردن مخزن‌های عوامل بیماری‌زای بالقوه در محیط (کاربرد تحقیقاتی دارد)؛
 2. ارزیابی زمان زنده‌ماندن ارگانسیم‌ها در محیط (کاربرد تحقیقاتی دارد)؛
 3. پیدا کردن منشأ آلودگی محیط (کاربرد تحقیقاتی دارد)؛
 4. در صورت بروز اپیدمی بیمارستانی و در مواردی که شواهد اپیدمیولوژیک بر انتشار عامل عفونت از سطوح محیطی و وسایل پزشکی به‌عنوان منبع -مخزن عفونت بیمارستانی دلالت کند، برای تأیید ارتباط بین عوامل جدا شده از محیط و بیمار به روش‌های مولکولی نیاز است؛
 5. کنترل کیفی و ارزیابی روش‌های ضدعفونی و تمیزکردن در زمانی که نیاز باشد.
- از آنجا که نمونه‌گیری و کشت دوره‌ای (روتین) از سطوح توصیه‌ نمی‌شود، زمانی که به این کار نیاز باشد باید هدف، برنامه و روش مشخص باشد و قبل از نمونه‌گیری به این موارد توجه شود:
1. اطلاعات اولیه و دلایل اپیدمیولوژیک؛
 2. محل نمونه‌گیری، روش، وسایل مناسب و تعداد دفعات نمونه‌گیری و کشت.
- مجموعه این عوامل باید با همکاری کمیته کنترل عفونت‌های بیمارستانی و در هر بیمارستان با توجه به بخش‌های آن تعیین شود.

روش‌های آزمایشگاهی

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

1. محل و روش نمونه‌گیری شامل روش فیزیکی نمونه‌برداری؛

2. تعداد نمونه‌های گرفته‌شده شامل زمان و ارزش بالینی؛
3. روش ارزیابی کشت و نمونه‌گیری شامل روش کمی و کیفی، حجم نمونه، نوع محیط کشت، محلول‌های مورد نیاز، میزان رقت‌ها و مواد خشی‌کننده (در مواردی که نمونه‌برداری از سطوحی باشد که قبلاً ضدعفونی شده‌اند)؛
4. زمان انکوباسیون، فاصله بین نمونه‌گیری و انتقال آن به آزمایشگاه، تشخیص و تفسیر.

محیط‌های کشت برای روش‌های کمی و کیفی

1. محیط جامد (آگار) مغذی و غیرانتخابی شامل TSA¹ یا محیط پایه بلاد آگار یا BHI² یا BHI² یا 5% SBA³ یا شکلات آگار؛
2. محیط‌های مایع TSB⁴ یا BHI⁴؛
3. محیط‌های انتخابی جامد و مایع شامل مکانکی آگار برای گرم منفی‌ها، Cetrinide Agar برای *Pseudomonas aeruginosa*، سابرو دکستروز برای قارچ‌ها و ...

محل‌ها

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

نمونه‌برداری به‌وسیله سواب استریل یا اسفنج استریل انجام می‌شود. روش نمونه‌گیری در قسمت‌های بعد توضیح داده خواهد شد. پس از نمونه‌گیری سواب را برای استخراج ارگانسیم در محل‌های شستشو مانند سالین استریل یا محیط

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

مایع TSB قرار می‌دهند. همچنین، به جای این روش می‌توان از محیط‌های کشت آماده استفاده کرد و سطح محیط آگار را به‌طور مستقیم با سطح محل نمونه‌برداری تماس داد. این نوع محیط‌ها RODAC¹ نامیده می‌شوند.

محلول‌های شستشو برای سطوحی که ضدعفونی نشده‌اند شامل سالین یا TSB است.
محلول‌های شستشو برای سطوحی که ضدعفونی شده‌اند و احتمال باقی‌ماندن مواد ضدعفونی‌کننده وجود دارد باید حاوی مواد خنثی‌کننده مانند Lecithin + Tween 80 (برای آمونیوم چهارظرفیتی) یا Glycine (برای گلو تاروئید و فرمالدئید) یا Sodium Thiosulfate (برای یُد و کلرین) باشد.
برای سادگی کار و در مواردی که نوع ماده ضدعفونی‌کننده مشخص نیست، می‌توان از محیط‌های مایع TSB یا BHI استفاده کرد که با غلظت دو برابر حالت عادی تهیه شده‌اند.

BHI یا TSB $\times 2$ ²، برای مثال، برای 100 سی‌سی محیط مایع DS-TSB، دو برابر حالت عادی محیط پایه را به 100 سی‌سی آب مقطر اضافه می‌کنیم.

کشت سطوح محیطی

روش کمی

- از محلولی که سواب داخل آن قرار گرفته است رقت $1/10$ و $1/100$ تهیه می‌کنیم و $0/1\text{ml}$ از محلول اولیه و رقت‌های $1/10$ و $1/100$ را روی سطح آگارمانند کشت ادرار کشت می‌دهیم. پس از انکوباسیون، پلیتی را که بین 30-300 کلنی دارد، می‌شماریم و با توجه به ضریب رقت و حجم برداشت شده، تعداد باکتری را محاسبه و در واحد سطحی که نمونه‌گیری شده گزارش می‌کنیم.
- روش فیلتر: در این روش حجم مشخصی از محلول حاوی ارگانیزم را که در مراحل قبل تهیه شده از فیلتر $0/45$ یا $0/22$ عبور می‌دهیم و سپس فیلتر حاوی باکتری را مستقیم روی آگار می‌گذاریم و کشت می‌دهیم. این روش برای

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

سطوحی که ضدعفونی شده‌اند مناسب است؛ چون به مواد خنثی‌کننده نیاز نیست. در این روش پلیتی شمرده می‌شود که بین 20-200 کلنی دارد.
3. روش Pour plate: روشی دقیق، ولی سخت و زمان‌بر است. 3-2 سی‌سی محلول اولیه یا رقیق‌شده را با محیط کشت جامد ذوب‌شده در حرارت 46°C - 44°C (مانند اضافه‌کردن خون به محیط بلاد آگار) مخلوط می‌کنیم و در پلیت می‌ریزیم. پس از جامدشدن، انکوبه می‌کنیم و باکتری‌های رشد کرده را می‌شماریم. باید توجه داشت که کلنی‌های عمقی به زمان بیشتری برای رشد نیاز دارند.

روش کیفی

روش انتخابی: در صورتی که به دنبال ارگانیزم‌های خاص در میان مجموعه‌ای از عوامل میکروبی باشیم می‌توانیم از محیط TSB استفاده کنیم. $0/5\text{ml}$ از محلول TSB را روی محیط‌هایی مانند مکانکی آگار یا ستریمید آگار یا محیط‌های انتخابی جهت کشت استافیلوکوک‌ها، اتروکوک‌ها یا ... کشت دهیم.
محیط TSB اولیه را به مدت 4-24 ساعت انکوبه می‌کنیم تا در صورتی که تعداد اولیه باکتری کم باشد، تکثیرشود و در صورت 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 آغشته می‌کنیم. مایع اضافی را با فشردن سواب به قسمت داخلی لوله می‌گیریم و از سطح موردنظر با حرکت گردشی و یک‌طرفه سواب نمونه برمی‌داریم. بهتر است این سطح اندازه مشخصی داشته باشد تا هنگام گزارش، تعداد کلنی در واحد سطح گزارش شود. پس از کوتاه‌کردن و دورانداختن قسمت چوبی که در تماس با دست بوده است، سواب را داخل مایع شستشو (سالین یا TSB) با حجم مشخص (5-10 سی‌سی) می‌گذاریم.

0 = excellent	0-25 = good	26-50 = fair	50 and over - poor
---------------	-------------	--------------	--------------------

در اتاق عمل در شرایط مطلوب کمتر از 5 کلنی روی محیط رشد می‌کند.

تشخیص

حداقل روی 2 کلنی از مجموع کلنی‌های با مورفولوژی مشابه کارهای تشخیصی انجام می‌دهیم. میزان کار تشخیصی انجام شده به اهداف ابتدایی، امکانات موجود و اهداف اپیدمیولوژیک در جهت ارزیابی شیوع یک بیماری خاص بستگی دارد. در بررسی‌های اپیدمیولوژیک تشخیص واحد گونه اجباری است. لازم به ذکر است که در حال حاضر، دقیق‌ترین روش برای تشخیص منبع آلودگی و راه انتقال، روش‌های تأییدی مولکولی روی باکتری‌های جدا شده است.

تفسیر

1. لوازم پزشکی Critical: مانند وسایل جراحی و وسایلی که در بافت‌های استریل نفوذ می‌کنند؛ هیچ باکتری یا اسپوری نباید وجود داشته باشد.
2. لوازم پزشکی Semicritical: مانند آندوسکوپ که با غشاهای مخاطی تماس دارد؛ هیچ باکتری نباید وجود داشته باشد، به جز باکتری‌های غیربیماری‌زای اسپوردار مانند باسیلوس و کلستریدیوم که گاهی دیده می‌شود.
3. لوازم پزشکی Noncritical: مانند گوشی پزشکی که با پوست سالم تماس دارد؛ باکتری‌های بیماری‌زا نباید وجود داشته باشد. باید توجه داشت که این معیار از جنبه میکروبی شناسی است و از دیدگاه اپیدمیولوژیک، چنانکه در مباحث قبل گفته شد، فقط جداسازی یک باکتری بیماری‌زا بر راه انتقال دلالت نمی‌کند و برای تأیید به روش‌های بیوتایپینگ و مولکولی نیاز است.
4. سطوح محیطی Noncritical: شامل سطوحی است که در تماس مستقیم با بیمار نیستند، مانند سطوح کف و دیوارها یا دستگاه‌هایی مانند X-ray و همودیالیز؛

درپوش لوله را می‌بندیم و 50 بار آن را سروته یا به مدت 30 ثانیه با دور بالا ورتکس می‌کنیم. از این محلول برای کشت‌های توضیح داده شده استفاده می‌کنیم.

روش غوطه‌ورکردن

می‌توان محلول شستشوی استریل را (سالین یا TSB) در ظرف بزرگ‌تر و استریل ریخت (مانند ظرف‌های 50 سی‌سی جمع‌آوری نمونه BAL). در صورتی که نمونه مورد نظر به اندازه‌ای کوچک باشد که در این ظرف جاشود، آن را درون ظرف حاوی محلول می‌گذاریم و به مدت 1 دقیقه به شدت تکان می‌دهیم. از محلول حاصل به روش‌های گفته شده کشت می‌دهیم. همچنین، می‌توان محلول TSB یا سالین استریل را مستقیم درون ظرف‌ها یا لوله‌های کوچکی که مشکوک به آلودگی هستند، بریزیم. به این صورت که 10-50 سی‌سی از محلول سالین یا TSB را داخل ظرف می‌ریزیم و آن را 50 بار سروته می‌کنیم. سپس حجم معینی از آن را کشت می‌دهیم یا از فیلتر عبور و فیلتر را کشت می‌دهیم.

روش RODAC

روشی ساده، ولی بسیار پرهزینه است. محیط‌های کشت آماده مصرف روی صفحه‌های پلاستیکی انعطاف‌پذیر قرار دارند. 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 به طور مستقیم با سطح نمونه برداری تماس می‌دهیم. پس از گذاشتن مجدد محافظ، پلیت‌ها را 48 ساعت در انکوباتور قرار می‌دهیم و تعداد کلنی‌ها را می‌شماریم. باید توجه داشت اگر بخواهیم از یک اتاق بیمارستانی نمونه برداریم، برای از بین بردن خطای انتخاب محل نمونه‌گیری حداقل به 15 عدد محیط RODAC نیاز داریم. برای تفسیر کشت محیط‌های RODAC جدول زیر پیشنهاد می‌شود.

Colonies per Rodac plate

اصولاً این سطوح در انتقال عوامل عفونی تأثیر کمی دارند و برای این سطوح تمیزی ظاهری و نبودن بیماری‌زاهای شناخته‌شده کافی است. برای تشخیص میزان رعایت اصول بهداشتی 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 Sanitation	Free of gram negative rods but containing some gram positive cocci
Poor Sanitation	Gram negative rods present

باید توجه داشت که رشد بیماری‌زاهای خاص همیشه نشانه آلودگی سطوح نیست و ممکن است با نمونه‌گیری نامناسب، خطا در حین کار و مراحل پس از آن در ارتباط باشد. برای جلوگیری از گزارش اپیدمی کاذب، انجام دادن روش‌های فوق نیازمند کارکنانی دقیق، با حوصله و آموزش‌دیده است که تمام مراحل را به‌نحو احسن انجام دهند. توصیه می‌شود آزمایشگاه به‌منظور جلوگیری از آلودگی در حین کار، کشت را در زیر کابینت بیولوژیک کلاس 2 انجام دهد.

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.

4. حساسیت به اکسیژن؛

5. 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 ادامه حیاتشان وجود داشته‌باشد و یک پوشش محافظ ارگانسیم را بپوشاند (مواد آلی خشک یا غیرآلی). بیماری‌زایی که در مقابل خشکی مقاومت می‌کنند (مانند گونه‌های 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 آئروسول ثانوی طی فعالیت‌های روزانه (مانند جاروکردن و مرتب‌کردن رختخواب‌ها) منتقل شوند.

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 وجود دارد، 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 تخلیه اتاق، میزان باکتری هوا پس از حدود 30 دقیقه به حداقل ممکن کاهش می‌یابد.

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

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

ملاحظات اولیه برای نمونه‌برداری از هوا

1. در نظر گرفتن مشخصات و شرایط آئروسول:

فصل هفتم

نمونه‌برداری از هوا

آلوده‌کننده‌های بیولوژیک هوا که به‌عنوان آئروسول شناخته‌می‌شوند شامل باکتری‌ها، قارچ‌ها، ویروس‌ها و پولن‌ها هستند. آئروسول‌ها ذرات جامد، مایع یا ذرات معلق در هوا هستند. 5 دقیقه صحبت کردن و سرفه کردن هر کدام ممکن است 3000 قطره تولید کند. همچنین، عطسه کردن حدوداً 40000 قطره ایجاد می‌کند که سپس بخار و به ذراتی حدود 12-0/5 میکرومتر تبدیل می‌شوند. به‌طور معمول، اندازه ذرات تشکیل‌دهنده آئروسول‌های بیولوژیک متفاوت‌اند (کمتر از 1 میکرومتر تا بیشتر از 50 میکرومتر). ممکن است این ذرات شامل یک نوع ارگانسیم به‌صورت جدا از هم یا یک مجموعه به هم چسبیده مرکب از تعدادی باکتری باشد. این مجموعه‌ها معمولاً شامل ذرات گردوغبار، مواد آلی و غیرآلی خشک هستند. شکل‌های رویشی باکتری‌ها و ویروس‌ها نیز ممکن است در هوا وجود داشته‌باشند. همچنین، اسپور باکتری‌ها یا قارچ‌ها نیز به میزان کمتر در هوا وجود دارند.

عوامل تعیین‌کننده پاییداری میکروارگانسیم در یک بیوآئروسول به‌شرح

زیر است:

1. محیط معلق در آن؛

2. دما؛

3. رطوبت مناسب؛

محدوده اندازه ذرات، ذرات بزرگتر از 5 میکرومتر به طور کامل در دستگاه تنفسی فوقانی به دام می افتند و با عمل اولیه مژه ها برگردانده می شوند. ذرات کوچکتر از 5 میکرومتر به ریه می رسند، اما فقط ذرات با اندازه 2-1 میکرومتر در آلونل ها به دام می افتند؛

غلظت میکروارگانیسم؛

عوامل محیطی.

2. تعیین نوع وسیله نمونه برداری، زمان و مدت نمونه برداری.

3. تعیین تعداد نمونه هایی که باید برداشته شوند.

4. اطمینان از متناسب بودن ابزار در دسترس.

5. تعیین روش سنجش که میزان جداسازی میکروارگانیسم ها را به طور مطلوب تضمین خواهد کرد.

6. تعیین آزمایشگاه مرجع که بتواند پشتیبانی های لازم برای بررسی های میکروبیولوژی را تدارک ببیند.

7. اطمینان از اینکه نمونه ها در یخچال نگهداری می شوند (در صورتی که نتوان آن را بلافاصله در آزمایشگاه بررسی کرد).

در جدول 7-1 روش ها و وسایل شناسایی و نمونه برداری و شمارش مشخص شده اند که موارد زیر را شامل می شوند:

1. عبور هوا از مایعات¹،

2. برخورد در سطوح جامد²،

3. رسوب دادن³،

4. فیلتراسیون⁴،

1. Impingement in liquids
2. Impaction on solid surfaces
3. Sedimentation
4. Filtration

5. سانتریفوژ کردن¹،

6. پرسپیتاسیون الکتروستاتیک²،

7. پرسپیتاسیون گرمایی³.

از بین این روش ها عبور هوا از مایعات، برخورد در سطوح جامد و سدیمان تاسیون (به وسیله قراردادن پلیت ها) برای مقاصد نمونه برداری هوا در مرکز بهداشتی استفاده شده است. چند وسیله برای نمونه برداری از باکتری های منتقله از هوا و قارچ ها معرفی شده اند. برخی وسایل نمونه برداری امکانات کاملی دارند که فقط به یک منبع مولد و محیط جمع آوری کننده مناسب نیاز دارند. اما سایر دستگاه ها به تجهیزات کمکی مانند پمپ مکش و یک وسیله اندازه گیری جریان هوا (فلومتر یا آنومتر) نیازمند است.

سدیمان تاسیون با استفاده از قراردادن پلیت ها انجام می شود؛ بنابراین، به وسایل یا تجهیزات ویژه نیاز ندارد. انتخاب وسیله نمونه برداری هوا، نیازمند شناخت دقیق شرایط و داشتن اطلاعات کافی ذیل است:

1. ارگانیسم ویژه یا ارگانیسم هایی که ممکن است در هوا وجود داشته باشند؛

2. غلظت ارگانیسم های زنده؛

3. تغییر غلظت ارگانیسم ها متناسب با زمان؛

4. دامنه توزیع اندازه ذرات جمع آوری شده؛

5. برای ارزیابی صحیح لازم است مقایسه ای بین تعداد میکروارگانیسم های محل نمونه گیری با هوای خارج از محل نمونه گیری انجام شود.

همکاری متخصص اپیدمیولوژی، بهداشت کار صنعتی، فرد آموزش دیده ای از آزمایشگاه و میکروبیولوژیست های محیطی در انتخاب روش و وسیله مناسب مفید خواهد بود.

1. Centrifugation
2. Electrostatic precipitation
3. Thermal precipitation

جدول 7-1: Air sampling method and examples of equipment

Method	Principle	Suitable for measuring	Collection media or surface	Rate of collection (L/min)	Auxiliary 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 <i>Legionella</i> 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 <i>Aspergillus</i> spp., fungal spores	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 microbial 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) عبور هوا از مایعات (**Impingement in liquids**): اصول این روش بر مکش هوا از میان یک موتور کوچک و خروج آن در مقابل یک سطح مایع است. کاربرد آن برای تعیین ارگانسیم‌های زنده و غلظت آنها در مدت زمان معین است (مانند نمونه‌برداری آئروسول‌های آب برای گونه‌های *لژیونلا*).

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

1. ارگانسیم‌های زنده‌ای که روی سطوح غیرمغذی وجود دارند؛
2. ارگانسیم‌های مقاوم به شرایط خشک، مانند اسپورها (نمونه‌برداری هوا برای *آسپرژیلوس* و *اسپوره‌های قارچ*).

ج) رسوب‌دادن (**Sedimentation**): ذرات و میکروارگانسیم‌ها بر اساس 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 در نظر گرفته شود:

1. نوع ارگانسمی که باید نمونه‌برداری شود؛
2. انطباق با روش انتخابی سنجش؛
3. حساسیت ارگانسیم‌ها به روش نمونه‌برداری؛
4. غلظت‌های احتمالی و اندازه ذرات؛
5. در صورتی که نوع باکتری به گونه‌ای باشد که احتمال کلامپینگ¹ وجود داشته باشد، باید شکسته شود؛
6. حجم هوا و مدت زمان نمونه‌برداری؛
7. میزان آلودگی پایه؛

1. Clumping

8. شرایط محیط؛
9. کارایی دستگاه نمونه برداری برای جمع آوری؛
10. دانش و مهارت فردی که با دستگاه کار می کند؛
11. قیمت تمام شده تجهیزات و کیفیت خدمات پشتیبانی پس از فروش.

نمونه بردارهای عبور هوا از مایعات و برخورد در سطح جامد کاربرد بیشتری برای نمونه برداری باکتری ها، ذرات و اسپورهای قارچی دارند؛ زیرا می توانند حجم بالایی از هوا را در زمان نسبتاً کوتاه جمع کنند. سیستم نمونه برداری که از طریق سطح جامد است به صورت غربالی و شکافی طراحی شده است.

در نوع شکافی از یک صفحه دوار استفاده می شود و امکان تعیین غلظت را در طی زمان مشخص فراهم می آورد. نوع غربالی از صفحاتی استفاده می کند که دارای سوراخ ها و حفره های کالیبره شده با قطرهای مختلف است.

برخی انواع نمونه بردارهای سطح جامد از نیروی سانتریفیوژ برای به دام انداختن ذرات روی سطح آگار استفاده می کنند که واجد سوراخ ها و حفره های کالیبره شده با قطرهای مختلف هستند. داخل هر وسیله نیز باید استریل شود تا از آلودگی های ناخواسته دستگاه نمونه بردار اجتناب شود. نتیجه های به دست آمده باید به صورت تعداد ارگانیسیم ها یا ذرات در واحد حجم هوا (CFU/m^3) گزارش شود.

نمونه برداری برای ارزیابی باکتری ها به توجهات ویژه نیاز دارد. از آنجا که باکتری ها ممکن است به صورت تک تک، مجتمع، مخلوط با غبار، پوشیده شده از لایه محافظ مواد آلی خشک یا غیر آلی باشند، استفاده از انواع خاصی از نمونه بردارها لازم است (برای مثال عبور از مایعات) که به طور کامل یا نسبی موجب متلاشی شدن تجمعات و ذرات بزرگ می شوند. نتیجه نمونه برداری نشان دهنده تعداد کل ارگانیسیم های منفرد موجود در هوا است.

اندازه گیری آئروسول های زنده (بیوآئروسول ها) با استفاده از انواع غربالی یا شکافی ساده است؛ زیرا این نمونه بردارها ذرات و میکروارگانیسیم ها را بر اساس دامنه اندازه آنها جدا می کنند. این نمونه بردارها باید در ابتدا کالیبره شوند.

روش قراردادن پلیت (برای مثال سدیماتناسیون یا روش ته نشینی) برای سنجش اسپورهای قارچ توصیه نمی شود. در روش پلیت گذاری¹، جداسازی ارگانیسیم ها صرفاً بر اساس سنگینی آنها انجام می پذیرد و از سرعت جریان هوا متأثر نیست. این روش چند ساعت زمان می برد تا کامل شود و ممکن است در برخی مناطق قابل استفاده نباشد.

نمونه بردارهای هوا بسته به نیازمندی های مختلف طراحی شده اند و برخی نمونه بردارها برای یک نوع نمونه برداری و سنجش بر انواع دیگر برتری دارند. به هر حال، هیچ نوع نمونه برداری و روش سنجشی نمی تواند 100 درصد تمام ارگانیسیم های منتقله از هوا را شمارش کنند.

نمونه بردار یا روش نمونه برداری انتخاب شده باید بتواند به میزان کافی هوا جمع کند تا تعداد مناسب ذرات در مدت زمان مناسب به دست آید و ارزیابی بیولوژیک هوا صحیح باشد.

کشت هوا برای قارچ ها

انواع قارچ ها از منابع مختلف مانند محیط های ساخت و ساز ساختمان یا محیط های گرم مرطوب به سهولت توسط جریان هوا جابه جا می شوند. استشاق انواع مختلف قارچ های منتقله از هوا پدیده ای روزمره و شایع است. در شرایطی که سیستم ایمنی از سلامت کامل برخوردار باشد، این ارگانیسیم ها عارضه ایجاد نمی کنند.

1. Settle Plate

ضعف شدید سیستم ایمنی به‌ویژه در بیماران بستری در بیمارستان، عامل ابتلا به عفونت‌های قارچی است. بنابراین، اتاق‌های تمیز (Clean room) باید از فشار مثبت سیستم‌های فیلتراسیون و تهویه مناسب برخوردار باشد. پایش مستمر فعالیت‌های مندرج در دستورالعمل‌های کنترل شرایط محیطی و شناسایی و ارزیابی منشاء هرگونه قارچ بیماری‌زا یا فرصت‌طلب نوظهور باید در دستور کار کمیته کنترل عفونت بیمارستانی قرار داشته‌باشد. بروز این‌گونه عفونت‌ها ممکن است از رعایت نکردن روش‌های اجرایی کنترل محیط از یک سو یا انجام ناقص روش‌های کنترلی از سوی دیگر ناشی شود (برای مثال: انتقال بیمار بدون ماسک به خارج از محیط تحت کنترل). تفکیک این دو وضعیت اهمیت ویژه‌ای دارد.

یکی از روش‌های کنترل فعالیت‌های توصیه‌شده، مقایسه میزان آلودگی هوا در محیط‌های ایزوله با محیط‌های معمولی از نظر تراکم انواع قارچ‌ها است. نتایج مقایسه این دو گروه از یافته‌ها، مبنای پایش و سنجش‌های بعدی را تشکیل می‌دهد. هر چند نمونه‌برداری دوره‌ای از هوای محیط بیمارستان توصیه نمی‌شود، با این حال، موارد زیر از این قاعده مستثنی هستند:

1. دریافت گزارش‌های مکرر مبنی بر شناسایی موارد عفونت ناشی از یک یا چند گونه قارچی محدود و مشابه.
 2. هرگونه فعالیت ساختمانی و ساخت‌وساز که در مجاورت محل بستری بیماران حساس یا مستعد انجام می‌شود.
 3. پیش از بستری کردن بیمار حساس در اتاق جدید یا نوساز که تخمینی از میزان تراکم قارچی در آن وجود ندارد.
 4. وقتی روش‌های ضروری برای تمیزکردن هوا در حال پایه‌ریزی و انجام 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 هوا¹ یا تجهیزات فیلتراسیون اتاق‌های تمیز مجهز شده‌باشد (اتاق‌های عمل جراحی، اتاق‌های آماده‌سازی فرآورده‌های تزریقی و ...)، استفاده از شمارش‌گرهای الکترونیکی ذرات معلق در محیط² قویاً توصیه می‌شود.

ملاحظات پیش از آزمایش³

نمونه

1. 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 نتیجه آن در یک سیستم Scoring به‌صورت کمی یا کیفی سطح‌بندی شوند. برای مثال، در صورت بروز عفونت‌های مکرر و مشابه که در مقطع زمانی محدود بروز کرده‌اند، مقایسه مذکور باید بین نمونه هوای اتاق‌های آلوده با اتاق‌هایی انجام‌شود که عفونتی در آن گزارش نشده‌است.

2. حجم نمونه و انکوباسیون

حجم هوای لازم برای نمونه‌برداری براساس پیش‌بینی آلودگی قارچی در محیط تحت بررسی است و به‌وسیله حجم هوا در واحد زمان تعیین می‌شود. حجم نمونه باید به‌اندازه کافی باشد تا بتوان اطلاعات لازم را برای شمارش به‌دست آورد. باید توجه داشت که دمای نگهداری کشت‌ها (حرارت اتاق و دمای 37°C) در رشد

1. Laminar flow
2. Anerometer
3. Preanalytical Considerations

و شمارش نهایی قارچ‌ها بسیار مؤثر است. برای مثال، طی فصل رشد گیاهان در هوای بیرون تقریباً $1000 \text{CFU}/\text{m}^3$ و در بالاترین حد $100000 \text{CFU}/\text{m}^3$ قارچ رشد می‌کند. این تعداد در شرایطی است که کشت‌ها در دمای اتاق نگهداری شوند. اما وقتی کشت‌ها در 37°C انکوبه می‌شوند، فقط $1-200 \text{CFU}/\text{m}^3$ قارچ رشد می‌کند. در فضاهای داخلی با حداقل فیلتراسیون، میزان قارچ حدود $\frac{1}{3}$ میزان آن در محیط خارج است. در این مناطق پس از فیلتراسیون با کارایی بالا، تعداد قارچ حداقل به $\frac{1}{10}$ کاهش می‌یابد.

اگر فیلترها مناسب کار گذاشته و نگهداری شوند، سیستم‌های فیلتراسیون قسمت اعظم قارچ‌ها را فیلتر می‌کنند و برای ارزیابی، نمونه‌ای با حجم بالا (بیشتر از 1 متر مکعب) لازم است. به‌هرحال، وقتی برف یا یخ محیط بیرون را برای زمان طولانی پوشانده‌باشد، میزان قارچ در محیط خارج بسیار کاهش می‌یابد.

3. وسایل نمونه برداری از هوا

بر اساس اطلاعات موجود، انواع مختلفی از دستگاه‌های نمونه برداری در دسترس‌اند که مزایا یا معایب آنها در جدول 7-3 آورده شده است. بسیاری از دستگاه‌های نمونه برداری هوا برای ذرات مختلف به‌غیر از قارچ‌ها استفاده می‌شوند.

نمونه بردارهای حجم کم در حد $1 \frac{\text{ft}^3}{\text{min}}$ یا کمتر عمل می‌کنند. بنابراین، زمان نمونه برداری 35 دقیقه یا بیشتر طول خواهد کشید تا حجم کافی هوا نمونه برداری شود. رفت و آمد زیاد کارکنان در یک قسمت و زیاد بودن پرستاران در بخش نمونه برداری شده ممکن است نمونه برداری را بی تأثیر نماید.

4. پلیت‌گذاری

این روش در گذشته بیشتر استفاده می‌شد، اما اغلب اطلاعات باارزشی به دست نمی‌آید. ذرات منتقله از هوا به‌طور مختلف روی سطوح قرار می‌گیرند و از آنجا که کوچک‌ترین ذرات قارچی اغلب مهم‌ترین بیماری‌زاها هستند، در این روش ممکن است عوامل بیماری‌زا را از دست داد. برای مثال، اسپورهای آسپرژیلوس فومیگاتوس $2-3/5$ میکرومتر قطر دارند و توان شناوری آنها در هوا در حضور سطوح ناصاف افزایش می‌یابد. بنابراین، فقط روش‌های حجم‌سنجی اطلاعات قابل اعتمادی به دست می‌دهند.

5. نمونه برداری از سطوح

در صورتی که تعداد زیادی از ارگانیسم‌های مشابه طی نمونه برداری از هوا جدا شوند، نمونه برداری‌های متوالی از سطوح مشکوک ممکن است مفید باشد. چنین نمونه برداری‌هایی ممکن است برای مرتبط‌سازی محل‌هایی مانند سینک، کابینت یا مجاری تهویه هوای با قارچ منتقله از هوا مفید باشد. نمونه برداری ساده توسط سواب از منطقه مشکوک و انتقال و کشت سواب روی محیط کشت برای بررسی این موارد کافی است.

جدول 7-2 فهرست منابع محیطی قارچی را در بیمارستان‌ها نشان می‌دهد.

زمانی که هدف فقط تعیین تعداد کلنی‌های قارچی است و انکوباسیون در دمای اتاق انجام شده است، گزارش تعداد کلنی‌ها بدون شناسایی گونه قارچ کافی است. وقتی منبع عفونت قارچی در دمای 37°C بهتر رشد می‌کند، در صورت نیاز بررسی میکروسکوپی و تجدید کشت برای شناسایی بیشتر انجام می‌شود.

جدول 7-2: منابع محیطی قارچی در بیمارستانها

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

6. محیط‌های کشت

توصیه می‌شود از محیط‌های کشت قارچ استفاده شود که حاوی کلرامفنیکل است (هر پلیت برای یک نمونه). سایر محیط‌های انتخابی موجب تمایز هر چه بیشتر قارچ‌ها خواهد شد. بسیاری از قارچ‌ها روی سایر محیط‌ها نیز جدامی شوند.

ملاحظات حین آزمایش¹

1. نمونه برداری

با اغلب نمونه بردارهای هوا می‌توان نمونه برداری کرد. دستگاه‌های نمونه بردار محیط‌ها را تلقیح می‌کنند. دستورالعمل‌های استفاده از این وسایل در ادامه آمده است.

1. Analytical Considerations

2. دمای انکوباسیون

؛ دمای اتاق: انتخاب دمای انکوباسیون با توجه به اهداف نمونه برداری تعیین می‌شود. تمیزترین محل اتاق باید برای انکوباسیون در دمای اتاق استفاده شود. این روش برای تعیین کارایی فیلتراسیون در محیط‌های تحت کنترل مختلف مفید است، اما برای شناسایی قارچ‌های بیماری‌زا مفید نیست.

؛ انکوباسیون در 37°C : شرایط انتخابی را برای جداسازی قارچ‌های منتقله از هوا که شامل بیماری‌زاهای فرصت طلب است، برای مثال گونه‌های آسپرژیلوس ایجاد می‌نماید. قارچ‌هایی که در دمای اتاق بهتر رشد می‌کنند، 10 برابر بیشتر از آنهایی هستند که در دمای 37°C رشد می‌کنند.

3. کنترل کیفی

وسایل نمونه برداری هوا باید دوره‌ای کالیبره شوند که شامل سنجش میزان هوای ورودی و کالیبراسیون پمپ است. برای روش‌های مناسب کالیبراسیون باید با شرکت‌های سازنده نمونه بردار تماس گرفت.

ملاحظات پس از آزمایش

محاسبات

1. عوامل تبدیل

$$1\text{ft}^3 = 28/4\text{liters}$$

$$1\text{m}^3 = 35/3\text{ft}^3$$

$$1\text{ft}^3/\text{min} = 0/0283\text{m}^3/\text{min}$$

2. انجام محاسبات

تعداد کلنی‌ها را در کل نمونه به حجم هوای نمونه برداری تقسیم و تعداد CFU را در هر مترمکعب محاسبه نمایید.

تفسیر اطلاعات

به علت پراکندگی قارچ‌ها تعداد کم قارچ در محیط اهمیت ندارد. روش‌هایی که قارچ‌ها را بدون شناسایی تفکیک می‌کنند، نباید استفاده شوند. روش‌هایی مانند پلیت‌گذاری که حساسیت آن برای شناسایی بیماری‌زاهای قارچی ناکافی است، مفید نیستند. مقایسه 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 انجام شود.

اگر فقط یک کلنی از یک قارچ بیماری‌زا جدا شود، تکرار نمونه برداری لازم است. رشد چند کلنی از یک قارچ بیماری‌زا بارزتر از جداسازی یک کلنی است که ممکن است تصادفی روی محیط رشد کرده باشد. در مکان‌های حفاظت‌شده (کارآیی فیلتراسیون معادل 99/97 درصد برای ذرات 0/3 میکرومتر، بیش از 12 بار تعویض هوا در ساعت، اختلاف فشار 0/01 اینچ و فشار آب 2/5 پاسکال) میزان کل بیماری‌زاهایی مانند اسپرژیلوس فومیگاتوس، فلاووس، ترئوس، گونه‌های فوزاریوم یا دیگر بیماری‌زاهای قارچی بالقوه، باید کمتر از $0/1 \text{ CFU/m}^3$ باشد. اگر میزان آلودگی به دلایل متعدد به 1 CFU/m^3 افزایش یابد، 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 رشد می‌کنند، نباید بیش از 15 CFU/m^3 و برای کشت‌هایی که در دمای 37°C رشد می‌کنند، نباید بیش از 2 CFU/m^3 باشد.

رشد یک‌دست از یک نوع ارگانیزم نشان‌دهنده منبع آلودگی داخلی است که چنین مشکلاتی عموماً ناشی از مکان‌هایی است که رطوبت کنترل شده دارند یا آنکه علت رطوبت نشت آب است.

شمارنده ذرات (مدل نوری یا تغلیظ) برای پیگیری‌های صحت فیلتراسیون و تضمین نصب صحیح فیلتر مناسب است. شمارنده تغلیظی، ذرات ناشی از نشت‌های کوچک را شناسایی خواهد کرد که ممکن است به دلیل شکاف در فیلتر باشد. این عمل با وسایل نمونه بردار هوا برای ذرات زنده قارچی امکان‌پذیر نیست. اما باید به‌خاطر داشت که شمارش ذرات فقط به‌عنوان یک شاخص برای شناسایی مشکل استفاده می‌شود. 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 میکروبی‌شناسی گران‌قیمت خواهد بود. تضمین مقدار فشار هوا در اتاق‌های حفاظت‌شده و میزان تعویض هوای اتاق، قبل از انجام آزمایش شناسایی ذرات زنده و غیرزنده هوا ضروری است.

پیوست

ویژگی‌های وسایل نمونه برداری حجمی مکانیکی

1. مکنده‌های آبکشی¹

این دستگاه‌ها برای جمع‌آوری ذرات استفاده می‌شوند و در انواع تجاری در دسترس هستند (جدول 7-3). نمونه بردار Andersen رایج‌ترین وسیله حجمی است. این نمونه بردار با فشردن هوا روی سطح آگار موجب جداسازی ذرات زنده می‌شود. ذرات در هر مرحله نمونه برداری از میان 200-400 حفره عبور می‌کنند و

1. Sieve impactor

به تدریج سوراخ‌ها کوچک‌تر می‌شوند تا تعداد ذرات در هر مرحله کاهش یابد. این روش اساس تمایز ذرات با اندازه‌های مختلف است. مکنده‌های آبکشی ذرات زنده قابل انتقال به عمق ریه را (کمتر از 5 میکرومتر) از ذرات غیرقابل انتقال (بیشتر از 5 میکرومتر) جداسازی کند (حداقل پس از دو مرحله نمونه برداری). این نمونه بردار، 6 مرحله دارد. ذرات عبوری قبل از مرحله 3 بیش از 5 میکرومتر و ذرات مرحله 6 کمتر از 5 میکرومتر هستند.

به دلیل طراحی و طبیعت آیرودینامیک ذرات منتقله از هوا در مرحله 3، ذراتی که قطر بزرگ‌تر از 5 میکرومتر دارند برگردانده و اجازه عبور به ذرات کوچک‌تر داده می‌شود تا به مرحله 6 داخل شوند. این توانایی به دستگاه نمونه بردار اجازه می‌دهد تا به‌طور صحیح از مناطق دارای غلظت بالای قارچ نمونه برداری کند. معایب: نمونه بردار با سرعت $1 \frac{\text{ft}^3}{\text{min}}$ عمل می‌کند و در یک محیط بسته نسبتاً تمیز برای تعیین 1CFU از بیماری‌زها در هر مترمکعب 35 دقیقه زمان نیاز است (برای جمع‌آوری $35/3\text{ft}^3$ یا 1 متر مکعب هوا). مکنده‌های آبکشی که اغلب مانند یک پمپ مکش عمل می‌کند، صدای زیادی در اتاق بیمار تولید می‌کند.

2. مکنده‌های شکافی¹

این دستگاه نمونه برداری مناسب است که از نیروی اینرسی برای مکش ذرات زنده روی سطح آگار استفاده می‌کند و ذرات را براساس اندازه آنها تفکیک نمی‌کند. دستگاه یک صفحه چرخنده دارد که به اندازه پللیت است (150mm یا 15cm) و چرخش پللیت در زیر محل شکاف شرایط و زمان مناسب تغلیظ را ایجاد می‌کند. این وسیله برای نمونه برداری حجم‌های 700-30 لیتر در دقیقه تنظیم شده است و اختلاف زمان نمونه برداری، شمارش کمی را ممکن می‌سازد. از آنجا که

1. Slit impactor

سرعت نمونه بردار تا $25\text{ft}^3/\text{min}$ است، نمونه برداری در چند دقیقه انجام می‌شود و در تعیین تغییرات غلظت ذرات در زمان‌های کوتاه کاربرد دارد.

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

3. نمونه برداری‌های سانتریفوژی¹

مانند سایر مکنده‌ها عمل می‌کنند. نواری با حفره‌های حاوی آگار در قسمت سر دستگاه نمونه بردار قرار دارد و دستگاه به راحتی حمل می‌شود.

معایب: کالیبراسیون و تنظیم میزان حجم هوای نمونه برداری فقط توسط سازنده امکان پذیر است؛ بنابراین، فقط برای مقایسه آلودگی بین مناطق مختلف کاربرد دارد. کارکردن با یک نوار چندخانه محیط کشت، تشخیص را مشکل می‌سازد و به تجدید کشت نیاز است.

4. Impingers

به علت حجم پایین این نمونه بردارها و تمایل به دام انداختن تجمع ذرات زنده، به کار بردن این وسیله به مناطقی محدود می‌شود که به وجود غلظت بالایی از آلودگی مشکوک است.

5. فیلتراسیون

این روش در ابتدا برای پیگیری گرد و غبار ذرات معدنی و قابل استنشاق به کار می‌رفت. به علت کوچکی فیلترها فقط میزان کمی از حجم نمونه (تقریباً 1 لیتر در دقیقه) فیلتر می‌شود. این روش برای نمونه برداری میکروب‌های زنده مناسب نیست.

1. Centrifugal impactor

6. پلیت‌گذاری

این وسیله مکنده برای جمع‌آوری نمونه در محیط داخل قابل استفاده نیست و عموماً برای تجزیه هوا از نظر اسپورها و گرده‌ها برای بررسی عوامل آلرژن در محیط خارج به‌کار می‌رود.

جدول 7-3: Air samplers for quantitation of viable fungal spores¹

Sampler type	Principle	Rate (liters/min)	Comment(s)
(1) 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.
(2) Slit impactor ³	Impaction on rotating agar plate	30-700	High volume allows short-term collections that might relate to specific activities; effective for low concentrations of spores. Quantification may be compromised at high levels of spores.
(3) Centrifugal impactor ⁴	Impaction on plastic strips containing agar media	40	Calibration difficult, thus limited to relative determinations.
(4) Impingers(glass)	Impingement into liquids	12.5	Low-volume sampling rates and tendency to disrupt clumps limits application to nonclinical sampling.
(5) Filters(cassette)	Filtration of air through 0.2-um-pore-size filters	1-2	Not practical for viable microbes.
(6) Settling plates	Gravity		Most significant spores are too small and buoyant to settle. Lack of quantification severely limits utility.

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

- For additional information, see reference 3
- Anderson Samplers Inc., 4215 Wendell Dr., Atlanta. GA 30336
- 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 Nashua Rd. #15. Amherst, NH 03031
- Biotest Diagnostics Corp., 6 Daniel Rd. East, Fairfield, NJ 07006

- حجم بالای نمونه‌برداری در این روش موجب کاهش زمان نمونه‌برداری می‌شود. این روش برای غلظت‌های پایین اسپورهای قارچی مؤثر است و در صورتی که اسپورهای قارچی در منطقه زیاد باشند، ممکن است شمارش کلنی‌ها اشتباه شود.
- کالیبراسیون آن مشکل است؛ بنابراین، فقط به‌طور نسبی (در تعیین مقایسه‌ای تعداد اسپورها) در منطقه مؤثر است.
- این روش بیشتر در نمونه‌برداری‌های غیربالینی به‌کار می‌رود؛ زیرا برای به‌دام انداختن توده‌های قارچی مؤثر است.
- برای میکروب‌های زنده به‌کار نمی‌رود.
- بیشتر اسپورهای بااهمیت به‌قدری کوچک و شناورند که نمی‌توانند رسوب کنند. نداشتن توان شمارش کمی در این روش موجب می‌شود که استفاده از آن محدود شود.

References

- Isenberg D. Henry: *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, American Society for Microbiology, 2 ED editions, 2004.
- Glen Mayhall C. *Hospital Epidemiology and Infection Control*, Lippincott Williams & Wilkins, 3D editions, 2004.
- 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.
- Guidelines on prevention and control of hospital Associated infections*, WHO, January 2002 «Regional office for South East Asia».
- 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.
- 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.
- 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.
- Noble WC, Clayton YM. *Fungi in the air of hospital wards*, J Gen Microbiol 1963; 32: 397-402.
- 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.
- Wadowsky RM, Benner SM. *Distribution of the genus Aspergillus in hospital room air conditioners*, Infect Control 1987; 8:516-518.
- Krasinski K, Holzman RS, Hanna B, et al. *Nosocomial fungal infection during hospital renovation*, Infect Control 1985; 6:278-282.
- 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.
- 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 (Peiphylum truncatum) and clivia (Clivia miniata). Biological and epidemiological aspects*, Mycopathologia 1978; 66:27-30.
15. Kyriakides GK, Zimmernan 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) نحوه انتقال و اکولوژی لژیونلا

1. لژیونلا در همه جا به خصوص محیط‌های آبی وجود دارد. به طور معمول گونه‌های لژیونلا در بخش وسیعی از منابع طبیعی و صنعتی آب از جمله سیستم‌های آب‌خوری، سیستم خنک‌کننده، کندانسورهای تبخیری، سیستم‌های گرمازا با آب داغ و تجهیزات درمانی تنفسی یافت می‌شوند.
2. گونه‌های لژیونلا می‌توانند مانند یک مخزن اپیدمیولوژیک عفونت‌های بیمارستانی از سیستم‌های توزیع آب بیمارستان به‌ویژه منابع آب گرم ایزوله شوند.
3. لژیونلا بعد از تنفس آئروسول‌های آلوده با باکتری منتقل می‌شود و دلیلی وجود ندارد که منبع محیطی عفونت‌های انسانی لژیونلایی به‌ویژه نوع انفرادی آن (اسپورادیک) یک منبع معمولی باشد.
4. 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 جراحی شده.

ب) معیارهای جداسازی و تأیید لژیونلا از منابع

1. وجود داشتن گونه‌های لژیونلا در یک منبع محیطی دلیلی بر عفونت‌زایی منبع نیست. لژیونلا اغلب از منابع آبی غیرمرتبط با بیماری‌های انسان جدا می‌شود.
2. در ارتباط با منابع یک عفونت بیمارستانی ناشی از لژیونلا 4 معیار به شرح ذیل وجود دارد:
 - ؛ رابطه بین یک منبع بالقوه عفونت‌زا و مدت زمان تماس؛
 - ؛ تعیین مکانیسم تولید آئروسول (آلوده به لژیونلا)؛
 - ؛ مستندسازی دقیق و کامل عوامل اتیولوژیک لژیونلا؛
 - ؛ جداسازی هم‌زمان گونه‌های لژیونلا از بیماران و منابع محیطی مرتبط (به عبارت دیگر، یک گونه لژیونلا در همه‌جا وجود داشته باشد)، 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**

1. ظرف‌های دهان‌گشاد پلاستیکی یا شیشه‌ای از جنس پلی‌پروپیلین با حداقل حجم معادل 30 سی‌سی؛
2. اپلیکاتور استریل از جنس پنبه یا پلی‌استر مانند اپلیکاتور داکرون استریل.

ب) فیلترها و ضمائم آنها

1. فیلترهای غشای پلی‌کربنات با اندازه سوراخ 0/2 میکرومتر (نوکلئوپور)؛
2. فیلتر پلاستیکی با اندازه 47mm (مانند فیلتر پلاستیکی ژلمن)؛
3. نگه‌دارنده فیلتر (مانند نگه‌دارنده سه‌شاخه فائل)؛

1. Acetamido Aminoethansulfonic acid

2. Buffered Charcoal Yeast Extract agar with α -Ketoglutarate

4. پنس (فورسپس) استیل ضدزنگ (مخصوص فیلترها).

ج) محیط کشت

- محیط‌هایی که بیشتر استفاده می‌شوند شامل محیط استامیدو آمینواتان سولفونیک اسید¹ (ACES) و محیط آگار حاوی عصاره مخمر، زغال بافری شده در $pH = 6/9$ و مکمل‌های اضافی نظیر سیستین، پیروفسفات و آلفاکتوگلوکوتارات (محیط کشت BCYE α)² است. بسته به شرایط باید از محیط‌های انتخابی خاصی استفاده کرد که مانع رشد بیش از حد ارگانیزم‌های غیر لژیونلا می‌شود. نمونه‌هایی از محیط‌های انتخابی رایج عبارت‌اند از:
1. محیط GPVA: محیط BCYE α حاوی مکمل‌های گلیسین، پلی‌میکسین، وانکومایسین و آنیزومایسین است.
 2. محیط DGVP: محیط BCYE حاوی مکمل‌های رنگدانه‌ای، گلیسین، وانکومایسین و پلی‌میکسین B است.
 3. سایر محیط‌های انتخابی نیز برای لژیونلا مناسب هستند و ممکن است سازندگان مختلف تغییرات جزئی در ترکیب آنتی‌بیوتیک‌ها و مکمل‌ها ایجاد کنند.

د) معرف‌ها

1. معرف اسیدی با $pH = 2$: این معرف اسیدی با تغییر pH سایر ارگانیزم‌های غیر لژیونلا را مهار می‌کند. اکثر ارگانیزم‌ها قدرت مقاومت در pH اسیدی شدید ($pH = 2$) را ندارند.
 2. معرف فیلترهای غشایی: فیلتراسیون غشایی با معرف حاوی آنتی‌بادی فلئورسنس مستقیم برای جداسازی گونه‌های لژیونلاها از ارگانیزم‌های مشابه توصیه می‌شود. این معرف‌ها می‌توانند نتایج مثبت کاذب واکنش سنجش مستقیم فلئورسنس را کاهش دهند.
- معرف‌هایی که این ارگانیزم از آنها قابل جدا شدن است:

1. Acetamido Aminoethansulfonic acid

2. Buffered Charcoal Yeast Extract agar with α -Ketoglutarate

؛ فسفات بافر سالین استریلیزه شده با فیلتر (pH = 7/6)؛

؛ آب مقطر دیونیزه و استریلیزه شده با فیلتر.

3. سدیم تیوسولفات که مانند خنثی کننده کلر در ظرفهای جمع آوری آب به کار می رود.

4. مایع مانته کننده گلسیرین بافری (pH = 9).

5. محلول پلی کلونال آنتی بادی مورد استفاده در روش فلوئورسنس مستقیم (برای لژیونلا) که به طور تجاری در دسترس است. مانند کنژوگه پلی کلونال پلی والان که می تواند سروگروپهای 1 تا 6 لژیونلا را شناسایی نماید.

ه) میکروسکوپ و ابزارهای مرتبط

1. میکروسکوپ فلوئورسنس با یک سیستم فیلتر شناسایی فلوئورسین ایزوتیوسیانات و فیلترهایی که در طول موج 490-520 نانومتر حداکثر ارتقای الکترونی را صورت می دهند.

2. میکروسکوپ استرئوسکوپیک؛

3. روشن کننده یا ایلومیناتور (برای نوردهی مایل) مانند روشن کننده با کندانسور ثابت؛

4. اسلایدهای میکروسکوپ فلوئورسنس که حداقل 2 دایره 10 میلی متری داشته باشد.

ملاحظات پیش از آزمایش

نمونه های برداشت شده

الف) مکان برداشت نمونه و انتخاب آن

1. مکان های نمونه برداری باید براساس اطلاعات اپیدمیولوژیک انتخاب شود که به طور عمده شامل منابع بالقوه آب و بیماران است.

2. فهرست منابع آبی که ممکن است حاوی گونه لژیونلا برای انتخاب محل نمونه برداری باشند، عبارت اند از:

؛ سیستم های عمومی آب آشامیدنی در بیمارستان:

— گرم کننده های آب،

— مخازن نگاه دارنده آب؛

؛ خروجی های 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،

— مرطوب کننده ها،

— یخ و یخ سازها،

— سیستم های چرخش آب حاوی رسوب، مانند رادیاتورهای آبی.

ب) جمع آوری نمونه ها

دو نوع نمونه که در مراحل ابتدایی باید از سیستم های آب آشامدنی جمع آوری شود، شامل یک سواب و یک لیتر نمونه آب در هر مکان است. در نمونه های آبی که تعداد بسیار پایینی لژیونلا دارد ممکن است به برداشت حجم های بیشتری از آب (10-1 لیتر) نیاز باشد.

بهتر است سوابها برای ارگانسیم های کلنیزه شده در بخش های انتهایی سیستم توزیع آب استفاده و نمونه ها از مناطق مختلف سیستم لوله کشی داخلی یا سطوح برج های خنک کننده گرفته شوند. در صورت لزوم، برداشت از مخزن ذخیره آب گرم به شرح ذیل انجام شود:

1. 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 حرکت می‌دهید).
- ؛ سواب‌های برداشت‌شده را مستقیم روی محیط انتخابی لژیونلا از طریق استریک متقاطع کشت می‌دهیم (می‌توانید استریک متقاطع را با یک سواب استریل تازه ادامه دهید).
- ؛ نگهداری و حفظ رطوبت سواب‌ها برای کارهای تکمیلی ضروری است. بنابراین، قراردادن سواب‌های برداشت‌شده در حجم کمی از نمونه آب اصلی برداشت‌شده (در همان زمان) بسیار مفید است. در ضمن، می‌توان سواب‌ها را در یخچال نگهداری نمود.

2. نمونه‌های آب

- ؛ پس از برداشت نمونه‌ها توسط سواب، باید 1 لیتر نمونه آب موردنظر را در ظرف استریل جمع نمود (تکنیک جمع‌آوری آسپتیک باشد).
- ؛ ظرف‌های جمع‌آوری نمونه 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 خشتی‌کننده کلر مانند سدیم تیوسولفات در ظرف استفاده کرد (0/83 سی سی سدیم تیوسولفات 0/1 نرمال به‌ازای هر لیتر آب کلردار).
- ؛ برای حمل نمونه‌ها به آزمایشگاه باید از ظرف‌های عایق‌بندی برای جلوگیری از مجاورت با حرارت بسیار بالا استفاده کرد.

؛ اگر نمونه‌های آب در همان روز انجام کشت آماده‌سازی نمی‌شوند، بهتر است نمونه در یخچال و دمای 4°C نگهداری شود تا از رشد بی‌رویه سایر باکتری‌ها و سوش‌های لژیونلا ممانعت شود. آماده‌سازی نمونه برای آزمایش باید در سریع‌ترین زمان ممکن صورت گیرد (حداکثر 48 ساعت پس از نمونه‌گیری).

3. نمونه مخزن‌های ذخیره آب

- ؛ 5-10 سی سی اول آب این مخزن‌ها باید به سرعت داخل یک ظرف استریل مناسب جمع شود. این نمونه منعکس‌کننده آب را که داخل لوله‌ها است.
- ؛ پس از خروج آب به مدت 30 ثانیه، نمونه دیگری از آب را (50-10 سی سی) در یک ظرف استریل مناسب جمع می‌کنیم. این نمونه آب منعکس‌کننده آب داخل مخزن است.
- ؛ هر دو نمونه بالا باید مستقیم روی پلیت‌ها کشت داده شود.

ملاحظات حین آزمایش

کنترل کیفی و اطمینان کیفیت

الف) محیط‌های کشت تجاری و آماده استفاده

بر اساس توصیه زیرکمیته بین‌المللی استانداردهای آزمایشگاهی (NCCLS)¹، آزمایش مجدد کنترل کیفی روی محیط‌های تجاری آماده مصرف لازم نیست و این استانداردها باید توسط شرکت سازنده رعایت شود.

1. از سال 2005 نام NCCLS به CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) تغییر یافته است.

ب) محیط‌های کشت ساخته‌شده در آزمایشگاه

هر ردیف ساخت این محیط‌های کشت باید از نظر pH و توانایی رشد لژیونلا کنترل کیفی شود. موارد قابل کنترل شامل موارد ذیل هستند:

1. اندازه‌گیری pH

؛ pH محیط کشت باید حدود $6/9 \pm 0/05$ باشد (بسیار اهمیت دارد).

؛ pH محیط‌های کشت جامد با استفاده از الکترودهای سطحی کنترل می‌شود (در صورت در دسترس بودن). می‌توان مقداری از آگار محیط را با آب مقطر در یک پلیت به صورت امولسیفیه درآورد و سپس، pH را با pH متر اندازه‌گیری نمود.

؛ اگر pH محیط در محدوده قابل‌قبول (۶ تا ۸) باشد، محیط را با آب مقطر (یا اسید کلریدریک 1 نرمال یا پتاس 1 نرمال) شست.

2. کنترل رشد لژیونلا روی محیط کشت غیرانتخابی

؛ سوش لژیونلا پنوموفیلا داخل آب مقطر استریل برده‌شود تا کدورتی معادل استاندارد 0/5 مک‌فارلند به‌دست آید. NCCLS برای کنترل کیفی محیط‌های کشت انتخابی، لژیونلا پنوموفیلا (ATCC-33152) یا لژیونلا بوزمانی¹ (ATCC-33217) را پیشنهاد می‌کند.

؛ با مخلوط کردن باکتری در فسفات بافر سالین استریل یک سوسپانسیون رقیق‌شده تهیه و سپس هر پلیت به میزان 10 لاند (توسط لوپ کالیبره) تلقیح شود تا کلنی معادل کانت 1.000-10.000 باکتری در پلیت به‌دست آید. پلیت‌ها در انکوباتور 35 درجه (با رطوبت محیطی حدود 50 درصد) انکوبه شود. اگر کلنی‌های ایزوله‌شده روی محیط کشت حاصل نشد، سوسپانسیون را 10 برابر رقیق‌تر کرده و پلیت‌ها مجدد تلقیح شود.

؛ بررسی روزانه محیط کشت، در صورتی که غلظت بالایی از باکتری به داخل پلیت تلقیح شده‌باشد. رشد اولیه پس از 24 ساعت قابل مشاهده است و

1. Legionella Bozemanii

کلنی‌های ایزوله در طول 2-3 روز پس از کشت به‌طور ماکروسکوپی قابل تفکیک خواهند بود. در صورتی که سوسپانسیون اولیه منجمد یا در یخچال نگهداری شود، قابلیت رشد آن کاهش خواهد یافت.

3. محیط کشت انتخابی مناسب

NCCLS در ارتباط با کنترل کیفی محیط‌های کشت انتخابی با هدف سنجش توانایی مهارت محیط انتخابی لژیونلا هیچ‌یک از ارگانسیم‌های ATCC را پیشنهاد نکرده‌است و روش استاندارد در این ارتباط وجود ندارد. در صورت امکان محیط انتخابی لژیونلا را باید با استفاده از نمونه آب محیطی کنترل کرد که حاوی لژیونلا باشد.

4. کنترل عدم آلودگی

پلیت محیط کشت تلقیح‌نشده برای کنترل استریلیتی انکوبه (35°C) و عدم رشد باکتری را بررسی کنید.

ج) کنترل کیفی معرف‌ها

معرف آنتی‌بادی فلونورسنت

1. باید با کنترل مثبت و منفی روزانه بررسی شود تا عدم آلودگی معرف رنگ‌آمیزی و سایر معرف‌ها با لژیونلا تأیید شود.
2. اسمیر کنترل مثبت باید جداگانه تهیه‌شود تا احتمال انتقال آلودگی ناشی از مجاورت (carryover) کنترل مثبت به نمونه‌ها کاهش یابد (مثبت کاذب).

د) اطمینان کیفی (QA)¹

گزارش تمام موارد جداشده لژیونلا در بیمارستان باید به اطلاع ICC (کمیته کنترل عفونت بیمارستان) رسانده شود.

1. Quality assurance

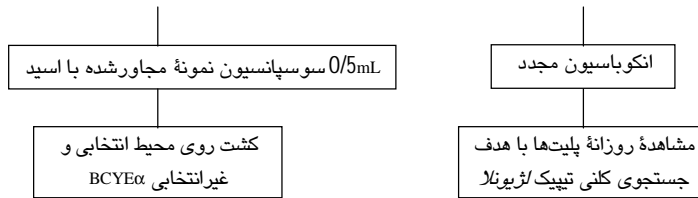
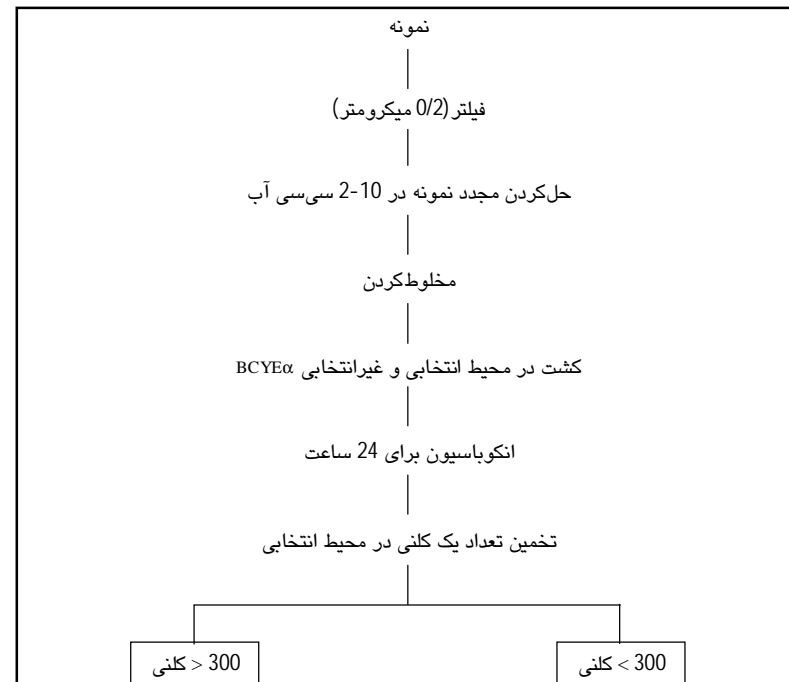
آماده‌سازی نمونه‌ها

الف) تغلیظ از طریق فیلتراسیون (آب آشامیدنی)

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

1. توسط یک فیلتر (47mm) استریل قیفی با اندازه سوراخ 0/2 میکرومتر نمونه آب را فیلتر می‌نماییم. غشاهای دارای منافذ موئینه ارجحیت دارند، مانند فیلتر نوکلی‌پور (Nuclepore) از جنس پلی‌کربنات که به علت منافذ ظریف یکسان بسیار مناسب است.

نمودار 8-1: تغلیظ با فیلتراسیون



2. فیلتر را به سرعت با پنس استریل خارج می‌کنیم و از سمت آغشته آن داخل یک لوله استریل سانتریفیوژ با حجم 50 سی سی قرار می‌دهیم که حاوی 10-2 سی سی از نمونه اصلی است.
3. اگر بیش از یک فیلتر برای تغلیظ یک نمونه نیاز باشد، همه فیلترها را داخل یک لوله قرار می‌دهیم.

ب) پلیت‌گذاری مستقیم¹ برای آب و رسوبات غیرآشامیدنی

نمونه‌هایی به جز آب آشامیدنی نظیر آب غیراستریل سیستم‌های رطوبت‌زا به تغلیظ نمونه نیازی ندارد. 10 سی سی نمونه آب را داخل لوله سانتریفیوژ 50 سی سی می‌ریزیم و آب را آماده می‌نماییم.

ج) یکنواخت کردن نمونه‌های آب تغلیظ شده و تغلیظ نشده

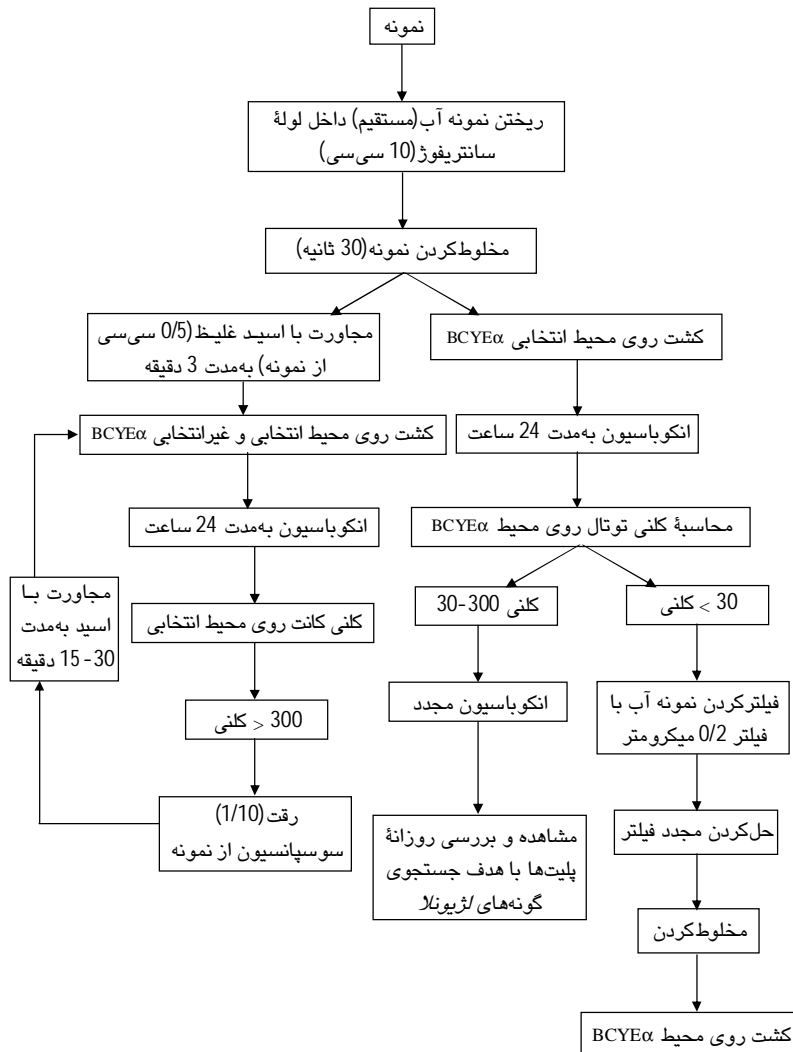
سرپیچ لوله‌های سانتریفیوژ حاوی نمونه آب را محکم و سپس به مدت 30 ثانیه خوب مخلوط می‌کنیم تا ارگانیسم‌های موجود در نمونه آب که مجتمع هستند، به طور کامل باز و پراکنده شوند.

1. Direct plating

د) نمونه آب حاصل از تغلیظ و اضافه کردن اسید

1. 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=2 آماده شوند.
2. 0/5 سی سی از آب مرحله ج را با 0/5 سی سی معرف اسیدی داخل لوله در پیچ‌دار استریل مخلوط می‌کنیم (pH نهایی باید حدود 2-2/2 باشد).
3. منتظر می‌مانیم تا مخلوط اسیدی شده به مدت 3 دقیقه در حرارت اتاق بماند. این زمان می‌تواند به مدت 15-30 دقیقه ادامه یابد، به ویژه زمانی که رشد کلنی بالای 300 عدد در مجاورت 3 دقیقه‌ای در مرحله اول به دست آمده باشد.

نمودار 8-2: کشت مستقیم پلیت‌ها



کشت نمونه‌ها روی پلیت

الف) نمونه تغلیظ‌شده به طریق فیلتراسیون

این نمونه‌ها را بدون مجاورت با اسید کشت می‌دهیم.

ب) نمونه‌های پلیت‌گذاری مستقیم

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

ج) روش کار

1. 0/1 سی سی سوسپانسیون نهایی نمونه آب را در پلیت (BCYE) غیرانتخابی و انتخابی (نظیر GPVA یا DGPV) تلقیح می‌کنیم. برای جداسازی ارگانسیم‌هایی با مورفولوژی مشابه کلنی لژیونلا از بلاد آگار استفاده می‌کنیم. در مواردی که انتظار داریم گونه‌هایی به جز لژیونلا پنوموفیلا وجود داشته‌باشد، از دو پلیت اضافی (BCYE) (انتخابی و غیرانتخابی) حاوی آلبومین (1 درصد) استفاده می‌کنیم به خصوص برای گونه‌های لژیونلا میکدادی¹ و لژیونلا بزممانی محیط حاوی آلبومین (α BCYE) ارجح است.
2. آب تلقیح‌شده را با میله شیشه‌ای یا پلاستیکی استریل در سطح پلیت پخش می‌کنیم.

د) ذخیره‌سازی نمونه‌ها

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

1. *Legionella Micdadai*

انکوباسیون

همه پلیت‌ها باید در حرارت 35°C و رطوبت بالای 50 درصد به مدت حداکثر 10 روز انکوبه و روزانه بررسی شوند. جار شمع‌دار یا انکوباتور مرطوب با CO_2 2-5 درصد نیز قابل قبول است.

ارزیابی و تفسیر کشت

الف) شمارش باکتری

پس از 24 ساعت انکوباسیون پلیت‌های اولیه باید بررسی شوند تا کیفیت آماده‌سازی هر سری از نمونه‌ها تعیین شود. پلیت‌های با تعداد کلنی 300-30 عدد مناسب هستند.

1. نمونه‌های اصلی (پلیت‌گذاری مستقیم)

- ؛ اگر در نمونه مجاورشده با اسید و روی محیط انتخابی (BCYE) بیش از 300 کلنی غیر از لژیونلا رشد کند، باید نمونه آب نگهداری‌شده در یخچال را $\frac{1}{10}$ رقیق و پروسه مجاورت با اسید (30-15 دقیقه) را تکرار نمود. سپس مجدد کشت داد تا از رشد باکتری‌های غیر لژیونلا ممانعت شود.
- ؛ اگر شمارش کلی نمونه آب بدون اضافه‌شدن اسید کمتر از 30 عدد کلنی روی محیط (BCYE) باشد، نمونه اصلی اولیه به روش فیلتراسیون تغلیظ و کشت مجدد شود.

2. نمونه اصلی تغلیظ‌شده به روش فیلتراسیون

- ؛ اگر شمارش کلی نمونه تغلیظ‌شده با فیلتر روی محیط انتخابی بیش از 300 کلنی باشد، باید نمونه سوسپانسیون که در یخچال نگهداری شده‌است را مجدداً با اسید (30-15 دقیقه) مجاور و به روش پلیت‌گذاری مستقیم کشت مجدد دهیم.

اگر شمارش کلی نمونه آب کمتر از 300 کلنی (روی محیط BCYE) باشد، انکوباسیون مجدد همان پلیت‌ها توصیه می‌شود.

ب) بررسی کشت‌ها از لحاظ لژیونلا

1. پس از انکوباسیون اولیه (24 ساعت اول) همه کشت‌ها روزانه با استرئومیکروسکوپ ارزیابی می‌شوند تا وجود کلنی‌های سفید خاکستری لژیونلا با ظاهر خاص و زمینه شیشه‌خرده تأیید شود.
2. با استفاده از یک نیدل به‌طور آسپتیک از کلنی‌های مشکوک برمی‌داریم و روی محیط‌های BCYE آگار یا BCYE α بدون سیستمین کشت می‌دهیم. اگر محیط آگار BCYE بدون سیستمین در دسترس نبود، می‌توان در مواردی از محیط بلاد آگار استفاده نمود. زیرا برخی انواع لژیونلا در نبود سیستمین توانایی رشد روی محیط بلاد آگار را دارند، هرچند برای اولین جداسازی به سیستمین نیازمند هستند.
3. هر پلیت را از ناحیه تلقیح‌شده با لوپ استریک و تا 48 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 (3-5 روز) روی محیط آگار BCYE با رنگ سفید - خاکستری درخشان، محدب با اندازه 1-4 میلی‌متر، گرد با حاشیه کامل و ظاهر شیشه‌خرده‌ای هستند. باکتری روی محیط BCYE آگار بدون سیستمین یا بلاد آگار گوسفند رشد نمی‌کند. کلنی‌های اولیه انعکاس

رنگین‌کمانی سبزآبی یا صورتی دارند و کلنی‌های کهنه به رنگ سفید مایل به کرم و بدون انعکاس رنگین‌کمانی هستند.

استرئومیکروسکوپ: قادر است با تابش قوی و مایل نور، کلنی‌های با ظاهر شیشه‌خرده‌ای را که از ویژگی‌های لژیونلا است، به‌خوبی نشان دهد.

استحکام کلنی: کلنی‌های رشته‌ای لژیونلا به‌سختی از سطح پلیت جدامی‌شوند و در هنگام کشت مجدد یکنواخت استریک نمی‌شوند.

د) فلوتورسنس کلنی

پلیت BCYE با کلنی‌های مشکوک لژیونلا را در طول موج 366 نانومتر با لامپ اولترا و یوله بررسی می‌کنیم. برخی گونه‌های لژیونلا کلنی‌های با اتوفلوتورسنس رنگ قرمز درخشان یا سفید مایل به آبی درخشان دارند.

E توجه: لژیونلا پنوموفیلا شایع‌ترین گونه جداشده لژیونلاها و فاقد فلوتورسنس خودبه‌خودی است.

رنگ‌آمیزی گرم

برای رنگ‌آمیزی گرم کلنی‌های مشکوک به لژیونلا بهتر است از رنگ مخالف کاربول فوشین به‌جای سافرانین استفاده کرد؛ زیرا سافرانین رنگ صورتی بسیار ضعیفی ایجاد می‌کند.

باکتری لژیونلا باسیل گرم منفی کوچک به طول 2-1 میکرون و عرض 0/5 میکرون است که بسته به شرایط فیزیولوژیک رشد برخی از این باکتری‌ها پلئومورفیک (چندشکلی) است و گاهی طول آنها به 20 میکرون هم می‌رسد.

روش‌های تأییدی شناسایی لژیونلا

مهم‌ترین روش‌های تأییدی برای لژیونلای احتمالی ایمونوفلوئورسنس و آنالیز اسیدهای نوکلئیک است. زمانی که این تکنیک‌های تأییدی در آزمایشگاه در دسترس نیست، می‌توان از آزمایش‌های بیوشیمی استفاده کرد و سوش لژیونلای احتمالی را برای تشخیص نهایی و تعیین سب‌تایپ به آزمایشگاه مرجع ارسال نمود. برای تأیید منبع شیوع عفونت بیمارستانی ناشی از لژیونلا پنوموفیلا و با توجه به تنوع و گستردگی سب‌تایپ‌های گونه لژیونلا پنوموفیلا که از منابع مختلف نظیر بیماران و محیط جدامی‌شوند، تعیین سب‌تایپ گونه 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 وجود دارد، 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:

1. با استفاده از سوسپانسیون نمونه آب دو دایره 10mm روی دو چاهک لام میکروسکوپ فلئورسنس را پر می‌کنیم.

؛ اگر تغلیظ ماده اولیه (آب) ضروری باشد، 100 سی سی از نمونه را در دور 3500g به مدت 30 دقیقه در حرارت اتاق سانتریفوژ می‌نماییم.

؛ رسوب را در آب مقطر یا آب دیونیزه یا بافر فسفات سالین استریل مجدد حل می‌کنیم (pH 7/6).

2. گسترش نمونه‌ها را در مقابل هوا خشک می‌کنیم.

3. گسترش‌ها را به سرعت از روی شعله عبور می‌دهیم تا با حرارت ملایم ثابت شود.

4. لام را با فرمالین 1 درصد استریزه شده با فیلتر، به مدت 10 دقیقه مجاور می‌کنیم.

5. لام را با بافر فسفات سالین استریزه شده با فیلتر (pH 7/6) می‌شوئیم.

ب) تأیید کشت (آماده‌سازی گسترش)

1. در شرایط آسپتیک کلنی مجزای مشکوک به لژیونلا را برداشت و در یک لوله آزمایش محتوی 1-0/5 سی سی سالین - فرمالین 1 درصد استریل، کدورتی معادل استاندارد 0/5 مک‌فارلند تهیه می‌کنیم. کدورت‌های بیش از 0/5 مک‌فارلند باعث کاهش فلئورسنس می‌شود که به دلیل پدیده پروزون ناشی از تعداد زیاد باکتری است.

2. با استفاده از پپیت پاستور 2-1 قطره از سوسپانسیون را داخل چاهک اسلاید ریخته و سپس دور می‌ریزیم به طوری که یک لایه نازک از سوسپانسیون روی چاهک باقی‌ماند.

3. گسترش‌ها را در مجاورت هوا خشک می‌کنیم.

4. با عبور دادن سریع از روی شعله، لام‌ها را با حرارت ثابت می‌نماییم.

ج) روش رنگ آمیزی فلئورسنس

1. معرف آنتی‌بادی فلئورسنت لژیونلایی را روی گسترش می‌ریزیم تا کاملاً آن را بپوشاند. کنژوگ‌های پلی‌کلونال از منوکلونال بهترند؛ زیرا توان شناسایی گونه‌های محیطی لژیونلا را دارند.

2. دستورات سازنده را در ارتباط با زمان انکوباسیون حرارت و شستشو به دقت رعایت می‌کنیم (آب مورد استفاده توسط فیلتر 0/2µm استریلیزه شود).

3. اسلایدها را در مجاورت هوا خشک می‌کنیم.

4. 2-3 قطره مایع مونته‌کننده را روی اسلاید اضافه می‌کنیم و سپس روی آن را با لامل می‌پوشانیم.

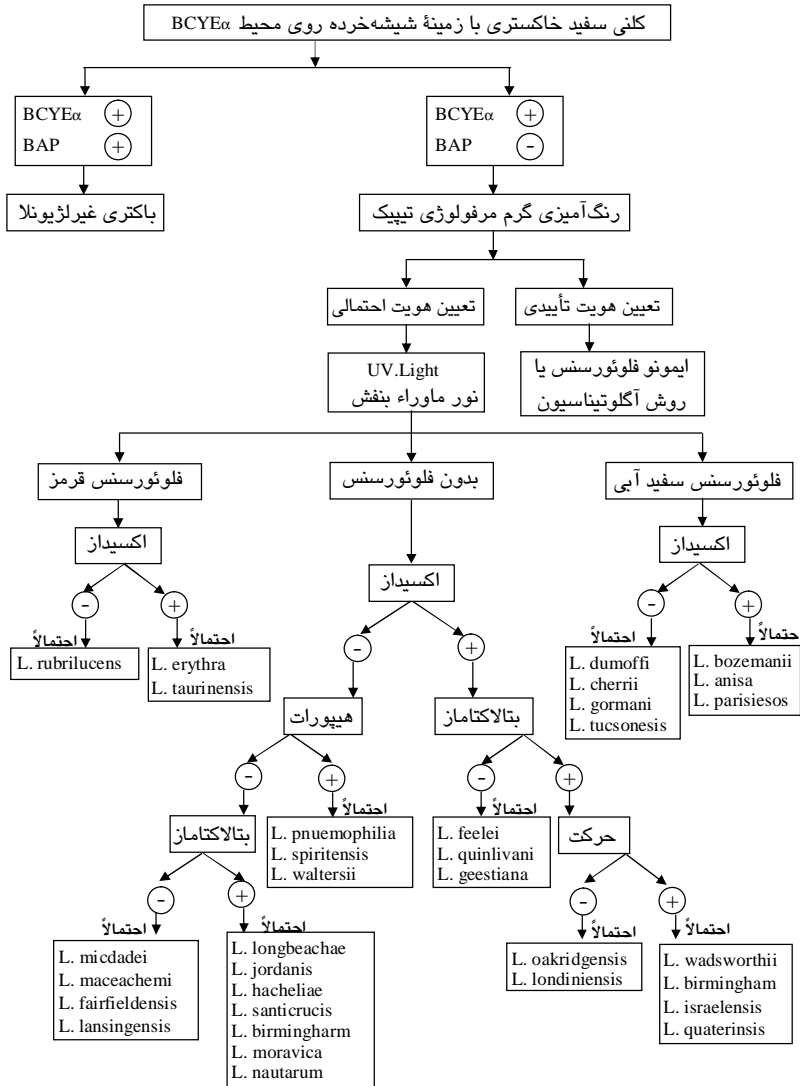
د) آزمایش لام‌های رنگ‌آمیزی شده

1. مشاهده لام‌ها با میکروسکوپ فلوروسنس با فیلتر شناسایی ایزوتیوسیانات؛
2. استفاده از عدسی‌های 10x و 40x برای جستجو و غربال باسیل‌های فلوروسنت در سطح لام؛
3. استفاده از عدسی‌های 63x و 100x (oil) برای تأیید مرفولوژی باکتری‌ها؛
4. مرفولوژی تیپیک لژیونلا با آنتی‌بادی فلوروسنت: کوکوباسیل کوتاه از نمونه مستقیم آب یا باسیل‌های رشته‌ای طولی از کشت که فلوروسنت سبز درخشان (3⁺-4⁺) در دیواره باکتری و تیره‌تر در نواحی مرکزی دارند.
5. ارگانسیم‌هایی که شدت فلوروسنت کمتر از 2⁺ دارند و مرفولوژی تیپیک لژیونلا را نشان نمی‌دهند، به‌عنوان نتیجه منفی در آزمایش آنتی‌بادی فلوروسنت گزارش می‌کنیم.

ه) پیگیری آزمایش‌ها

باکتری لژیونلا با مشخصات واضح که توسط کنژوگه پلی‌والان رنگ‌آمیزی شده‌باشند، باید با آنتی‌بادی‌های اختصاصی برای تعیین گونه و سرگروه بررسی شوند.

نمودار 3-8: شناسایی فامیل لژیونلاها



Reference

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

هستند. اگرچه این باکتری‌ها اندوتوکسین تولید نمی‌کنند، ولی در مقابل عوامل ضد عفونی کننده مقاوم هستند.

بیماران تحت دیالیز در معرض واکنش‌های تب‌زای ناشی از اندوتوکسین، باکتری می‌توأم با سپسیس و سندروم‌های مزمن التهابی هستند. این واکنش‌ها ممکن است 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 تدوین شوند که شامل دفعات نمونه‌برداری و روش‌های آزمایش کمی است. در ادامه، درخصوص اندازه‌گیری اندوتوکسین نیز توضیح داده خواهد شد که اغلب توسط آزمایشگاه‌های مرجع انجام می‌گیرد.

ملاحظات پیش از آزمایش

تعداد و زمان نمونه‌برداری

نمونه‌برداری از آب دیالیز باید برای شمارش تعداد باکتری‌ها انجام گیرد. بررسی باکتریولوژیکی آب باید از قسمت‌های مختلف دستگاه همودیالیز انجام شود:

1. منبع آب،
2. از قسمت انتهایی سیستم سبک‌کننده آب،
3. از قسمت انتهایی کارتریج شارکول فعال شده،
4. از قسمت انتهای اسموز معکوس،
5. آب خروجی از سیستم همودیالیز.

ابتدا محل نمونه‌گیری را ضد عفونی کنید و از آبی که در جریان است نمونه بردارید. حجم نمونه برداشت شده نباید از 1ml کمتر باشد و باید در ظرف استریل جمع شود. آب را باید سریعاً کشت داد و در صورت نبود امکان کشت سریع، می‌توان آن را حداکثر تا 24 ساعت در دمای 4°C نگهداری کرد.

فصل نهم

کشت و اندازه‌گیری اندوتوکسین مایعات همودیالیز و دیالیز صفاقی

تعداد افرادی که به نارسایی مزمن کلیه دچار می‌شوند و به همودیالیز احتیاج پیدا می‌کنند در سال‌های اخیر افزایش چشمگیری پیدا کرده‌است به طوری که در هر سال 7-10 درصد به تعداد آنها افزوده می‌شود. بیمارانی که تحت دیالیز قرار می‌گیرند سیستم ایمنی ضعیف شده دارند که آنها را در مقابل بیماری‌های عفونی مستعد می‌سازد. یک دستگاه همودیالیز از یک منبع تهیه آب، سیستم مخلوط کردن 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 متصل می‌شود و خون از طریق آن پمپ شده و پس از عبور از غشای دیالیز مواد زائد خون گرفته می‌شوند. اگرچه پیشرفت‌های زیادی به‌ویژه در اواخر دهه 1960 و اوایل دهه 1970 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 *اسیتوباکتر*، *الکالی ژنز*، *آنروموناس*، *فلاوباکتریوم*، *پسودوموناس*، *سراشیا* و *استنوتروفوموناس* شایع‌ترین باکتری‌هایی هستند که می‌توانند در آب رشد و تکثیر نمایند و موجب مشکلاتی در سیستم همودیالیز شوند. از باکتری‌های دیگر که می‌توانند موجب آلودگی همودیالیز شوند، مایکوباکتریوم‌های غیرسلی (مایکوباکتریوم‌های آتیبیک)

الف) نمونه برداری روتین (در شرایطی که گزارشی از آلودگی یا عفونت وجود نداشته باشد)
نمونه‌ها را برای اهداف پایشی حداقل ماهیانه جمع‌آوری نمایید.

ب) نمونه برداری مکرر

کشت‌های مکرر را تا زمانی انجام دهید 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 کشت دهید تا نتیجه قابل قبول حاصل شود.

ج) نمونه برداری موردی

زمانی که علائم بالینی بیمار نشان‌دهنده واکنش‌های تب‌زا و عوارض ناشی از سپتی سمی باشد، بنا به درخواست پزشک یا مسئول کنترل عفونت‌های بیمارستانی نمونه برداری نمایید.

د) زمان نمونه برداری

باید همیشه قبل از ضدعفونی کردن سیستم تصفیه آب و ماشین دیالیز نمونه‌ها جمع‌آوری شوند. اگر سیستم به‌تازگی ضدعفونی شده باشد، قبل از نمونه برداری آن را به‌خوبی آبکشی کنید. همچنین، مخزن ذخیره آب و قسمت توزیع‌کننده را بشویید و آبکشی کنید تا هیچ‌گونه ماده ضدعفونی‌کننده باقی نماند. کشت آب و مایع دیالیز دستگاه‌هایی که تازه نصب شده‌اند را در ابتدا هفتگی و سپس ماهیانه انجام دهید؛ مگر آنکه طبق اطلاعات به‌دست آمده به تعداد بیشتری نمونه برداری نیاز باشد.

جمع‌آوری

الف) آب دیالیز

1. نمونه را از ناحیه بعد از تصفیه آب (مانند قسمت اسمز معکوس و واحد دیونیزاسیون) برداشت نمایید.
2. اگر از مخزن‌های ذخیره آب استفاده می‌شود، از آب مخزن ذخیره نمونه بردارید.
3. از آب در محل ورود به ماشین دیالیز یا مخلوط‌کننده مرکزی نمونه بردارید.
4. اگر سیستم همودیالیز را برای همان بیمار مجدد استفاده می‌کنید، از آبی که برای آبکشی دیالیز یا در تهیه ماده ضدعفونی‌کننده برای دیالیز استفاده می‌شود نمونه بردارید.

ب) مایع دیالیز

1. پس از دیالیز، از فاضلاب خروجی دستگاه دیالیز نمونه بردارید.
2. در بعضی ماشین‌های دیالیز جدید، جریان دیالیز زمانی متوقف می‌گردد که لوله انشعاب فاضلاب از خروجی جدامی‌شود. در این‌گونه موارد، دیالیز به محل نمونه برداری خروجی مجهز است که می‌توان با سرنگ نمونه برداشت.

ج) حجم

حداقل 50ml از هر قسمت نمونه بردارید. از ظرف‌های فاقد اندوتوکسین استفاده کنید. اغلب ظرف‌های پلاستیکی استریل که به‌صورت تجاری در دسترس هستند، فاقد اندوتوکسین است.

وسایل و مواد لازم جهت شمارش پلیت

1. محیط TSA¹ را در پلیت‌های به قطر 100mm بریزید. محیط‌های کشت بلاد آگار و شکلات آگار مناسب نیستند، زیرا غنی هستند و اجازه رشد به باکتری‌های آسیب‌دیده را نمی‌دهند؛
2. اتانول 95 درصد؛
3. انکوباتور 35°C؛
4. پیپت‌های استریل با حجم‌های 10، 100 و 1000 میکرولیتر (یک سی‌سی).

1. ترکیب محیط پایه بلاد آگار بدون خون شبیه TSA است.

ملاحظات حین آزمایش

روش کار

برای تعیین و شمارش باکتری‌ها در آب همودیالیز باید از روش‌های کمی استفاده کرد. 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 میکروپشناسی بالینی وجود ندارد، از روش‌های جایگزینی استفاده می‌شود. استفاده از لوپ‌هایی که برای کشت ادرار استفاده می‌شود برای کشت آب دیالیز توصیه نمی‌شود؛ زیرا حساسیت کمتری دارند. استفاده از پیپت که بتواند 1-5ml آب را به محیط کشت انتقال دهد مناسب است. استفاده از محیط‌های خیلی غنی مانند بلاد آگار و شکلات آگار توصیه نمی‌شود. محیط کشت استاندارد برای کشت آب همودیالیز محیط TSA است. پلیت را پس از کشت دادن باید در دمای 35°C به مدت 48 ساعت انکوباسیون کرد. طولانی‌کردن زمان انکوباسیون به مدت 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 35°C به مدت 48 ساعت روش استاندارد است. ولی این روش برای رشد مایکوباکتریوم‌های غیرسلی که در آب وجود دارند و همچنین، قارچ‌ها و مخمرها مناسب نیست. از سوی دیگر، بیوفیلم‌هایی که در سطوح داخلی لوله‌ها تشکیل می‌شود، موجب می‌شود که تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌ها پنهان شوند و در کشت‌های روتین معلوم نشوند. فرآیندهای ضدعفونی کردن به ندرت موجب حذف بیوفیلم می‌شوند و افزایش سریع تعداد باکتری‌ها پس از ضدعفونی کردن ممکن است نشان‌دهنده تشکیل بیوفیلم باشد.

1. نمونه‌های آب را ابتدا با استفاده از ورتکس کاملاً مخلوط نمایید. سپس حجم‌های 100 و 1000 میکرولیتر از نمونه آزمایش را روی پلیت‌ها تلقیح کنید (برای مایع دیالیز حجم 10 میکرولیتر را هم کشت دهید) و با استفاده از یک لوپ استریل روی پلیت کشت دهید.

2. پلیت‌ها را در دمای 35°C و به مدت 48 ساعت انکوبه کنید.
3. کلنی‌ها را بشمارید و تعداد آنها را در هر میلی‌لیتر نمونه محاسبه‌نمایید. برای این کار پلیت‌های با شمارش کلنی بین 30-300 را در نظر بگیرید.
4. تعیین هویت ارگانیسیم‌ها ضرورت ندارد (در بعضی از موارد تعیین هویت مشکل است). می‌توان پلیت‌ها را برای مطالعات بعدی باکتریولوژیک به مدت یک هفته نگهداری کرد.
5. تعداد کلنی‌ها را به صورت واحد تشکیل‌دهنده کلنی (CFU) در هر میلی‌لیتر گزارش‌نمایید.
6. توجه: فیلتراسیون غشایی روشی توصیه‌شده برای آزمایش مایع همودیالیز است. روش‌های نمونه‌برداری تجاری نیز برای آزمایش وجود دارند، ولی نباید از آنها به عنوان جایگزین روش‌های متداول و فیلتراسیون غشایی استفاده کرد.

تفسیر

الف) مایع دیالیز

میزان بروز واکنش‌های تب‌زا در بیمارانی که تحت دیالیز هستند به تعداد ارگانیسیم‌های حمام دیالیز بیمار بستگی دارد. براساس این مطالعات معیار کمتر از 2000CFU را برای مایع دیالیز در نظر گرفتند. استاندارد مایع دیالیز در سال‌های آینده تغییر خواهد کرد.

ب) آب مورد استفاده در دیالیز

شمارش تعداد باکتری در آب مورد استفاده همودیالیز در مقایسه با مایع دیالیز پایین‌تر و باید کمتر از 200CFU در هر میلی‌لیتر باشد. با این‌همه، در استانداردهای جدید پیشنهاد شده است معیار 50CFU در نظر گرفته شود.

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 گزارش کنید. وقتی تعداد کلنی‌ها در آب مورد استفاده برای همودیالیز بیش از 200CFU و در مایع همودیالیز بیش از 2000CFU باشد، سریعاً به مسئول بخش همودیالیز یا پزشک مسئول کنترل عفونت گزارش‌نمایید. برای شمارش کلنی بیش از 50CFU در آب به کارکنان فنی در خصوص تصفیه آب تذکره دهید. نتایج نهایی آزمایش‌ها را به کمیته کنترل عفونت بیمارستان و مدیر پرستاری واحد همودیالیز که مسئول تضمین کیفیت است گزارش دهید.

آزمایش اندوتوکسین باکتریال

اندوتوکسین‌ها، لیپوپلی‌ساکارید (LPS) غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی هستند که قسمت توکسیک آن لیپید A است. زیر واحد پلی‌ساکاریدی آن به علت حلالیت در آب در سمیت اندوتوکسین دخالت دارد. اندوتوکسین ممکن است موجب تب، لکوپنی و در موارد شدید شوک و مرگ شود. آستانه واکنش تب‌زایی اندوتوکسین 5 واحد توکسین به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن است (تزریق داخل وریدی). اندوتوکسین مایعات همودیالیز در پدیده‌ای که امروزه به نام سندروم واکنش التهابی نامیده می‌شود دخالت دارد. آزمایش لیمولوس آمبوسیت لیزات¹ برای تشخیص اندوتوکسین از مشاهده اثر عفونت‌های باکتری‌های گرم منفی در خرچنگ نعل‌اسبی که به انعقاد داخل عروقی منجر می‌شود، منشاء گرفته است. امروزه مشخص شده است که این واکنش به‌واسطه آنزیمی است که توسط اندوتوکسین کاتالیز می‌شود. این پدیده به

1. Limulus Amebocyte Lysate

پیدایش آزمایش‌هایی منجر شد که برای تعیین اندوتوکسین در داروها و مواد بیولوژیک با کاربرد درمانی استفاده می‌شود.

در حال حاضر، انواع کیت‌های تجاری با روش ساده، تشکیل لخته ژل در لوله یا روش‌های تعیین کیتیک (کدورت‌سنجی یا رنگ‌سنجی) در دسترس هستند.

ملاحظات پیش از آزمایش اندوتوکسین

نمونه

1. می‌توان هر مایعی را از لحاظ وجود اندوتوکسین آزمایش کرد. بعضی ترکیبات یا محلول‌ها به‌واسطه داشتن املاح فلزات یا قدرت یونی بالا یا اسمولاریته بالا ممکن است 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 ممکن است برای این آزمایش با آزمایشگاه‌های شرکت‌های تجاری قرارداد ببندند.

2. pH نمونه باید بین 6-7/5 باشد.

3. نمونه را مانند نمونه‌ای جمع کنید که برای کشت استفاده می‌شود. در صورت استفاده از ظرف‌های شیشه‌ای، باید عاری از اندوتوکسین باشند؛ بنابراین، می‌توان آنها را به مدت 4 ساعت در دمای 180°C در داخل فور قرارداد یا از ظرف‌های پلاستیکی استریل یک‌بار مصرف استفاده کرد.

4. نمونه‌ها را می‌توان در دمای $2-8^{\circ}\text{C}$ به مدت 24 ساعت نگهداری نمود. برای نگهداری طولانی مدت یا ارجاع به آزمایشگاه مرجع می‌توان نمونه‌ها را در 20°C - فریز کرد.

وسایل و مواد لازم

می‌توان معرف‌ها و استانداردهای آزمایش اندوتوکسین را از شرکت‌های تجاری تهیه کرد.

ملاحظات حین آزمایش

روش

برای آزمایش از دستورالعمل شرکت سازنده که داخل جعبه کیت قرار دارد استفاده یا طبق دستورالعمل روش‌های اندازه‌گیری LAL به روش کیتیک عمل کنید.

کنترل کیفی

1. آزمایش باید هم‌زمان با استانداردهای رقیق‌شده انجام شود که نشان‌دهنده حساسیت نقطه نهایی (endpoint) کیت است.
2. استاندارد کنترل اندوتوکسین می‌تواند دارای نقطه نهایی 5 EU/ml-0/001 باشد که به روش بستگی دارد. روش کیتیک کمی (کدورت‌سنجی یا رنگ‌سنجی) یا روش‌های نیمه‌کمی (لخته ژل و رنگ‌سنجی).

ملاحظات پس از آزمایش

گزارش نتایج

1. اگر نتیجه آزمایش منفی باشد، هر نمونه منفی را با توجه به مقدار ماده قابل اندازه‌گیری توسط کیت گزارش نمایید که به حساسیت کیت به‌کار رفته بستگی دارد؛ مانند 0.03 EU/ml یا 0.06 EU/ml <.
2. گزارش نتایج مثبت به روش آزمایش بستگی دارد و اینکه آیا از روش‌های کیتیک کمی یا نیمه‌کمی (تشکیل لخته ژل) یا تک‌لوله‌ای (Single Tube) استفاده می‌شود. برای روش‌های کیتیک کمی EU در هر میلی‌لیتر گزارش می‌شود و برای آزمایش لخته ژل EU عیار آخرین لوله‌ای است که لخته شده و به صورت breakpoint گزارش می‌شود. اولین لوله‌ای که لخته تشکیل نشده است در

محدوده این دو نقطه قرار می‌گیرد. برای روش‌های تک‌لوله‌ای نتایج به‌صورت مساوی یا بیشتر از حساسیت لوله منفرد گزارش می‌شود؛ مانند $0.06 \text{ EU/ml} \geq$ یا $0.125 \text{ EU/ml} \geq$.

محدودیت

1. LAL یک واکنش وابسته به آنزیم است و به تنظیم pH، املاح و یون‌های دو ظرفیتی نیاز دارد. نتایج منفی به‌علت عوامل مهاری به‌معنای فقدان اندوتوکسین نیست.
2. در بعضی موارد ممکن است واکنش تسریع‌شود. مانند آلودگی با استات سلولز یا سلولز-دی یا تری‌استات که با LAL واکنش نشان می‌دهند. این موارد مانند واکنش‌دهنده با LAL محسوب می‌شوند و ضرورتاً نشان‌دهنده وجود یا فقدان اندوتوکسین نیستند.
3. در هر قسمتی که برای سنجش اندوتوکسین به‌کار می‌رود، باید استاندارد تعریف‌شود. در دستورالعمل استاندارد ملی آمریکا برای آب همودیالیز تعداد کلنی برای آب همودیالیز کمتر از 200CFU و میزان مجاز اندوتوکسین 2 EU/ml با محدودیت 1 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

1. گروه بیماران: یک درصد بیمارانی که در مرحله نهایی (End-Stage) بیماری‌های کلیوی هستند، از طریق همودیالیز یا دیالیز صفاقی یا پیوند کلیه تحت درمان قرار می‌گیرند. در سال 1998، از تعداد 346,453 بیمار مبتلا به نارسایی کلیه،

29 درصد پیوند کلیه شدند، 61 درصد تحت درمان همودیالیز و 7/3 درصد از طریق نوعی از انواع همودیالیز صفاقی تحت درمان قرار گرفتند. متداول‌ترین نوع دیالیز صفاقی دیالیز صفاقی آمبولاتوری و دیالیز مداوم گردشی است.

2. روش: مایع دیالیز از طریق یک سوند دائمی وارد صفاق می‌شود. این شیوه درمان در خانه نیز قابل اجرا است. در دیالیز صفاقی آمبولاتوری 2 لیتر مایع دیالیز همواره در حفره صفاق وجود دارد به‌نحوی که خون مداوم صاف‌شده و مایع روزانه عوض می‌شود (APD)¹. دو روش APD به‌شرح زیر رایج است:
 - 1. CAPD²: مایع دیالیز در هر روز 4 نوبت از طریق تخلیه مایع دیالیز کهنه و جایگزینی آن با مایع جدید عوض می‌شود. این عمل حدود 45 دقیقه طول می‌کشد. تعویض‌ها با فاصله در طی روز انجام می‌گیرد.
 - 2. CCPD³: در دیالیز مداوم گردشی در طول شب یک سیکل اتوماتیک وصل و تعویض در طول خواب انجام می‌شود. وقتی بیمار از ماشین جدا می‌شود، 2 لیتر از مایع دیالیز در حفره صفاق باقی‌مانده که این مقدار پس از اتصال مجدد به دستگاه در هنگام شب خارج خواهد شد.

E توجه: تمام مراحل کار باید به‌صورت آسپتیک انجام‌گیرد تا شانس آلودگی کیسه‌ها کاهش‌یابد. باوجود استفاده از روش‌های آسپتیک بروز عفونت محتمل است.

1. Ambulatory Peritoneal Dialysis
2. Continuous APD
3. Continuous Cycling Peritoneal Dialysis

نمونه**جمع‌آوری و انتقال**

1. احتیاط‌های ایمنی: کیسه دیالیز را داخل کیسه پلاستیکی بزرگ‌تری قرار دهید. این کیسه را داخل یک ظرف پلاستیکی غیرقابل نشت قرار دهید و به آزمایشگاه منتقل کنید.
2. قسمت اول و کدر نمونه را برای کشت انتخاب کنید. در بیمارانی که CCPD انجام می‌شود، ممکن است نمونه شفاف باشد. در این موارد یک نمونه مجدد پس از یک ساعت جمع‌آوری و شکل ظاهری آن را ارزیابی کنید. در 6 درصد از بیماران با کشت مثبت که دچار پریتونیت هستند، مایع دیالیز شفاف است.

شرایط انتقال

نمونه را سریعاً به آزمایشگاه منتقل کنید. اگر انتقال نمونه بیش از یک ساعت طول می‌کشد، آن را در دمای یخچال نگهداری نمایید.

آماده‌سازی

1. محتوی کیسه را 20-10 بار پشت و رو کنید تا کاملاً مخلوط شود.
2. قسمت ورودی را با بتادین ضد عفونی کنید و اجازه دهید تا خشک شود. 100 میلی‌لیتر از مایع دیالیز را بکشید و در یک ظرف درپنج‌دار 50 میلی‌لیتری بریزید.
3. شمارش تام و افتراقی سلولی را انجام دهید. اگر تعداد گلبول‌های سفید $50/\text{mm}^3$ باشد، ممکن است کشت ضرورت داشته باشد. وجود بیش از 100 گلبول سفید در میلی‌متر مکعب که حداقل 50 درصد آن PMN باشد، قویاً به نفع پریتونیت است.

4. نمونه را به مدت 15 دقیقه در 3000g سانتریفوژ کنید و مایع رویی را با احتیاط دور بریزید.
5. از رسوب آن اسمیر گرم تهیه کنید.
6. رسوب حل‌شده را در محیط‌های مناسب مانند بلاد آگار، شکلات آگار، EMB یا مکانکی، BHI، محیط‌های اختصاصی قارچ‌ها و شیشه کشت خون کشت دهید.

آزمایش میکروسکوپی**الف) رنگ‌آمیزی گرم**

1. نمونه را طبق روش فوق سانتریفوژ کنید.
2. اسمیر گرم را تهیه و در صورت مشاهده ارگانسیم سریعاً گزارش کنید.
3. رنگ‌آمیزی گرم در 40-9 درصد موارد پریتونیت مثبت است و در صورت مثبت شدن در 85 درصد موارد کشت نیز مثبت خواهد بود. با وجود آنکه رنگ‌آمیزی گرم در نهایت در 50 درصد موارد مثبت می‌شود، نتایج آن برای شروع درمان بسیار حائز اهمیت است.

ب) رنگ‌آمیزی اسید فاست

استفاده 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 ممکن است موجب پریتونیت شوند. در صورت وجود علائم بالینی و شک به پریتونیت، چنانچه نتایج کشت معمولی منفی باشد، ممکن است این میکروارگانسیم‌ها عامل بیماری باشند.

کشت

1. باکتری‌ها: نمونه را در پلیت هوازی کشت دهید و هم‌زمان از بطری‌های کشت خون استفاده کنید. 5 میلی‌لیتر از نمونه را داخل بطری‌های کشت خون تلقیح کنید. پلیت را در شرایط CO_2 5 درصد به مدت 48 ساعت انکوبه کنید.
2. عفونت بی‌هوازی در پریتونیت ناشی از CCPD و CAPD نادر است و انجام دادن کشت بی‌هوازی اختیاری است. در صورت نیاز نمونه را در محیط‌های کشت غیرانتخابی بی‌هوازی کشت دهید و به مدت 7 روز در $35^{\circ}C$ و در شرایط بی‌هوازی انکوبه نمایید. به منظور جداسازی بی‌هوازی‌های کند رشد، محیط مایع کشت نمونه‌ها باید یک هفته دیگر نگهداری شوند.

کشت موازی

- مایع دیالیز سانتریفیوژ شده هم‌زمان با کشت روتین در محیط مایکوباکتریوم‌ها و قارچ‌ها کشت داده می‌شود. این عمل زمانی اندیکاسیون دارد که اسمیر مستقیم اسید فاست یا دید مستقیم قارچ‌ها با KOH یا کالکوفلور مثبت باشد.
- ؛ مایع دیالیز تغلیظ شده به مدت 5 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

1. بیوپسی: در مواردی که کشت مایع دیالیز منفی است، ولی شک بالینی به پریتونیت مطرح است، می‌توان از بیوپسی صفاق و کشت آن استفاده نمود.
2. روش LAL و سایر آزمایش‌ها برای تعیین عوامل عفونی ممکن است به اندازه کافی حساسیت و ویژگی نداشته باشد.

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 ارگانسیم‌های مولد عفونت مشکل است و در تفسیر نتایج کشت باید به ارجحیت میکروارگانسیم‌های غیربیماری‌زای و میکروفلورای سطحی توجه داشت.

1. موارد زیر مثبت تلقی می‌شوند:

- ؛ یک یا چند کلنی از یک یا چند نوع (بر مبنای شکل ظاهری) بدون در نظر گرفتن ماهیت آنها که روی خطوط کشت یا در ناحیه کشت رشد کنند.
- ؛ یک یا چند کلنی از یک نوع که در ناحیه کشت یا خطوط کشت رشد کنند و نوع آنها با کلنی‌هایی که در خارج از ناحیه کشت یا خطوط کشت رشد کرده‌اند فرق کند.

2. موارد زیر را آلودگی در نظر بگیرید:

- ؛ کلنی‌هایی که در خارج از ناحیه کشت یا خطوط کشت مشاهده می‌شوند.
- ؛ کلنی‌هایی که در خارج از ناحیه کشت یا خطوط کشت رشد یافته باشند، ولی از لحاظ ظاهر با هم شباهت نداشته باشند.

ارزیابی کمی

تعداد کم ارگانسیم‌ها (کلنی‌ها) می‌تواند با ارزش باشد، ولی اغلب بیماران مبتلا به پریتونیت تعداد کلنی بالایی دارند. در حالت اول باید از علائم بالینی کمک گرفت.

یافته‌های مکمل بالینی

الف) شمارش سلولی

1. مایع پریتوان نرمال (CAPD):

- ؛ حاوی 100-50 گلبول سفید در هر میلی‌متر مکعب است که اغلب تک‌هسته‌ای هستند.
 - ؛ از لحاظ ظاهری شفاف است.
2. مایع دیالیز پریتوان:
- ؛ حاوی بیش از 100 گلبول سفید در هر میلی‌متر مکعب است.
 - ؛ از لحاظ ظاهری کدر است.

ب) تشخیص افتراقی

1. پریتونیت باکتریایی: پلی‌مرفونوکلترها غالب هستند و بیش از 50 درصد سلول‌ها را تشکیل می‌دهند.
2. پریتونیت مایکوباکتریایی:
 - ؛ نوتروفیل‌ها گاهی در این نوع پریتونیت دیده می‌شوند.
 - ؛ غالب موارد ارجحیت با سلول‌های تک‌هسته‌ای است.
3. پریتونیت آلرژیک: هنگامی که بیش از 10 درصد گلبول‌های سفید از نوع انوزینوفیل باشد.

علائم و نشانه‌ها

1. بیمارانی که مایع پریتوان آنها کدر یا دچار درد شکم یا تب هستند (CAPD).
2. بیمارانی که دارای مایع پریتوان کدر یا دچار درد شکم یا تب در هر مرحله از دیالیز آمبولاتوری گردشی (CCPD) هستند.

3. در موارد مشکوک مانند درد شکم یا تب چنانچه مایع دیالیز شفاف باشد، از یک مایع تعویضی دیگر بعد از 2 ساعت، کشت انجام می‌شود.

پاسخ بالینی

برای بیمارانی که بعد از 48-96 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 ممکن است به مداخله جراحی نیاز باشد، همچنین احتمال دارد که بیمار مبتلا به عفونت‌های قارچی، مایکوباکتریایی یا ارگانسیم‌های سخت‌رشد باشد.

تضمین کیفیت

1. محیط‌های کشت و معرف‌ها باید کنترل کیفی شوند.
2. کشت هم‌زمان نرمال سالین و آب مقطر استریل ضروری است.
3. تمام نتایج مثبت را به کمیته کنترل عفونت و واحد دیالیز گزارش نمایید. در صورتی که میزان عفونت افزایش ناگهانی داشته باشد یا تعداد عفونت‌های کاذب افزایش یافته باشد، باید تحقیقات بیشتری درخصوص آلودگی دستگاه دیالیز انجام شود.

Reference

1. Isenberg D. Henry: *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, American Society for Microbiology.