

## عنوان دستورالعمل:

### نحوه انجام آزمایشات میکروبیشناسی

|                                  |                   |                                |
|----------------------------------|-------------------|--------------------------------|
| کد: WIC 13-18                    | شماره ویرایش: ۱۱  | تاریخ تصویب و ابلاغ: ۱۴۰۵/۲/۲۰ |
| حوزه تولید: آزمایشگاه            | تعداد صفحه ها: ۱۸ | تاریخ آخرین ویرایش: ۱۴۰۵/۲/۱۷  |
| هدایت کننده: سوپروایزر آزمایشگاه |                   | تاریخ بازبینی بعدی: ۱۴۰۶/۲/۲۰  |

## اهداف:

معرفی اقدامات لازم برای انجام آزمایشات کشت و اسمیر در بخش میکروبیشناسی

## روش انجام کار:

### عبارتند از:

۱. روش تحویل و پذیرش نمونه و جوابدهی
۲. روش انجام کشتهای مختلف
  - ۲،۱. کشت ادرار
  - ۲،۲. کشت مدفوع
  - ۲،۳. کشت نمونه های دستگاه تنفسی فوقانی (خلط و ساکشن)
  - ۲،۴. کشت زخم و ترشحات خارجی بدن
  - ۲،۵. کشت بافت
  - ۲،۶. کشت خون و مایعات داخلی بدن
  - ۲،۷. کشت اجسام خارجی
  - ۲،۸. کشت لاواژ BAL
  - ۲،۹. کشت گلو و بینی
۳. بررسی لام ترشحات و مایعات
۴. بررسی لام قارچ
۵. روش انجام تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی
۶. روشهای تعیین مقاومت به کولیستین برای Enterobacterales و Pseudomonas aeruginosa
۷. روش انجام E-Test
۸. دستورالعمل تهیه انواع محیط های کشت، معرفها و رنگ های مصرفی در آزمایشگاه میکروب شناسی
۹. روش انجام کشت های محیطی و دست

## تعریف واژگان و کلمات کلیدی:

XLD = Xylose Lysine Deoxycholate

SF =Selenite-F

BAC TEC =Bacterial Technology (Automation Method Culture)

BAL= Broncho Alveolar Lavage

KOH =Kalium Hydroxide

CFU= Colony forming unit

AST=Antibiotic sensitivity test

Q= quantitate

ID=Identification

GS= Gram stain

M= Mixed flora

## روش انجام کار :

### ۱. روش تحویل و پذیرش نمونه :

۱.۱. تحویل گیرنده نمونه ها نمونه های مختلف ارسالی به بخش میکروبیشناسی را از جهت معیار رد یا قبول نمونه ،نام و نام خانوادگی، کد بیمار را بررسی کند.

۱.۲. هر نمونه از نظر مناسب بودن می باید ارزیابی گردد. نمونه ممکن است به دلایل زیر "رد" شود:

۱- مشخصات کامل بیمار را نداشته باشد.

۲- در شرایط نامناسب دریافت شود.

۳- آزمایش بدون ارزش تشخیصی درخواست شده باشد.

۴- نمونه آورده شده در فرمالین.

۵- نمونه خلط ۲۴ ساعته .

۶- اسمیر ترشحات دهانه رحم ، کانال واژن یا مقعد جهت رنگ آمیزی گرم برای جستجوی نایسریا گونوره آ.

۷- یک سواب تک جهت چند درخواست (مثال هوازی ، بیهوازی ،قارچی ، توپرکلوز و...)

۸- هرگونه نمونه ناکافی ، غیر استریل (به جزء مدفوع ) و نشئت داده شده از ظرف که امکان آلوده شدن و آلوده کردن را دارد.

۹- پلیتهای کشت خشک شده یا با رشد بیش ازحد که به آزمایشگاه آورده شوند.

۱۰- عدم قبول نمونه حاصل از کاتتر فولی ادرار

۱۱- نمونه های مکرر از منبع مشابه در یک روز (به جز خون که در طی ۲۴ ساعت آورده شوند).

۱۲- کاتتر خونی فردی که مشکوک به باکتری می نیست.

۱۳- نمونه سواب با درخواستهای متعدد برای ارگانیسیمهای مختلف

۱۴- نمونه خلط که در رنگ آمیزی گرم کمتر از ۲۵سلول سفید و بیش از ۱۰سلول اپیتلیال در بزرگنمایی پایین داشته باشد.

۱۵- سواب های گرفته شده و مانده بیش از ۲۴ ساعت (سواب خشک)

۱۶- سواب های گرفته شده ویخچال گذاری شده و یا بیش از یکساعت گرفته شده از واژن و گردن رحم جهت نایسریا .

۱۷- کشت خون با درخواست جهت آزمایش میکروسکوپی توپرکلوز.

۱,۳. جهت کشت بی هوازی نمونه های زیر قابل قبول نیست :

- مایع حاصل از شستشوی معده و روده (بجز در سندروم قوس کور)
- ادرار (به جز نمونه سوپراپوبیک آسپیراسیون)
- ترشحات پروستات تهیه شده از ترانس اورتال
- سوابهای ایلووستومی و کولوستومی و مدفوع (به جز جستجو برای کلستریدیومها در مسمومیت های غذایی برای کلستریدیوم ها)

- سواب های نازوفارینژیال، گلو، بینی و اوروفارینژیال و سواب لثه و خلط
- نمونه گرفته شده از محیط و پوست سطحی، سطح زخم بستر و زخمها
- سواب های واژینال و سرویکال

۱,۴. معیارهای رد یا قبول نمونه های کشت ادرار و مایعات بدن:

۱,۱,۱. نمونه ی ارسالی در ظرف غیراستریل ارسال گردد.

۳,۱,۴. حجم نمونه ارسالی کمتر از ۱CC باشد.

۴,۱,۴. قبل از انجام کشت ادرار از همان ظرف، آنالیز ادرار انجام گردد.

۵,۱,۴. مخلوط بودن نمونه ادرار ارسالی با مدفوع

۶,۱,۴. قرار گرفتن نمونه ادرار در درجه حرارت اتاق به مدت طولانی (بیشتر از ۲ ساعت)

۷,۱,۴. نمونه بدون برچسب مشخصات بیمار

برای مایعات ارسالی نیز باید ارسال نمونه مایع در ظرف استریل درپوش دار رعایت گردد. در غیر این صورت نمونه به عنوان غیراستریل قابل انجام نخواهد بود.

برای ارسال نمونه های سواب از زخم و ترشحات بهتر است نمونه سواب با ۰/۵ تا ۱ سی سی نرمال سالین استریل مخلوط گردد و بعداً به آزمایشگاه ارسال گردد. در غیر این صورت به بخش گزارش گردیده تا نمونه جدید به همراه نرمال سالین به آزمایشگاه میکروب شناسی ارسال گردد.

نمونه های مایعات ارسالی باید ظرف مدت کمتر از ۱ ساعت کشت و CSF کمتر از نیم ساعت کشت داده شوند.

۱,۵. درخواست کامپیوتری نمونه های کشت در قسمت Laboratory و قسمت Bacteriology و هر کشت بصورت جداگانه موجود است.

درخواست مربوط به هر کشت در قسمت درخواستهای وارد شده موجود می باشد که پس از کلیک کردن مربع خالی جلوی اسم بیمار آیتم تأیید موارد انتخاب شده ☒ را کلیک کرده و بدین صورت درخواست آزمایش تأیید می گردد (به قسمت نتایج گزارش منتقل می شود).

مسئول کشت نمونه مشخصات نمونه را در دفتر کشت نمونه ها ثبت می نماید.

ثبت در دفتر کشت نمونه ها بصورت وارد کردن نام و نام خانوادگی، بخش بیمار، کد بیمار، تاریخ و ساعت انجام کشت نوع آزمایش و انجام دهنده آزمایش می باشد.

جواب زدن برای نمونه های کشت بعد از ۴۸ ساعت و بافت ۷۲ ساعت و کشت خون ۵ روز است ولی در صورت مثبت شدن بلافاصله اطلاع داده شده و جواب آماده در اسرع وقت در سیستم وارد میشود.

## ۲. روش انجام کشت‌های مختلف :

کلیه کشت ها پس از استفاده از وسایل حفاظت فردی (دستکش و ماسک ) زیر هود لامینار کلاس دو انجام می شود.

### ۲.۱. کشت ادرار

۲.۱.۱. مسئول انجام کشت ،نمونه ادرار را قبل از انجام کشت بخوبی مخلوط نماید.

۲.۱.۲. کشت ادرار توسط لوپ کالیبره که استریل شده است وبعد از خنک شدن بروش زیکزاک در ۲ محیط بلادآگار و مک کانکی آگار انجام می شود.

۲.۱.۲.۱. از آنجائیکه این کشت بصورت کلنی کانت باکتری بیماریزا گزارش می شود ،مسئول انجام کشت، برای هر پلیت کشت بصورت مجزا به نمونه آغشته می نماید.

۲.۱.۲.۲. بعد از انجام کشت پلیت بلادآگار و مک کانکی آگار در انکوباتور ۳۵ درجه قرار می گیرد.

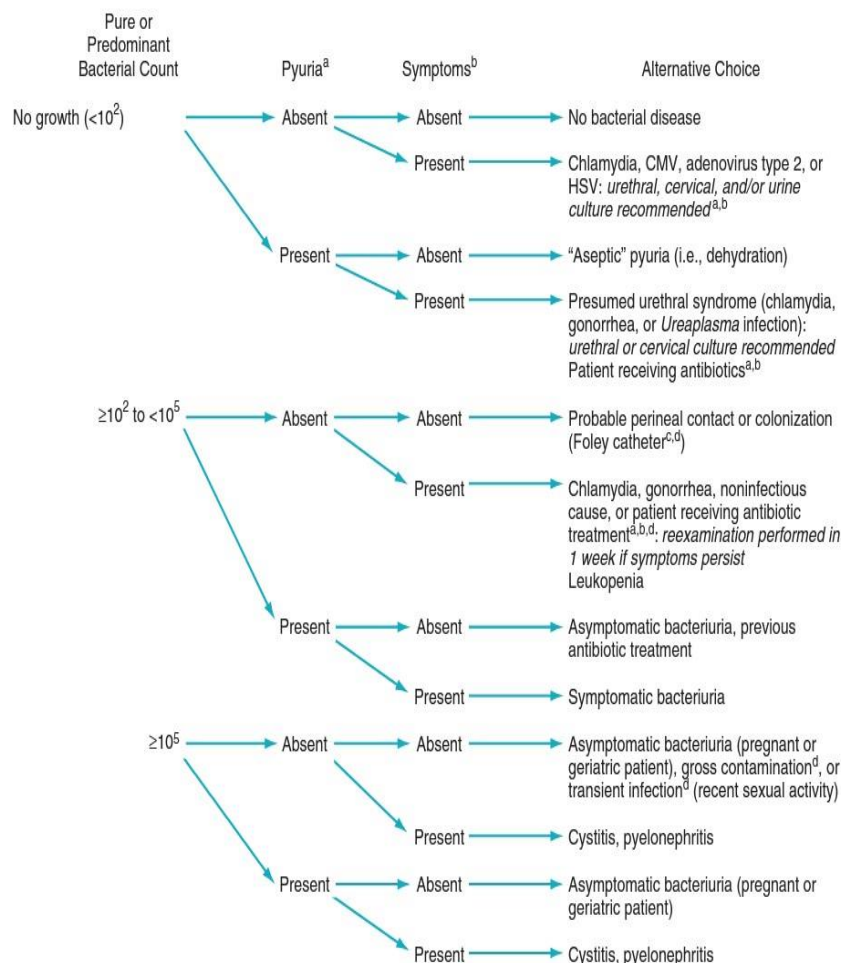
۲.۱.۲.۳. تفسیر نتایج کشت ادرار براساس تعداد باکتری، پیوری و علائم بالینی:

A- در صورتی که بیمار تحت درمان با آنتی بیوتیک است، رنگ آمیزی گرم، شمارش WBC و نتیجه کشت ممکن است قابل قبول نباشد.

B- تعداد ارگانیسم و شمارش WBC در ادرار سانتیفریوژ شده (سدیمان ادراری) ارزش مقایسه ای ندارد.

C- تفسیر برای سوند تعیین نشده است.

D- پلیت ها برای بررسی و مشورت باید تا ۷۲ ساعت نگهداری شوند



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

(۱) برای تعیین تعداد ۱۰<sup>۲</sup> کلنی در ادرار باید از لوپ ۰,۰۱ استفاده کرد .

(۲) تمیز ادرار . CV (Clean Voided)

(۳) Catheterized Straight (CA) ادرار گرفته شده توسط سوند کوتاه مدت.

(۴) Work-up: به عملیات آزمایشگاهی نیاز است. مخمر در کشت ادرار به هر تعداد که وجود داشته باشد، باید به پزشک گزارش شود (ضروری است کلنی کانت ذکر شود) و در صورتی که بیشتر از ۱۰<sup>۵</sup> مخمر در نمونه ادرار رشد کند، گونه آن را نیز باید تعیین کرد.

(۵) با توجه به جدول "تفسیر نتایج کشت ادرار" توصیه ها و اطلاعات آموزشی مفید را به پزشک پیشنهاد کنید .

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

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

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

M&Q: تعداد کل باکتریها را بشمارید و به عنوان flora urethral mixed گزارش کنید

GS&Q: شمارش گزارش ظاهری به وسیله رنگ آمیزی

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

الف) تعداد کلنی رشد یافته بیشتر از 10<sup>2</sup> CFU/ml

۱. رشد دو نوع بیماریزای ادراری احتمالی در تعداد بیشتر از 10<sup>4</sup> CFU/ml :

● شناسایی کامل و انجام دادن آزمایش حساسیت آنتی بیوتیکی روی هر دو ارگانیسم؛

● شناسایی توصیفی گونه هایی که در تعداد کمتر از ۱۰<sup>۴</sup> رشد کرده اند.

۲. رشد یک یا دو نوع باکتری آلوده کننده احتمالی در تعداد بیشتر از CFU/ml: ۱۰<sup>۴</sup>

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

نحوه گزارش :

Multiple organisms present, probable contamination, please repeat culture.

۳. رشد یک نوع بیماریزای ادراری احتمالی و یک نوع باکتری آلوده کننده احتمالی:

● شناسایی کامل روی بیماریزای احتمالی؛

● شناسایی توصیفی: باکتری آلوده کننده احتمالی براساس نوع ظاهری کلنی .

۴. رشد سه نوع ارگانیسم در نمونه:

● شناسایی توصیفی ارگانیسمها براساس شکل ظاهری کلنی .

نحوه گزارش: مانند گزارش بالایی است .

Multiple organisms present, probable contamination, please repeat culture.

ب) تعداد کلنی رشد یافته کمتر  $10^4$  CFU/mL

۱. برای بیماران تحت درمان آنتی بیوتیک، بیماران خانم مبتلا به اورتریت و مردان علامت دار شناسایی کاملو آزمایش حساسیت آنتی بیوتیکی.

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

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

● یک یا دو پاتوژن ادراری که به تعداد بیشتر یا مساوی  $10^2$  CFU/mL یافت شده اند، در صورتیکه بیمار شرایط کلینیکی مشخصی مثل سندرم حاد مثانه یا مصرف قبلی آنتی بیوتیک داشته است، باید به صورت متداول ( $<10^2$  CFU/mL) شناسایی کامل شده و گزارش شوند.

● مواردی که استافیلوکوکوس اورئوس به طور خالص و هر تعداد در محیط کشت رشد نماید، نتیجه را به پزشک گزارش نموده و باتوجه به نظر پزشک تعیین حساسیت شود.

● لاکتوباسیلوس و دیفتروئید و استافیلوکوکوس های کوآگولاز منفی در صورتیکه بیمار فاقد علائم بالینی و سوند (به خصوص CoN.Staph) باشد، نرمال فلور و با احتمال آلودگی گزارش شود.

● وجود کاندیدا در کشت ادرار به هر تعداد که باشد در آقایان به پزشک گزارش شود (ذکر تعداد کلنی ضروری است) و در بانوان با توجه به علائم بیمار گزارش شود.

## ۲.۲. کشت مدفوع :

۲.۲.۱. مسئول انجام کشت ، برای انجام کشت مدفوع از محیط های مک کانکی آگار و XLD آگار و SF براث استفاده می شود.

۲.۲.۲. از مناطقی که چرکی و خونی باشد جهت انجام کشت برداشت می شود.

۲.۲.۳. ابتدا سواب استریل را به مناطق گفته شده آغشته می کنیم ( ۱ گرم) سپس سواب آغشته را به محیط های مک کانکی آگار و XLD آگار برده بصورت کشت چهار منطقه ایی ( Streaking Method Culture ) با لوپ معمولی استریل کشت می دهیم نهایتاً سواب آغشته را به محیط SF براث منتقل می کنیم .

۲.۲.۴. بعد از انجام کشت محیط های مک کانکی آگار و XLD آگار و SF براث در انکوباتور ۳۵ درجه قرار می گیرد.

۲.۲.۵. در صورت شناسایی سویه های شینگلا و سالمونلا از کشت های مدفوع، جهت تعیین هویت باید سویه ها به آزمایشگاه مرجع سلامت ارجاع داده شوند.

## ۲.۳. کشت نمونه های دستگاه تنفسی ( خلط و ساکشن).

نمونه های دستگاه تنفسی به دو حالت ارسال می شود:

۲.۳.۱. خلط:

کشت نمونه های دستگاه تنفسی فوقانی یا اصطلاحاً خلط در چهار محیط بلادآگار و مک کانکی آگار و شکلات آگار انجام می شود.

ابتدا با استفاده از سواب استریل از نواحی چرکی و خونی برداشت کرده سپس سواب آغشته را به سه محیط بلادآگار و مک کانکی آگار و شکلات آگار بصورت کشت چهار منطقه ایی ( Streaking Method Culture ) و با استفاده از لوپ معمولی استریل کشت می دهد. گزارش باکتری ها در این نمونه ها به صورت کیفی گزارش می شود.

بعد از انجام کشت چهار محیط بالا در انکوباتور ۳۵ درجه قرار می گیرد.

پلیت شکلات آگار در جار شمع دار ( شرایط میکروآتروفیل = CO2 دار ) قرار میگیرد.

از نمونه خلط با استفاده از لوپ معمولی استریل دو عدد گسترش نازک جهت رنگ آمیزی گرم و بلودومتیلن تهیه می گردد.

## ۲.۳.۲. ساکشن (آسپیراسیون آندوتراکئال):

این نمونه ها برای تشخیص پنومونی از بیمارانی گرفته می شود که لوله گذاری شده اند. کشت این نمونه ها در چهار محیط بلادآگار و مک کانکی آگار و شکلات آگار انجام می شود.

نمونه یکنواخت شده، توسط لوپ کالیبره استریل شده با شعله به روش زیگزاگی کشت داده می شود. در این نمونه ها گزارش میکروارگانیسم ها به صورت کمی می باشد.

بعد از انجام کشت چهار محیط بالا در انکوباتور ۳۵ درجه قرار می گیرد.

پلیت شکلات آگار در جار شمع دار ( شرایط میکروآتروفیل = CO2 دار ) قرار میگیرد.

از نمونه خلط با استفاده از لوپ معمولی استریل دو عدد گسترش نازک جهت رنگ آمیزی گرم و بلودومتیلن تهیه می گردد.

## ۲,۳,۳. تفسیر رنگ آمیزی گرم در نمونه خلط:

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

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

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

## ۲,۴. کشت زخم و ترشحات خارجی بدن :

۲,۴,۱. مسئول انجام کشت ، این نمونه ها را در پنج محیط بلاداآگار و مک کانکی آگار و شکلات آگار و بلاداآگار بی هوازی و تایوگلیکولات برات کشت می دهد.

۲,۴,۲. ابتدا سواب آغشته شده به نمونه را در چهار محیط بلاداآگار و مک کانکی آگار و شکلات آگار و بلاداآگار بی هوازی بصورت کشت چهار منطقه ایی (Streaking Method Culture) و با استفاده از لوپ معمولی استریل کشت می دهد و نهایتاً سواب آغشته را به محیط تایوگلیکولات برات منتقل می کنیم .

۲,۴,۳. بعد از انجام کشت پنج محیط بالا در انکوباتور ۳۵ درجه قرار می گیرد.

۲,۴,۴. پلیت شکلات آگار در جار شمع دار ( شرایط میکروآئروفیل = CO2 دار ) قرار میگیرد.

۲,۴,۵. پلیت بلاد آگار بی هوازی در جار بی هوازی ( بدون اکسیژن با کمک گازپک نوع A ) قرار میگیرد.

## ۲,۵. کشت بافت :

۲,۵,۱. کشت بافت در داخل ظروف استریل توسط پزشک مربوطه گرفته می شود.

۲,۵,۲. کشت بافت ارسالی به مدت ۲۴ ساعت بعد از اضافه کردن محیط کشت تایوگلیکولات در انکوباتور ۳۵ درجه نگهداری می شود .

۲,۵,۳. مسئول انجام کشت، این نمونه ها را در پنج محیط بلاداآگار و مک کانکی آگار و شکلات آگار و بلاداآگار بی هوازی و سابوردکستروز آگار (در صورت درخواست بررسی قارچ) کشت می دهد.

۲,۵,۴. ابتدا سواب استریل را با محیط حاوی بافت مربوطه آغشته کرده و سپس در چهار محیط بلاداآگار و مک کانکی آگار و شکلات آگار و بلاداآگار بی هوازی بصورت کشت چهار منطقه ایی ( Striking Method Culture ) و با استفاده از لوپ معمولی استریل کشت می دهد.

۲,۵,۵. بعد از انجام کشت پنج محیط بالا در انکوباتور ۳۵ درجه قرار می گیرد.

۲,۵,۶. پلیت شکلات آگار در جار شمعدار ( شرایط میکروآنروفیل  $CO_2$  = دار ) قرار میگیرد.  
۲,۵,۷. پلیت بلاد آگار بی هوازی در جار بی هوازی ( بدون اکسیژن با کمک گازپک ) قرار میگیرد.

## ۲,۶. کشت خون و مایعات داخلی بدن:

۲,۶,۱. کلیه کشت های خون و مایعات داخلی بدن در روش اتوماتیک درون ویال های کشت BAC TEC توسط پرستار بخش یا پرسنل آزمایشگاه نمونه گیری شده و ارسال می گردد. و سپس در بخش میکروشناسی، نمونه را وارد دستگاه Bac Tec میشود.

۲,۶,۲. در صورت عدم وجود ویال های کشت خون بک تک، از ویال های دستی کشت خون استفاده می شود. حداقل ۱۰ میلی لیتر خون در ویال بزرگسال و اطفال ۵ میلی لیتر باید تزریق شود. ویال ها در بازه های زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت و یک هفته ای بر روی محیط های کشت بلاد آگار و مک کانکی و شکلات آگار و بلاد آگار بی هوازی برده می شوند تا حضور میکروارگانیسم در آنها بررسی شود.

۲,۶,۳. بعد از مثبت شدن کشت های بک تک در چهار محیط بلادآگار و مک کانکی آگار و شکلات آگار و بلادآگار بی هوازی بصورت کشت چهار منطقه ای (Streaking Method Culture) و با استفاده از لوپ معمولی استریل کشت می دهد.

۲,۶,۴. بعد از انجام کشت چهار محیط بالا در انکوباتور ۳۵ درجه قرار می گیرد.

۲,۶,۵. پلیت شکلات آگار در جار شمع دار ( شرایط میکروآنروفیل  $CO_2$  = دار ) قرار میگیرد.

۲,۶,۶. پلیت بلاد آگار بی هوازی در جار بی هوازی ( بدون اکسیژن با کمک گازپک ) قرار میگیرد.

۲,۶,۷. فرایند بررسی کشت خون ها به روش اتوماتیک به طور کل ۵ روز است (در مورد کشت های دستی این زمان ۷ روز است) که در صورت مثبت نشدن بعد از ۵ روز با توجه به اعلان دستگاه، از دستگاه خارج شده و کشت منفی تلقی میشود.

## ۲,۶,۸. تعداد کشت خون و زمان نمونه گیری:

بسته به نوع باکتریی احتمالی، سن و مصرف قبلی آنتی بیوتیک متفاوت است. به طور 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 باکتریی متناوب (Intermittent): با یک کشت خون 80 درصد و با سه کشت خون 99 درصد عامل مشخص می شود.
- 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 می شود.
- در موارد اندوکاردیت با یک نمونه خون 90 درصد و با دو نمونه خون 95 درصد عامل مشخص می شود. در کسانی که آنتی بیوتیک دریافت کرده اند بیش از 3 کشت خون نیاز است.

## تعداد و زمان خون گیری

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

2. بیماری غیرحاد: قبل از شروع درمان، 2-3 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 3 رگ جداگانه در مدت 1-2 ساعت گرفته شود.
4. اندوکاردیت تحت حاد: 3 نمونه از 3 رگ با فاصله زمانی حداقل یک ساعت طی 24 ساعت گرفته شود. اگر کشت بعد از 24 ساعت منفی بود، 2-3 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): 2-3 نمونه از قسمت‌های مختلف با فاصله زمانی حداقل یک ساعت و طی 24 ساعت گرفته شود. در صورت منفی بودن کشت در مدت 24-48 ساعت، 2-3 نمونه دیگر گرفته خواهد شد.

## ۲.۷. کشت اجسام خارجی

- ۲.۷.۱. اجسام خارجی ای که لازم به بررسی از نظر وجو باکتری و قارچ هستند در داخل ظروف استریل توسط پزشک مربوطه گرفته شده و ارسال میگردد. کشت اجسام خارجی ارسالی به مدت ۲۴ ساعت بعد از اضافه کردن محیط کشت تایوگلیکولات در انکوباتور ۳۵ درجه نگهداری می شود.
- ۲.۷.۲. مسئول انجام کشت، این نمونه‌ها را در پنج محیط بلادآگار و مک کانکی آگار و شکلات آگار و بلادآگار بی هوازی و سابوروز کستروز آگار (در صورت درخواست بررسی قارچ) کشت می دهد.
- ۲.۷.۳. ابتدا سواب استریل را با محیط حاوی جسم خارجی مربوطه آغشته کرده و سپس در چهار محیط بلادآگار و مک کانکی آگار و شکلات آگار و بلادآگار بی هوازی بصورت کشت چهار منطقه ایی (Streaking Method Culture) و با استفاده از لوپ معمولی استریل کشت می دهد.
- ۲.۷.۴. بعد از انجام کشت پنج محیط بالا در انکوباتور ۳۵ درجه قرار می گیرد
- ۲.۷.۵. پلیت شکلات آگار در جار شمعدار (شرایط میکروآنروفیل  $\text{CO}_2$  دار) قرار میگیرد.
- ۲.۷.۶. پلیت بلاد آگار بی هوازی در جار بی هوازی (بدون اکسیژن با کمک گازپک) قرار میگیرد.

## ۲.۸. کشت لاواژ BAL:

- ۲.۸.۱. مسئول انجام کشت، بعد از مخلوط کردن ویکنواخت کردن نمونه با استفاده از لوپ کالیبره که قبلاً استریل شده از نمونه برداشت کرده و در سه محیط بلادآگار و مک کانکی آگار و شکلات آگار همانند کشت ادرار بصورت زیکزاکي کشت می دهند.
- ۲.۸.۱.۱. از آنجائیکه این کشت به صورت کلنی کانت باکتری بیماریزا گزارش می شود، مسئول انجام کشت، برای هر پلیت کشت به صورت مجزا به نمونه آغشته می نماید.
- ۲.۸.۲. بعد از انجام کشت سه محیط بالا در انکوباتور ۳۵ درجه قرار می گیرد.
- ۲.۸.۳. پلیت شکلات آگار در جار شمع دار (شرایط میکروآنروفیل  $\text{CO}_2$  دار) قرار میگیرد.

## ۲.۹. کشت گلو و بینی :

۲.۹.۱. نمونه های مربوط به این آزمایش توسط پرستار یا پزشک مربوطه یا همکار آزمایشگاه با استفاده از سواب استریل از ناحیه لوزتین ( برای نمونه گلو ) و از داخل بینی نمونه گیری شده و به آزمایشگاه ارسال می گردد. لازم است که از طرف پزشک، علت بررسی این نواحی و عامل عفونی مشکوک اطلاع داده شود.

۲.۹.۲. مسئول انجام کشت، سواب آغشته به این نمونه را به سه محیط بلادآگار و مک کانکی آگار و شکلات آگار بصورت کشت چهار منطقه ای (Streaking Method Culture) و با استفاده از لوپ معمولی استریل کشت می دهد و نهایتاً سواب آغشته را به محیط تایوگلیکولات برات منتقل می کنیم .

۲.۹.۳. بعد از انجام کشت چهار محیط بالا در انکوباتور ۳۵ درجه قرار می گیرد.

۲.۹.۴. پلیت شکلات آگار در جار شمعدار ( شرایط میکروآتروفیل  $CO_2$  دار ) قرار میگیرد.

۲.۹.۵. در صورت درخواست بررسی ترشحات بینی از نظر وجود MRSA ، سواب ارسالی صرفاً در محیط کشت بلاد آگار و تایوگلیکولات کشت داده می شود.

## ۳. بررسی لام ترشحات و مایعات

۳.۱. نمونه های ارسال شده جهت تهیه لام توسط مسئول انجام کشت دو عدد اسمیر نازک جهت رنگ آمیزی گرم و بلودومتیلن تهیه می گردد. ( لازم است که نمونه هایی که به وسیله سواب نمونه گیری شده است، حتماً یک سواب مجزا برای اسمیر ارسال شود)

۳.۲. در مورد مایعات حتماً باید نمونه هایی که جهت اسمیر در لوله آورده شده است قبل از تهیه گستره به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۳۰۰۰ و اگر مایع مغزی نخاعی باشد با دور ۲۰۰۰ سانتریفیوژ شود.

۳.۳. روش رنگ آمیزی گرم و بلودومتیلن در دستورالعمل رنگ آمیزی موجود است. (رجوع شود به SOP میکروبیشناسی بخش ج فرآیند انجام آزمایش صفحه ۹)

۳.۴. در نهایت لام ها رنگ شده توسط کارشناس فنی میکروبیشناسی از نظر وجود سلولهای سفید و قرمز خونی و سلولهای اپیتلیال و باکتریهای مختلف با میکروسکوپ نوری دیده شده و در قسمت Bacteriology کامپیوتر در قسمت اسمیر گزارش می گردد.

## ۴. نمونه گیری و بررسی لام قارچ

۴.۱. بیماران مشکوک به عفونتهای قارچی توسط کارشناس فنی میکروبیشناسی پس از شستشوی محل با الکل ۷۰٪ و با کمک تیغ بیسوری نمونه گیری شده و نمونه در داخل پلیت استریل ریخته می شود.

۴.۲. نمونه در یک محیط بلادآگار و دو محیط سابرو دکستروز آگار بروش عمقی و سطحی کشت داده شده می شود. یک محیط سابرو دکستروز آگار در دمای اتاق و محیط بلادآگار و محیط سابرو دکستروز آگار دیگر در اتو ۳۵ درجه انکوبه می شود.

۴.۳. از نمونه گرفته شده توسط کارشناس فنی میکروبیشناسی با استفاده از KOH ۱۰٪ و یا لاکتوفنول کاتن بلو لام مرطوب تهیه می گردد و سپس کارشناس مربوطه با استفاده از میکروسکوپ نوری از نظر وجود کنیدی و میسیلیوم و سودومیسیلیوم و حتی قارچ کامل بررسی و گزارش می نماید.

## ۵. روش تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی:

برای انجام صحیح تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی یا آنتی بیوگرام به روش دیسک دیفیوژن ابتدا از کلنی های موجود در محیط کشت اولیه، کشت (۲۴-۱۸)، ۳-۴ کلنی برداشته و به لوله ی حاوی سرم فیزیولوژی استریل انتقال داده و لوله ها به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور ۴۲ درجه سانتیگراد قرار داده می شود تا سوسپانسیونی معادل کدورت نیم مک فارلند تهیه گردد. سواب استریل را به لوله آغشته کرده و به جداره های داخلی لوله کاملاً تماس داده تا اضافی سوسپانسیون گرفته شود و سپس بر روی محیط مولر هینتون آگار در تمام جهات کشت داده تا در سطح پلیت کاملاً تلقیح گردند. پلیت ها را به مدت ۱۰-۵ دقیقه در دمای اتاق

گذاشته تا رطوبت آنها جذب شود، سپس دیسک های آنتی بیوتیکی مورد استفاده را که از فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد از قبل خارج شده اند تا به دمای محیط برسند، با کمک پنس استریل در کنار شعله و زیر هود میکروبیولوژی به فاصله ۲۰ میلیمتر از لبه پلیت و ۲۵ میلیمتر از یکدیگر در سطح پلیت قرار داده می شوند.

در انتها پلیت ها را به صورت واژگون جهت جلوگیری از تعریق سطح پلیت به انکوباتور ۳۵ درجه سانتیگراد انتقال داده و نتایج پس از ۱۸ ساعت مورد بررسی قرار می گیرند. در پایان نتایج بر اساس اندازه گیری قطر هاله عدم رشد توسط خط کش میلی متری به صورت حساس، مقاوم، بینابین طبق جدیدترین نسخه پروتوکل CLSI تعیین می گردد.

#### ۶. روشهای تعیین مقاومت به کولیسیتین برای *Pseudomonas aeruginosa* و *Enterobacterales*

پلی میکسین ها (کولیسیتین و پلی میکسین B) آخرین راه حل ضد میکروبی برای درمان عفونت های مقاوم به چند دارو هستند. داده های بالینی و PK/PD نشان می دهد که این عوامل اثربخشی بالینی محدودی دارند. عوامل جایگزین به شدت ترجیح داده می شوند. اگر این عوامل در دسترس نباشند، آگاهی از MIC کولیسیتین ممکن است برای اطلاع از تصمیمات درمانی مفید باشد. برای کولیسیتین، روش های میکرو برات دایلوژن (Microdilution broth)، دیسک الوشن برات (Disk elution broth) و روش های MIC رقت آگار (Agar dilution MIC) قابل قبول است. برات میکرو دایلوژن تنها روش تایید شده برای پلی میکسین B است. روش های انتشار دیسک و دیفیوژن گرادیان نباید انجام شود.

کولیسیتین و پلی میکسین B به عنوان عوامل معادل در نظر گرفته می شوند، بنابراین MIC های به دست آمده از آزمایش کولیسیتین، MIC ها را به پلی میکسین B و بالعکس پیش بینی می کنند. در حال حاضر، روش های آزمایش پلی میکسین B را ارزیابی نکرده است، و روش های زیر نباید با پلی میکسین B سازگار شوند. روش های زیر برای گونه های *Acinetobacter* ارزیابی شدند توسط CLSI و نتایج نادرست به دست آمد.

این روش ها با تولیدکنندگان محدود دیسک و/یا محیط های کشت به دست آمده اند و تا زمانی که داده های بیشتری توسط CLSI ارزیابی شود و مطابق با دستورالعمل های سند CLSI M231 نشان داده شود، موقتی در نظر گرفته می شوند

#### مراحل انجام روش Colistin Broth Disk Elution test

ابتدا لوله ها (۱۰ میلی لیتر) و دیسک های کولیسیتین باید به دمای محیط برسند

۱.۱. شماره گذاری چهار لوله از ایزوله جدا شده جهت انجام تست به صورت ۱ و ۲ و ۴ و کنترل به روش آسپتیک به هر لوله دیسک ها رو اضافه می کنیم:

\*۱ دیسک کولیسیتین برای ۱ µg/mL

\*۲ دیسک کولیسیتین برای ۲ µg/mL

\*۴ دیسک کولیسیتین برای ۴ µg/mL

۱.۲. لوله ها به آرامی ورتکس شوند و ۳۰ دقیقه اجازه داده شود در دمای محیط لوله ها باشند تا کولیسیتین از دیسک به محلول انتشار پیدا کند ولی بیش از ۶۰ دقیقه طول نکشد.

۱.۳. محلول تلقیح استاندارد تهیه شود.

۱.۴. ۵۰ µL از محلول تلقیح استاندارد تهیه شده به لوله های کنترل و ۱ و ۲ و ۴ µg/mL شماره گذاری شده اضافه شود تا به غلظت نهایی تقریباً  $10^5 \times 7,5$  CFU/mL برسد.

۱.۵. از لوپ ۱۰ میکرولیتری برای برداشت از رقت های تهیه شده و رشد بر روی پلیت آگار خوندار جهت کنترل خالص بودن کشت ها استفاده شود.

۱.۶. لوله ها را محکم بسته و هر لوله تلقیح شده با سرعت کم ورتکس شود تا مخلوط شود. سرعت آهسته برای جلوگیری از چسبیدن کولیسیتین به درپوش و سطح شیشه بالای مایع پیشنهاد می شود. قبل از گرماگذاری کمی درب لوله ها شل شود.

۱.۷. لوله ها و پلیت های کنترلی در دمای ۳۵-۳۳ درجه سانتیگراد و شرایط هوازی به مدت ۲۰-۱۶ ساعت گرماگذاری شوند.

۱.۸. بررسی نتایج روش Colistin Broth Disk Elution test

پلیت خلوص را برای اطمینان از خالص بودن تلقیح بررسی شود. لوله کنترل رشد بررسی شود، که باید کدورت آشکاری را نشان دهد تا آزمایش معتبر باشد. توجه: برخی از جدایه های *P. aeruginosa* ممکن است فقط در نزدیکی سطح محلول رشد کنند. کمترین غلظتی که رشد ایزوله را کاملاً مهار می کند به عنوان MIC خوانده شود.

*P. aeruginosa* و *Enterobacterle*

•  $\mu\text{g/mL} = \text{intermediate } 2 \geq$        $\mu\text{g/mL} = \text{resistant } 4 \geq$

## ۷. روش انجام تست اپسیلومتري E-test :

این روش در واقع نوعی آنتی بیوگرام به روش دیسک دیفیوژن است که توانایی تعیین MIC را دارد. در این روش، غلظت های مختلفی از آنتی بیوتیک در روی نوارهای پلاستیکی بسیار ظریف قرار داده شده است. این نوارها در روی سطح محیط کشت مولر هینتون آگار تلقیح شده با باکتری مورد آزمایش ( غلظتی برابر کدورت نیم مک فارلند) قرار داده می شوند و بعد از ۱۸ ساعت انکوباسیون، نتیجه تست از جهت بالای نوار به طرف پایین نوار ( از غلظت زیاد آنتی بیوتیک به سمت غلظت کم) خوانده می شود. نفوذ آنتی بیوتیک از نوار به محیط آگاردار اطراف آن باعث ایجاد یک هاله عدم رشد تخم مرغی یا بیضی شکل در اطراف هر نوار می نماید. مقدار MIC آنتی بیوتیک جایی است که هاله بیضی شکل نوار پلاستیکی را قطع می کند.

### روش انجام:

ابتدا از کلنی های موجود در محیط بلاد آگار یا مک کانکی آگار، کشت (۲۴-۱۸)، ۳-۴ کلنی برداشته، و به لوله حاوی سرم فیزیولوژی استریل انتقال داده و لوله ها به مدت ۴۰-۳۰ دقیقه در انکوباتور ۴۲ درجه سانتی گراد قرار داده می شوند تا سوسپانسیونی معادل کدورت نیم مک فارلند تهیه گردد. سواب استریل به لوله آغشته کرده و به جداره های داخلی لوله کاملاً تماس داده تا اضافی سوسپانسیون گرفته شود و سپس بر روی محیط مولر هینتون آگار در تمام جهات کشت داده تا در سطح پلیت کاملاً تلقیح گردند.

پلیت ها را به مدت ۱۰-۵ دقیقه در دمای اتاق گذاشته تا رطوبت آنها جذب شود، سپس نوارهای E-test را با کمک پنس استریل در کنار شعله و زیر هود میکروبیولوژی روی سطح پلیت گذاشته و سپس در انکوباتور ۳۵ درجه سانتیگراد بمدت ۱۸ ساعت قرار می گیرند. در نهایت نتیجه تست با توجه به دستورالعمل شرکت تولید کننده و معیارهای CLSI قرائت میگردد.

## ۸. دستورالعمل تهیه انواع محیط های کشت، معرفها و رنگ های مصرفی در آزمایشگاه میکروب شناسی

### تهیه انواع محیط های کشت دهیدراته و استریلیزاسیون آنها

روش کار بر اساس دستورالعمل موجود بر روی قوطی های حاوی انواع محیط های کشت میباشد. روش استریلیزاسیون نیز بر روی برچسب دستورالعمل تهیه محیط کشت درج گردیده است. این دستورالعمل ها بر حسب نوع محیط کشت و کارخانه تولیدکننده، متفاوت است و به طور کلی پس از وزن کشی و مخلوط کردن با حجم مورد نیاز آب مقطر اتوکلاو (دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد و فشار ۱،۲) می شوند. محیط های کشت دهیدراته شامل:

آگار بی هوازی، بلاد آگار (BA)، برین هارت آگار و براث (BHB/BHA) بایل اسکولین آگار، بیسموت سولفیت آگار، بروسلا مدیوم، کوکدمیت براث، کمپیلوباکتر سلکتیو آگار، کری بلر، DNase تست آگار، EMB آگار، هموفیلوس سلکتیو آگار، هکتون انتریک آگار، کلایگلر آیرون آگار (KIA) لایزین دکربوکسیلاز سولفیدراز مدیوم (LDS)، لوون اشتاین جنسن مدیوم، لوفلر بلاد سرم، لایزین آیرون آگار، مولر هینتون آگار و براث (MHA/MHB)، MRVP، مانیتول سالت

آگار، مک کانکی آگار، مالونات براث، نوترینت آگار و براث (N.A/N.B)، نیتراٹ براث، اورنی تین دکربوکسیلاز آرژینین دهیدرولاز تست براث، OF بازال مدیوم، پپتون واتر، فنیل آلانین آگار، فنل رد براث و آگار، پپتون آگار، سیمون سیتراٹ آگار، SIM مدیوم، سالمونلا شیگلا آگار (S.S)، سلنیت براث، تریپل شوگر آیرون آگار (TSI)، TCBS آگار، تایو گلیکولات براث، اوره آگار و براث، XLD آگار و سایر محیط های کشت دهیدراته که در دفتر راهنمای محیط های کشت ثبت شده اند می باشد.

روش تهیه محیط کشت ژلاتین (ترکیبی)

پپتون = ۵ g

۳ = Beef Extract g

ژلاتین = ۱۲۰ g

مقادیر فوق را به ۱۰۰۰ cc آب مقطر اضافه کرده و در بن ماری جوش قرار دهید تا کاملاً حل شوند (از حرارت دادن این محیط کشت بر روی شعله پرهیز کنید). سپس در اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه و دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد و فشار ۱۵ Lb استریل نمایید. سپس در لوله تقسیم کرده و PH محیط کشت را به ۸/۶ برسانید.

روش تهیه محیط کشت آب پپتونه قلیلی:

پپتون = ۱۰ g

کلرور سدیم (NaCl) = ۱۰ g

آب مقطر = ۱۰۰۰ cc

سپس pH را به ۸-۹ برسانید و در شرایط ۱۵ دقیقه، فشار ۱۵ Lb در اتوکلاو قرار داده و استریل نمایید (دمای ۱۲۱ سانتیگراد) برای تنظیم از سود N ۱ استفاده کنید.

روش تهیه محیط کشت حاوی گلیسرین جهت دیپ فریز:

محیط کشت پایه: محیط TSB (Trypticase Soy Broth) یا محیط کشت BHB (Brain Heart Infusion Broth) استفاده کنید. به میزان ۱۵٪ گلیسرین به محیط پایه اضافه نمایید. به خوبی تکان دهید تا محلول یکنواختی حاصل شود. سپس در مقادیر کم (۱-۲ ml) در لوله

ای درپیچ دار تقسیم نموده و در شرایط ۱۵ دقیقه، دمای ۱۲۱ و فشار ۱۵ Lb اتوکلاو نمایید.

روش تهیه محیط کشت (۵/۶٪) NaCl براث / آگار

محیط پایه همان محیط نوترینت براث / آگار است. از آنجا که این محیط کشت فاقد نمک میباشد، بنابراین ۵/۶٪ نمک به این محیط پایه اضافه نمایید. شرایط استریلیزاسیون همان دمای ۱۲۱، درجه سانتیگراد و فشار ۱۵ Lb و زمان ۱۵ دقیقه میباشد.

روش تهیه انواع قندها:

محلول ۱۰٪ از انواع قندها تهیه نمایید (قند = ۱۰ g و آب مقطر = ۱۰۰ cc)

روش استریلیزاسیون قندها استفاده از فیلتراسیون میباشد. محیط پایه اتوکلاو می شود و در نهایت با توجه به حجم مورد نظر، به روش فیلتراسیون با فیلتر سرسرنگی ۰,۴۵ میکرومتر قند به محیط پایه اضافه می شود. اگر بخواهید قندها را از هم تفکیک نمایید عبارتند از: لاکتوز، مالتوز، گزیلوز، سالیسین، سوکروز، ترهالوز و آرابینوز.

روش تهیه انواع معرف ها و رنگ ها:

روش تهیه معرف های VP

- تهیه آلفا نفتول معرف (A):

پودر آلفا نفتول: ۵ g

اتانول: CC۱۰۰

-تهیه KOH (پتاس ) معرف(B):

KOH: ۴۰ g

کراتین: ۰,۳ g

آبمقطر: CC۱۰۰

معرف ها در ظروف تیره و در یخچال نگهداری میشوند. چون دارای پایداری متغیر هستند لازم است به طور هفتگی (بر حسب میزان کار) کنترل کیفی گردند.

#### روش تهیه معرف متیل رد MR

پودر متیل رد = ۱/۰ g

اتانول = CC۳۰۰

پودر متیل رد را در اتانول حل کرده سپس با آب مقطر حجم آنرا به CC۵۰۰ برسانید. معرف در ظرف تیره و در یخچال نگهداری میشود. چون دارای پایداری متغیر است، لازم است بطور هفتگی (برحسب میزان کار) کنترل کیفی گردد.

#### روش تهیه معرف کواکس

P- دی متیل آمینو بنز آلدئید: ۱۰ g

آمیل الکل: CC۱۵۰

اسید کلریدریک غلیظ و تازه: CC۵۰

دی متیل آمینو بنز آلدئید را به آمیل الکل اضافه نموده و به آرامی اسید کلریدریک را به آنها اضافه نمایید. برای تهیه این معرف از هود استفاده نمایید. معرف در ظروف تیره و در یخچال نگهداری میشود. چون دارای پایداری متغیر است، لازم است بطور هفتگی (برحسب میزان کار) کنترل کیفی گردد.

تهیه آب اکسیژنه ۳٪ (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>):

محلول آب اکسیژنه ۳۰٪ به نسبت ۱۰:۱ با آب مقطر رقیق نمایید. یعنی CC۱ آب اکسیژنه ۳۰٪ را به CC۹ آبمقطر اضافه نمایید. محلول در ظرف تیره و در یخچال نگهداری می شود.

#### روش تهیه کریستال ویوله ذخیره و اگزالات آمونیوم ذخیره

-تهیه کریستال ویوله

پودر کریستال ویوله = ۲۰ g

اتانول = CC۱۰۰

-تهیه اگزالات آمونیوم

پودر اگزالات آمونیوم = ۱ g

آب مقطر = ۱۰۰

هنگام مصرف، محلول کریستال ویوله ذخیره را به نسبت ۱۰:۱ با آب مقطر رقیق نمایید (CC۱ از محلول کریستال ویوله و CC۹ آب مقطر) سپس این محلول را با چهار حجم از محلول اگزالات آمونیوم رقیق کنید (CC۱ محلول کریستال ویوله رقیق شده و CC۴ اگزالات آمونیوم). محلول ذخیره و مصرفی کریستال ویوله، در ظرف تیره و در دمای اتاق نگهداری میشود.

#### روش تهیه لوگل

ید = ۱ g

یدور پتاسیم = ۲ g

آب مقطر = CC۲۴۰

محلول آبی بیکربنات سدیم ۵٪ = CC ۶۰

در مقدار کمی از آب مقطر، ید و یدور پتاسیم را کاملاً حل نمایید، بعد حجم را با آب مقطر به CC۲۴۰ برسانید. محلول ۵٪ بیکربنات سدیم (بیکربنات سدیم: g۵ آب مقطر: CC۱۰۰) را نیز به آن اضافه نمایید. محلول در دمای اتاق نگهداری می شود . درب آنرا باید کاملاً " محکم ببندید.

### روش تهیه محلول الکل-استون

اتانول = CC۲۵۰

استون = CC۲۵۰

حجم مساوی از الکل اتیلیک (اتانول) را با استون مخلوط نمایید.

### روش تهیه فوشین / یا سافرانین ذخیره

پودر فوشین = g۲

اتانول = CC۱۰۰

و یا پودر سافرانین = g۵/۲

اتانول = CC۱۰۰

به هنگام مصرف، محلول ذخیره فوشین یا محلول ذخیره سافرانین را به نسبت ۱۰:۱ با آب مقطر رقیق نمایید. محلولها در ظروف تیره، تهیه و در دمای اتاق ذخیره می شوند.

## ۹. نمونه برداری از سطوح محیط به روش سوآب:

سواب استریل را با محیط مایع استریل یا سالین استریل آغشته می کنیم. مایع اضافی را با فشردن سواب به قسمت داخلی لوله می گیریم و از سطح موردنظر با حرکت گردشی و یکطرفه سواب نمونه برمی داریم. بهتر است این سطح اندازه مشخصی داشته باشد تا هنگام گزارش، تعداد کلنی در واحد سطح گزارش شود. پس از کوتاه کردن و دورانداختن قسمت چوبی که در تماس با دست بوده است، سواب را داخل مایع شستشو(سالین یا TSB) با حجم مشخص ۵ الی ۱۰ سی سی میگذاریم. درپوش لوله را می بندیم و ۵۰ بار آن را سروته یا به مدت ۳۰ ثانیه با دور بالا ورتکس می کنیم. از این محلول برای کشت های زیر استفاده می کنیم.

۱۸- روش کمی:

از محلولی که سواب داخل آن قرار گرفته است رقت یک دهم و یک صدم تهیه می کنیم و یک دهم میلی از محلول اولیه و رقت های یک دهم و یک صدم را روی سطح آگارمانند کشت ادرار کشت می دهیم. پس از انکوباسیون، پلیتی را که بین ۳۰ الی ۳۰۰ کلنی دارد می شماریم و با توجه به ضریب رقت و حجم برداشت شده، تعداد باکتری را محاسبه و در واحد سطحی که نمونه گیری شده گزارش می کنیم.

۱۹- روش کیفی:

روش انتخابی: در صورتی که به دنبال ارگانیسم های خاص در میان مجموعه ای از عوامل میکروبی باشیم می توانیم از محیط TSB استفاده کنیم نیم میلی از محلول TSB را روی محیط هایی مانند مکانکی آگار یا محیط های انتخابی جهت کشت استافیلوکوکها، انتروکوکها یا ... کشت دهیم. محیط TSB اولیه را به مدت ۴ الی ۲۴ ساعت انکوبه می کنیم تا در صورتی که ، تعداد اولیه باکتری کم باشد، تکثیرشود و در صورت کدورت TSB را برای بار دوم روی محیط های جدید سابکالچر می دهیم.

تفسیر کشت ها:

- ۱- لوازم پزشکی بحرانی: مانند وسایل جراحی و وسایلی که در بافتهای استریل نفوذ می کنند؛ هیچ باکتری یا اسپوری نباید وجود داشته باشد.
  - ۲- لوازم پزشکی نیمه بحرانی: مانند آندوسکوپ که با غشاهای مخاطی تماس دارد؛ هیچ باکتری نباید وجود داشته باشد، به جز باکتری های غیربیماریزای اسپوردار مانند باسیلوس و کلسترییدیومکه گاهی دیده می شود.
  - ۳- لوازم پزشکی غیربحرانی: مانند گوشی پزشکی که با پوست سالم تماس دارد باکتری های بیماریزا نباید وجود داشته باشد. باید توجه داشت که این معیار از جنبه میکروب شناسی است و از دیدگاه اپیدمیولوژیک، چنان که در مباحث قبل گفته شد، فقط جداسازی یک باکتری بیماریزا بر راه انتقال دلالت نمی کند و برای تایید به روش های بیوتایپینگ و مولکولی نیاز است.
  - ۴- سطوح محیطی غیر بحرانی: شامل سطوحی است که در تماس مستقیم با بیمار نیستند، مانند سطوح کف و دیوارها یا دستگاههایی مانند X-ray و همودیالیز؛ اصولاً این سطوح در انتقال عوامل عفونی تاثیر کمی دارند و برای این سطوح تمیزی ظاهری و نبودن بیماریزاهای شناخته شده کافی است.
- برای تشخیص میزان رعایت اصول بهداشتی در این سطوح محیطی جدول ذیل پیشنهاد می شود.

| 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                                         |

#### ۱۰. نمونه برداری از دست:

روش نمونه برداری با استفاده از سواب می باشد. توسط سواب مرطوب شده با نرمال سالین استریل از نواحی مختلف کف دست و لای انگشتان و زیر ناخن ها کشت تهیه می شود. سپس سواب روی محیط های کشت بلادآگار و مک کانکی آگار برده می شود. بعد از انکوباسیون ۲۴ ساعته نوع باکتری های آلوده کننده با روش های افتراقی متناسب شناسایی می شوند.

#### نام و نام خانوادگی تهیه کنندگان و سمت :

- دکتر کامبیز مظفری: مسئول فنی بخش میکروب شناسی
- هادی خلج :سوپروایزرآزمایشگاه
- هنگامه صعودی: مسئول بخش میکروشناسی
- نغمه ملکیان: همکار بخش میکروشناسی

#### منابع و امکانات لازم:

۱. نیروی انسانی به تعداد کافی- حداقل ۴ کارشناس میکروشناسی و یک کارشناس آزمایشگاه جهت کار در بخش لازمست
۲. هود لامینار کلاس II - انکوباتور ۳۵ درجه - دستگاه BAC TEC - جار CO2 ، جار بی هوازی
۳. مواد و ملزومات مورد نیاز بخش

## مراجع:

۱. راهنمای آزمایشگاه تشخیص عفونت بیمارستانی- وزارت بهداشت، درمان، و آموزش پزشکی -معاونت سلامت -مرکز مدیریت بیماریهای آزمایشگاه مرجع سلامت، سال ۱۳۸۶، دکتر بابک ولی زاده
۲. تست های تشخیصی و آزمایشگاهی پاگان-انتشارات خسروی باهمکاری نشر دیباج-سال ۱۳۹۹
۳. مستندات و اصول مستند سازی در آزمایشگاه پزشکی -دکتر حسین دارآفرین-سال ۱۳۸۷
۴. بروشور دستگاه ها
۵. تجربیات بیمارستانی

|                                                                                     |                                                                      |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| نام و امضاء تایید کننده<br>رئیس بخش آزمایشگاه تشخیص طبی :<br>دکتر سیامک میراب سمیعی | نام و امضاء سرپرست تهیه کنندگان:<br>مسئول فنی بخش: دکتر کامبیز مظفری |
| نام و امضاء تصویب و ابلاغ کننده<br>رئیس انستیتو: دکتر فریدون نوحی                   | مهر و امضاء دفتر بهبود کیفیت<br>دکتر بهزاد مومنی                     |