فهرست مطالب

M01	کنترل کیفی محیطهای کشت
M02	راهنمای انتخاب محیط کشت برای نمونه‌های مختلف
M03	جدول شناسایی باکتری‌ها
M04	جدول پاتوژن‌ها و فلور نرمال
M05	کنترل کیفیت دیسک‌های آنتی‌بیوگرام
M06	روش تعیین حجم لوپ
M07	تهیه کدورت نیم مک فارلند
M08	نگه‌داری و استفاده از سویه‌های باکتری
M09	دستورالعمل فور و اتوکلاو و انکوباتور
M11	راهنمای ایمنی جهت انتقال نمونه‌های عفونی
M12	راهنمای رنگ‌آمیزی گرم
M13	فهرست تجهیزات، مواد، محیط‌های کشت و دیسک‌های تشخیصی
M15	راهنمای کار با هودهای ایمنی بیولوژیک
M16	موارد بحرانی در آزمایشگاه میکروب‌شناسی
M17	دستورالعمل تهیه انواع محیط کشت، معرف‌ها و رنگ‌ها
M18	دستورالعمل مدیریت نمونه در آزمایشگاه‌های پزشکی
WLM01	سیتوکروم اکسیداز
WLM03	Methyl Red Test
WLM04	Voges Proskauer
WLM08	فنیل آلانین دآمیناز
WLM09	بررسی حرکت باکتری
WLM13	Kligler Iron Agar
WLM14	MacConkey Agar
WLM15	TCBS Agar
WLM16	TSI Agar
WLM18	Malonate Broth
WLM20	کاتالاز
WLM22	حساسیت به باسیتراسین و SXT
WLM23	CAMP
WLM29	DNAse Test Agar
WLM30	حساسیت به باسیتراسین
WLM31	مانیتول سالت آگار
WLM32	دیسک نوبیوسین
WLM34	PYR
WLM35	استاندارد نیم مک فارلند
WLM39	نگه‌داری و استفاده از سوش‌های میکروبی ذخیره به روش طولانی مدت و کوتاه مدت
WLM47	تهیه انواع محیط کشت، معرف‌ها و رنگ‌های مورد استفاده در آزمایشگاه میکروب‌شناسی
	جدول راهنمای مدیریت پسماندهای آزمایشگاهی
	دستورالعمل فنی فور، اتوکلاو انکوباتور
	دستورالعمل مدیریت پسماندهای آزمایشگاهی ۱
	دستورالعمل مدیریت پسماندهای آزمایشگاهی ۲
	دستورالعمل نمونه‌گیری و تشخیص آزمایشگاهی ویبریوکلرا
	روش جمع‌آوری نمونه آنفلوآنزا

مقدمه

محیط های کشت نقش اساسی را در آزمایشگا ه میکروب شناسی ایفا می کنند و بطور گسترده ای جهت جداسازی، تعیین هویت و آنتی بیوگرام میکروارگانیسم های بیماریزا بکار میروند. بسیاری از آزمایشگاهها بطور روتین محیط های کشت مورد نیاز برای مصارف تشخیصی وتحقیقاتی را خودشان تهیه می نمایند. با این همه جهت اطمینان از اینکه محیط های کشت، کیفیت خوب و نتایج مطلوبی داشته باشند بایستی روشهای کنترل کیفی مناسبی بکار گرفته شود. برای رسیدن به این هدف بایستی در تهیه و مصرف محیط های کشت معیارهای زیر را در نظر گرفت.

مواد خام

کیفیت محیط ها بطور مستقیم بستگی به کیفیت مواد خام مورد استفاده در تهیه آنها دارد. آب یکی از مهمترین مواردی است که در تهیه محیط های کشت بکار میرود. سه معیار مهم آب مورد استفاده در تهیه محیط ها ی کشت شامل وجود یونهای مس، قدرت هدایت الکتریکی و pH می باشد. در شرایط ایده آل نباید یونهای مس در آب مورد استفاده جهت تهیه محیط های کشت وجود داشته باشد چون خاصیت مهار کنندگی برای میکرو ارگانیسم ها را دارد. قدرت هدایت الکتریکی آن باید کمتر از ۱۵میکروزیمنس باشد. pH آب مورد استفاده بهتر است کمی اسیدی باشد ولی در هر حال نباید کمتر از ۵/۵ باشد.

پتری دیش

کیفیت پتری دیش های مورد استفاده در تهیه محیط نیز اهمیت دارد. معمولا پتری دیش ها را با اتیلن اکساید و یا اشعه گاما استریل می کنند. درصورت استفاده از پتری دیش هائی که با اتیلن اکساید استریل شده باشند بایستی به روش کروماتوگرافی وجود یا عدم وجود بقای ای ن ماده بررسی شود. اتیلن اکساید دارای خاصیت مهار کنندگی برا ی میکروارگانیسم ها میباشد. در صورت استفاده از پتری دیش های شیشه ای بایستی از پتری دیش هایی از جنس بوروسیلیکات استفاده کرد. استفاده از پتری دیش هایی از جنس قلیائی ممکن است موجب آزاد سازی قلیا در داخل محیط کشت گردد.

استریل کردن محیط های کشت

استریل کردن، یک مرحله اساسی در تهیه محیط های کشت است. معمولا برای استریل کردن محیط های کشت از اتوکلاو استفاده می کنند. با این همه ارتباط نزدیکی بین مدت زمان لازم جهت استریل کردن و حجم محیط وجود دارد. حرارت بیش از حد ممکن است منجر به تخریب محیط های کشت گردد. بنابراین تنظیم دما و مدت زمان آن اهمیت ویژه ای دارد. در شرایط معمولی دمای 121 درجه سانتیگراد به مدت 15 دقیقه برای استریل کردن یک لیتر محیط کشت کافی است. در صورتیکه حجم

محیط کشت بیش از یک لیتر باشد ممکن است مدت زمان بیشتری لازم باشد. کنترل کیفی اتوکلاو، کنترل دما و فشار اتوکلاو بایستی بطور مداوم انجام گردد. برای کنترل اتوکلاو از اندیکاتورهای شیمیائی استفاده می کنند. از اند یکاتورهای بیولوژیکی که جهت کنترل کارآرائی اتوکلاو استفاده می‌کنند اسپور *Bacillus stearothermophilus* را می توان نام برد که بصورت تجارتی قابل دسترس می‌باشد.

پارامتر های فیزیکی

محیط کشت های تهیه شده باید از لحا ظ فیزیکی و ظاهری بررسی شوند. معیارهای ظاهری قابل بررسی شامل وجود حباب، حفره، ناصافی سطح محیط، ترک خوردگی، یخ زدگی می باشد. ضخامت محیط نیز اهمیت دارد. ضخامت محیط کشت های پلیتی۴میلی متر است. pH نیز از مهمترین معیارهای فیزیکی میباشد که باید قبل ازاتوکلاو کردن و پس از آن با pH متر کالیبره شده اندازه گیری گردد.

نگهداری محیط های کشت تهیه شده:

طول عمر محیط های کشت تهیه شده بستگی به نوع اجزا تشکیل دهنده محیط، نحوه نگهداری و انبار کردن آنها دارد. تمامی محیط های کشت باید دور از نور نگهداری شوند. تابش نور به محیط های کشت موجب تشکیل مواد باکتریواستاتیک و باکتریساید مانند پراکسیداز می گردد. اغلب محیط های کشت که در پلیت تهیه می شوند در دمای ۴ درجه سانتیگراد حداقل طول عمر آنها یک هفته می باشد ولی اگر در در داخل کیسه های پلاستیکی بسته بندی شوند بطوریکه هوا داخل آنها نفوذ نکند تا ۳-۴ هفته قابل مصرف هستند. طول عمر محیط های کشت های حاوی آنتی بیوتیک بستگی به پایداری آنتی بیوتیک موجود در آن دارد. در مجموع محیطهای حاوی آنتی بیوتیک را در عرض یک هفته باید مصرف کرد. از سوی دیگر با گذشت زمان اینگونه محیط های کشت رطوبت خود را از دست داده، بدلیل افزایش غلظت آنتی بیوتیک قدرت انتخابی آنها افزایش می یابد.دمای پلیت ها را باید قبل از مصرف به دمای اتاق رساند. اگر پلیت محیط کشت بیش از ۸ ساعت در دمای اتاق باقی بماند برای مصرف مناسب نمی باشد. محیط های کشت تهیه شده در لوله در مقایسه با محیط های کشت پلیتی عمر طولانی دارند. اغلب این محیط های کشت اگر در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شوند ۶-۳ماه قابل مصرف می باشند.

جدول شماره۱ علل اشکالات رایج در محیط های کشت

اشکال	علت
نرم بودن آگار	حرارت بیش از حد، pH پائین که موجب هیدرولیز آگار می گردد. توزین غلط، مخلوط نکردن خوب و عدم حل شدن
pH نامناسب	استفاده از شیشه های قلیائی، آب ناخالص، حرارت بیش از حد، آلودگی شیمیائی، اندازه گیری pH در حرارت نامناسب، استفاده از pH متر استاندارد نشده و استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده
رنگ نامناسب	ناخالص بودن آب، استفاده از شیشه آلات کثیف، استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده، حرارت دادن بیش از حد و pH نامناسب
تیره شدن شدن محیط	حرارت دادن بیش از حد، استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده
سمیت	حرارت دادن بیش از حد (سوزاندن محیط)، استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده
رشد ضعیف ارگانیسم	استفاده از آب و یا شیشه آلات آلوده، استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده، توزین غلط وعدم بهم زدن کافی محیط و حرارت بیش از حد.
داشتن خاصیت ضعیف انتخابی و یا افتراقی	استفاده از آب ویا شیشه آلات آلوده، استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده،توزین غلط وعدم بهم زدن کافی محیط و حرارت بیش از حد.

کنترل کیفی محیط های کشت

برای کنترل کیفی محیط های کشت از سویه های کنترل کیفی استفاده می کنند. سویه های کنترل کیفی از منابع مختلف مانند American Type Culture Collection (ATCC) قابل تهیه می باشند.

روش انجام آزمون کنترل کیفیت میکروبیولوژیکی محیط های کشت

یک کشت از ارگانیسم کنترل را روی پلیت تهیه کنید. بعد از انکوباسیون ۵-۳ کلنی ایزوله را در مقدار کمی TSB و BHI استریل سوسپانسیون کرده وآن را برای چهار یا پنج ساعت انکوبه نمائید. کدورت را با استاندارد نیم مک فارلند تنظیم کنید (استاندارد نیم مک فارلند در طول موج ۶۲۵nm وجذب ۰/۰۸ تا۰/۱۳ می باشد). به این روش می توان یک سوسپانسیون در سرم فیزیولوژی از کلنی های ۲۴ ساعته تهیه و کدورت آن را مطابق روش فوق تنظیم نمود.

برای آزمایش ظرفیت مغذی بودن (Nutritional activity) یک محیط کشت پلیتی، سوسپانسیون اولیه را به نسبت ۱ به ۱۰۰ در نرمال سالین رقیق نموده و به هرپلیت ۱۰میکرولیتر از سوسپانسیون رقیق شده را تلقیح می نمائیم. تعداد کلنی های مورد انتظار در هر پلیت $۱۰^{۴}\times۲-۱$ عدد می باشد. اگر برای محیط های خاصی کلنی های ایزوله بدست نیاید سوسپانسیون باید ده بار رقیق تر تهیه شود.

برای آزمایش ظرفیت مهارکنندگی (Inhibitory activity) محیط های کشت انتخابی، سوسپانسیون اولیه را به نسب۱ به ۱۰ درنرمال سالین یا آب تخلیص شده رقیق نموده و در هر پلیت ۱۰میکرولیتر یا۱./. میلی لیتر سوسپانسیون رقیق شده تلقیح می کنیم. تعداد کلنی های مورد انتظار در هر پلیت $۱۰^{۵}\times$ ۲-۱ می باشد. جهت اجتناب از رشد زیاد باکتری در بعضی از محیط های کشت انتخابی ممکن است نیاز باشد که سوسپانسیون ده بار رقیق تر شود. برای آزمایش محیط های کشت لوله ای، هر لوله باید با ۱۰میکرولیتر یا ۱./. میلی لیتر از سوسپانسیون اولیه مطابق با نیم مک فارلند تلقیح شود. گاهی ممکن است به تلقیح کمتر یا بیشتر نیاز باشد.

محیط کشت مورد کنترل کیفی را بعد از تلقیح تحت شرایطی که در جدول ۲-۴ آمده است انکوبه نما ئید. به طور نرمال مدت زمان انکوباسیون ۲۴- ۱۸ ساعت یا ۴۸-۲۴ ساعت در ۲ ± ۳۵ درجه سانتی گراد می باشد. شکلات آگار و محیط های کشت برای جداسازی انتخابی گونه های نیسریای بیماریزا باید در ۱۰-۵% Co_2 انکوبه شوند و در ۲۴-۱۸ ساعت و ۴۸-۲۴ ساعت بررسی شوند. برای بی هوازی ها، کشتها عموما به حداقل ۴۸ ساعت انکوباسیون در شرایط بی هوازی وغنی از Co_2 نیاز دارند. برای کمپیلوباکترآگار، پلیتها باید در۴۲ درجه سانتی گراد در شرایط میکروآئروفیلیک غنی از Co_2 به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شوند.

تفسیر نتایج

یک محیط کشت زمانی قابل قبول می باشد که با همه سویه های آزمون پیشنهادی برای محیط کشت در جدول ۲-۴، رشد کافی داشته و خصوصیات رشد و مورفولوژی کلنی ها بارز باشد. در محیط های انتخابی، رشد بعضی از ارگانیسمهای خاص مهار می شود، در ضمن اینکه اجازه رشد کافی به ارگانیسم

های دیگر می دهد. در بعضی موارد واکنشهای رنگی خاص یا همولیز همچنانکه در جدول ۲ آمـده اسـت باید ایجاد شود.

جدول شماره ۲ کنترل کیفی محیط های کشت باکتریولوژیک متداول

محیط کشت	شرایط ومدت زمان انکوباسیون	ارگانیسم های کنترل	نتایج مورد انتظار
ژلوزخون دار Sheep Blood Agar	هوازی و یا co_2 24 -18 ساعت دمای ۳۵°c	استرپتوکوکوس پنومونیه ۶۳۰۵	رشد همولیز آلفا
		استرپتوکوکوس پایوژن ۱۹۶۱۵	رشد همولیز بتا
		استافیلوکوکوس اورئوس۲۵۹۲۳	رشد
		اشریشیا کولی۲۵۹۲۲	رشد
شکلات آگار	CO_2 24-48 ساعت دمای ۳۵°c	نیسریا گونوره ا ۴۳۰۶۹	رشد
		هموفیلوس آنفلوانزا ۱۰۲۱۱	رشد
محیط غنی کننده برای باسیلهای انتریک (GN)broth	هوازی ۲۴- ۱۸ ساعت دمای ۳۵°c	سالمونلا تیفی موریوم ۱۴۰۲۸	رشد پس از کشت مجدد
		شیگلا سونئی ۹۲۹۰	رشد پس از کشت مجدد، ممکن است بوسیله محیط سلنیت مهار شود
		اشریشیا کو لی۲۵۹۲۲	مهار(نسبی –کامل) پس از کشت مجدد،رشد پس از کشت مجدد از GN broth
ائوزین متیلن بلو EMB	هوازی ۲۴- ۱۸ ساعت دمای ۳۵°c	سالمونلا تایفی موریوم ۱۴۰۲۸	رشد، کلنی های بیرنگ تا کهربایی
		اشریشیا کولی۲۵۹۲۲	رشد، آبی- سیاه، جلای سبز فلزی
		انتروکوکوس فکالیس ۲۹۲۱۲	عدم رشد (رشد جزئی)
هکتون انتریک آگار HE	هوازی ۲۴- ۱۸ ساعت دمای ۳۵°c	سالمونلا تایفی موریوم ۱۴۰۲۸	رشد ،کلنی های آبی تا آبی متمایل به سبز با مرکز سیاه
		شیگلا فلکسنری ۱۲۰۲۲	رشد و کلنی های سبزتا

			سبز متمایل به آبی با مراکز سیاه رنگ
		انتروکوکوس فکالیس۲۹۲۱۲	مهار نسبی رشد، کلنی های زرد
		اشریشیا کولی ۲۵۹۲۲	مهاررشدکامل ویا نسبی، در صورت رشد کلنی به رنگ زرد تا صورتی مایل به نارنجی
مکانکی آگار	هوازی ۲۴- ۱۸ ساعت دمای ۳۵°c	اشریشیا کولی ۲۵۹۲۲	رشد، کلنی های صورتی
		پروتئوس میرابیلیس ۱۲۴۵۳	رشد، کلنی های بیرنگ ، ممانعت از سوارمینگ (تا اندازه ای)
		سالمونلا تایفی موریوم ۱۴۰۲۸	رشد، کلنی های بیرنگ
		انتروکوکوس فکالیس۲۹۲۱۲	مهار رشد نسبی
مانیتول سالت آگار	هوازی ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت، دمای ۳۵°c	استافیلوکوکوس اورئوس ۲۵۹۲۳	رشدکلنی های با هاله زرد پس از ۴۸ ساعت
		استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس ۱۲۲۲۸	رشد کلنی های با هاله قرمز رنگ پس از ۴۸ساعت
		پروتئوس میرابیلیس ۱۲۴۵۳	عدم رشد (نسبی)
سالمونلا شیگلا آگار	هوازی ۲۴ ساعت دمای ۳۵°c	سالمونلا تایفی موریوم ۱۴۰۲۸	رشد،کلنی های بیرنگ با ویا بدون رنگ سیاه در مرکز
		شیگلا فلکسنری۱۲۰۲۲	رشد، ،کلنی های بیرنگ
		انتروکوک فکالیس۲۹۲۱۲	مهار رشد(کامل)
		اشریشیا کولی۲۵۹۲۲	مهار رشد (کامل ویا نسبی ، در صورت رشد کلنی های صورتی تا قرمز گل سرخی همراه با رسوب)

تیو گلیکولات با و یا بدون معرف	هوازی ۴۸ ساعت (درپوش محکم شده) دمای ۳۵°c	باکتروئیدوس فراژیلیس۲۵۲۸۵	رشد
محیط کشت های لوله ای مانند BHI ,TSB	هوازی۲۴-۴۸ ساعت دمای ۳۵°c	اشریشیا کولی ۲۵۹۲۲	رشد
		استافیلوکوکوس اورئوس ۲۵۹۲۳	رشد
زایلوز لیزین دکربوکسیلاز XLD	هوازی ۲۴ ساعت دمای ۳۵°c	سالمونلا تایفی موریوم ۱۴۰۲۸	رشد- کلنی های قرمز- مرکز سیاه
		شیگلا فلکسنری۱۲۰۲۲	رشد-کلنی های قرمز
		انتروکوک فکالیس ۲۹۲۱۲	مهار رشد (نسبی)
		اشریشیا کولی ۲۵۹۲۲	مهار رشد (نسبی تا کامل- کلنی های زرد تا قرمز متمایل به زرد)

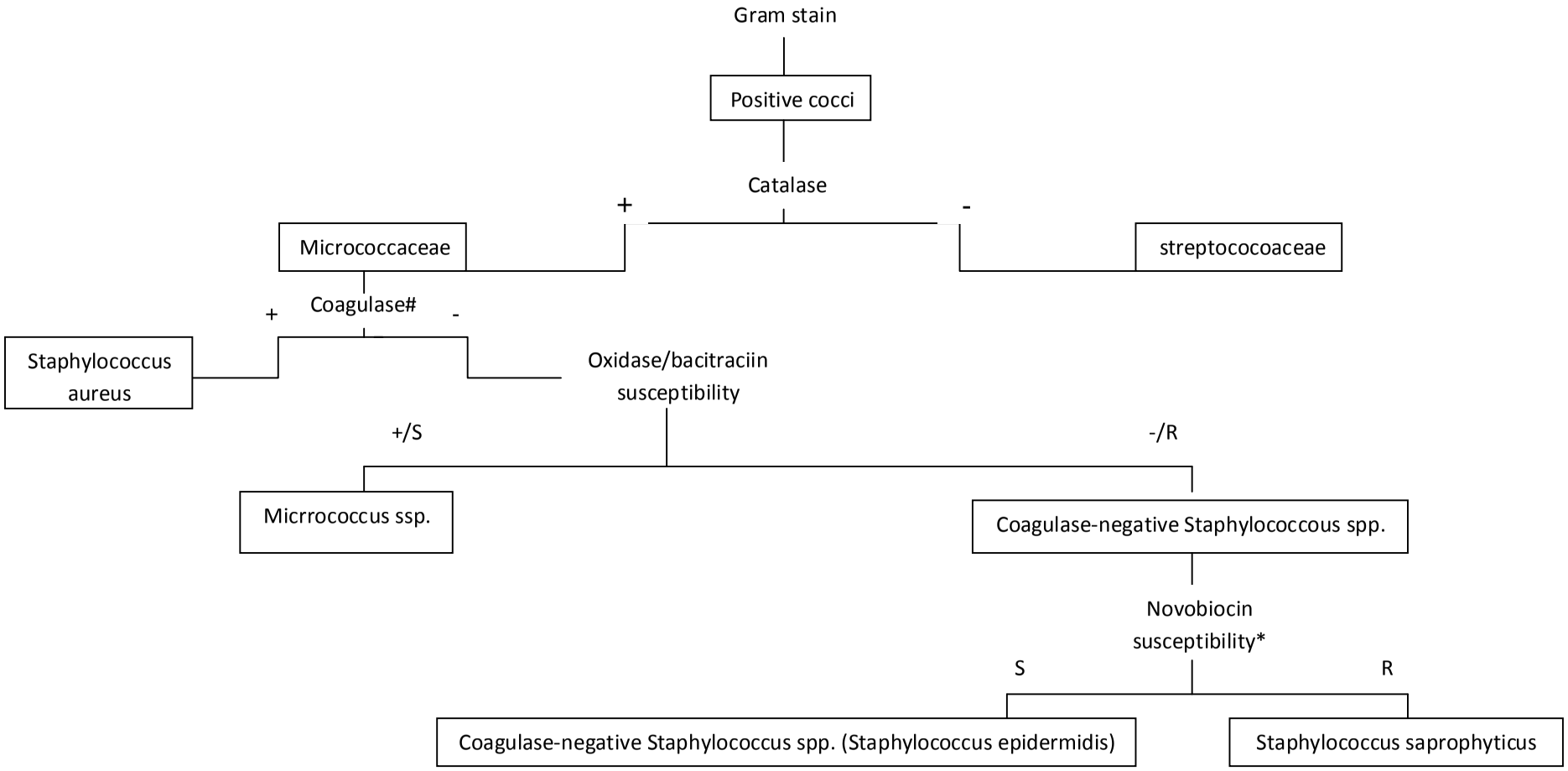
References:
1- National Committee for Clinical Laboratory Standards: Quality assurance for commercially prepared microbiology culture media ed2 Approved standards; M22-A22) Wayne, Pa 1996 NCCLS
2- Mahon CR. Manuselis. Text book of Diagnostic Microbiology Ed. 2 –W. B Saunders Company .2000

راهنماي انتخاب محيط هاي كشت براي نمونه هاي مختلف

	محيط هاي كشت براي بازيابي باكتريهاي هوازي و بي هوازي اختياري					محيط هاي كشت براي بازيابي باكتريهاي بي هوازي		
محيط / نمونه	**BAP(**blood agar plate)	**MAC(**MacConkey agar) **or EMB(**eosin methylene blue)	**CBA(**chocolate blood agar)	**Broth**	**Other**	**BAP(**blood agar plate)	**BBE(***Bacteroides* bile esculin agar**)**	**PEA(**phenylethyl alcohol**)**
حفرات بدن					BCB((blood culture bottles) جهت حجمهای زیاد			
مايعات								
مايع مغزي نخاعي	X		X	X (برای نمونه های شانت)				
مايع صفاقي	X	X	X		**BCB**(blood culture bottles)	X	X	X
مايع جنبي؛ مايع پريكارد	X		X	X	BCB	X		
مايع سينوويال	X		X	X	**BCB**			
زخم ها								
آسپيره	X	X	X			X	X	X
سواب	X	X				جهت كشت بيهوازی توصيه نميشود		
بافت	X	X	X	X		X	X	X
مجراي تنفسي								
خلط	X	X	X					
گلو	X							
لاواژ برونش	X	X	X		**CYE**(charcoal yeast extract; for *Legionella* or *Nocardia* requests)			
براش؛ شستشوها	X	X	X			X	X	X
بيني	X							

	محيط هاي كشت براي بازيابي باكتريهاي هوازي و بي هوازي اختياري					محيط هاي كشت براي بازيابي باكتريهاي بي هوازي		
محيط / نمونه	**BAP(**blood agar plate)	**MAC(**MacConkey agar) **or EMB(**eosin methylene blue)	**CBA(**chocolate blood agar)	**Broth**	**Other**	**BAP(**blood agar plate)	**BBE(***Bacteroides* bile esculin agar**)**	**PEA(**phenylethyl alcohol**)**
ادراري تناسلي								
واژينال/ ركتال جهت استرپتوكوكهاي گروه B (GBS)				**LIM**(enrichment broth for Group B Streptococcus)	Selective or chromogenic GBS media			
ساير موارد	X	X	X		**GC media**(Thayer–Martin or Martin–Lewis or other media enriched for recovery of *N. gonorrhoeae*)	X	X	X
سرويكس					GC media			
پيشابراه/ آلت تناسلي مرد					GC media			
ادرار								
ادرار مياني	X	X			Screen; chromagar			
آسپيره سوپراپوبيك	X	X						
مدفوع			X	**EB**(enrichment broth)	**HE**(Hektoen enteric agar) or **XLD**(xylose–lysine–deoxycholate agar) **Campy**(Campylobacter-selective medium)			
چشم	X	X	X			X		
گوش؛ آسپيره گوش مياني	X	X				X		
كاتترهاي عروقي	X							

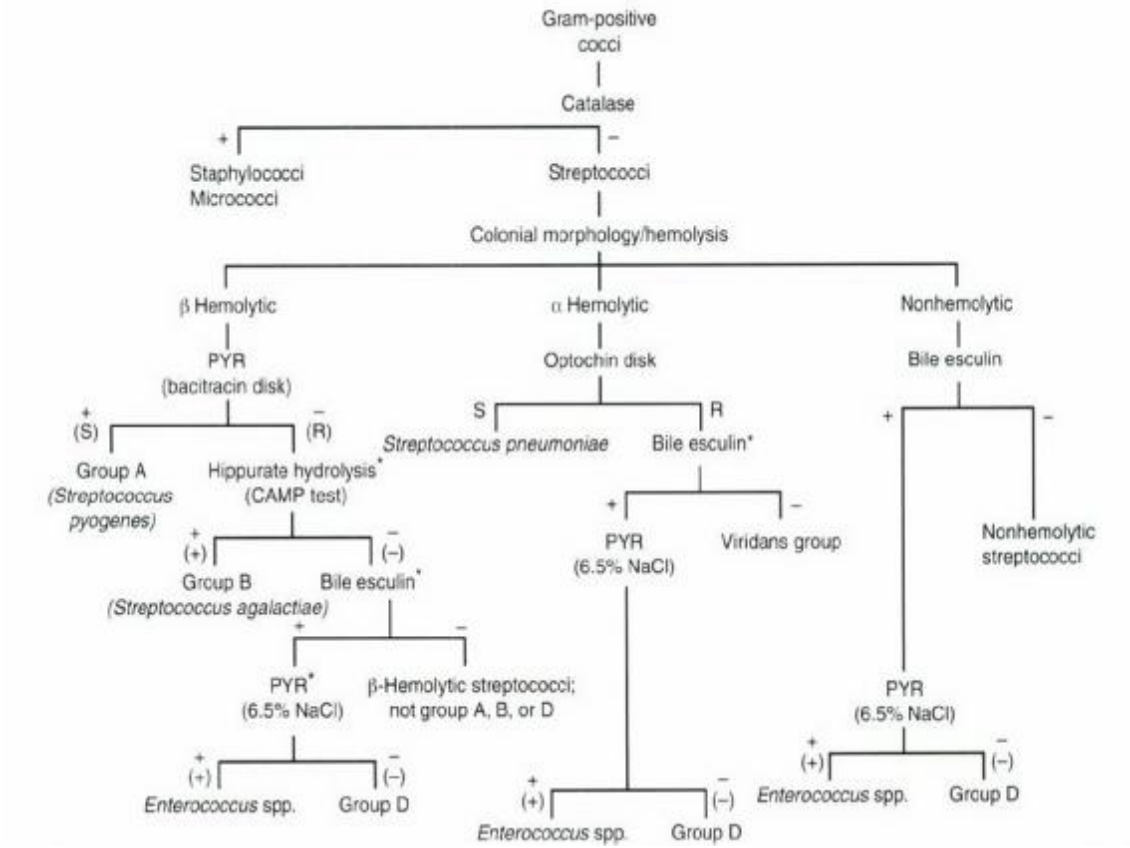
چارت شناسائی گونه های استافیلوکوک



#علاوه برS.aureus، S.lugdunensis، S.intermedius، S.schleferi و S.tryicus نیز کواگولاز مثبت میباشند.

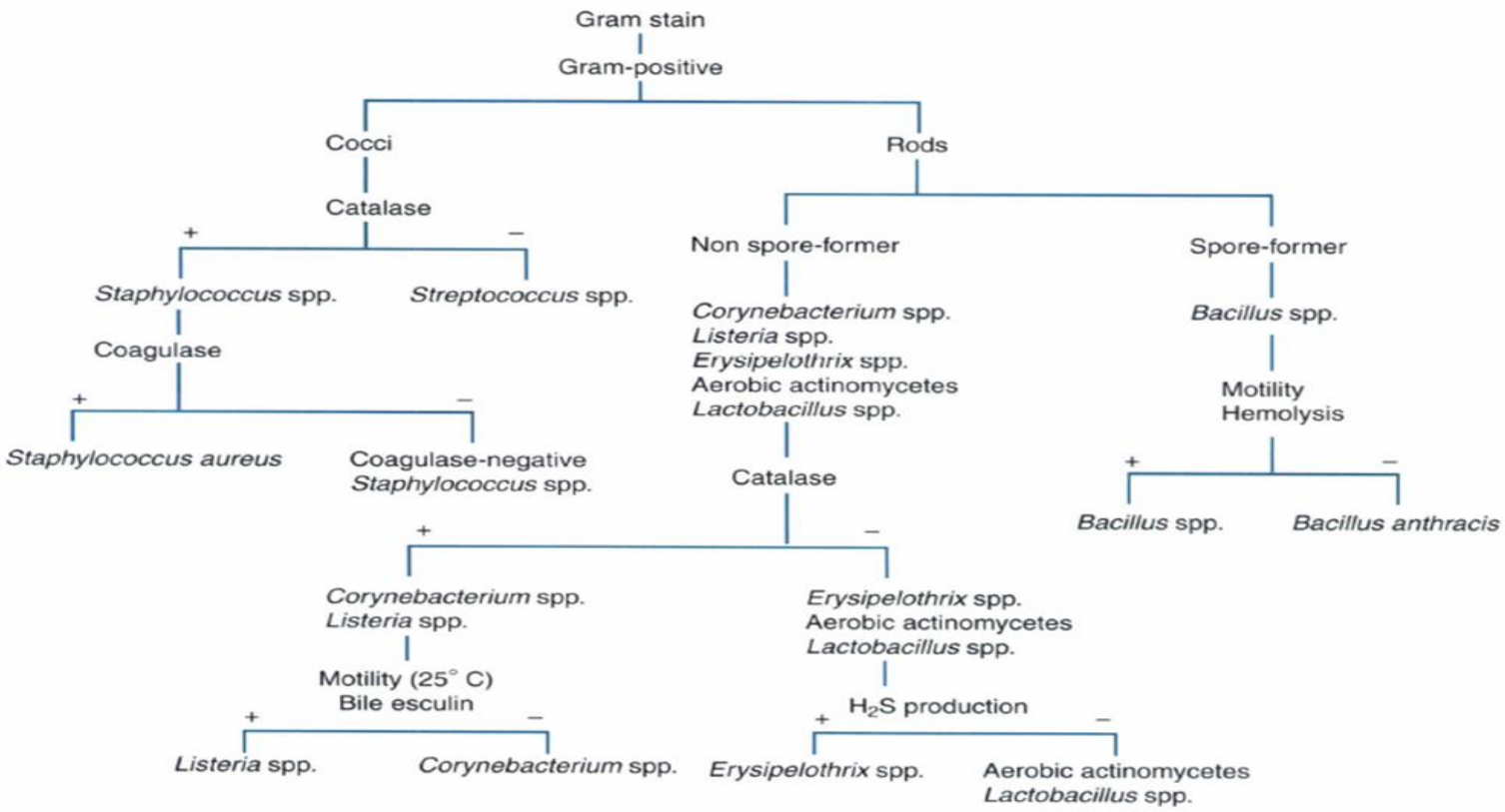
*Novobiocin susceptibility⟶S:16mm≤

چارت شناسائی کوکسی های گرم مثبت کاتالاز منفی

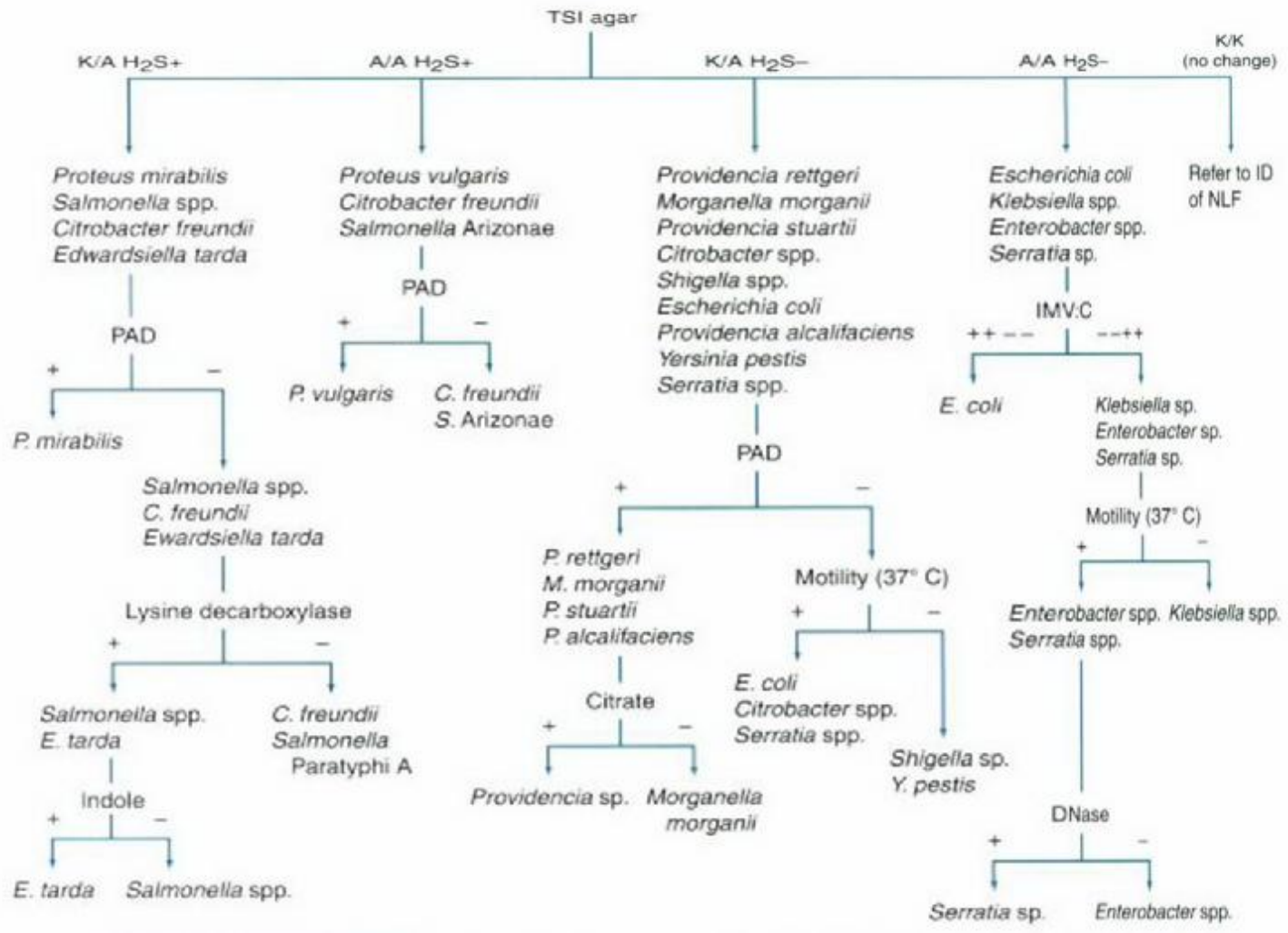


*Optochin disk ≥14mm:S <9mm:R 9-13mm:Do Bile esculin

چارت شناسائی باسیل های گرم مثبت



چارت تشخیص احتمالی انتروباکتریاسه ها در برخورد با آگار TSI



- شناسائی گونه های انتروباکتریاسه با توجه به واکنش آنها در محیطهای TSI و LIA

A, Acid
@, acid and gas production
H_2S, hydrogen sulfide
K, alkaline
LIA. Lysine iron agar
NC. no change
TSI. triple sugar iron agar

TSI Reactions‡	LIA Reactions‡	Possible Identification
K/Ⓐ *or* K/A H_2S +	K/K *or* K/NC H_2S +	*Salmonella* spp. *Edwardsiella* spp.
K/A H_2S+	K/K *or* K/NC H_2S +	*Salmonella* spp. (rare)
K/Ⓐ	K/K *or* K/NC	*Salmonella* spp. (rare)
K/A	K/K *or* K/NC H_2S +	*Salmonella typhi* (rare)
K/Ⓐ	K/K *or* K/NC	*Salmonella* spp. (rare)
K/Ⓐ	K/A H_2S +	*Salmonella paratyphi* A (usually H_2S–)
K/Ⓐ	K/A *or* A/A	*Escherichia coli* *Salmonella paratyphi A* *Shigella flexneri* 6 (uncommon) *Aeromonas* spp. (oxidase-positive)
K/A	K/K *or* K/NC	*Plesiomonas* sp. (oxidase-positive) *Salmonella typhi* (rare) *Vibrio* spp. (oxidase-positive)
K/A	K/A *or* A/A	*Escherichia coli* *Shigella* groups A-D *Yersinia* spp.
A/Ⓐ H_2S +	K/K *or* K/NC H_2S +	*Salmonella* spp. (rare)
A/Ⓐ	K/A *or* A/A	*Escherichia coli* (rare)
A/A	K/A *or* A/A	*Escherichia coli* *Yersinia* spp. *Aeromonas* spp. (oxidase-positive) *Vibrio cholerae* (rare, oxidase-positive)
A/A	K/K *or* K/NC	*Vibrio* spp. (oxidase-positive)

مشخصات بیوشیمیائی گونه های انتروباکتریاسه

Tests or Substrate	Escherichieae	Edwardsielleae	Citrobacteriaceae	Salmonelleae*	Klebsielleae	Proteeae†	Yersinieae
Hydrogen sulfide (TSI agar)	–	+	+ or –	+	–	+ or –	–
Urease	–	–	(+*) or –	–	– or (+)	+ or –	+
Indole	+ or –	+	– or +	–	–	+ or –	+ or –
Methyl red	+	+	+	+	–	+	+
Voges-Proskauer	–	–	–	–	+	–	–
Citrate (Simmons)	–	–	+	+	+	d	–
KCN	–	–	+ or –	–	+	+	–
Phenylalanine deaminase	–	–	–	–	–	+	–
Mucate	d	–		d	+ or –	–	
Mannitol	+ or –	–	+	+	+	– or +	+

Modified from Ewing WH: *Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae*, ed 4, East Norwalk, Conn, 1986, Appleton & Lange.

+, ≥90% positive within 1 or 2 days; (+), positive reaction after 3 or more days (decarboxylase tests: 3 or 4 days); –, ≥90% no reaction in 30 days; + *or* –, most cultures positive, some strains negative; – *or* +, most strains negative, some cultures positive; *d*, different reactions, +, (+), –; +*, weakly positive reaction *TSI*, triple sugar iron; *KCN*, potassium cyanide.

Salmonella serovar Typhi and Paratyhpi and some rare serovars fail to use citrate in Simmons medium. Cultures of serovar Paratyhpi and some rare serotypes may fail to produce hydrogen sulfide; an occasional strain of almost serotype of *Salmonella* genus may be hydrogen sulfide negative.

†Some cultures of *Proteus mirabilis* may yield positive Voges-Proskauer tests.

	پاتوژن های گرم مثبت		پاتوژن های گرم منفی	
	نام باکتری	نام بیماری	نام باکتری	نام بیماری
کوکسی	استافیلوکوکوس اورئوس	عفونت بافتی و پوستی، باکتریمی، سندرم شوک سمی	نیسریا منتژیتیدیس	منتژیت
	استرپتوکوکوس پیوژن	عفونت بافتی و پوستی، فارنژیت و نازوفارنژیت	نیسریا گنوره	سوزاک
	استرپتوکوکوس آگالاکتیه	باکتریمی نوزادان، منتژیت	اشریشیا کولی	عفونت ادراری، پنومونی
	استرپتوکوکوس پنومونیه	پنومونی،منتژیت	پروتئوس	اسهال
	انتروکوکوس فسیوم	باکتریمی، عفونتهای ادراری- بیمارستانی	کلبسیلا پنومونیه و اکسی توکا	عفونت ادراری، پنومونی
باسیل	لیستریا منوسیتوژنز	باکتریمی ، منتژیت	شیگلا	اسهال
	نوکاردیا	پنومونی، عفونت بافت نرم، آبسه مغزی	انترو باکتر	عفونت ادراری، پنومونی پنومونی بیمارستانی
	باسیلوس آنتراسیس	عفونت بافتی و پوستی، پنومونی، عامل بیوتروریسم	سراشیا	پنومونی بیمارستانی
	کورینه باکتریوم دیفتریه	دیفتری		

فلور نرمال و پاتوژن های دستگاههای مختلف در بدن	
Acinetobacter species - Viridans streptococci – β_Hemolytic streptococci –Streptococcus pneumoniae – Staphylococcus aureus- Staphylococcus epidermidis - Entrococcus species – Lactobacillus species - Actinomyces species- Corynebacterium diphtheriae – Neisseria species – Cryptococcus neoformans - Mycoplasma species – Haemophilus influenzae– Haemophilus species- Branhamella (Moraxella)catarrhalis - -Herpes simplex virus- Enterobacteriaceae-Mycobacterium species-Pseudomonas species- Filamentous fungi- Klebsiella ozaenae -Eikenella corrodens - Bacteroides species-Peptostreptococcus species- Porphyromonas species – Prevotella species- Fusobacterium species- Veillonella species- Treponema species – Candida species	**فلور نرمال شایع دستگاه تنفسی (oropharynx,nasopharynx)**
Staphylococci coagulase-negative(saprophyticus) – Streptococcus viridans– Lactobacilli –Diphthroids – Neisseria (nonpathogenic) – Propionibacterium – mycobacterium(commensal) – Mycoplasma (commensal)	**فلور نرمال دستگاه ادرار**
Staphylococcus aureus –Staphylococcus epidermidis – Staphylococcus pneumoniae – Viridans streptococci– Neisseria species – Haemophilus species	**فلور نرمال بینی**
Surviving bacteria from upper respiratory tract and food	**فلور نرمال مری و معده**
Staphylococcus epidermidis– Pseudomonas species – Enterobacteriaceae	**فلور نرمال گوش خارجی**
Staphylococcus aureus - Staphylococcus epidermidis - Haemophilus species	**فلورنرمال ملتحمه چشم**
Enterococcus species – Lactobacillus species - Clostridium species – Enterobacteriaceae - Mycobacterium species	**فلور نرمال روده باریک**
Staphylococcus aureus - Staphylococcus epidermidis – Group B Streptococcus - Viridans Streptococcusi- Enterococcus species -	**فلور نرمال روده بزرگ**

Lactobacillus species - Clostridium species –Actinomyces species – Peptostreptococcus species - Pseudomonas species – other nonfermenters – Enterobacteriaceae – Bacteroidaceae – Treponema species - Mycobacterium species – Candida species	
Mycoplasma species – Ureaplasma urealyticum- Staphylococcus epidermidis - Group B Streptococcus– Viridans Streptococci – Enterococcus species- Lactobacillus species - Clostridium species - Actinomyces species - Bifidobacterium species – Propionibacterium acnes- Peptostreptococcus species - Neisseria species – Acinetobacter species – Enterobacteriaceae - Gardnerella vaginalis - Candida species	فلور نرمال واژن
Mycoplasma species – Ureaplasma urealyticum - Enterococcus species – Enterobacter - Bacteroidaceae – Mycobacterium	فلور نرمال ژنیتال خارجی و مجرا
Staphylococcus aureus - Staphylococcus epidermidis - Viridans Staphylococci – Corynebacterium species – Propionicbacterium acnes – Malassezia furfur – Candida species	فلور نرمال پوست
Corynebacterium diphteriae-Neisseria gonorrhoeae- Mycobacterium tuberculosis- Mycoplasma pneumoniae- Chlamydia trachomatis- Chlamydia pneumonia-Bordetella species- Pneumocystis carinii- Legionella species- Nocardia species	پاتوژنهای دستگاه تنفسی
Community – acquired acute cystis : Escherichia coli- Klebsiella and other Entrobacteriaceae –Staphylococcous saprophyticus **Hospitalized patients** : E.coli- Klebsiella species - Proteus mirabilis and other Entrobacteriaceae - Pseudomonas aeruginosa and Enterococci – other less frequently isolated agents are other gram negative bacilli such as Acinetobacter- Alcaligenes- Citrobacter-Gardnerella vaginalis – β_Hemolytic Streptococci - Neisseria gonorrhoeae	پاتوژنهای دستگاه ادرار
Chlamydia trachomatis – Gardnerella vaginalis – Haemophilus ducreyi – Mycoplasma hominis- Mycoplasma genitalium – Neisseria gonorrhoeae – Neisseria meningitidis – Ureaplasma urealyticum	پاتوژنهای ژنیتال
Acute nonlymphocytic leukemia : Enterobacteriaceae – Pseudomonas – Staphylococci – Corynebacterium – jeikeium –	پاتوژن های بیماران سرطانی

Aspergilus – Mucor – Hepatitis C and other non A ,non B Acute lymphocytic leukemia : Streptococci – Pnemocystis carinii- Herpes simplex virus – Cytomegalovirus – Varicella zoster virus Lymphoma : Brucella – Candida – Cryptococcus neoformans - Herpes simplex virus – Herpes zoster virus – Cytomegalovirus - Pnemocystis carinii – Toxoplasma gondii – Listeria monocytogenes – Mycobacteria – Nocardia- Salmonella – Staphylococci - Enterobacteriaceae – Pseudomonas – Strongy loides stercoralis Mutiple myeloma : Haemophilus influenzae – Streptococci pneumoniae - Neisseria meningitidis – Enterobacteriaceae – pseudomonas – Herpes varicella zoster virus – Candida - Aspergillus	

Reference:

Bailely and Scotts , Diagnostic Microbiology 2007

کنترل کیفیت دیسک های آنتی بیوتیک جهت انجام آزمایش تعیین حساسیت میکروبی به روش *disk diffusion agar*

هدف

هدف از برنامه کنترل کیفی پایش و ارزیابی موارد زیر می باشد :

- صحت و دقت روش انجام آزمایش تعیین حساسیت
- مواد و وسایل به کار برده شده در این آزمایش
- عملکرد افرادی که آزمایش را انجام داده و نتایج بدست آمده را قرائت می نمایند.

به منظور دست یابی بهینه به این اهداف در دسترس داشتن سویه های کنترل کیفی تهیه شده از مراکز معتبر ضروری است .

سویه های کنترل کیفی پیشنهادی توسط CLSI عبارتند از:

Enterococcus faecalis ATCC 29212

Escherichia coli ATCC 25922

Escherichia coli ATCC 35218

Haemophilus influenzae ATCC 49247

Haemophilus influenzae ATCC 49766

Klebsiella pneumoniae ATCC 700603

Neisseria gonorrhoeae ATCC 49226

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Streptococcus pneumoniae ATCC 49619

E.coli ATCC 35218 فقط به عنوان یک میکروارگانیسم کنترلی برای ترکیبات ممانعت کننده بتالاکتاماز، مثل ترکیبات حاوی کلاولانیک اسید، سولباکتام یا تازوباکتام پیشنهاد می شود .

Enterococcus faecalis ATCC 29212 (یا *E.faecalis ATCC 33186*) برای ارزیابی محیط مولر هینتون آگار با دیسک تری متوپریم / سولفامتوکسازول استفاده می شود. درمحیط کشت قابل قبول ، هاله عدم رشد

واضحی به قطر *mm* ۲۰ یا بزرگتر ایجاد می شود در حالیکه در محیطهای کشت غیر قابل قبول ، هاله عدم رشد ایجاد نمی شود یا در داخل هاله ، رشد کم مشاهده می شود و یا هاله ای با قطر کمتر از *mm* ۲۰ ایجاد میگردد. این کار به منظور بررسی مقادیر غیر قابل قبول تیمیدین در محیط کشت مزبور است .

Enterococcus faecalis ATCC 29212 همچنین برای کنترل دیسکهای آمینو گلیکوزید با دوز بالا به کار می رود.

Klebsiella pneumoniae ATCC 700603 به عنوان یک سویه کنترلی برای آزمایشات *ESBL* به کار برده می شود .

کنترل کیفیت قطر هاله عدم رشد سویه کنترلی/ دیسک آنتی بیوتیکی

سویه های کنترل کیفی را باید به روش استاندارد آزمایش *disk diffusion* و با استفاده از همان مواد و روشی که برای سویه های جدا شده از نمونه های کلینیکی استفاده می شود آزمایش و نتایج را با جداول ۳ و ۳A CLSI (ضمیمه ۳) مقایسه و بررسی نمود . محدوده قطر هاله عدم رشد قابل قبول برای هر سویه کنترلی نسبت به یک دیسک آنتی بیوتیکی در جداول فوق فهرست شده است .

چنانچه تغییر در میانگین قطر هاله عدم رشد ناشی از خطا در روش انجام آزمایش نباشد ، احتمالا" ناشی از تغییر در حساسیت ذاتی باکتری نسبت به آن آنتی بیوتیک می باشد. در این صورت لازم است کشت تازه از سوش کنترل تهیه شود .

آزمایش کنترل کیفیت را باید درچه فواصل زمانی انجام داد ؟

الف _ انجام آزمایش روزانه

برای هر سویه کنترلی با یک دیسک آنتی بیوتیکی باید ۲۰ روز متوالی آزمایش تعیین حساسیت انجام و نتایج با مقادیر قابل قبول اشاره شده در جداول فوق مقایسه گردد . بر اساس ضریب اطمینان ۹۵% تنها یک مورد از ۲۰ نتیجه قرائت شده می تواند خارج از محدوده کنترل باشد (به ضمیمه ۲مراجعه کنید) . چنانچه بیشتر از یک مورد خارج از محدوده کنترل باشد نیاز به اقدامات اصلاحی خواهد بود ، که در ادامه توضیح داده می شود.

ب _ انجام آزمایش هفتگی

- در صورتیکه تنها یک مورد از ۲۰ نتیجه قطر هاله عدم رشد برای هر سویه کنترلی/ دیسک آنتی بیوتیکی خارج از محدوده قابل قبول مندرج در جداول ۳ و ۳A(ضمیمه ۳) قرار گیرد ، کنترل کیفی روزانه را به هفتگی تغییر دهید(به ضمیمه ۲ مراجعه کنید) .

- آزمایش کنترل کیفی هفتگی را یکبار در هفته و هم چنین زمانیکه یکی از عوامل آزمایش (مانند سری ساخت آگار یا دیسکهای تهیه شده از یک سازنده) تغییر کند، انجام دهید .

اگر هر یک از نتایج کنترل کیفی هفتگی خارج از محدوده قابل قبول باشد ، انجام اقدامات اصلاحی مورد نیاز است .

اقدامات اصلاحی (Corrective actions)

الف _ نتایج خارج از محدوده قابل قبول به دلیل خطاهای مشهود و واضح شامل:

- استفاده از دیسک اشتباه
- استفاده از سویه کنترلی اشتباه
- آلودگی واضح سویه
- استفاده غیرعمدی از دما و شرایط اشتباه انکوباسیون

بوجود آمده است . دراین حال باید دلیل ایجاد خطا مکتوب و پس از اصلاح آزمایش دوباره تکرار شود .

اگر نتایج گزارش شده در محدوده مورد نظر قرار گرفت ، عملیات اصلاحی بیشتری مورد نیاز نمی باشد .

ب _ عامل ایجاد نتایج خارج از محدوده کنترل نامشخص است. در این حال باید اقدامات اصلاحی فوری بشرح زیر انجام شود.

- آزمایش را جهت یک سویه کنترلی / دیسک آنتی بیوتیکی برای ۵ روز متوالی تکرار و همه نتایج را ثبت کنید .
- اگر اندازه هر ۵ قطرهاله مطابق جداول ۳ و ۳A(ضمیمه ۳) و در محدوده قابل قبول باشد ، عملیات اصلاحی بیشتری مورد نیاز نمی باشد .
- اگر اندازه هر یک از ۵ قطر هاله عدم رشد خارج از محدوده قابل قبول باشد ، به عملیات اصلاحی اضافی نیاز است .
- آزمایشهای کنترلی روزانه باید ادامه داده شود تا به دلیل نهایی مشکل پی برده شود .

عملیات اصلاحی اضافی :

وقتی عملیات اصلاحی فوری مشکل را حل نکرد ، احتمالا" خطای مشاهده شده بعلت بروز یک اشکال کلی در سیستم و نه یک خطای تصادفی ایجاد شده است . در این حالت باید موارد بیشتری بررسی شوند،مانند:

- اندازه گیری و ثبت صحیح قطر هاله های عدم رشد

- رعایت تاریخ انقضا و شرایط نگهداری دیسکها و مواد مورد استفاده (دور از رطوبت و در دمای مناسب)
- مناسب بودن دما و اتمسفر انکوباتور
- تغییرنیافتن یا آلوده نبودن سویه های کنترل
- مطابقت صحیح سوسپانسیون تلقیح با استاندارد نیم مک فارلند
- استفاده از پلیت کشت تازه برای تلقیح (پلیت کشت باید تازه بوده و مدت زمان انکوباسیون آن بیشتر از ۲۴ ساعت ، نباشد.)

وقتی مشکل بر طرف شد ، می‌توان کنترل کیفی هفتگی را برقرار کرد.

نگهداری دیسکهای آنتی بیوتیکی

- دیسکها باید در یخچال$^{\circ}C$ ۸ و پایین تر ، یا در فریزر$^{\circ}C$ ۱۴- و پایین تر تا زمان مصرف نگهداری شوند.
- تمامی دیسکهای گروه بتالاکتام مانند پنی سیلین ، آمپی سیلین ، کربنی سیلین ، تیکارسیلین ، اگزاسیلین و نسل اول ، دوم و سوم سفالوسپورین ها و ... باید در فریزر نگهداری شوند ، و فقط می توان مقداری از آن را بر اساس کار روزانه آزمایشگاه حداکثر به مدت یک هفته در یخچال نگهداری نمود .
- بعضی آنتی بیوتیکهای حساس مثل ایمیپنم ، سفاکلر و ترکیبات کلاولانیک اسید یا سولباکتام اگر تا هنگام مصرف در فریزر نگهداری شوند ، پایداری بیشتری خواهند داشت .
- دیسکها باید در ظروف دارای درپوش محکم و حاوی مواد جاذب رطوبت نگهداری شوند .
- دیسکهای آنتی بیوتیکی باید یک تا دو ساعت قبل از استفاده از یخچال یا فریزر خارج شوند تا به درجه حرارت اتاق برسند .

برای شمارش کلنی‌های بدست آمده از کشت نمونه‌های بالینی بویژه ادرار به منظور تشخیص عفونت لازم است از لوپهای استاندارد با حجم معین استفاده شود. آزمایشگاه می‌بایست همواره از لوپهای کالیبره جهت کشت نمونه‌های ادراری استفاده وتعداد کلنی‌های موجود در هر میلی‌لیتر ادرار(CFU/ml) را گزارش نماید.

برای بررسی حجم لوپ از روشهایی مانند رنگسنجی و توزین استفاده می‌شود. ساده ترین روش برای بررسی حجم لوپ استفاده از روش رنگسنجی از طریق اسپکتروفتومتر یا فتومتر به کمک مواد رنگی مانند متیلن بلو ، کریستال ویوله و اوانس بلو می‌باشد. در این دستورالعمل روش رنگسنجی با استفاده از اوانس بلو توضیح داده شده است.

ابزار و مواد مورد نیاز تعیین حجم لوپ با استفاده از ماده رنگی اوانس بلو

۱- پودر اوانس بلو (Evans Blue) .این ماده به صورت پودر تجاری قابل‌دسترس بوده و به آسانی در آب حل می‌شود.

۲- آب مقطر

۳- لوله آزمایش

۴- پیپت یا سمپلر

۵- اسپکتروفتومتر یا فتومتر کالیبره

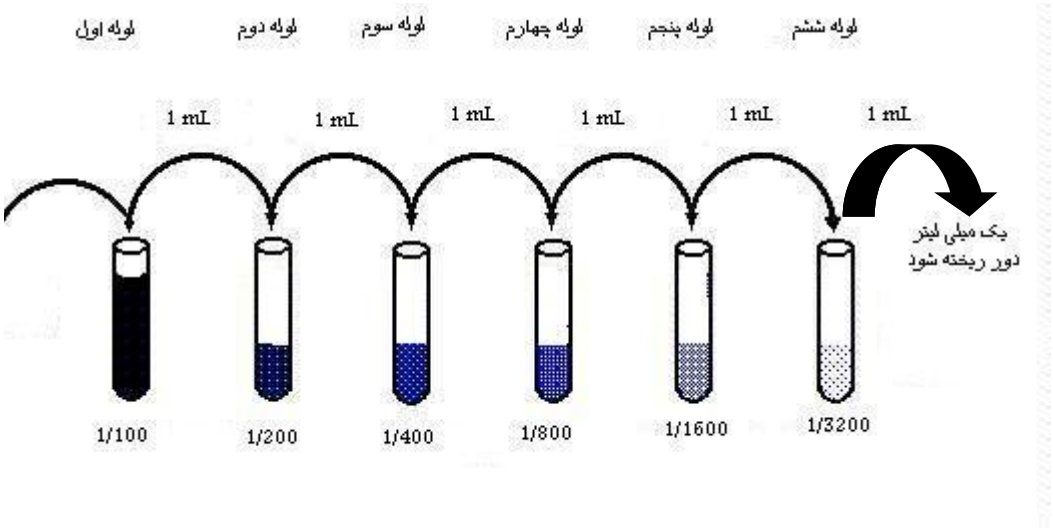
۶- کاغذ میلیمتری

روش انجام

۱- 20mg از پودر رنگی اوانس بلو را در ۱۰ میلی لیترآب حل نمایید. غلظت این محلول 0.2g/100 می‌باشد.

۲- ۶ لوله آزمایش انتخاب کرده ، در لوله اول 2ml ودر هر یک از لوله‌های باقیمانده 1ml آب مقطر بریزید. 20 لاندا (0.02 ml) از محلول ذخیره اولیه (0.2g/100) برداشته در لوله اول ریخته و کاملا مخلوط نمایید. سپس 1ml از لوله اول برداشته و در لوله دوم بریزید ، از لوله دوم ، در لوله سوم و این عمل را تا آخر ادامه

دهید. در انتها یک میلی لیتر از لوله ششم را برداشته و دور بریزید . به این ترتیب ۶ محلول خواهید داشت که رقت نهایی بدست آمده در هر یک و میزان ماده رنگی موجود در آن بشرح زیر خواهد بود.



20λ از محلول ذخیره 0.2g/100

رقت	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200
مقدار ماده رنگی	**10λ**	**5 λ**	**2.5λ**	**1.25λ**	**0.625λ**	**0.3125λ**

۳- میزان جذب نوری (OD) هر یک از۶ محلول حاصله را به کمک اسپکتروفتومتر در طول موج 620nm بدست آورید.

۴- جهت تعیین حجم لوپ مورد بررسی ، ۱۰ لوله آزمایش برداشته و در هر یک ۱ میلی‌لیتر آب مقطر بریزید.

۵- لوپ تحت کنترل را بطور کاملا عمودی وارد محلول ذخیره اولیه نموده ، از محلول رنگی برداشته و در لوله‌های آزمایش فرو برید . این کار را ۱۰ بار تکرار و در فواصل لوپ را روی کاغذ خشک کن قرار دهید تا کاملا خشک شود. از سوزاندن لوپ خودداری نمایید.

۶- بعد از مخلوط کردن ، جذب هریک از لوله‌ها را در طول موج 620nm قرائت نمائید.

۷- بر روی کاغذ میلی‌متری نموداری ترسیم نمایید که در آن ، محور افقی نشانگر رقتهای تهیه شده و محور عمودی نمایانگر جذب نوری هر رقت باشد. (مشابه ضمیمه ۴)

۸- با قرار دادن میانگین جذب بدست آمده از لوپ کنترلی، روی محور عمودی می‌توان ضریب رقت لوپ کنترلی را از روی محور افقی بدست آورد.

جهت تعیین تعداد کلنی در هر میلی‌لیتر ادرار ، باید تعداد کلنی‌های بدست آمده از کشت روی پلیت را در عکس ضریب رقت لوپ ، ضرب کرد. بطور مثال اگر ضریب رقت لوپ مجهول ۱/۱۰۰ و تعداد کلنی‌های روی پلیت ۵۰۰ عدد باشد ، باید ۵۰۰ را در ۱۰۰ ضرب و نتیجه را بصورت cfu/ml ۵۰/۰۰۰ گزارش نمود.

روشهای دیگری نیز برای بررسی میزان حجم برداشتی توسط لوپ باکتریولوژی وجود دارد که از بین آنها می‌توان به روش توزینی مندرج در کتاب

Diagnostic microbiology ,Elmer W.Koneman, 5th edition, page 96

اشاره کرد که در آن با استفاده از ترازوی بسیار حساس تغییرات وزن دیسک کاغذی بعد از افزودن یک لوپ آب مقطر روی آن، محاسبه می‌گردد.

آزمایشگاه مرجع سلامت	تهیه کدورت نیم‌مک‌فارلند	کد: M-07/00 صفحه1 از 1

برای استاندارد کردن غلظت تلقیح ، جهت آزمایش تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی، باید از استاندارد سولفات باریم (BaSo4) که برای تهیه آن به روش زیر عمل می‌شود ، استفاده نمود.

۰/۵ میلی‌لیتر از کلرور باریم (0.048 mol/L(BaCl2) (W/V $BaCl_2/H_2O$ 1.175%) را به ۹۹ /۵ میلی‌لیتراسید سولفوریک mol/L 0.18 (1% V/V) اضافه کنید و با هم زدن مداوم یک سوسپانسیون تهیه نمائید.

چگالی صحیح استاندارد با تعیین جذب این سوسپانسیون توسط اسپکتروفتومتر در کووت به قطر ۱ سانتی‌متر تعیین می‌شود. جذب در ۶۲۵ نانومتر باید بین ۰/۰۸ تا۰/۱۳ باشد.

از سوسپانسیون حاصله ۶-۴ میلی لیتر در لوله‌های درپیچدار هم اندازه با لوله‌های سوسپانسیون باکتریایی ریخته می‌شود.

در لوله‌ها محکم بسته شده و در دمای اتاق ودرشرایط تاریکی، نگهداری می‌شوند.

قبل از هر بار استفاده ، استاندارد با ورتکس مکانیکی به شدت همزده می‌شوند تا کدورت یکنواختی بدست آید. در صورت مشاهده ذرات بزرگ ، باید استانداردتازه‌ای جایگزین شود.

استاندارد سولفات باریم ، باید بصورت ماهانه جایگزین گردیده یا جذب آن اندازه‌گیری شود.

برای نگهداری سویه‌های باکتریایی می‌توان از روشهای طولانی مدت و کوتاه مدت استفاده نمود.

نگهداری طولانی مدت

نگهداری طولانی‌مدت باکتریها این امکان را می‌دهد که کلیه سویه‌های میکروبی اعم از هوازی (بارشد سریع ویا سخت رشد) ونیز بیهوازی ، ماهها و حتی سالها به صورت زنده نگهداری شوند. بهترین روشهای نگهداری طولانی مدت شامل لیوفیلیزاسیون (Freeze drying) و نگهداری در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد یا پایین تر (در دیپ فریز یا در نیتروژن مایع) می‌باشد.

۱- نگهداری در دیپ فریز (۵۰- تا ۷۰- درجه سانتی‌گراد یا پایینتر) ویا نیتروژن مایع :

باکتری مورد نظر را روی محیط مغذی مانند پلیت (Trypticase Soy Agar) TSA حاوی ۵% خون گوسفند و در مورد میکروارگانیسمهای سخت رشد روی محیط آگار شکلاته کشت دهید. پلیتها را به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۲±۳۵ درجه سانتی‌گراد و در صورت نیاز تحت شرایط CO_2 برای هر باکتری انکوبه نمائید.

بعد از انکوباسیون، خالص بودن و مورفولوژی کلنی‌ها را بررسی نموده و در صورت نیاز، تستهای بیوشیمیایی آنرا انجام دهید. سپس از باکتری رشد یافته ، سوسپانسیون غلیظی در ۱۰۰-۵۰ میلی‌لیتر از یک محیط محافظت‌کننده از سرما (Cryoprotective) تهیه نمائید. این محیط برای جلوگیری از تخریب سلولهای باکتری در شرایط انجماد مورد استفاده قرار می‌گیرد. محیط محافظت‌کننده از سرما می‌تواند Skim milk ، خون گوسفند یا خرگوش دفیبرینه استریل یا Tryptic Soy Broth (TSB) حاوی گلیسرول با غلظت نهایی ۱۵-۱۰% باشد.

سپس از سوسپانسیون باکتریایی فوق به مقدار mL ۱- ۰/۵ در ویالهای شیشه‌ای یا پلاستیکی کوچک استریل توزیع کنید . تعداد ویال ذخیره خود را برای مصرف یکسال آماده نمائید.

ویالهای حاوی سویه‌ها را می‌توان در برودت ۵۰- تا ۷۰- درجه سانتی‌گراد به مدت یکسال نگهداری نمود. در صورت عدم دسترسی به فریزر ۷۰- درجه می توان سویه‌های با رشد سریع را در فریزر ۲۰- درجه نیز نگهداری نمود. در این شرایط توجه به نکات زیر ضروری است.

سویه‌های سخت رشد مانند هموفیلوس انفلوآنزا و نیسریا گنوره در این دما قابل نگهداری نمی‌باشند و باید در فریزر ۷۰- درجه نگهداری شوند.

سویه‌های بارشد سریع در این دما عمر کمی دارند و تعداد زیادتری از آنها از بین می‌روند. بنابراین توصیه می‌شود برای اطمینان از حیات سویه‌ها هر چند ماه ، طبق روش زیر کشت داده شوند.

یک ویال از فریزر بیرون آورده و و سریعا زیر آب جاری ولرم محتویات آنرا ذوب نمائید. نمونه را روی محیط آگار خوندار یا شکلاته (در مورد باکتریهای سخت رشد) تلقیح کرده و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۲±۳۵ درجه ودر صورت نیاز در شرایط CO_2 انکوبه نمایید. این باکتری می‌تواند برای آزمایشهای کنترل داخلی کیفیت در آزمایشگاه یا برای تهیه working control بکار رود. قبل از هر اقدام باید از خالص بودن نمونه ، اطمینان حاصل کرد. **ویال مورد استفاده بعد از ذوب شدن باید دور انداخته شده و بهیچوجه مجددا فریز نگردد.**

کشتهای working control : عبارتست ازکشت مجدد از کشت ذخیره فریز شده که برای کنترل کیفیت محیط کشت و.. استفاده می‌شود.

از کشت ذخیره تا ۳ پاساژ پشت سر هم می‌توان انجام داد . پس از آن ، نمونه باید دور انداخته شده و از یک کشت ذخیره فریز شده دیگر برای تهیه کشتهای working control استفاده شود. پاساژهای مکرر(بیش از ۳ پاساژ)، احتمال تغییر فنوتیپی سویه‌ها را افزایش می‌دهد.

برای تهیه working control ، از کشت ذخیره فریز شده ، روی پلیت یا آگار شیبدار تلقیح و آنرا به مدت یک شبانه‌روز تا زمانی که رشد مناسبی بدست آید، انکوبه نمائید. در مورد ارگانیسمهای با رشد سریع این پلیت یا آگار شیبدار را می‌توان در ۸-۲ درجه سانتیگراد یا در دمای اتاق تا مدت ۴ هفته نگهداری نمود. بعد از هر پاساژ، خالص بودن و مورفولوژی کلنی‌ها را بررسی نمائید.

۲- استفاده از روغن معدنی در دمای اتاق :

۱- محیط کشت Brain Heart Infusion Agar (BHIA) را با شیب کم در لوله تهیه نمایید. برای باکتریهای مشکل‌پسند مانند گونوکک ، منتگوکک ، استرپتوکک پنومونیه و هموفیلوس آنفلوانزا ، لازم است محیط

شکلات آگار را با افزودن ۵% خون گوسفند به محیط فوق پس از خروج از اتوکلاو و رسیدن به دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و قرار دادن در بن‌ماری ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه تهیه نمود.

۲- روغن معدنی (یا پارافین مایع) را در حرارت خشک (۱۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یکساعت) استریل نمائید.

۳- میکروب مورد نظر را روی محیط کشت دهید.

۴- بعد از بدست آوردن کشت کافی ، روغن استریل را به مقدار cc ۱ روی سطح محیط بریزید.

۵- در صورت نیاز به کشت مجدد ، نمونه از سطح آگار (زیر روغن) برداشته می‌شود.

۶- بعد از ۱۲-۶ ماه تجدید کشت نمایید.

۱- کشت عمقی و نگهداری در دمای اتاق :

این روش فقط برای باکتریهایی که مشکل‌پسند نیستند مانند استافیلوکک وخانواده انتروباکتریاسه بکار می‌رود.

۱- یک محیط کشت آگار بدون کربوهیدرات مانند TSA را باعمق زیاد در لوله تهیه نمایید.

۲- باکتری را بصورت کشت عمقی در در این محیط تلقیح نمایید.

۳- این محیط را ۲۴ ساعت در اتو ۳۵ درجه انکوبه نمائید.

۴- در لوله را با درپیچ یا چوب پنبه ببندید.

۵- لوله در پیچ‌دار را در پارافین مایع فرو ببرید به گونه‌ای که کاملا در لوله را بپوشاند.

۶- کشتها را در حرارت اتاق نگهداری نمائید.

۷- هرساله سوش موردنظر را تجدید نمائید.

۲- کشت عمقی در محیط سیستین تریپتیکیس آگار (CTA) برای نیسریا و استرپتوکک :

۱- محیط CTA را در لوله تهیه نمایید .

۲- باکتری را بطو عمقی در این محیط کشت دهید.

۳- محیط را بمدت ۲۴ ساعت در اتو ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.

۴- در لوله را با چوب‌پنبه یا در پیچ ببندید.

۵- لوله در پیچ‌دار را در پارافین مایع فرو ببرید به گونه‌ای که کاملا در لوله را بپوشاند.

۶- برای نیسریا لوله را در ۳۵ درجه نگهداری و هر دو هفته کشت را تجدید نمائید . برای استرپتوکک لوله را در حرارت اتاق نگهداری کرده و هر ماه تجدید کشت کنید.

۳- محیط کشت Cooked meat برای باکتریهای بیهوازی :

۱- باکتری را در لوله‌های حاوی محیط Cooked meat کشت دهید.

۲- محیط را بمدت ۲۴ ساعت در اتو ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.

۳- در لوله را با چوب‌پنبه یا در پیچ ببندید.

۴- کشتها را در حرارت اتاق نگهداری نمائید.

۵- هردو ماه کشت را تجدید نمائید.

نگهداری کوتاه مدت

کشتهای working control که برای کارهای روتین روزانه استفاده می‌شوند ، به روشهای زیر تهیه می‌شوند:

§ باکتریهای با رشد سریع

۱- سوش مورد نظر را در سطح محیط TSA لوله‌ای درپیچ‌دار کشت دهید.

۲- محیط را بمدت ۲۴ ساعت در اتو ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.

۳- پس از رشد کامل، لوله را در یخچال نگهداری کنید

۴- هر ماه کشت را تجدید نمائید.

§ استرپتوککها

۱- سوش مورد نظر را در سطح آگار خوندار شیبدار(لوله‌ای درپیچ‌دار) کشت دهید.

۲- محیط را بمدت ۲۴ ساعت در اتو ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.

۳- پس از رشد کامل، لوله را در یخچال نگهداری کنید. (جهت استرپتوکک پنومونیه ، محیط را در دمای اتاق نگهداری کنید.)

۴- هر ماه کشت را تجدید نمائید.

§ مننگوکک و هموفیلوس

۱- سوش مورد نظر را در سطح محیط آگار شکلاته لوله‌ای یا پلیت کشت دهید.

۲- محیط را بمدت ۲۴ ساعت در اتو ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.

۳- پس از رشد کامل، لوله را در حرارت اتاق نگهداری کنید

۴- هر۲ هفته کشت را تجدید نمائید.

§ گونوکک

۱- سوش مورد نظر را در سطح محیط آگار شکلاته کشت دهید.

۲- محیط را بمدت ۲۴ ساعت در اتو ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.

۳- نمونه را در **دمای ۳۵ درجه** نگهداری نمایید.

۴- هر۲ روز یکبار کشت را تجدید نمائید.

اتوکلاو

اگر چه اتوکلاو بهترین وسیله برای استریلیزاسیون است، باید تصدیق کنیم که طولانی شدن مرحلهٔ گرمایی، سبب کاهش کیفیت مواد مغذی در محیط های کشت کمپلکس محتوی قند، مواد معدنی و فلزی می شود و در نتیجه به محیط های کشت زیان وارد می کند. بنابراین در چرخهٔ استریلیزاسیون باید از زمان کوتاهتر و دمای بالاتر استفاده کنیم تا علاوه بر آنکه آسیب کمتری به محیط کشت وارد می شود، برای ارگانیسم نیز کشنده تر باشد.

چرخهٔ استریلیزاسیون

- مرحلهٔ ۱ : زمان بالا رفتن دما در محفظهٔ اتوکلاو (۱۲۱˚C-۲۰ ˚C)
- مرحلهٔ ۲ : زمان نفوذ گرما به داخل ظرف محیط کشت (۱۲۱˚C - ۱۰۰˚C>)
- مرحلهٔ ۳ : زمان نگهداری در دمای مقرر (۱۲۱˚C)
- مرحلهٔ ۴ : زمان پایین آمدن دمای محفظه (۱۲۱˚C-۸۰˚C)

انواع استریلیزاسیون

- استریلیزاسیون محیط های کشت و محلول ها
- استریلیزاسیون مواد مصرفی آلوده
- استریلیزاسیون مواد خشک بسته بندی شده

استریلیزاسیون محیط های کشت و محلولها

- بهتر است از لوله و ارلن درپیچ دار استفاده شود. بیشتر از ۲/۳ آنها را پر نکنید. درپیچ آنها را شل کنید.
- از قرار دادن اشیاء بر روی یکدیگر بپرهیزید. باید فاصلهٔ اشیاء از یکدیگر و از دیواره های اتوکلاو حداقل ۵ سانتی متر باشد تا بخار جریان یابد.
- درب اتوکلاو را ببندید. زمان و دما را طبق دستور شرکت سازنده (معمولاً ۱۵ دقیقه در ۱۲۱˚C) تنظیم کنید.
- در بعضی از محیط های کشت که به دمای بالا حساس هستند (محتوی مقدار قند بالا یا عوامل مهار کننده مثل دزوکسی کولات سدیم یا نمکهای صفراوی هستند) تحت تأثیر دمای بالا، pH محصول نهایی کاهش می یابد.

- دمای استریلیزاسیون به دمای چمبر اتوکلاو برمیگردد نه به دمای محیط کشت. زمان لازم برای رسیدن به این دما باید در حد ممکن کوتاه باشد.
- چرخهٔ استریلیزاسیون باید متناسب با زمان نفوذ گرما در نظر گرفته شود. برای مثال محتویات یک ظرف یک لیتری محیط کشت باید طی ۱۵ دقیقه از زمان رسیدن محفظه به دمای ۱۲۱°C، به این دما برسد.

استریلیزاسیون مواد مصرفی آلوده

- مواد مصرفی آلوده را جدا نموده و در کیسه های قابل اتوکلاو شدن قرار دهیدو بر روی آنها برچسب Biohazardنصب کنید.
- برای اطمینان از نفوذ بخار به همهٔ قسمتهای کیسه، یا گرهٔ آنرا شل کنید یا قبل از محکم کردن گره، یک پیمانه (۰/۳ لیتر) آب به آن اضافه کنید. بیش از ۳/۴ کیسه را پر نکنید.
- برای جلوگیری از مسدود شدن آبگذر اتاقک اتوکلاو توسط آگار مذاب، کیسه ها را داخل سطل قرار دهید.
- زمان لازم برای استریلیزاسیون زباله، ۶۰-۳۰ دقیقه در ۱۲۱°Cیا ۳۰-۱۵ دقیقه در ۱۳۴° Cمی باشد.
- وقتی آگار ذوب شده، سفت شد آنرا مثل زبالهٔ طبیعی دور بریزید. اما محیط کشت محتوی سلنیت را باید بصورت زبالهٔ مخصوص منهدم کنید.

استریلیزاسیون مواد خشک بسته بندی شده

- بسته ها را طوری در اتوکلاو قرار دهید که حداکثر چرخش بخار در بین آنها ایجاد شود و با دیواره های اتوکلاو نیز تماسی نداشته باشند.
- زمان لازم برای استریلیزاسیون مواد خشک بسته بندی شده ، ۲۵ دقیقه با خروج سریع بخار یا ۳۰ دقیقه بدون خروج بخار در دمای ۱۲۱°Cمی باشد.

نحوهٔ نگهداری

- روزانه: صفحهٔ کف اتوکلاو را از سوراخ آبگذر اتاقک جدا کرده، تمیز کنید. لوازم فرعی مثل طبقات و سینی ها را با آب و صابون بشویید. سطح آب ژنراتور را کنترل کنید.
- هفتگی: آبگذر و درزها را تمیز کنید. سوپاپ اطمینان را بررسی کنید.
- ماهانه: آب دستگاه را تعویض نمایید.
- هر ۳ ماه: داخل و خارج دستگاه و قسمت بیرونی آبگذر را تمیز کنید.

- هر ۶ ماه: دستگاه توسط نمایندۀ سرویس تعمیر، بازرسی شود.

کنترل کیفیت

تست شیمیایی:

- نوار کاغذی TST: سه عامل زمان، بخار و دما را کنترل می کند و از زرد به بنفش تغییر رنگ می دهد. در هر سری کاری از این نوار استفاده کنید.
- برچسب Sterility-Record: علاوه بر سنجش استریلیتی، امکان ثبت تاریخ استریلیزاسیون، نام فرد استریل کننده و نام محیط کشت بر روی این برچسب وجود دارد. در هر سری کاری از این برچسب استفاده کنید.

تست بیولوژیک:

استفاده از ویال حاوی اسپور باسیلوس استئاروترموفیلوس ATCC 7953 بطور هفتگی توصیه می شود.

ایمنی

- از دستکش مقاوم به حرارت و محافظ چشم استفاده کنید.
- بعد از آنکه فشار اتاقک اتوکلاو به صفر و دمای آن به حدود ۶۰ $^{\circ}C$ رسید کنار درب اتوکلاو بایستید و آنرا باز کنید. منتظر بمانید تا ظروف کمی خنک شوند، سپس آنها را حمل کنید.
- هرگز در هنگام روشن بودن دستگاه اقدام به بارگذاری یا خارج نمودن وسایل و مواد ننمایید.
- هرگز در هنگام روشن بودن دستگاه و اتصال آن به پریز اقدام به تمیز نمودن آن نکنید.
- هرگز پیچ های محکم کنندۀ درب را در هنگام کار دستگاه شل و سفت نکنید.

فور(اون)

اون برای استریل کردن موادی که نمی توانند بطور کامل تحت نفوذ بخار قرار گیرند، اما می توانند دمای بالای مورد نیاز مثل ۱۸۰ $^{\circ}C$ - ۱۶۰ را تحمل کنند، به کار می رود. اون بویژه برای ظروف شیشه ای مثل لوله آزمایش، پتری دیش، پی پت و نیز برای آلات فلزی مثل پنس، اسکالپل و قیچی به کار می رود

اون باید دارای فن (جهت چرخش هوای متراکم در سراسر اتاقک)، نشانگر درجه حرارت، ترموستات و تایمر، طبقات مشبک، قفل داخلی درب و عایق بندی مناسب جداره ها باشد.

استریلیزاسیون در اون

۱- برای بسته بندی وسایل فوق‌الذکر جهت استریل نمودن آنها در اون میتوان از فویل آلومینیومی یا کاغذ کرافت و سربطریهای پنبه ای استفاده نمود.

۲- باید دقت شود که کاغذ و پنبه نسوزند چون پنبهٔ نیم سوز مواد ضد باکتری فرّاری را متصاعد می کند.

۳- حدود ۲ سانتی متر از انتهای فوقانی پی پتها را با پنبهٔ غیر جاذب ببندید و آنها را در ظروف فلزی قرار داده، درب آنها را ببندید.

۴- درپوش لوله های آزمایش را با کاغذ آلومینیومی بپوشانید و آنها را بطور عمودی در جا لوله ای قرار دهید. درپوش، لبهٔ لوله را از آلودگی از طریق هوا در طی ذخیره سازی حفظ می کند.

۵- در صورتی می توان بطری های درپیچ دار را در اون استریل نمود که درپوش و آستری آنها از موادی مثل فلز، پلی‌پروپیلن یا لاستیک سیلیکون ساخته شده باشد تا در دمای استریلیزاسیون از شکل طبیعی خارج نشود.

۶- پودر، روغن، چربی و گریس مثل Petroleum Jelly را در ظرف شیشه ای یا فلزی ودر اندازه های کوچک که از وزن ۱۰ گرم یا عمق یک سانتی متر تجاوز نکند، استریل نمایید.

۷- قبل از قرار دادن ظروف شیشه ای در اون، از خشک بودن آنها مطمئن شوید. مواد را به گونه ای در اون قرار دهید که هوای داغ در اطراف و مابین آنها در جریان باشد.

۸- زمان نگهداری استریلیزاسیون از زمانی آغاز می شود که اتاقک به دمای استریل انتخابی برسد و نیز مدتی هم بیشتر درنظر گرفته می شود تا همهٔ قسمتهای اتاقک و مواد داخل آن به دمای مورد نظر برسند($180^{\circ}C$-۱۶۰ به مدت ۲ ساعت).

۹- به دلیل عایق بودن دستگاه، چند ساعت طول می کشد تا اشیاء داخل آن خنک شود، مگر آنکه مجهز به فن باشد. درب اون را باز نکنید تا اتاقک، ظروف و مواد داخل آن تا دمای حدود $60^{\circ}C$ خنک شوند. اگر هوای سرد ناگهان وارد دستگاه شود ممکن است ظروف شیشه ای ترک بخورند.

نحوهٔ نگهداری :

بطور ماهانه داخل آن تمیز وهر ۶ ماه توسط نمایندهٔ سرویس تعمیر، بازرسی شود.

کنترل کیفیت :

تست شیمیایی: ویال شیشه ای Browne و مشاهدهٔ تغییر رنگ مناسب از قرمز به سبز. از این ویال در هرسری کاری استفاده کنید.

تست بیولوژیک: استفاده از نوار کاغذی حاوی اسپور باسیلوس سوبتیلیس واریتهٔ نایجر ATCC 9372 بطور هفتگی توصیه می شود.

ایمنی:

استفاده از دستکش مقاوم به حرارت و محافظ چشم.

انکوباتور

انکوباتور محفظه عایق بندی شده ایست که برای نگهداری دما و رطوبت کنترل شده محیط برای رشد میکروارگانیسم ها نیاز است . بعضی انکوباتورها برای نگهداری میزان دلخواه از CO_2 برای میکروارگانیسم هایی که دی اکسید کربن دوست (Capnophilic) هستند ، تجهیز شده اند .

الف _ انکوباتورهای بدون CO_2 :

- تنظیم کننده دما را روی دمای مورد نظر قرار دهید.
- وقتی درجه حرارت به دمای مورد نظر رسید ، دما را در هر روزکاری که از انکوباتور استفاده می‌شود، روی برگه QC ثبت کنید.
- نمونه ها را به طور ایمن روی سینی ها یا قفسه ها قرار دهید .
- می توانید با قراردادن یک تشتک پر از آب متناسب با اندازه اتاقک در کف انکوباتور ، محیط مرطوب ایجاد نمایید .

ب _ انکوباتورهای CO_2 دار :

- سطح دما و CO_2 در برگه QC در هر روز استفاده ثبت می شوند .

نکته :

در صورت اتمام کپسول گاز CO_2 ، تا زمان شارژ مجدد آن می توانیم جهت انکوباسیون نمونه های نیازمند CO_2 از کندل جار بصورت جایگزین استفاده نماییم .

نحوه نگهداری :

- همه انکوباتورها باید به طورماهانه با محلول صابون ملایم تمیز شوند .
- به منظور رعایت موارد ایمنی ، کپسولهای CO_2 باید به صورت ایستاده با زنجیر سنگین به دیوار محکم شود. زمانیکه از سیلندرها استفاده نمی شود ، سوپاپها و درپوشها باید ، به طور محکم بسته شوند . سیلندرهای خالی را روی حمل کننده سیلندر گازبه طور محکم با زنجیر نگهداری کنید . هرگز سیلندرهای گاز را در دمای بالاتر از ($۵۲^{O}C$) $۱۲۵^{O}F$ نگهداری نکنید . سیلندرها را در وضعیت افقی قرار ندهید .

الف _ انکوباتورهای بدون CO_2 :

زمانیکه دمای انکوباتور خارج از محدوده قابل قبول برای واحد مورد نظر باشد ، باید اقدامات اصلاحی باید مطابق موارد ذیل انجام شود :

- منبع برق ، پریز برق و Circuit Panel را بررسی کنید .
- دمای تنظیمی (Set Point) را بررسی کنید .
- اگر دستگاه هنوز درست کار نمی کند ، به نماینده سرویس دهنده اطلاع دهید .

ب _ انکوباتورهای CO_2 دار :

یک کشت از نیسریا گونوره در انکوباتور قرار دهید . هر روز آن را پاساژ داده و رشدش را بررسی نمایید . این ارگانیسم به CO_2 نیاز کامل دارد .

دستورالعمل فنی انکوباتور

کلیات

انکوباتور برای نگهداری سوسپانسیون یا محیط‌های کشت حاوی میکروب یا نگهداری مواد در برخی آزمایش‌ها که نیاز به حرارت خاص دارند، استفاده می‌گردد.

چگونگی کاربری

انکوباتور محفظه عایق‌بندی شده‌ای است که برای نگهداری دماو رطوبت تنظیم شده محیط برای رشد میکروارگانیسم‌ها مورد نیاز است. بعضی انکوباتورها برای نگهداری میزان دلخواه از CO_2 برای میکروارگانیسم‌هایی که دی اکسیدکربن دوست (Capnophilic) هستند، تجهیز شده‌اند.

الف - انکوباتورهای بدون CO_2:

- تنظیم کننده دما را روی دمای مورد نظر قرار دهید.
- وقتی درجه حرارت به دمای مورد نظر رسید، دما را در هر روز استفاده روی برگه کنترل کیفی (QC) ثبت کنید.
- نمونه‌ها را به‌طور ایمن روی سینی‌ها یا قفسه‌ها قرار دهید.
- می‌توانید با قراردادن یک تشتک پر از آب متناسب با اندازه اتاقک در کف انکوباتور، محیط مرطوب ایجاد نمایید.

ب – انکوباتورهای CO_2 دار:

- سطح دما و CO_2 در برگه QC در زمان استفاده از آن، ثبت می‌شوند.
- درصورت اتمام کپسول‌گاز CO_2، تا زمان شارژ مجدد آن می‌توانیم جهت نگهداری نمونه‌های نیازمند CO_2 از محفظه حاوی شمع (candle jar) به‌صورت جایگزین استفاده نماییم.

نحوه نگهداری

- تمامی انکوباتورها باید به‌طور ماهانه با محلول صابون ملایم تمیز و در صورت لزوم ضد عفونی شوند.
- زمانی‌که دمای انکوباتورهای بدون Co_2 خارج از محدوده قابل قبول برای واحد مورد نظر باشد، باید به سوپروایزر فنی اطلاع داده شود. اقدامات اصلاحی مطابق موارد ذیل انجام شود:

× منبع برق، پریز برق و کلیدهای روشن/ خاموش را بررسی شود.

× دمای تنظیمی(Set Point) را بررسی گردد.

× اگر دستگاه هنوز درست کار نمی‌کند، باید به نماینده سرویس دهنده اطلاع داده شود.

× تمام عملیات نگهداری، تمیزکردن و تعویض سیلندر باید در جداول مربوطه ثبت گردد.

کنترل کیفیت

- حرارت انکوباتور با دماسنج کالیبره، اندازه‌گیری و به‌طور روزانه و در دو نوبت بر روی منحنی حرارت ثبت می‌گردد.

- در انکوباتورهای CO_2 دار یک کشت از نایسریا گونوره را در انکوباتور قرار داده و هر روز آن را پاساژ و رشد آن بررسی و ثبت گردد. این ارگانیسم برای رشد به CO_2 نیاز دارد.

ایمنی

- سیستم برق‌رسانی مطابق توان و ولتاژ مصرفی باشد تا احتمال وقوع هرگونه حادثه مخاطره‌آمیز کاهش یابد.
- در موقع تنظیم فشار و دما به نکات مندرج در دفترچه راهنما و زمان مربوطه توجه گردد.
- در زمان اتمام کار با دستگاه، رعایت نکات ایمنی ازجمله استفاده از دستکش و خروج تدریجی بخار و در صورت لزوم استفاده از محافظ صورت ضروری می‌باشد.
- به منظور رعایت موارد ایمنی، کپسول‌های CO_2 باید به‌صورت ایستاده به دیوار با زنجیر سنگین محکم شوند. زمانی‌که از سیلندرها استفاده نمی‌شود، سوپاپ‌ها و درپوش‌ها باید محکم بسته شوند. سیلندرهای خالی را روی حمل کننده سیلندر محکم با زنجیر بسته شوند. هرگز سیلندرهای گاز در دمای بالاتر از (52°C) 125°F نگهداری نشوند. سیلندرها در وضعیت افقی قرارنگیرند.

راهنمای ایمنی برای انتقال نمونه های عفونی

انتقال نمونه های آلوده یا نمونه هایی که احتمال آلودگی آنها وجود دارد از یک آزمایشگاه به آزمایشگاه دیگر، از بخش های مختلف بیمارستان به آزمایشگاه بیمارستان یا آزمایشگاه خارج از بیمارستان و نیز از مطب پزشکان به آزمایشگاه، باید تحت شرایط استاندارد صورت گیرد. این روند باید با استفاده از ظروف مناسب ، بسته بندی به روش استاندارد با درج علائم وبرچسب های لازم روی بسته ، رعایت اصول ایمنی جهت انتقال نمونه، و درنظرداشتن شرایط مناسب طی انتقال نمونه به نحوی که کیفیت و تمامیت نمونه حفظ شود ، صورت پذیرد.

حمل ونقل نمونه ها می تواند از راه هوا، دریا ، جاده و راه آهن طبق قوانین موجود در هر کشور ودستورالعمل مربوطه، با رعایت شرایط صحیح بسته بندی و انتقال انجام شود.

برای انتقال نمونه های عفونی از طرق مختلف، سازمان ملل متحد (United Nations) قوانین مشخصی تبیین نموده است.همچنین انجمن حمل ونقل هوایی بین المللی (International Air Transport Association, IATA) در مورد چگونگی حمل ونقل مواد عفونی قوانین سخت گیرانه ای تدوین نموده که در بیشتر کشورها مورد استفاده قرار می گیرد.

سازمان جهانی بهداشت نیز کتابی تحت عنوان مقررات انتقال نمونه های عفونی منتشر نموده است.

راهنمای ذیل خلاصه ای از مراجع فوق و ویرایش پانزدهم قوانین سازمان ملل متحد بوده و در مورد شرایط استاندارد نقل وانتقال نمونه های عفونی یا بالقوه عفونی بحث می کند.طبق قوانین IATA = International Airline Transport Association اصولا مواد خطرناک به ۹ گروه تقسیم می شوند. این ۹ گروه بیشتر شامل مواد شیمیایی خطرناک می شوند، در این تقسیم بندی مواد عفونی درگروه ۶ قرار می گیرند. این گروه، مواد عفونی شناخته شده ویا موادی که ممکن است عفونی باشند، را دربر گرفته و شامل باکتری ها، ویروس ها، ریکتزیا، انگل ها، قارچ هاونیزعوامل دیگری مانندپریون ها می باشند. این مواد در صورتی که به دلیل بسته بندی نامناسب به بیرون نشت کنند، می توانند در تماس فیزیکی با انسان ویا حیوان باعث ایجاد بیماری گردند.

مواد عفونی خود به دو گروه **A, B** تقسیم می شوند.

<u>موادعفونی گروه A</u> : موادی هستندکه می توانند باعث ناتوانی دائمی ویا بیماری های کشنده ویا تهدید کننده زندگی در انسان ویا حیوان سالم شوند و بسته به بیماری های بومی وشرایط هرمنطقه متفاوت می باشند. به طور

مثال نمونه کشت باکتری سل، بروسلا، وکشت انواع ویروس ها مانند هپاتیت B در این گروه قرار می گیرند.
موادعفونی این گروه تحت عنوان **United Nations Number=** *UN 2814* طبقه بندی شده اند.
آن دسته از مواد عفونی گروه Aکه فقط باعث بروز بیماری درحیوانات می شوند، تحت عنوان *UN 2900* قرار می گیرند.

موادعفونی گروه B: موادعفونی که شرایط فوق را از نظر بیماری زایی دارا نمی باشند، جزء نمونه های بیولوژیکی گروهB و **United Nations Number=** *UN 3373* طبقه بندی می شوند

بسته بندی نمونه ها

بسته بندی کلیه نمونه ها می بایست به روش استاندارد و با استفاده از سه محفظه صورت گیرد با توجه به نوع نمونه ای که منتقل می شود اطلاعات روی برچسب الصاق شده روی محفظه خارجی نمونه متفاوت است نحوه بسته بندی نمونه های مختلف درشکل های پیوست آمده است.

روش بسته بندی:

جهت بسته بندی نمونه ها طبق شرایط استاندارد، باید از سه محفظه که واجد شرایط ذیل باشد، استفاده گردد :
نمونه ایتدا باید داخل یک ظرف درپیچ دارکه غیرقابل نفوذ به مایعات و همچنین غیر قابل نشت بوده، قرار داده شود. بیشتر اوقات نمونه ها داخل لوله آزمایش حمل می شوند.
درصورتی که تعداد نمونه ها و بالطبع تعداد لوله ها زیاد باشد، برای جلوگیری از تماس بین آنها می توان مطابق اشکال پیوست و به ویژه شکل شماره ۵ لوله ها را توسط جداکننده های مقوایی ضخیم و یا جداکننده هایی ازجنس دیگر مانند اسفنج از یکدیگر جدا کرده و بسته بندی نمود .
در صورتی که نمونه مایع باشد، باید اطراف لوله ها به طور جداگانه ماده جاذب الرطوبه مانند تکه های ابر ویا ماده مشابه گذاشت و سپس درمحفظه دوم قرارداد، در واقع این مواد جاذب بین محفظه اول (لوله آزمایش) و محفظه دوم قرار می گیرند تا در صورت شکستن لوله ها یا آسیب محفظه اول، مواد آلوده به محفظه بیرونی نشت ننماید.
مقدار و حجم ماده جاذبی که بین محفظه اول و دوم قرار می گیرد باید متناسب با حجم نمونه باشد طوری که بتواند در صورت شکسته شدن یا آسیب به لوله ، کل حجم نمونه مایع را جذب نماید تا رطوبت به خارجی ترین محفظه نرسد.

پس از قراردادن محفظه اول در داخل محفظه دوم که مقاوم ، غیرقابل نشت وغیرقابل نفوذ به مایعات می باشد، می بایست مشخصات نمونه روی آن درج گردد.

درمرحله بعد محفظه دوم داخل محفظه سوم که مقاوم به ضربه و شرایط محیطی نامساعد بوده، قرار داده می شود . در مورد نمونه هایی که نیاز به رعایت زنجیره سرد دارند محفظه سوم می تواند Cold Box باشد.

نمونه های عفونی گروهA (UN 2814, UN2900) مطابق شکل پیوست شماره ۱ و نمونه های عفونی گروهB (UN 3373)مطابق شکل پیوست شماره ۲ بسته بندی می شوند.

علامت گذاری

کلیه بسته ها باید قبل از انتقال بطور مناسب علامت گذاری شده طوری که حاوی اطلاعات لازم در خصوص ماهیت نمونه ، خطرات آن و استانداردهای رعایت شده جهت بسته بندی ، باشد.

علائم روی بسته ها باید واضح درج شده و خوانا باشند وبه گونه ای قرار گیرند که کاملا قابل مشاهده بوده و توسط برچسب یا علامت دیگری پوشانده نشده باشد. روی محفظه خارجی (محفظه سوم)هر بسته باید اطلاعات زیر درج گردد:

- نام و آدرس فرستنده یا ارسال کننده کالا
- نام و آدرس حمل کننده کالا
- شماره تلفن شخص مسئول تایید شرایط بسته بندی نمونه
- نام و آدرس دریافت کننده (گیرنده) کالا
- نوع نمونه
- شماره UN
- نام گذاری ویژه برای گروه های خطر(Proper shipping name): برای انتقال نمونه هایی که درگروههای خطر مختلف قرار می گیرند نامگذاری ویژه ای وجود دارد که بر روی محفظه بیرونی نمونه درج می گردد مثلا برای انتقال موادعفونی گروه UN2814 باید عبارت INFECTIOUS SUBSTANCE AFFECTING HUMANS بر روی محفظه بیرونی درج شود.

برای انتقال مواد آلوده در گروه UN 2900 باید عبارت INFECTIOUS SUBSTANCE AFFECTING ANIMALS only بر روی بسته مربوطه درج گردد.(مطابق شکل پیوست شماره ۱)

برای انتقال نمونه های گروه UN3373 باید عبارت Clinical Specimens ویا Diagnostic Specimens برروی بسته مربوطه درج شود.

بطور مثال

UN 2814“INFECTIOUS SUBSTANCE AFFECTING HUMANS”

و یا

UN 2900“INFECTIOUS SUBSTANCE AFFECTING ANIMALS”

- برچسب دارای علامت خطر زیستی (مربوط به مواد عفونی) باید به صورت لوزی شکل برروی محفظه بیرونی

الصاق شود به طوری که عبارت ""گروه ۶ " در قسمت پایین آن درج شده باشد.(مطابق شکل ۳)

- محدوده دمایی قابل قبول جهت انتقال و ذخیره سازی

در مواردی که از یخ خشک یا نیتروژن مایع استفاده می شود، نوع و مقدار آن باید مشخص شود.

شایع ترین مواد خنک کننده که جهت حفظ زنجیره سرد در هنگام انتقال استفاده می شوند یخ (Ice Pack)، یخ خشک و نیتروژن مایع می باشند. در این صورت لایه های اول و دوم باید در برابر درجه حرارت پایین مقاوم و نشت ناپذیر باشند . در هنگام انتخاب لایه خارجی باید به نوع ماده خنک کننده توجه گردد .

در صورتی که از یخ معمولی استفاده می گردد ، کافیست که لایه خارجی کاملا نشت ناپذیر باشد .

در صورت استفاده از یخ خشک لایه خارجی باید نشت ناپذیر بوده ولی قابلیت عبور گاز دی اکسید کربن را داشته باشد .

در مواردی که نیاز به استفاده از نیتروژن مایع می باشد، این لایه ها باید قابلیت تحمل درجه حرارت های بسیار پایین را داشته باشند.

- برچسب Package Orientation در هنگام انتقال نمونه های مایع، بویژه با حجم بیشتر از ۵۰ میلی لیتر می بایست نصب گردد و نشان دهنده جهت رو به بالا برای حمل محفظه حاوی نمونه باشد.(مطابق شکل ۴)

حجم قابل انتقال

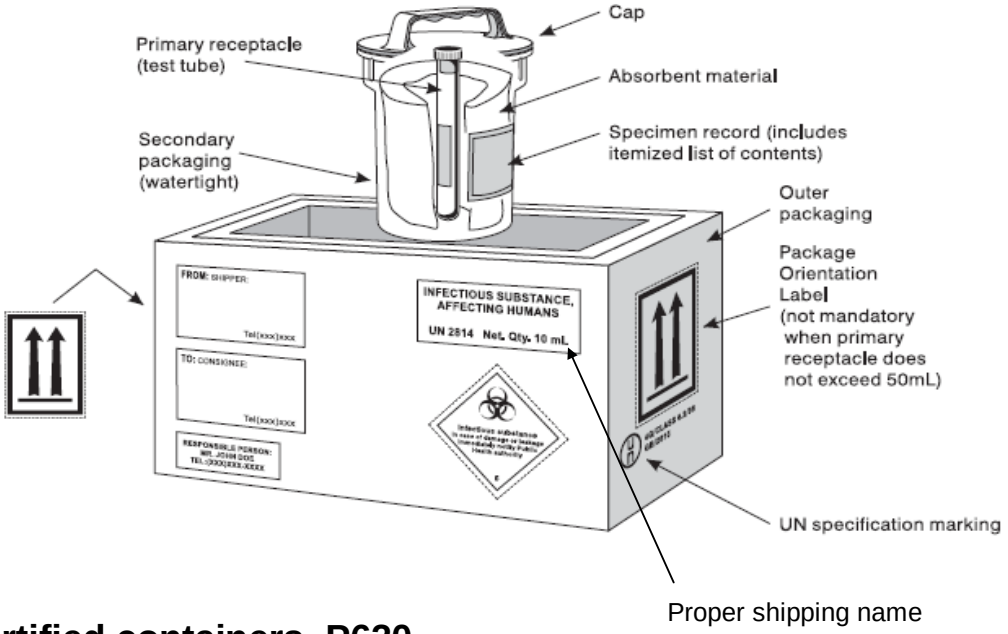
برای نمونه هایی که از راه زمینی جابجا می شوند محدودیتی برای حجم مواد تعیین نشده است. نمونه هایی که درگروه2814 UN قرار می گیرند و نمونه های با حجم بیش از ۵۰ میلی لیتر و یا ۵۰ گرم را نباید در هواپیمای

مسافربری بارگیری نمود. حداکثر حجم نمونه هایی را که می توان با هواپیمای باربری انتقال داد ۴ لیترو یا ۴ کیلوگرم می باشد.

- انتقال نمونه های عفونی به صورت شخصی و بوسیله افراد از طریق هوایی کاملاً غیر قانونی می باشد.
- در صورت آسیب دیدن بسته بندی ویا نشت مواد باید فوراً به مسئولین مربوطه اطلاع داد.
- در شرایطی مسئولیت ارسال کننده نمونه به پایان می رسد که نمونه عفونی تحت شرایط استاندارد منتقل شده وارسال کننده از دریافت آن توسط گیرنده مطمئن شود.

شکل ۱

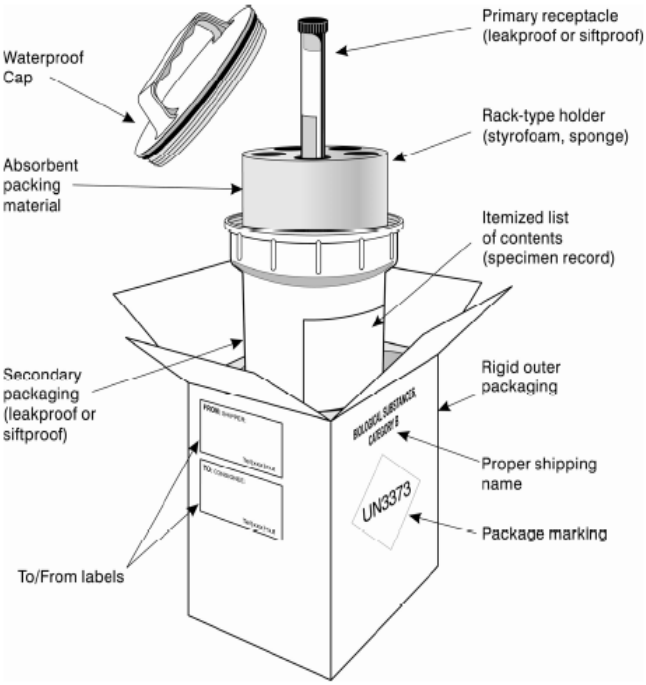
Packaging instructions for UN 2900 and UN 2814: category A



UN certified containers, P620

شکل ۲

Packaging for UN 3373 (category B, P650)



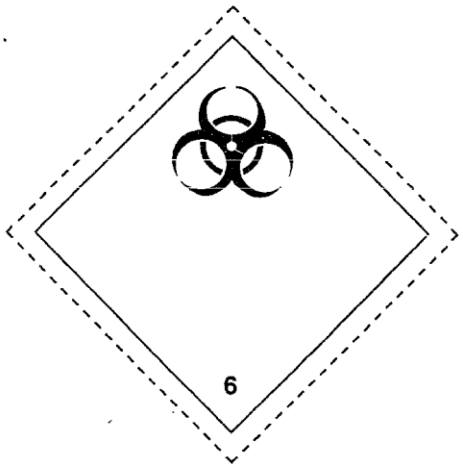
Primary receptacle:
- Leakproof or stiftproof
- absorbent material (eg. Kleenex)

Secondary packaging:
- Leakproof or stiftproof

Rigid outer packaging:
Never envelopes

شکل ۳

Figure 7.2.A
Class 6 — Infectious Substances (Division 6.2)



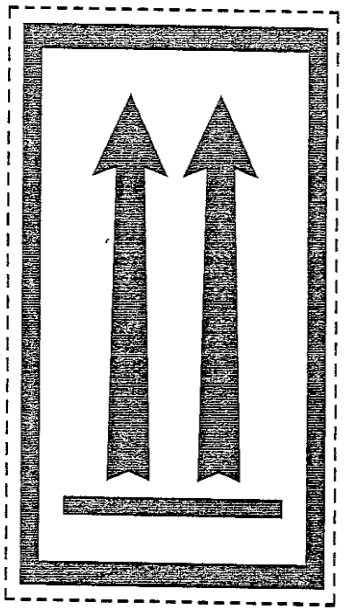
The lower part of the label should bear the inscription:
INFECTIOUS SUBSTANCE
In case of Damage or Leakage
Immediately Notify
Public Health
Authority

Name: Infectious Substance
Minimum dimensions: 100 × 100 mm

For small packages the dimensions may be 50 × 50 mm
Symbol (three crescents superimposed on a circle) and inscription: Black
Background: White

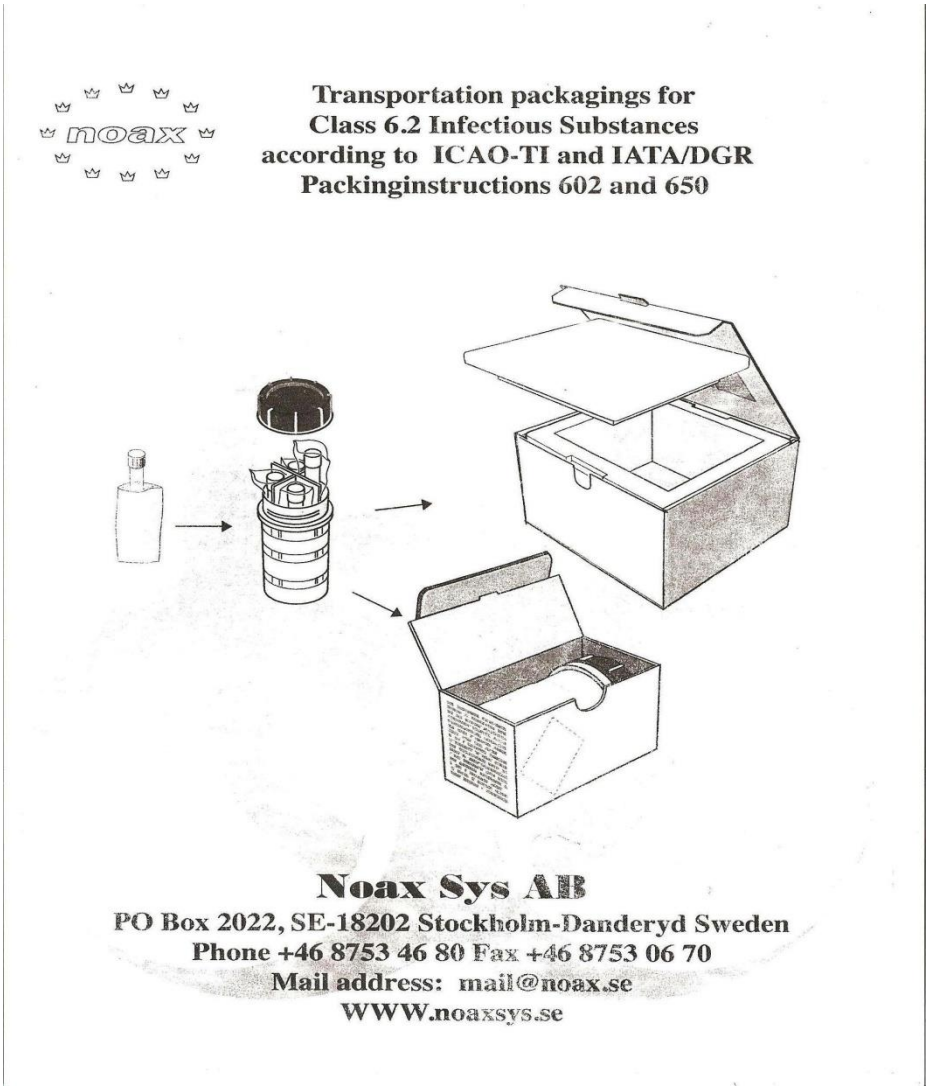
شکل ۴

Figure 7.2.F
Package Orientation



Name: Package Orientation (This Way Up)
Minimum dimensions: 74 × 105 mm
Colour: Red or Black on a contrasting background

شکل ۵



دکتر شهلا فارسی

مدیر ایمنی و بهداشت آزمایشگاه مرجع سلامت

خرداد ۱۳۸۸

رنگ آمیزی گرم

اصول:

در آزمایشگاه میکروب شناسی بالینی، رنگ آمیزی گرم آزمایشی مهم برای تشخیص احتمالی سریع عوامل عفونی است و کیفیت نمونه های بالینی را ارزیابی می کند . این آزمایش برای طبقه بندی باکتری ها بر اساس شکل، اندازه، مورفولوژی سلول و واکنش گرم آنها به کار می رود.

تفسیر گسترش هایی که رنگ آمیزی گرم شده اند، با در نظر گرفتن مشخصه های رنگ آمیزی ، اندازه، شکل و آرایش سلول صورت می گیرد. این مشخصه ها ممکن است بوسیله بسیاری از فاکتورها مانند مدت زمان ماندگی پلیت ها، محیط کشت، اتمسفر انکوباسیون ، روش رنگ آمیزی و وجود مواد مهارکننده تحت تأثیر قرار بگیرند. برای تفسیر اسمیرهای تهیه شده از نمونه های بالینی مانند خلط، به وجود عوامل اضافی مانند انواع سلول های میزبان و فاگوسیتوز نیز می بایست دقت نمود .

نمونه:

اسمیر برای رنگ آمیزی گرم ممکن است از نمونه های بالینی، محیط براث یا کلنی های رشد کرده روی محیط کشت جامد تهیه شود. نمونه های بالینی تازه وکشت های تازه (کمتر از ۲۴ ساعت) از محیط های غیرمهارکننده ، صحیح ترین نتایج را می دهند؛برای برخی بررسی های مورفولوژیکی، اسمیر تهیه شده از کشت براث مورد نیاز می باشد.

مواد:

A. معرف ها

معرف ها ممکن است به صورت تجاری خریداری شوند یا در آزمایشگاه تهیه گردند.

۱- Hucker's modification

a. کریستال ویوله

b. ید

احتیاط: ید خاصیت خورندگی دارد. از استنشاق، خوردن یا تماس آن با پوست خودداری کنید.

c. رنگ برها

۱) کندترین رنگ بر: اتانول ۹۵ ٪

۲) رنگ بر متوسط: استون ـ الکل؛ مخلوطی از ml ۱۰۰ اتانول ۹۵٪ و ml ۱۰۰ استون (reagent grade) را در بطری شیشه ای قهوه ای رنگ ترکیب کنید، با یک سال تاریخ انقضاء، برچسب بزنید و در حرارت اتاق نگهداری کنید.

۳) سریع ترین رنگ بر: استون (reagent grade)

احتیاط: اتانول و استون قابل اشتعال هستند.

d. **Counterstains** (رنگ متقابل)

۱) سافرانین

۲) به طور جایگزین: فوشین بازی (wt/vol) ۰/۲٪ یا ۰/۱٪

۲- Kopeloff's modification for anaerobes
۳- Carbol-fuchsin–basic fuchsin counterstain

B. وسایل و مواد مورد نیاز

۱- لام شیشه ای (۲۵×۷۵ mm)
۲- NaCl ۰/۸۵٪ استریل
۳- پی پت پاستور و اپلیکاتور چوبی استریل
۴- لوپ میکروب شناسی، آنس تلقیح سازی
۵- Safety box برای دور ریختن زباله بیولوژیک شامل وسایل نوک تیز
۶- روغن ایمرسیون

C. تجهیزات

موارد اختیاری با توجه به نوع نمونه
۱- سانتریفوژ
۲- ورتکس
۳- لوله درپیچ دار استریل
۴- قیچی، اسکالپل و پنس استریل
۵- خردکن بافت
۷- متانول خالص

نکته: متانول را در بطری های درپیچ دار قهوه ای ذخیره کنید. ذخیره کاری را می توان در ظروف پلاستیکی برای حداکثر دو هفته ذخیره نمود .

کنترل کیفی:

A. روزانه معرف ها را از نظر ظاهری بررسی کنید.

۱- اگر کریستال ویوله رسوب کرده یا ته نشین شده، قبل از استفاده آن را صاف کنید، حتی زمانی که معرف ها به صورت تجاری خریداری می شوند.

نکته: بعضی رنگ ها، خصوصاً فوشین بازی و سافرانین می توانند آلوده شوند. در صورت شک به آلودگی ، انجام رنگ آمیزی با استفاده از معرف تازه توصیه میگردد .

۲- تبخیر شدن مواد ممکن است کارایی و تأثیر معرف ها را دگرگون کند. اگر محلول های کاری با مصرف روزانه تمام نمی شوند، باید به طور منظم تعویض شوند.

B. به طور روزانه و زمانی که یک سری ساخت جدید استفاده می شود، گسترشی از *اشریشیا کلی* (ATCC 25922) و *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* (ATCC 12228) و یا *استافیلوکوک اورئوس* (ATCC 25923) تهیه و فیکس کرده و مطابق روش فوق رنگ آمیزی کنید.

نتایج مورد انتظار:

۱ - باسیل های گرم منفی، صورتی

۲- کوکسی های گرم مثبت، بنفش پررنگ

توجه: به عنوان روش کنترل کیفی جایگزین پیشنهاد می شود با یک اپلیکاتور چوبی از بین دندان ها نمونه گیری شود؛ هم ارگانیسم های گرم مثبت و هم گرم منفی وجود خواهد داشت.

C. برخی از علل رایجی که موجب تهیه اسلاید رنگ آمیزی گرم نامناسب می گردند:

۱- استفاده از لام های شیشه ای که قبلا تمیز یا چربی زدایی نشده اند.

توجه: با ذخیره لام ها در ظرف حاوی اتانول ۹۵٪ از تمیز بودن آنها مطمئن خواهیم بود. قبل از استفاده، الکل اضافی را از

روی لام خالی کنید یا آن را روی شعله بگیرید.

۲- گسترش ها خیلی ضخیم تهیه شده است.

۳- حرارت دادن زیاد گسترش، زمانی که برای فیکس کردن از حرارت ا ستفاده می شود.

۴- آب کشی زیاد در طی فرایند رنگ آمیزی

D. برای اطمینان از صحت تفسیر، سیستمی برای بررسی گزارش های رنگ آمیزی گرم برقرار کنید.

۱- بررسی روزانه تعدادی از رنگ های گرم توسط سوپروایزر

۲- مقایسه نتایج کشت نهایی با گزارش های رنگ آمیزی گرم

۳- گردآوری مجموعه ای از لام های مرجع برای آموزش

روش انجام آزمایش:

A. تهیه اسمیر

اسمیر مناسب باید لایه ای از ارگانیسم ها با تراکم مناسب برای مشاهده آسان ایجاد نماید. پراکندگی ارگانیسم ها می بایست به نحوی باشد که آرایش آنها مشخص شود. برای تهیه اسمیر از لام های شیشه ای نو و تمیز استفاده نمایید.

نکته: زمانی که از یک پی پت یا سواب برای تهیه اسمیر و تلقیح محیط کشت استفاده می کنید، همیشه قبل از تهیه اسمیر، ابتدا محیط کشت را تلقیح کنید.

۱- نمونه های بالینی:

نکته : استفاده از دستکش لاتکس در زمان کار روی نمونه های بالینی ضروری است .

a. نمونه های دریافت شده روی سواب

ترجیحاً باید یک سواب جداگانه برای تهیه اسمیر آماده شود .

۱) جهت جلوگیری از تخریب عناصر سلولی و از بین رفتن آرایش باکتریایی، به آرامی سواب را در سرتاسر لام بچرخانید.

۲) در مواردی که فقط یک سواب دریافت می شود، سواب را در مقدار کمی سالین قرار داده و آن را ورتکس کنید. سواب را به دیواره داخلی لوله بفشارید و آن را برای تهیه گسترش به کار ببرید. از باقیمانده سوسپانسیون برای تلقیح محیط کشت استفاده کنید.

b. نمونه هایی که روی سواب دریافت نمی شوند شامل: آسپیره ها، ترشحات، چرک، مدفوع

۱) اگر نمونه در یک سرنگ دریافت شده باشد، ابتدا تمامی آن را در یک لوله استریل بریزید. در صورت کافی بودن حجم نمونه آن را ورتکس کنید.

نکته: سرنگ های همراه سوزن را ، نپذیرید. به کارکنان مربوطه جداسازی ایمن سوزن ها را آموزش دهید .

۲) با استفاده از یک اپلیکاتور، پی پت یا لوپ سیمی استریل قسمت های چرکی یا خونی نمونه را انتخاب کنید. نمونه های خیلی غلیظ یا نمونه های چرکی را می توان در یک قطره سالین روی لام رقیق نمود تا تهیه اسمیر آسان تر شود.

۳) نمونه را روی منطقه بزرگی از لام پهن کنید تا یک لایه نازک ایجاد شود.

c. CSF و سایر مایعات بدن که نیاز به سانتریفوژ دارند

بعضی از آزمایشگاهها ممکن است برای تغلیظ مایعات بدن و تهیه اسمیر از Cytopsin Slide Centrifuge استفاده کنند. این روش به افزایش حساسیت رنگ گرم ،کاهش زمان سانتریفوژ و دسترسی سریعتر به نتیجه کمک می نماید.

۱) بعد از انجام سانتریفوژ، با استفاده از پی پت استریل، محلول رویی را به یک لوله استریل منتقل کنید، حدود ۰/۵ ml را به عنوان رسوب باقی بگذارید.

۲) رسوب را ورتکس کرده یا با چند بار داخل و خارج کردن از یک پی پت پاستور استریل آنرا کاملا مخلوط نمایید.

۳) با استفاده از پی پت پاستور یک قطره کوچک از رسوب را روی یک لام تمیز قرار دهید.

۴) قطره را پخش نکنید. اجازه دهید تا در مجاورت هوا خشک شود.

d. نمونه های ادرار

۱) سانتریفوژ نکنید. نمونه را به خوبی مخلوط کنید.

۲) با استفاده از یک پی پت پاستور استریل ۱ قطره را روی لام قرار دهید. قطره را پخش نکنید.

۳) اجازه دهید قطره در مجاورت هوا خشک شود.

e. مواد خشک یا مقادیر خیلی کم نمونه های بالینی:

۱) نمونه را در ۰/۵ ml سالین استریل حل کنید. در صورت نیاز ورتکس نمایید.

۲) با استفاده از پی پت پاستور استریل ۱ قطره را روی لام قرار دهید.

۳) با استفاده از نوک پی پت، قطره را پخش کنید تا لایه نازکی ایجاد شود.

f. بیوپسی ها و برش های بافت

تهیه نمونه حاصل از تماس مستقیم اسلاید با سطح نمونه (touch prep) و/یا نمونه خرد شده (ground specimen)

۱)بافت را با استفاده از قیچی یا اسکالپل استریل خرد کنید.

۲) نمونه ای حاصل از تماس مستقیم اسلاید با سطح نمونه (touch prep) تهیه کنید. با استفاده از پنس استریل قطعه ها را نگه دارید و کناره های یک یا تعداد بیشتری از قطعات خرد شده را با اسلاید شیشه ای استریل تماس دهید، برای بررسی آسانتر تماس ها را با هم دسته بندی کنید.

۳) برای نمونه های تماسی یکنواخت، یک قطره را روی اسلاید قرار دهید و به اندازه یک دایره ۲/۵ سانتی متری پخش کنید.

۲- کشت های براث:

برای جلوگیری از مخلوط شدن نمونه های مختلف روی یک لام ، توصیه می شود روی هر اسلاید، یک گسترش تهیه شود.

a. با استفاده از پی پت پاستور استریل (یا یک سوزن منفذدار، برای ظروفی مثل بطری های کشت خون، جهت جلوگیری از آلودگی با سوزن و سرنگ) یک قطره روی لام قرار دهید.
b. قطره را پخش کنید تا لایه نازکی ایجاد شود.

۳- کلنی از روی محیط های کشت جامد:

a. یک قطره سالین یا آب مقطر استریل روی لام قرار دهید.
b. مقدار کمی از کلنی را با یک اپلیکاتور، آنس یا لوپ استریل بردارید.
c. به آرامی مخلوط کنید تا سوسپانسیون یکنواختی حاصل گردد.

B. فیکس کردن اسمیر (گسترش):

اسمیرها ممکن است با حرارت یا متانول فیکس شوند.

۱- حرارت:

a. اسمیر را در مجاورت هوا روی یک سطح صاف یا داخل اتو قرار دهید تا خشک شود.
b. اگر اسمیرها در مجاورت هوا خشک شدند، آنها را ۲ یا ۳ بار از روی شعله بگذرانید. برای جلوگیری از سوختگی یا تغییر شکل سلول ها، از حرارت زیاد استفاده نکنید .
c. بگذارید لام قبل از رنگ آمیزی خنک شود.

۲- از آنجا که حفظ مشخصات سلولهای میزبان جهت تفسیر گستره های بالینی ضروری است بهترین روش برای رنگ آمیزی گستره های مستقیم، فیکس کردن با استفاده از متانول است. این امر با ممانعت از لیز گلبول های قرمز و تخریب

سلول های میزبان موجب واضح تر شدن زمینه اسلاید می گردد که تفسیر نمونه راآسانتر میکند.این روش برای همه نمونه های بالینی، مخصوصاً ادرار موکدا توصیه می شود که در عین حال مانع از شسته شدن نمونه های ادرار می گردد.

a. اسمیر را در مجاورت هوا روی یک سطح صاف خشک نمایید.

b. برای ۱ دقیقه چند قطره متانول روی لام بریزید. متانول را بدون آبکشی از روی لام خالی کنید و اجازه دهید تا اسلاید در مجاورت هوا خشک شود.

c. قبل از رنگ آمیزی، از حرارت استفاده نکنید.

C. روش انجام رنگ آمیزی:

۱- Hucker's modification

a. اسمیر فیکس شده را با محلول کریستال ویوله بپوشانید. ۳۰ ثانیه منتظر بمانید.

b. آهسته کریستال ویوله را خالی کنید، اسلاید را به آرامی با آب جاری بشوئید.

احتیاط: شستشوی بیش از حد در این مرحله می تواند باعث شسته شدن کریستال ویوله از سلول های گرم مثبت شود. برای اطمینان از جریان آرام آب در سمت اسمیردار لام، اسلاید را به صورت زاویه دار نگه دارید.

c. آب اضافی را با محلول ید شستشو دهید و سپس اسلاید را با محلول ید تازه بپوشانید. ۳۰ ثانیه منتظر بمانید.

d. اسلاید را به آرامی با آب جاری بشوئید.

e. با جاری کردن معرف روی گستره در حالی که اسلاید زاویه دار نگه داشته شده است، رنگ بری کنید. وقتی مایع جاری ، بی رنگ می شود این کار را به اتمام برسانید. زمان رنگ بری را بر اساس ضخامت اسمیر و نوع رنگ بر مورد استفاده تنظیم کنید.

f. رنگ بر اضافی را با جریان آرام آب خارج کنید.

نکته: اسمیری که بطور مناسب رنگ بری شده است، با ته رنگ سبز زیتونی و بدون آثاری از رنگ کریستال ویوله دیده خواهد شد.

g. اسلاید را با سافرانین بپوشانید و اجازه دهید رنگ متقابل(counter stain) برای ۳۰ ثانیه باقی بماند.

h. رنگ متقابل اضافی را با جریان آرام آب خارج کنید.

i. اسلاید را در وضعیت ایستاده در مجاورت هوا خشک کنید. پشت لام را با استفاده از دستمال کاغذی آغشته به استون یا الکل پاک کنید.

j. اسمیر را از نظر میکروسکوپی بررسی کنید.

۲- Basic/carbol-fuchsin counterstain

Basic/carbol-fuchsin برای شناسایی ارگانیسم های گرم منفی که رنگ کمی گرفته اند به کار می رود.

۳- Kopeloff's modification

برای مشاهده و افتراق بهتر بی هوازیها توصیه می شود از روش رنگ آمیزیKopeloff's modification استفاده شود .

گزارش نتایج:

A. نتایج و تفسیر

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

a. دقت نمایید که اسمیر بطور مناسبی رنگ بری شده باشد. بسته به نوع نمونه، زمینه عموما باید شفاف یا صورتی باشد. اگر گلبول های سفید وجود دارند، بایدبه صورت گرم منفی ظاهر شوند. رسوب های نازک سوزنی شکل کریستال ویوله را با باکتری های میله ای شکل گرم مثبت اشتباه نگیرید.

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

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

a. مقادیر مربوط به نوتروفیل ها، مونوسیت ها و گلبول های قرمز

b. مقادیر مربوط به سلول های اپی تلیال و باکتری های فلور نرمال که ممکن است نشانگر جمع آوری نامناسب نمونه باشد.

c. وضعیت و آرایش میکروارگانیسم ها

۳- مناطق متعددی از اسمیر را با روغن ایمرسیون از نظر وجود میکروارگانیسم ها بررسی و به شیوه زیر گزارش کنید.

a. در صورت عدم مشاهده هر گونه میکروارگانیزم :"هیچ میکروارگانیسمی مشاهده نشد".

b. در صورت مشاهده میکروارگانیزمها ، تراکم کلی و مرفولوژی را شرح دهید.

۴- شکل سلولی غالب میکروارگانیسم ها را ذکر نمایید

a. شکل کلی: کوکوس، کوکوئید، کوکوباسیل، باسیل، رشته ای شکل، شبه مخمر

b. ظاهر انتهاها: کروی، شمعی شکل، مسطح، گرزی شکل، مقعر. برآمدگی کناره ها می تواند وجود اسپورها را پیشنهاد کند، اما می تواند به علت واکوئل ها، پلئومرفیسم، یا رنگ آمیزی نامنظم باشد.

c. ظاهر کناره ها: موازی، تخم مرغی شکل (برآمده)، مقعر، نامنظم

d. ماهیت محور تقارن: مستقیم، منحنی، فنری

e. پلئومرفیسم (ناپایداری در شکل): عبارت توصیفی "دیفتروئید" یا "کورینه فرم" برای توصیف باسیل های گرم مثبت به کار می رود که چند شکلی، گرزی شکل یا نامنظم و بی قاعده هستند یا آرایش نرده ای یا زاویه دار دارند (اشکال Vو L).

f. گسترش شاخه ای یا سلولی

B. ثبت مشاهدات

هر آزمایشگاه باید سیاست گزارشدهی ویژه ای را تدوین کند. یافته های مهم بالینی باید جهت اطلاع به پزشک معالج اعلام شود.

- اسمیر نمونه های بالینی

برای کشت های ادرار ۲۰ فیلد یا بیشتر را بررسی کنید. اگر بطور میانگین،ن یک ارگانیسم یا بیشتر در فیلد روغن ایمرسیون دیده می شود، مثبت گزارش کنید. این با کلنی کانت $CFU/ml \ ^{5}۱۰ \leq$ همبستگی دارد.

a. مقادیر مربوط به سلول ها و میکروارگانیسم های مشاهده شده را گزارش دهید. معمولا سیستم های کمی مورد استفاده شامل موارد زیر است.

۱) عددی

a) +۱ (۱> در فیلد روغن ایمرسیون [×۱۰۰])

b) +۲ (۱ در فیلد روغن ایمرسیون)

c) +۳ (۲ تا ۱۰ در فیلد روغن ایمرسیون)

d) +۴ (غالب یا ۱۰< در فیلد روغن ایمرسیون)

۲) توصیفی

a) کمیاب (۱< در فیلد روغن ایمرسیون)

b) کم (۱ تا ۵ در فیلد روغن ایمرسیون)

c) متوسط (۵ تا ۱۰ در فیلد روغن ایمرسیون)

d) زیاد (۱۰< در فیلد روغن ایمرسیون)

b. مرفولوژی باکتری های مشاهده شده را ثبت کنید.

C. مرور رنگ آمیزی گرم

۱- بعد از تفسیر اسمیرها، اسلایدها را به مدت کافی برای مرور تأییدی نگه دارید .

a. روغن اضافی را خالی کنید یا به آرامی پاک کنید.

b. برای اسلایدهای کتابخانه و مجموعه های آموزشی که برای مدت زمان طولانی تری ذخیره خواهد شد، روغن ایمرسیون را می توان با محلول گزیلن پاک کرد و با یک درزگیر نظیر محلول permount پوشاند تا از محوشدگی آنها جلوگیری شود.

c. اسلایدها ممکن است کیسه های خطر زیستی را سوراخ کنند، آنها را به عنوان مواد زائد بیولوژیک " تیز و برنده" در نظر گرفته

و جهت دفع از ظروف خطر زیستی (biohazard) مطابق با دستورالعمل دفع پسماند آزمایشگاه مرجع سلامت استفاده کنید.

۲- اگر تکرار رنگ آمیزی گرم یا یک رنگ آمیزی ویژه برای تأیید یافته ها لازم است، وقتی اسمیرهای رنگ نشده اضافی در دسترس نیستند، یک اسمیر رنگ گرم را می توان رنگ بری نمود.

a. روغن ایمرسیون را با محلول گزیلن از روی اسلاید بردارید.

b. اسلاید را با الکل- استون بپوشانید تا اسمیر بی رنگ شود.

c. دوباره رنگ کنید.

توجهات :

A. نتایج رنگ آمیزی گرم میبایستی در تطابق با سایر یافته های بالینی و آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گیرد.

B. برای کسب نتایج صحیح، پیروی دقیق از روش انجام آزمایش و معیارهای تفسیر الزامی می باشد. صحت، ارتباط زیادی با آموزش و مهارت شخص مشاهده کننده اسلاید دارد.

C. مشاهده میکروارگانیزم های گرم مثبت و نمونه های کشت منفی ممکن است در نتیجه آلودگی معرف ها و سایر لوازم، حضور عوامل ضدمیکروبی، یا کاهش رشد ارگانیسم ها تحت شرایط کشت معمول (محیط کشت ، اتمسفر و غیره) باشد.

D. نتایج گرم نادرست ، ممکن است مربوط به کیفیت نامناسب جمع آوری نمونه باشد.

E. ممکن است گاهی واکنش رنگ آمیزی گرم با کلنی های خیلی تازه در مقایسه با کلنی های کهنه تر متفاوت باشد. وقتی که اسمیرها از ساب کالچر ۲۴ - ۱۸ ساعته تهیه می شوند (زمانی که سلول های باکتریایی در فاز لگاریتمی رشد هستند)، مرفولوژی اغلب باکتری ها در رنگ آمیزی گرم، در بهترین شرایط می باشد.

آزمایشگاه مرجع سلامت	فهرست تجهیزات، مواد، محیط های کشت و دیسک های تشخیصی	صفحه 1 از 5

تجهیزات آزمایشگاهی
یخچال
فریزر ۲۰°C-
فریزر ۷۰°C-
لیوفیلیزاتور
ترازو
جار شمع دار
آنس/ لوپ
تلقیح کننده چند شاخه برای MIC
لوپ های کالیبره ۰/۰۱ و mL ۰/۰۰۱
چراغ گازی بونزن
در صورت عدم وجود چراغ بونزن، آیا چراغ الکلی یا وسیله دیگری برای استریل کردن لوپ و آنس وجود دارد؟
پلیت
لوله
جالوله ای
همزن ورتکس
امکانات رنگ آمیزی- سینک و جای اسلاید (لام)
ظروف کافی برای تهیه محیط های کشت (بالون، استوانه و ...)
pH متر
سمپلر
دستگاه آب مقطرگیری
سانتریفیوژ
اتوکلاو
اون هوای داغ
بن ماری

آزمایشگاه مرجع سلامت	فهرست تجهیزات، مواد، محیط های کشت و دیسک های تشخیصی	صفحه 2 از 5

انکوباتور
انکوباتور CO_2
میکروسکوپ با عدسی روغنی
لام و لامل
میکروسکوپ معکوس
میکروسکوپ فلورسنت
سیستم اتوماسیون کشت خون
هود ایمنی بیولوژیک - سطح ۱ (محافظت کاربر ومحیط زیست از آلودگی: جلوی دستگاه باز است. هوای ورودی از فیلتر عبور نمی کند، اما سیستم خروجی دارای فیلتر است).
هود ایمنی بیولوژیک - سطح ۲ (محافظت کاربر، محیط زیست و محصول (محیط کشت) از آلودگی: جلوی دستگاه باز است. هوای ورودی و خروجی فیلتر می شود).
هود ایمنی بیولوژیک - سطح ۳ (محافظت کاربر، محیط زیست و محصول (محیط کشت) از آلودگی: سیستم کاملا بسته، دارای فشار منفی است. هوای ورودی و خروجی هپا فیلتر می شود).

مواد، محیط های کشت و دیسک های تشخیصی

۱- محیط بلاد آگار (خون گوسفندی)

۲- محیط مکانکی آگار یا EMB آگار

۳- محیط نوترینت آگار یا TSA یا برین هارت اینفیوژن آگار (BHIA)

۴- محیط کشت خون (TSB یا BHIB) در صورت نیاز

۵- محیط مولر هینتون آگار

۶- محیط شکلات آگار(خون گوسفندی)

۷- محیط مانیتول سالت آگار

۸- محیط DNase آگار

۹- محیط 6.5% Nacl براث یا آگار

۱۰- محیط بایل اسکولین آگار

۱۱- محیط KIA

۱۲- محیط TSI

۱۳- محیط SIM

۱۴- محیط سیمون سیترات آگار

۱۵- محیط MR-VP براث

۱۶- محیط اوره آگار

۱۷- محیط ژلاتین

۱۸- محیط فنل رد آگار یا براث + قندهای گلوکز، لاکتوز، مانیتول، سوکروز و ...

۱۹- محیط لایزین آیرون آگار (LIA) یا مولر لایزین دکربوکسیلاز

۲۰- محیط پایه مولر (Muller's base)+ اسیدهای آمینه آرژینین و اورنی تین

۲۱- محیط فنیل آلانین آگار

۲۲- محیط OF + قندهای گلوکز، لاکتوز، مالتوز، مانیتول و...

۲۳- محیط هکتون انتریک آگار (HE) یا XLD آگار

۲۴- محیط انتقالی کری بلر

۲۵- محیط TCBS

۲۶- محیط آب پپتونه قلیایی

۲۷- محیط GN Broth

۲۸- محیط SF Broth

۲۹- محیط TSB حاوی ۱۵٪ گلیسرول

۳۰- محیط "هموفیلوس تست مدیوم" (HTM)

۳۱- محیط GC agar + ۱٪ فاکتور رشد

۳۲- استاندارد نیم مک فارلند

۳۳- دیسک ONPG

۳۴- دیسک نووبیوسین ۵ میکروگرمی

۳۵- دیسک فورازولیدون

۳۶- دیسک باسیتراسین ۰/۰۴ واحد (....)

۳۷- دیسک اپتوچین

۳۸- دیسک Polymixin B 300U

۳۹- دیسک SXT

۴۰- پلاسمای EDTA دار خرگوش

آنتی سرم ها

۱- مجموعه آنتی سرم های شیگلا

۲- مجموعه آنتی سرم های سالمونلا

۳- مجموعه آنتی سرم های E. coli

معرف ها

۱- معرف کاتالاز (آب اکسیژنه ۳٪)

۲- معرف اکسیداز (تترا متیل پارافنیلن دی آمین دی هیدروکلراید)

۳- معرف HCl ۱٪

۴- معرف کواکس

۵- معرف MR

۶- معرف های VP (α نفتول و KOH)

۷- معرف کلرور فریک

۸- معرف های A و B نیترات

راهنمای کار با هودهای ایمنی بیولوژیک:

محل قرارگیری هود:

- هود ایمنی بیولوژیک باید در مکانی دور از رفت و آمد افراد، قرار داده شود. عبور و مرور افراد، وجود در و پنجره در نزدیک هود و باز و بستن آنها باعث تولید جریان های هوایی می شود که یکنواختی جهت جریان هوا را از فضای باز جلویی به داخل هود مختل می کند.
- تعبیه فضای حداقل ۳۰ سانتی متری در اطراف هود جهت دسترسی به آن برای تعمیر و نگهداشت و نیز تعبیه فضای ۳۰ تا ۳۵ سانتی متری در بالای هود به منظور انجام آزمایش های کنترل کیفیت بررسی سرعت هوا در فیلتر خروجی، تعویض فیلتر و غیره باید مد نظر قرار گیرد.

کاربر:

- از قبل تمامی وسایل، مواد و غیره باید آماده شوند تا تعداد دفعات حرکت دست و یا حرکت افراد به حداقل برسد. می توان بدین منظور چک لیستی تهیه نمود.
- باید از حرکات سریع دست در داخل هود خودداری شود. باید بعد از وارد کردن دست ها، یک دقیقه منتظر ماند تا جریان هوای داخل هود تنظیم گردد.
- هنگام استفاده از هود بیولوژیک نباید درِ شیشه‌ای محافظ آن باز و بسته شود.

طریقه قراگیری وسایل و مواد در داخل هود:

- باید دقت کرد که سطح مشبک (سوراخ های مختص عبور جریان هوا) هودهای کلاس ۲ با قرار دادن وسایل، کاغذ و غیره مسدود نشود.
- تجهیزاتی مانند سانتریفیوژ، ورتکس و غیره در قسمت عقب هود قرار می گیرند. کیسه های مخصوص اتوکلاو و ظروف ایمن (Safety Box) و غیره باید در داخل هود و در قسمت عقب آن قرار داده شوند. در صورت لزوم، می توان در هنگام کار از دستمال های جاذب آغشته به مواد گندزدا بر روی سطح کاری استفاده نمود.
- اختلال در جریان هوای داخل هود می تواند باعث آلودگی کارکنان و کشت گردد.
- فن هود باید ۵ دقیقه قبل از شروع کار و یا بعد از اتمام کار، روشن باشد تا هوای آلوده از هود خارج شود.

استفاده از شعله:

- استفاده از شعله می تواند در جریان هوا اختلال ایجاد کرده و به فیلتر آسیب برساند. همچنین در هنگام استفاده از مواد قابل اشتعال باعث ایجاد خطراتی گردد. بدین منظور از سوزاننده های کوچک (Microincinerator) یا کوره های الکتریکی استفاده می شود، اما بهتر است از لوپ های یکبار مصرف استریل استفاده شود.

لامپ ماوراء بنفش (UV):

- معمولا این لامپ ها در هود ایمنی بیولوژیک مورد نیاز نمی باشند. در صورت وجود، باید به صورت هفتگی با الکل ۷۰٪ تمیز و گندزدایی گردد. این لامپ ها در زمان حضور افراد باید خاموش باشند. در ارتباط با فضای داخل هود باید از لامپ مناسب استفاده شود.

بررسی و تأیید صحت عملکرد هود:

- صحت عملکرد دستگاه باید در زمان نصب و در فواصل زمانی منظم، مطابق دستورالعمل سازنده توسط افراد مجرب، بررسی و مستند شود. آزمایش های لازم می تواند شامل بررسی نشت فیلتر هپا، بررسی سرعت جریان هوا و چگونگی جابجایی آن، محاسبه حجم هوای خروجی، فشار منفی و غیره باشد. همچنین آزمایش های دیگری شامل بررسی میزان ارتعاش، بررسی سیستم الکتریکی و روشنایی، بررسی عملکرد لامپ UV می تواند مد نظر قرار گیرد. تعویض فیلترها به علت جذب زیاد عوامل میکروبی در فاصله زمانی مناسب با توجه به ساعات کارکرد و توصیه سازنده نیز باید انجام شود.

آلودگی زدایی هودهای بیولوژیک:

- تمامی وسایل و سطوح داخلی باید قبل و بعد از استفاده به وسیله ماده گندزدای مناسب مانند الکل ۷۰٪ و یا محلول های تجاری گندزدایی شود. در صورت استفاده از محلول سفید کننده خانگی با رقت ۱/۱۰ و یا ۱/۱۰۰، باید بعد از استفاده از این ماده، به علت خاصیت خورندگی آن، محل را با آب استریل تمیز نمود.
- همچنین هودهای ایمنی بیولوژیک باید قبل از تعویض فیلتر و قبل از جابجایی آن، با استفاده از روش هایی مانند بخار دادن با گاز فرمالدئید آلودگی زدایی شوند. این کار باید توسط افراد کارآزموده انجام شود. در صورت وجود دستگاه پسماند سوز استاندارد می توان از آن جهت سوزاندن فیلتر استفاده نمود.
- برای آلودگی زدایی هودهای بیولوژیک کلاس ۱ و ۲، از تجهیزاتی که جداگانه قابلیت تولید، گردش هوا و خنثی سازی گاز فرمالدئید را دارند، استفاه می‌شود. روش دیگر، استفاده از میزان مناسبی پارافرمالدئید (با غلظت نهایی ۸٪ پارافرمالدئید در هوا) درون یک ظرف است که روی پلیت گرمکن الکتریکی گذاشته می‌شود. همچنین درون ظرف دیگر، محلول حاوی بی‌کربنات آلومینیوم به میزان ۱۰٪ بیش از پارافرمالدئید روی گرمکن الکتریکی دوم در داخل هود قرار داده می‌شود. باید سیم برق پلیت‌های گرمکن خارج از هود درون پریز شود، تا بتوان ظروف را خارج از هود به وسیله خاموش و روشن کردن گرمکن کنترل کرد.
- اگر رطوبت نسبی زیر ۷۰٪ است باید یک ظرف آب داغ بدون در نیز در داخل هود گذاشته شود، سپس درِ هود توسط نوار محکم بسته شود. فضای باز جلوی هود و هواکش‌های هود به‌وسیله پوشش پلاستیکی ضخیمی که محکم بسته شده، پوشیده می‌شود تا بتوان از عدم نشت درون اتاق اطمینان یافت.
- اطراف محل ورود سیم برق به داخل هود نیز توسط نوار محکم بسته می‌شود.

- برق مربوط به گرمکن ظرف حاوی پارافرمالدئید وصل می‌شود و تا زمانی که تمامی پارافرمالدئید تبخیر نشده، نباید از پریز برق کشیده شود.
- هود باید به مدت حداقل ۶ ساعت دست نخورده باقی بماند. سیم پلیت گرمکن مربوط به ظرف دوم به برق متصل شده تا بی‌کربنات آلومینیوم نیز تبخیر شود، سپس پریز برق قطع شده، هود برای دو بار به مدت هر بار ۲ ثانیه روشن می‌شود تا گاز بی‌کربنات آلومینیوم کاملاً در داخل هود گردش کند. هود به مدت ۳۰ دقیقه قبل از باز شدن درِ جلوئی و برداشتن پوشش پلاستیکی دست نخورده باقی می‌ماند. سطوح داخل هود قبل از استفاده مجدد باید کاملاً تمیز شود.

سیستم هشدار دهنده:

- بعضی از هودها دارای سیستم هشدار دهنده در خصوص وضعیت نامناسب پنجره، اختلال در جریان هوا و غیره می باشند که در این صورت باید کار متوقف شده و مشکل برطرف گردد. در صورت لزوم باید به مسئول مرتبط اطلاع داده شود.

آلودگی زدایی در موارد ریختن مواد آلوده در داخل هود ایمنی:

نکته: در هنگام کار با هود ایمنی، مواد و وسایل پاک کننده لازم و کیسه "خطر زیستی" را در داخل هود ایمنی قرار دهید تا در هنگام ریختن مواد آلوده، در دسترس باشند.

نکته: پس از ریختن مواد آلوده در داخل هود ایمنی، اجازه دهید هود به کار خود ادامه دهد.

نکته: برای جلوگیری از پخش آلودگی به بیرون از هود ایمنی، هیچ چیزی از جمله دستانتان را، از داخل هود ایمنی خارج نکنید.

نکته: برای جلوگیری از پاشیدن مواد به خارج از هود ایمنی در هنگام آلودگی زدایی آن، با احتیاط کار کنید تا از تولید و رها شدن آئروسل ها و مواد آلوده کننده به بیرون از هود جلوگیری شود.

- **در موارد ریختن مقدار کم مواد آلوده:** در صورت ریختن جزئی مواد آلوده درون BSC، فورا آن را مدیریت کنید:

۱- محل ریزش مواد آلوده را با محلول سفید کننده ۱۰٪ تازه تهیه شده یا سایر محصولات گندزدای مورد تأیید بپوشانید، به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه بسته به اندازه محل آلوده شده، منتظر بمانید، و سپس محل را با حوله کاغذی یا جاذب دیگر پاک کنید.

۲- کاغذ جاذب آلوده را برداشته و آن را در کیسه "خطر زیستی" داخل BSC قرار دهید.

۳- دوباره سطح را با آب استریل یا الکل ۷۰٪ و حوله های کاغذی تمیز، پاک کنید تا باقی مانده های محلول سفید کننده حذف شود و سپس حوله های کاغذی را در کیسه "خطر زیستی" قرار دهید.

۴- همه لکه های روی وسایل داخل هود ایمنی را بدون خارج کردن وسایل، و نیز داخل هود ایمنی را با حوله کاغذی آغشته به محلول سفید کننده ۱۰٪ یا سایر محصولات گندزدای مورد تأیید، پاک کنید. برای جلوگیری از خوردگی سطوح، دوباره آنها را با آب استریل یا الکل ۷۰٪ و حوله های کاغذی تمیز پاک کنید تا باقی مانده های محلول سفید کننده حذف شود و سپس حوله های کاغذی را در کیسه "خطر زیستی" قرار دهید.

۵- دستکش های آلوده را درآورید و دست ها را بشویید.

۶- دستکش های تمیز بپوشید و همه چیز را به جای خود بازگردانید.

۷- کیسه "خطر زیستی" را اتوکلاو کنید.

- **در موارد ریختن مقدار زیاد مواد آلوده:** در صورت ریختن مقدار زیاد مواد آلوده به حدی که منجر به جاری شدن مایع در سطوح مشبک جلو یا عقب گردد، نیاز به آلودگی زدایی گسترده تری دارد:

۱- فن هود ایمنی را روشن بگذارید.

۲- در حالی که وسایل داخل BSC را از جای خود برمی دارید، سطح همه آنها را با محلول سفید کننده ۱۰٪ تازه تهیه شده با سایر محصولات گندزدای مورد تأیید آلودگی زدایی کنید.

۳- محلول سفید کننده ۱۰٪ یا سایر محصولات گندزدای مورد تأیید را روی سطح کاری BSC، و از طریق سطوح مشبک، داخل تانک تخلیه (مجرا) بریزید.

۴- ۲۰ تا ۳۰ دقیقه منتظر بمانید تا آلودگی زدایی شود. مدت زمان انتظار، مطابق با نوع پاتوژن یا میکروارگانیسمی که با آن سروکار داریم، متغیر است.

۵- سطح را با حوله های کاغذی آغشته به محلول سفید کننده ۱۰٪ یا سایر مواد جاذب مورد تأیید، پاک کنید و در کیسه "خطر زیستی" قرار دهید.

۶- برای جلوگیری از خوردگی سطوح، با استفاده از حوله های کاغذی تمیز آغشته به آب استریل یا الکل ۷۰٪، سطوح BSC را دوباره پاک کنید تا باقی مانده های محلول سفید کننده حذف شود و سپس حوله های کاغذی را در کیسه "خطر زیستی" قرار دهید.

۷- محتویات تانک تخلیه را درون ظرف حاوی محلول سفید کننده ۱۰٪ تازه تهیه شده با سایر محصولات گندزدای مورد تأیید، خالی کنید.

۸- لوله ای انعطاف پذیر را به دریچه تخلیه وصل کنید. لوله باید به اندازه کافی بلند باشد تا انتهای باز آن بتواند در محلول گندزدا در داخل ظرفی که در بالا ذکر شد، غوطه ور شود.

۹- تانک تخلیه را کاملا با آب شستشو دهید و مواد را از طریق لوله، خالی کنید. لوله تخلیه را بردارید.

۱۰- دستکش ها را درآورید و دست ها را بشویید.

۱۱- دستکش های تمیز بپوشید و همه چیز را به جای خود بازگردانید.

۱۲- کیسه "خطر زیستی" را اتوکلاو کنید.

موارد بحرانی در آزمایشگاه میکرب شناسی

تعریف:

موارد بحرانی در آزمایشگاه میکرب شناسی، شامل نتایج آزمایش هایی است که می توانند تهدید کننده حیات بیمار باشند و باید فورا" و از هر طریق ممکن به اطلاع پزشک معالج برسد. این موارد شامل یافته های مرتبط با ارگان های درگیر، تشخیص میکروارگانیسم ها و بعضی از مقاومت های میکربی است که از نظر بالینی مهم هستند و نیاز به اطلاع رسانی فوری آزمایشگاه دارد، به نحوی که اقدام سریع پزشک معالج، پرسنل بیمارستان و یا گزارش به مراجع مسئول را طلب می کند.

وظایف آزمایشگاه:

۱- کلیه آزمایشگاه های بیمارستانی و غیر بیمارستانی موظف هستند نتایج بحرانی را فورا" به طور شفاهی و به شیوه مناسب و از هر طریق ممکن به اطلاع پزشک معالج یا پرسنل درمانی برسانند.

۲- آزمایشگاه موظف است فردی را به عنوان تأیید کننده و گزارش دهنده نتایج بحرانی مشخص نماید.

۳- تمام مراحل فرایند اطلاع رسانی باید با ذکر جزئیات، مستند و نگهداری شود. برای مثال: نام فرد گزارش دهنده، نام فرد تأیید کننده و مسئول، نحوه تماس، ساعت و تاریخ تماس، شماره تماس، مشخصات فردی که با او تماس گرفته شده است و ....

۴- اگر کلیه تلاش های منطقی و قابل قبول برای تماس با پزشک یا یکی از کادر درمانی بیمار ناموفق بود، تمام مراحل انجام شده باید توسط آزمایشگاه به صورت مکتوب نگهداری شود.

۵- به دنبال گزارش شفاهی، لازم است نتیجه آزمایش اولیه به صورت کتبی نیز گزارش شود.

۶- گزارش نهایی موارد بحرانی، بعد از تکمیل مراحل آزمایش باید به صورت کتبی به اطلاع پزشک یا پرسنل درمانی رسانده شود.

توضیح:

۱- تلاش شده است مجموعه پیوست، به صورت جامع و برای تمام آزمایش های میکرب شناسی تهیه گردد. بدیهی است آزمایشگاه هر مرکز با توجه به سطح و نوع آزمایش هایی که انجام می دهد، می تواند از بخش های مختلف این مجموعه استفاده نماید.

۲- مجموعه پیوست شامل موارد بحرانی در بخش های ذیل می باشد:

- باکتری شناسی: اسمیر، کشت، آزمایش های آنتی ژنی و سرولوژی، سنجش توکسین و روش های مولکولی
- قارچ شناسی: اسمیر، کشت و آزمایش های آنتی ژنی
- انگل شناسی: اسمیر، کشت، آزمایش های آنتی ژنی و سرولوژی، و روش های مولکولی
- ویروس شناسی: کشت و روش های مولکولی
- سایر آزمایش های مرتبط با بخش میکرب شناسی

جدول ۱- موارد بحرانی در آزمایشگاه میکرب شناسی- آزمایش های باکتری شناسی

آزمایش		سن	نتایج بحرانی	ملاحظات
اسمیر (رنگ آمیزی گرم و متیلن بلو)	کشت خون	تمام گروه های سنی	هر نتیجه مثبت	
	مایع مغزی نخاعی (CSF)	تمام گروه های سنی	هر نتیجه مثبت	
	مایعات استریل بدن شامل: جنب، آسیت، مفصل، زجاجیه، پریکارد و ...	تمام گروه های سنی	هر نتیجه مثبت	اولین تشخیص باکتری در رنگ آمیزی گرم بحرانی تلقی می شود. در صورت مثبت شدن مجدد طی یک هفته، این نتیجه دیگر بحرانی تلقی نمی گردد.
	بیوپسی بافت مانند مغز، کبد، کلیه، استخوان و مغز استخوان	تمام گروه های سنی	هر نتیجه مثبت	
	نمونه های بخش جراحی مانند آبسه های مغزی و مایعاتی که در حین جراحی برداشته می شوند	تمام گروه های سنی	هر نتیجه مثبت یا منفی	
	تراشه قرنیه	تمام گروه های سنی	هر نتیجه مثبت	
	پتشی از نظر منتگوکک	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	نمونه قانقاریای گازی	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	باسیل های گرم مثبت درشت مشابه کلستریدیوم
	اسمیر گرم و پارشیال اسید فست نوکاردیا	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	اسمیر اسید فست در نمونه های تنفسی	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	

ادامه جدول ۱- موارد بحرانی در آزمایشگاه میکرب شناسی- آزمایش های باکتری شناسی

آزمایش		سن	نتایج بحرانی	ملاحظات
کشت	کشت خون	تمام گروه های سنی	هر نتیجه مثبت	
	مایع مغزی نخاعی (CSF)	تمام گروه های سنی	هر نتیجه مثبت	
	مایعات استریل بدن شامل: جنب، آسیت، آمنیوتیک، مفصل، زجاجیه، پریکارد و ...	تمام گروه های سنی	هر نتیجه مثبت	اولین تشخیص باکتری در کشت بحرانی تلقی می شود. در صورت مثبت شدن مجدد طی یک هفته، این نتیجه دیگر بحرانی تلقی نمی گردد.
	تراشه قرنیه	تمام گروه های سنی	هر نتیجه مثبت	
	بیوپسی بافت مانند مغز، کبد، کلیه، استخوان و مغز استخوان	تمام گروه های سنی	هر نتیجه مثبت	
	مدفوع	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت برای *ویبریو کلرا*	
		کمتر از ۱۸ سال	نتیجه مثبت برای *E. coli* Enterohemorrhagic مانند *E. coli* O157	
		کمتر از ۱۲ سال	نتیجه مثبت برای *شیگلا*	در بیماران بستری
		تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت برای *شیگلا دیسانتریه*	در بیماران بستری و سرپایی
		اطفال	نتیجه مثبت برای *کمپیلوباکتر*	در صورت وجود خون یا گلبول سفید در نمونه بیمار
		تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت برای *سالمونلا تایفی*	در بیماران بستری و سرپایی
		تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت برای *سالمونلا*های غیر تایفی	بیماران با علائم بالینی شدید یا دارای نقص سیستم ایمنی
	مایع دیالیز	تمام گروه های سنی	هر نتیجه مثبت	
	بورخلدریا مالئی و *سودومالئی*	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	نیسریا منتژیتیدیس در نمونه های مایع مغزی نخاعی، خون، مایع مفصل و پتشی	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	

ادامه جدول ۱- موارد بحرانی در آزمایشگاه میکرب شناسی- آزمایش های باکتری شناسی

آزمایش		سن	نتایج بحرانی	ملاحظات
کشت	*سودوموناس* در نمونه چشم	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	گونه های *بروسلا*	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	هر نمونه ای
	باسیلوس آنتراسیس	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	هر نمونه ای
	فرانسیسلا تولارنسیس	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	هر نمونه ای
	یرسینیا پستیس	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	هر نمونه ای
	استرپتوکک گروه A جدا شده از فاسیت و یا زخم های جراحی	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	لژیونلا	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	لپتوسپیرا	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	لیستریا	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	زنان باردار و افراد مبتلا به هر گونه نقص سیستم ایمنی
	کشت مثبت *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس*	تمام گروه های سنی	اولین بار جداسازی و جداسازی سویه های مقاوم (MDR و XDR)	در صورتی که از نمونه مجدد بیمار طی دو هفته دوباره باکتری جدا شود، دیگر به گزارش شفاهی یا فوری نیازی نیست.
	سایر گونه های *مایکوباکتریوم*	تمام گروه های سنی	اولین جواب مثبت	هر نمونه ای
	کورینه باکتریوم دیفتریه	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	استرپتوکوکوس آگالاکتیه در نمونه های ادرار، تناسلی و رکتوم در زنان باردار	زنان باردار هفته ۳۷-۳۵ بارداری	نتیجه مثبت	
	سودوموناس آئروژینوزا یا گونه های *باسیلوس* در نمونه ترشحات چشم	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	بردتلا پرتوسیس	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	ارگانیسم هایی با مقاومت میکربی چندگانه، مانند MRSA، MRS، ESBLs، مقاومت به کارباپنم ها، مقاومت VRSA، VISA، VRE، پنوموکک مقاوم به پنی سیلین و هر گونه مقاومت غیر منتظره	تمام گروه های سنی	نتایج مثبت	این مقاومت ها با نظر کمیته کنترل عفونت می تواند در بخش های مختلف بیمارستان به عنوان موارد بحرانی در نظر گرفته شود.

ادامه جدول ۱- موارد بحرانی در آزمایشگاه میکرب شناسی- آزمایش های باکتری شناسی

	آزمایش	سن	نتایج بحرانی	ملاحظات
آزمایش های آنتی ژنی و سرولوژی	*استرپتوکوکوس پنومونیه، استرپتوکوکوس آگالاکتیه، هموفیلوس انفلوانزا، لیستریا منوسیتوژنز، نیسریا مننژیتیدیس* در نمونه مایع مغزی نخاعی	تمام گروه های سنی	نتایج مثبت	
	تشخیص مورد جدید سیفیلیس	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	لپتوسپیرا	تمام گروه های سنی	تیتر با ارزش آنتی بادی	
سنجش توکسین	توکسین A و B *کلستریدیوم دیفیسیل* در نمونه مدفوع	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	تشخیص اولیه به عنوان نتیجه بحرانی تلقی می شود و جواب های مثبت مجدد طی یک هفته، دیگر به عنوان نتیجه بحرانی تلقی نمی گردد.
	کلستریدیوم بوتولینوم در نمونه ماده غذایی مصرفی	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	شیگاتوکسین در نمونه مدفوع	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
روش های مولکولی	TB در نمونه های مایع مغزی نخاعی و تنفسی	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	بردتلا پرتوسیس	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	کلامیدیا در نمونه چشم	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	MRSA	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	لژیونلا	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	

جدول ۲- موارد بحرانی در آزمایشگاه میکرب شناسی- آزمایش های قارچ شناسی

آزمایش		سن	نتایج بحرانی	ملاحظات
اسمیر	رنگ آمیزی India Ink در مایع مغزی نخاعی از نظر کریپتوکوکوس	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	پنوموسیستیس با روش DFA	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	تراشه قرنیه	تمام گروه های سنی	هر نتیجه مثبت	
	نمونه های کشت خون، مایع مغزی نخاعی، مایعات بدن یا نمونه های بیوپسی بافت	تمام گروه های سنی	هر نتیجه مثبت	اولین تشخیص مستقیم قارچ در این نمونه ها، بحرانی تلقی می شود و در صورت مثبت شدن مجدد طی یک هفته، دیگر بحرانی تلقی نمی گردد.
	نمونه بیوپسی سینوس در بیماران دیابتی و دارای نقص سیستم ایمنی	تمام گروه های سنی	هر نتیجه مثبت	
کشت	نمونه های کشت خون، مایع مغزی نخاعی، مایعات بدن یا نمونه های بیوپسی بافت	تمام گروه های سنی	هر نتیجه مثبت	
	نمونه بیوپسی سینوس در بیماران دیابتی و دارای نقص سیستم ایمنی	تمام گروه های سنی	هر نتیجه مثبت	
	تراشه قرنیه	تمام گروه های سنی	هر نتیجه مثبت	
آزمایش های آنتی ژنی	آنتی ژن کریپتوکوکوس در نمونه مایع مغزی نخاعی و سرم	تمام گروه های سنی	اولین جواب مثبت	نتیجه اولیه بحرانی تلقی می شود و نیازی به گزارش مجدد نمی باشد؛ مگر آن که در آزمایش کمی، افزایش معنی داری معادل ۴ تیتر در آزمایش های بعدی مشاهده گردد.

جدول ۳- موارد بحرانی در آزمایشگاه میکرب شناسی- آزمایش های انگل شناسی

آزمایش		سن	نتایج بحرانی	ملاحظات
اسمیر یا کشت	اسمیر مالاریا	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	اسمیر لارو استروژیلوئیدس استرکورالیس در نمونه های خارج روده ای	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	اسمیر تروفوزوئیت انتامبا هیستولیتیکا در مدفوع خونی	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	اسمیر یا کشت گونه های اکانتامبا از مایع مغزی نخاعی یا چشم	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	اسمیر یا کشت گونه های نگلریا از سیستم اعصاب مرکزی (CNS)	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
آزمایش های آنتی ژنی و سرولوژی	توکسوپلاسما در نمونه مایع مغزی نخاعی و مایع آمنیوتیک	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
روش های مولکولی	توکسوپلاسما در نمونه مایع مغزی نخاعی و مایع آمنیوتیک	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	

جدول ٤- موارد بحرانی در آزمایشگاه میکرب شناسی- آزمایش های ویروس شناسی

آزمایش		سن	نتایج بحرانی	ملاحظات
کشت	ویروس هرپس سیمپلکس در نمونه های مایع مغزی نخاعی، مغز، مایع آمنیوتیک و چشم	تمام گروه های سنی	نتایج مثبت	
	ویروس هرپس سیمپلکس در نمونه های زخم تناسلی	در پایان دوره بارداری	نتیجه مثبت	
	آنسفالیت های ویروسی	تمام گروه های سنی	نتایج مثبت	
	نمونه مایع مغزی نخاعی شیرخواران	کمتر از ۱۲ ماه	هر نتیجه مثبت	
	انفلوانزای A و B	تمام گروه های سنی	نتایج مثبت	در شروع اپیدمی
	نورو ویروس در نمونه مدفوع	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	نمونه های مایع مغزی نخاعی، خون، مایعات استریل بدن، مایع آمنیوتیک یا نمونه های بیوپسی بافت	تمام گروه های سنی	نتایج مثبت	مانند CMV، انترو ویروس، EBV، VZV
	Respiratory Syncytial Virus (RSV)	اطفال	نتیجه مثبت	
روش های مولکولی	ویروس هرپس سیمپلکس در نمونه های مایع مغزی نخاعی، مغز، مایع آمنیوتیک و چشم	تمام گروه های سنی	نتایج مثبت	
	ویروس هرپس سیمپلکس در نمونه های زخم تناسلی	در پایان دوره بارداری	نتیجه مثبت	
	آنسفالیت های ویروسی	تمام گروه های سنی	نتایج مثبت	
	نمونه مایع مغزی نخاعی شیرخواران	کمتر از ۱۲ ماه	هر نتیجه مثبت	
	انفلوانزای A و B	تمام گروه های سنی	نتایج مثبت	در شروع اپیدمی
	نورو ویروس در نمونه مدفوع	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	سیتومگالوویروس (CMV) به روش کمی (viral load) در بیماران پیوندی یا دارای نقص سیستم ایمنی و شیرخواران کمتر از ۳ ماه	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	RSV	اطفال	نتیجه مثبت	

جدول ۵- موارد بحرانی مرتبط با آزمایشگاه میکرب شناسی

آزمایش	سن	نتایج بحرانی	ملاحظات
وانکومایسین	تمام گروه های سنی	> ۴۵ µg/ml	
آمیکاسین	تمام گروه های سنی	> ۳۵ µg/ml	
جنتامایسین	تمام گروه های سنی	> ۲۰ µg/ml	
تست پروکلسیتونین	تمام گروه های سنی	> ۱۰ ng/ml	

مراجع:

1- Critical Values- The University of Kansas Hospital, KUMED- 2005

2- Critical Value Chart- UCL & DBQ PA Laboratories- 2010

3- Microbiology Critical Values for Wards that Require Immediate Clinical Notification- Bon Secours Hospital- 2011

4- Critical Values; Indiana University Health- 2011

5- Critical Results List, DLMP Critical Values; Mayo Medical Laboratories- 2011

6- Communication of Pathology Results, Document ID; GE- QA- 19.9- 2009

7- Critical Values Policy, Policy Number; Lab 0051- UNC Health Care- 2010

8- Laboratory Critical, Panic Value List; Stanford University Medical Center- 2011

9- Microbiology Critical Values; Legacy Laboratory Services- 2011

10- Semi Urgent List, DLMP Semi Urgent Values; Mayo Medical Laboratories- 2011

11- Clinical Microbiology Procedures Handbook; Isenberg, ASM- 2007

12- Textbook of Diagnostic Microbiology; Mahon- 2011

13- Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology- 2007

14- Clinical Laboratory Critical Value Immediate Notification Test List- University of Rochester Medical Center- 2008

دستورالعمل تهیه انواع محیط های کشت، معرفها و رنگ های مصرفی در آزمایشگاه میکروب شناسی، به شرح ذیل می باشد:

روش 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.

محیط های کشت دهیدراته شامل:

آگار بی هوازی، بلاد آگار(B.A)، برین هارت آگار و براث (BHB/BHA)، بایل اسکولین آگار، بیسموت سولفیت آگار، بروسلا مدیوم، کوکدمیت براث، کمپیلوباکتر سلکتیو آگار، کری بلر، کازو آگار و براث (TSA/TSB)، CTA مدیوم، 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 براث، مانیتول سالت آگار، مک کانکی آگار، مالونات براث، نوترینت آگار و براث (N.A/N.B)، نیترات براث، اورنی تین دکربوکسیلاز آرژینین دهیدرولاز تست براث، OF بازال مدیوم، پپتون واتر، فنیل آلانین آگار، فنل رد براث و آگار، پپتون آگار، سیمون سیترات آگار، SIM مدیوم، سالمونلا شیگلا آگار (S.S)، سلنیت براث، ترپیل 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

Beef Extract = ۳ g

ژلاتین= ۱۲۰ g

مقادیر فوق را به ۱۰۰۰cc 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 ^{o}C ۱۲۱ در فشار ۱۵ پوند (Lb ۱۵) استریل نمایید. سپس در لوله تقسیم کرده و PH محیط کشت را به ۶/۸ برسانید

روش تهیه محیط کشت آب پپتونه قلیایی یا APW (ترکیبی)

پپتون= ۱۰g

کلرور سدیم (Nacl)= ۱۰g

آب‌مقطر= ۱۰۰۰cc

سپس pH را به ۹-۸/۶ برسانید و در شرایط ۱۵ دقیقه, فشار Lb ۱۵ در اتوکلاو قرار داده و استریل نمایید. دما نیز ^{o}C ۱۲۱ است. (برای تنظیم از سود N ۱ استفاده کنید)

روش تهیه محیط کشت حاوی گلیسرین جهت دیپ فریز

از 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 (۲-۱ ml) در لوله های درپیچ دار تقسیم نموده و در شرایط ^{o}C ۱۲۱ ، ۱۵ دقیقه و فشار Lb ۱۵ اتوکلاو نمایید.

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

محیط پایه همان محیط نوترینت براث/آگار است. از آنجا که این محیط کشت فاقد نمک می‌باشد، بنابراین ۶/۵٪ نمک به این محیط پایه اضافه نمایید. شرایط استریلیزاسیون همان دمای ^{o}C۱۲۱، فشار Lb ۱۵ و زمان ۱۵ دقیقه می‌باشد.

روش تهیه انواع قندها:

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

روش استریلیزاسیون قندها استفاده از فیلتراسیون می‌باشد. در غیر اینصورت می توان همه انواع قندها را در فشار Lb ۵ به مدت ۵ دقیقه استریل نمود.

اگر بخواهید قندها را از هم تفکیک نمایید، شرایط استریلیزاسیون برای انواع لاکتوز، مالتوز، گزیلوز، سالیسین، سوکروز، ترهالوز و آرابینوز شامل فشار Lb ۱۵، دمای ^{o}C ۱۲۱ به مدت ۳ دقیقه و شرایط استریلیزاسیون برای سایر قندها شامل فشار Lb ۱۲-۱۰، دمای ^{o}C ۱۱۸-۱۱۶ و زمان ۱۵ دقیقه می باشد.

روش تهیه انواع معرف ها و رنگ ها

روش تهیه معرف های VP

– تهیه آلفا نفتول (معرفA):

پودرآلفا نفتول: ۵ g

اتانول: ۱۰۰cc

-تهیه KOH (پتاس) (معرفB):

KOH: ۴۰g

کراتین (cr): ۰/۳ g

آب‌مقطر: ۱۰۰cc

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= ۰/۱ g

اتانول= ۳۰۰cc

پودر متیل رد را در اتانول حل کرده سپس با آب مقطر حجم آنرا به ۵۰۰cc برسانید. معرف در ظرف تیره و در یخچال نگهداری می‌شود. چون دارای پایداری متغیر است، لازم است بطور هفتگی (بر حسب میزان کار) کنترل کیفی گردد.

روش تهیه معرف کواکس

P-دی متیل آمینو بنز آلدئید= ۱۰g

آمیل الکل: ۱۵۰cc

اسید کلریدریک غلیظ و تازه: ۵۰cc

دی متیل آمینو بنزآلدئید 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 می شود. چون دارای پایداری متغیر است، لازم است بطور هفتگی (برحسب میزان کار) کنترل کیفی گردد.

روش تهیه معرف کلرور فریک

کلرور فریک= ۱۰g

آب مقطر = ۱۰۰cc (روش غیر اسیدی)

(روش دیگر تهیه این معرف شامل کلرور فریک: ۱۲g، اسید کلریدریک غلیظ: ۲/۵cc و آب مقطر cc ۱۰۰ می‌باشد، که این روش، روش اسیدی است). معرف در ظروف تیره و در یخچال نگهداری می‌شود. چون دارای پایداری متغیر است، لازم است بطور هفتگی (برحسب میزان کار) کنترل کیفی گردد.

روش تهیه معرف های احیاء نیترات

-تهیه معرف A:

N، N دی متیل آلفا نفتیل آمین: ۶g

اسیداستیک گلاسیالN۵، (۳۰٪): ۱۰۰۰cc

مقدار فوق از N، N دی متیل آلفا نفتیل آمین را در کمتر از ۱۰۰۰cc اسید استیک گلاسیال N۵ حل کرده و کمی حرارت ملایم دهید تا حل شود. حجم را به یک لیتر رسانیده، محلول را از صافی رد کنید.

-تهیه معرف B:

سولفانیلیک اسید (P- آمینو بنزن سولفونیک اسید): ۸g

اسیداستیک گلاسیال N۵، (۳۰٪): ۱۰۰۰ cc

مقدار فوق از سولفانیلیک اسید را در کمتر از ۱۰۰۰ cc اسیداستیک حل کرده و سپس حجم را به یک لیتر برسانید. معرف ها در ظروف تیره و در یخچال نگهداری می شوند. آلفا نفتیل آمین سرطان زا است. چون دارای پایداری متغیر هستند لازم است به طور هفتگی (بر حسب میزان کار) کنترل کیفی گردند.

روش تهیه معرف نین هیدرین

پودر نین هیدرین= ۳/۵ g

استن= ۵۰ cc

بوتانول = ۵۰ cc

استن و بوتانل را مخلوط کرده و سپس پودر نین هیدرین را اضافه نمایید. معرف در ظرف تیره و در دمای اتاق نگهداری می شود. درب آن باید کاملاً محکم بسته شود.

روش تهیه ویتامین K_1

پودر ویتامین k_1= ۰/۲g

اتانول= ۲۰cc

محلول در ظرف تیره و در یخچال نگهداری می‌شود. درب ظرف باید کاملاً محکم بسته شود. غلظت نهایی محلول ۰/۱ µg/ml برای محیط های مایع و ۱۰µg/ml برای محیط های آگاردار است. ۰/۲g پودر ویتامین K_1 را روی یک قطعه کوچک فویل آلومینیومی استریل وزن کرده و در شرایط آسپتیک به ۲۰ml اتانول در یک بطری استریل اضافه کنید. برای رقیق سازی بیشتر از آب مقطر استریل استفاده کنید. محلول ذخیره ۱۰mg/ml است. ۱ml از محلول ذخیره را به یک لیتر آگار و ml/l ۰/۰۱ براث اضافه کنید. محلول را دور از نور و در یخچال ذخیره کنید.

روش تهیه همین(Haemine)

پودر همین= g ۰/۵

سود (NaOH) ۱N =۱۰cc

مقدار فوق از پودر همین را به ۱۰ccسود ۱ نرمال اضافه کرده و حل کنید، سپس با آب مقطر به حجم ۱۰۰ccبرسانید. در شرایط ۱۵ دقیقه، ۱۲۱^{o}C، فشار Lb ۱۵ در اتوکلاو استریل نمایید.

محلول در ظرف تیره و در یخچال نگهداری می شود. این محلول ذخیره mg/ml ۵ غلظت دارد، ولی هنگام مصرف به عنوان ساپلمنت، باید دارای غلظت نهایی µg/ml ۵ باشد.

روش تهیه آب اکسیژنه (H_2O_2) ۳٪

محلول آب اکسیژنه ۳۰٪ را به نسبت ۱:۱۰ با آب مقطر رقیق نمایید. (یعنی ۱cc آب اکسیژنه ۳۰٪ را به ۹cc 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 = ۲۰g

اتانول= ۱۰۰cc

-تهیه اگزالات آمونیوم

پودر اگزالات آمونیوم= ۱g

آب مقطر= ۱۰۰cc

هنگام مصرف، محلول کریستال ویوله ذخیره را به نسبت ۱:۱۰ با آب مقطر رقیق نمایید. (۱cc از محلول کریستال ویوله و ۹ cc آب مقطر) سپس این محلول را با چهار حجم از محلول اگزالات آمونیم رقیق کنید (۱cc محلول کریستال ویوله رقیق شده و ۴cc اگزالات آمونیم). محلول ذخیره و مصرفی کریستال ویوله، در ظرف تیره و در دمای اتاق نگهداری می‌شود.

روش تهیه لوگل

ید= ۱g

یدور پتاسیم = ۲g

آب مقطر= ۲۴۰cc

محلول آبی بیکربنات سدیم۵٪= ۶۰cc

در مقدار کمی از آب مقطر، ید و یدور پتاسیم را کاملاً حل نمایید، بعد حجم را با آب مقطر به ۲۴۰cc برسانید. محلول ۵٪ بیکربنات سدیم (بیکربنات سدیم: ۵g آب مقطر: ۱۰۰c) را نیز به آن اضافه نمایید. محلول در دمای اتاق نگهداری می شود . درب آنرا باید کاملا" محکم ببندید.

روش تهیه محلول الکل-استون

اتانول= ۲۵۰cc

استون= ۲۵۰cc

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

روش تهیه فوشین/ یا سافرانین ذخیره

پودر فوشین= ۲g

اتانول= ۱۰۰cc

و یا

پودر سافرانین= ۲/۵g

اتانول= ۱۰۰cc

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

مدیریت نمونه در آزمایشگاه های پزشکی

مقدمه

نتایج آزمایش‌ها تحت تاثیر متغیرهای گوناگونی است که شناسایی آن‌ها و بدنبال آن استاندارد نمودن روش‌های آزمایشگاهی جهت تفسیر و استفاده بهینه از داده‌های آزمایشگاهی ضروری است. این متغیرها شامل مراحل قبل از، حین و پس از آزمایش می‌باشند. در سال‌های اخیر با توجه به تاکید بر اجرای روش‌های کنترل کیفی در کلیه بخش‌های آزمایشگاه در مرحله حین آزمایش و به‌دنبال آن برگزاری دوره‌های آموزشی در این خصوص، خطاهای حین آزمایش به حداقل رسیده است و لذا تاثیر متغیرهای قبل و بعد از آزمایش بسیار پررنگ شده است.

با توجه به اهمیت متغیرهای قبل از آزمایش در این فصل سعی شده است مجموعه‌ای از دستورالعمل-های کاربردی در خصوص مدیریت نمونه بیان گردد که این موارد شامل: نحوه جمع‌آوری انواع نمونه‌های بالینی، شامل خون و سایر مایعات بدن، آماده‌سازی نمونه، جابجایی و نقل انتقال نمونه، شرایط نگه‌داری و موارد رد نمونه می‌باشد.

بدیهی است رعایت موارد ذکر شده در این مجموعه در به حداقل رساندن عواملی که می‌تواند نتایج آزمایش را تحت تاثیر قرار دهد، کمک شایانی خواهد نمود.

تجهیزات لازم جهت اتاق نمونه‌برداری

نمونه‌گیری باید در یک محل مجزا، تمیز و ساکت صورت گیرد. این اتاق بهتر است مجهز به دستشویی بوده و در صورت عدم دسترسی به آب، باید محلول‌های تمیزکننده دست موجود باشد.

۱- صندلی نمونه‌برداری: باید دارای دسته قابل تنظیم باشد به‌طوری که بیمار بتواند در راحت‌ترین وضعیت جهت نمونه‌گیری روی صندلی بنشیند. هم‌چنین صندلی باید دارای حفاظ ایمنی جهت جلوگیری از افتادن بیمار باشد.

۲- تخت معاینه

۳- سینی جمع‌آوری ظرف‌های نمونه

۴- دستکش

- *دستکش در صورت آلودگی و یا در فواصل نمونه‌گیری‌ها باید تعویض گردد.*

۵- سوزن (19–23G)

۶- سرنگ یا نگه‌دارنده مخصوص (holder) جهت استفاده از لوله‌های خلاء (evacuated tube)

۷- نیشتر یک‌بار مصرف

۸- انواع لوله‌ها و ظروف در پیچ‌دار یا لوله‌های خلاء

۹- بازوبند (tourniquet)

۱۰- یخچال یا یخ باید در دسترس باشد

۱۱- ضدعفونی کننده‌ها:

- ایزوپروپیل الکل یا اتیل الکل ۷۰٪
- محلول povidone – iodine ۱۰-۱٪ یا کلر هگزیدین گلوکونات جهت کشت خون

۱۲- گاز پارچه‌ای در ابعاد ۵×۵ cm یا ۷/۵×۷/۵ cm (استفاده از پنبه پیشنهاد نمی‌گردد). باند و گاز باید جهت پانسمان در دسترس باشد.

۱۳- ظروف مخصوص دفع سرسوزن‌های آلوده (Puncture Resistant Disposal Container)

۱۵- فهرست انواع آزمایش‌ها و درج مقدار خون لازم برای هر آزمایش و نوع لوله مورد استفاده

۱۶- روتاتور جهت مخلوط نمودن لوله‌های محتوی خون

نمونه‌گیری وریدی

مراحل نمونه‌گیری

خون‌گیری صحیح نیاز به دانش و مهارت توام دارد. جهت جمع‌آوری نمونه خون وریدی، خون‌گیر کار آزموده باید مراحل زیر را پی‌گیری نماید:

۱- انطباق مشخصات برگه درخواست آزمایش با مشخصات بیمار

۲- اطمینان از رعایت رژیم غذایی پیش از نمونه‌گیری

۳- انتخاب وسایل مورد نیاز

سرنگ و سرسوزن مناسب یا لوله خلاء براساس نوع آزمایش انتخاب می‌شود.

**** به‌طور کلی توصیه می‌گردد به‌دلیل رعایت اصول ایمنی از سرنگ و سرسوزن استفاده نشود و لوله‌های خلاء جایگزین آن گردند.***

۴- استفاده از دستکش

۵- وضعیت بیمار هنگام نمونه‌گیری

بیمار بر روی صندلی نمونه‌گیری نشسته و دست خود را به منظور برجسته شدن وریدها مشت کرده و به نحوی روی دسته صندلی نمونه‌برداری قرار می‌دهد که بازو تا مچ دست در یک خط مستقیم قرار گیرند. باید توجه داشت که بیمار نباید مشت خود را باز و بسته نماید زیرا باز و بسته کردن مشت باعث تغییر بعضی مواد در خون می‌شود.

۶- بستن تورنیکه

به منظور افزایش پر شدن ورید از خون و برجسته شدن رگ مورد نظر و جهت تسهیل ورود خون به‌داخل سرنگ یا لوله‌های خلاء از رگ‌بند (تورنیکه) استفاده می‌شود (قابل ذکر است در مواردی نظیر اندازه‌گیری لاکتات خون نباید تورنیکه بسته شود).

رگ‌بند باید۱۰- ۷/۵ سانتی‌متر بالای ناحیه نمونه‌گیری بسته شود و نباید بیش از یک دقیقه بر روی بازوی بیمار بسته بماند.

۷- انتخاب ورید مناسب

در اغلب موارد نمونه‌گیری از وریدهای Median cubital و Cephalic صورت می‌گیرد. خون‌گیری از وریدهای پشت دست نیز قابل قبول است، ولی وریدهای سطح داخلی مچ نباید مورد استفاده قرار گیرند.

۸- تمیزکردن محل نمونه‌گیری

ناحیه نمونه‌گیری به کمک گاز آغشته به ایزوپروپیل الکل یا اتیل الکل ۷۰٪ به‌صورت حرکت دورانی از داخل به خارج تمیز می‌شود. نمونه‌گیری پس از خشک شدن موضع در هوا، به‌منظور جلوگیری از همولیز و کاهش سوزش ناشی از تماس نوک سوزن با الکل و پوست، صورت می‌گیرد.

۹- نمونه‌گیری

باید سر سوزن در حالی که قسمت مورب نوک آن به سمت بالا است، با زاویه ۳۰°C یا کمتر وارد ورید شود.

**** به محض ورود خون بداخل سرنگ یا لوله خلاء باید رگ‌بند (تورنیکه) باز شود.***

در صورت استفاده از لوله خلاء باید تمهیدات زیر صورت گیرد :

•• حتی‌الامکان سوزن در رگ ثابت نگه‌داشته شده و اولین لوله با فشار به سوزن مرتبط شود.

•• لـولـه‌ها باید تا خاتمه مکش از خون پر شوند. پس از وقفه جریان خون اولین لوله از سوزن جدا شده و لوله‌های بعدی به سوزن متصل می‌شوند.

•• لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد و خون باید بلافاصله پس از پرشدن مخلوط شوند (با۱۰-۵ مرتبه سروته نمودن). جهت جلوگیری از همولیز نباید لوله‌ها به شدت مخلوط گردند.

پس از جاری شدن روان خون به داخل سرنگ یا لوله‌های خلاء بیمار باید مشت خود را باز کند.

۱۰- دفع سر سوزن

سر سوزن‌های آلوده ***بدون گذاشتن درپوش سرسوزن*** باید در ظروف ایمن، دفع گردند. سپس نمونه خون به آرامی در ظروف مربوطه تخلیه شود.

۱۱- تخلیه خون

نمونه‌هایی که در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد ریخته می‌شوند باید بلافاصله و به آرامی ۵ تا ۱۰ بار مخلوط شوند. در صورتی‌که نمونه در لوله بدون ماده ضد انعقاد ریخته می‌شود باید به آرامی در جدار داخلی لوله تخلیه گردد.

۱۲- اقدامات پس از نمونه‌گیری

پس از خاتمه نمونه‌گیری، باید موضع از نظر بندآمدن خون‌ریزی و یا به‌وجود آمدن هماتوم کنترل گردد.

۱۳- برچسب‌گذاری ظرف حاوی نمونه

بلافاصله پس از اتمام نمونه‌گیری باید برچسب دارای اطلاعات زیر را بر روی لوله‌ها و ظروف حاوی نمونه خون بیمار الصاق نمود:

- نام، نام خانوادگی بیمار، شماره شناسایی، تاریخ، زمان نمونه‌گیری (بخصوص در آزمایش‌های ردیابی دوز درمانی داروها TDM)، نام فرد خون‌گیر

خون‌گیری مویرگی – نمونه‌گیری از طریق سوراخ کردن پوست (Skin Puncture)

خون‌گیری مویرگی در نوزادان، اطفـــال و بزرگسالان در شرایط خاص نظیر بیماران با سوختگی وسیع، بیماران بسیار چاق، بیماران مستعد به ترومبوز و بیماران مسن یا سایر بیمارانی که وریدهای سطحی آن‌ها قابل دسترسی نبوده یا بسیار شکننده است، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

- **نواحی مناسب جهت سوراخ کردن پوست و جمع‌آوری نمونه:**

- بند انتهایی انگشتان دست
- سطح داخلی و خارجی پاشنه پا

- ***در نوزادان کمتر از یک سال معمولا خون‌گیری از پاشنه پا انجام می‌گیرد.***
- ***در اطفال و بـزرگسـالان معمولا از سطـح داخـلی بند آخـر انگشتان (انگشت سـوم یـا چهـارم) خون‌گیری صورت می‌گیرد. سطح جانبی و نوک انگشتان مناسب نمی‌باشند.***

از نواحی زیر *نباید* خون‌گیری صورت گیرد:

۱) نرمه گوش
۲) ناحیه مرکزی پاشنه پا در نوزادان
۳) انگشتان (دست و پا) نوزادان و اطفال کمتر از یک‌سال

نواحی متورم یا مناطقی که قبلا جهت نمونه‌گیری سوراخ شده‌اند(به‌دلیل تجمع مایع بافتی)

- **روش کار**

موضع مورد نظر توسط محلول ایزوپروپانول ۷۰٪ (یا اتانول ۷۰٪) ضد عفونی شده و پس از خشک شدن در مجاورت هوا، خون‌گیری به‌وسیله لانست استریل انجام می‌شود. قابل ذکر است که باید اولین قطره خون را به‌وسیله گاز پاک کرده و از قطرات بعدی استفاده نمود.

آماده‌سازی نمونه خون

سرم یا پلاسما باید در کوتاه‌ترین زمان به‌دنبال نمونه‌گیری از سلول‌های خونی جدا گردد. حداکثر زمان مجاز جهت جداسازی سرم یا پلاسما ۲ ساعت پس از نمونه‌گیری پیشنهاد می‌گردد. قابل ذکر است که درخصوص اندازه‌گیری ترکیباتی نظیر پتاسیم، هورمون‌های کورتیکواستروئیدی، کورتیزول، کاتکولامین‌ها، اسید لاکتیک و هموسیستین این زمان باید کمتر از ۲ ساعت باشد.

قابل ذکر است که درجه حرارت محیط نیز بر پایداری برخی مواد تاثیر می‌گذارد.

آماده‌سازی نمونه در طی سه مرحله انجام می‌گیرد: مرحله پیش از سانتریفیوژ، مرحله سانتریفیوژ، مرحله پس از سانتریفیوژ.

- **مرحله پیش از سانتریفیوژ**

برای اکثر روش‌های اندازه‌گیری مواد در خون به‌جز اندازه‌گیری گازهای خون و آمونیاک، استفاده از سرم یا پلاسما ارجحیت دارد.

•• **تهیه سرم:** نمونه خون پس از جمع‌آوری (در ظروف در بسته)، باید جهت جداسازی و سانتریفیوژ مراحل لخته شدن را طی نماید که بهتر است این مرحله با طی زمان و به‌طور خودبخود صورت گیرد. عمل لخته شدن به‌طور طبیعی در دمای اتاق (۲۵°C-۲۲) پس از ۶۰-۳۰ دقیقه کامل می‌گردد. در صورتی که بیمار داروهای ضد انعقاد مصرف نماید، زمان لخته شدن طولانی‌تر بوده و اگر نمونه در شرایط سرما قرار گیرد (۸°C-۲) نیز این عمل به تاخیر می‌افتد. هم‌چنین اگر زمان لازم جهت کامل شدن مراحل تشکیل لخته کافی نباشد، تشکیل رشته‌های ظریف فیبرین ممکن است سبب ایجاد خطا در نتایج بسیاری از دستگاه‌های خودکار بیوشیمی گردد. جهت تسریع در عمل لخته شدن می‌توان از لوله‌های جمع‌آوری سرم که حاوی فعال‌کننده یا تسریع‌کننده عمل لخته شدن باشد استفاده نمود. به‌طور مثال لوله‌های حاوی افزودنی نظیر سم مار، زمان تشکیل لخته را به ۵-۲ دقیقه، ترومبین به ۵ دقیقه، سیلیکا و پارتیکل‌های شیشه به حدود ۳۰-۱۵دقیقه می‌رسانند. (استفاده از اپلیکاتور چوبی یا پلاستیکی جهت جداسازی لخته از دیواره لوله پیشنهاد نمی‌گردد)

•• **تهیه پلاسما:** لوله‌های حاوی خون به همراه مواد افزودنی به‌جز سیترات سدیم باید پس از نمونه‌گیری به آرامی برای حداقل ۱۰-۵ بار جهت مخلوط شدن سر و ته گردند (به‌جز موارد خاص که باید مطابق دستورالعمل سازنده لوله عمل گردد). لوله‌های حاوی سیترات سدیم و خون باید ۴-۳ مرتبه سر و ته گردند.

•• **سرد نمودن:** بعضی نمونه‌ها باید تا قبل از عمل سانتریفیوژ و جداسازی در سرما نگه‌داری شوند. سرد کردن نمونه، متابولیسم سلول‌های خونی را مهار نموده و سبب پایداری اجزای حساس به حرارت می‌گردد. جهت سرد نمودن، نمونه باید سریعا در یخ خرد شده یا مخلوطی از آب و یخ قرار گیرد (استفاده از تکه‌های بزرگ یخ به‌دلیل تماس ناکافی بین نمونه و یخ قابل قبول نمی‌باشد). یخ باید کاملا اطراف سطح خون درون لوله را احاطه کند.

نکته: قرار دادن نمونه خون بیش از دو ساعت در سرما سبب افزایش کاذب پتاسیم می‌گردد. سرما سبب مهار گلیکولیز شده، لذا انرژی جهت پمپ پتاسیم به داخل سلول ایجاد نمی‌گردد و بدنبال آن پتاسیم از سلول‌ها به بیرون نشت می‌کند. نمونه جهت اندازه‌گیری الکترولیت‌ها نیز نباید تا قبل از سانتریفیوژ و انجام آزمایش در دمای ۸-۲ ℃ قرار گیرد.

نمونه خون جهت اندازه‌گیری ترکیباتی نظیر کاتکول آمین‌ها، آمونیاک، اسید لاکتیک، پیروات، گاسترین، هورمون پاراتیروئید، فعالیت رنین پلاسما و اسید فسفاتاز، باید پس از جمع‌آوری در سرما نگه‌داری شود.

•• **نگه‌دارنده‌ها و مهارکننده‌های متابولیک:** بعضی افزودنی‌ها می‌توانند از تغییرات غلظت مواد در نمونه با گذشت زمان جلوگیری نمایند. مواد آنتی گلیکولیتیک نظیر فلوراید می‌توانند گلوگز را در حضور سلول‌های خونی به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق (۲۲-۲۴°C) و تا ۴۸ ساعت در دمای یخچال (۲-۸°C) پایدار نگه‌دارند. به‌دلیل حساسیت اندازه‌گیری گلوگز در نوزادان و اطفال می‌توان از مواد افزودنی آنتی گلیکولیتیک استفاده نمود. هم‌چنین جهت اندازه‌گیری لاکتات باید از فلوراید سدیم یا اگزالات پتاسیم استفاده نمود.

انتقال

انتقال نمونه‌های بیولوژیک نظیر خون، ادرار و سایر مایعات بدن از محل نمونه‌گیری به آزمایشگاه جزء مهمی از چرخه‌کاری در آزمایشگاه می‌باشد. در مورد نمونه‌های خون روند انتقال ۱/۳ زمان چرخه کاری را شامل می‌شود.

*** جمع‌آوری نمونه در محل آزمایشگاه**

•• **زمان:** نمونه‌ها باید در ظروف در بسته مناسب در کوتاه‌ترین زمان ممکن به آزمایشگاه ارسال گردند. انتقال نمونه‌ها می‌بایست در شرایط دمای اتاق صورت گیرد، به‌جز نمونه‌هایی که باید با حفظ زنجیره سرد نگه‌داری و منتقل شوند. انتقال سریع نمونه از محل نمونه‌گیری به آزمایشگاه در شرایطی که دمای محل نمونه‌گیری بالاتر از ۲۲°C است از اهمیت زیادی برخوردار است.

•• **وضعیت لوله:** نمونه‌های خون باید در لوله‌های در پوش‌دار و در وضعیت قائم نگه‌داری گردند. این امر سبب تسریع فرایند انعقاد و هم‌چنین کاهش به هم خوردگی محتوی لوله می‌گردد و احتمال ایجاد همولیز را نیزکاهش می‌دهد.

•• **درپوش:** نمونه‌ها باید در طول مدت انتقال و نگه‌داری در ظروف درپوش‌دار قرار گیرند. عدم وجود درپوش باعث خطا در نتایج بعضی متغیرها به‌دلیل از دست دادن دی اکسید کربن و افزایش PH نظیر کلسیم یونیزه و اسید فسفاتاز (افزایش می‌یابند) می‌گردد.
هم‌چنین وجود درپوش خطر ایجاد آئروسل، تبخیر نمونه و آلودگی را نیز کاهش می‌دهد.

•• **همولیز:** حمل و نقل نمونه باید به آرامی صورت گیرد تا امکان آسیب به گلبول‌های قرمز را به حداقل رساند. وجود همولیز در نمونه سبب تداخل با عملکرد برخی دستگاه‌هایی می‌شود که به روش نوری پارامترها را اندازه‌گیری می‌کنند. ترکیبات زیادی در سرم و پلاسما تحت تاثیر همولیز (با منشا خارجی) قرار می‌گیرند که نمونه‌هایی از آن به شرح زیر است:

- پارامترهایی که شدیدا تحت تاثیر همولیز قرار گرفته و افزایش می‌یابند شامل: هموگلوبین پلاسما، آسپارژین امینو ترانسفراز (AST)، پتاسیم، لاکتات دهیدروژناز می‌باشند.
- پارامترهایی که به‌طور قابل توجهی تحت تاثیر همولیز قرار می‌گیرند شامل: آهن، آلانین امینو ترانسفراز (افزایش می‌یابند) و T4 (کاهش می‌یابد) هستند.
- پارامترهایی که کمتر تحت تاثیر همولیز قرار گرفته ولی امکان افزایش آن‌ها به‌دنبال همولیز وجود دارد شامل: فسفر، پروتئین توتال، آلبومین، منیزیم، کلسیم، و اسید فسفاتاز می‌باشند.

قابل ذکر است پلاسمای حاوی ۲۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر هموگلوبین، به رنگ صورتی روشن و پلاسمای حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر هموگلوبین، به رنگ قرمز است. بالا رفتن بیلی‌روبین در پلاسما ممکن است وجود هموگلوبین

را بپوشاند به‌طور مثال غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر هموگلوبین ممکن است با چشم غیر مسلح با وجود بیلی-روبین ۲۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر قابل رویت نباشد.
وجود همولیز در نمونه خون کامل ممکن است با چشم قابل رویت نباشد لذا پیشنهاد می‌گردد در مواردی که نتایج متغیر مورد اندازه‌گیری بالاتر از محدوده مرجع آن می‌باشد، نمونه مورد آزمایش از نظر وجود همولیز نیز بررسی گردد. (با سانتریفیوژ و بررسی پلاسما)

•• **مجاورت با نور**: نمونه نباید در مقابل نور خورشید قرار گیرد این امر بخصوص در مورد ترکیباتی که به نور خورشید یا اولترا ویوله بسیار حساس هستند نظیر بیلی‌روبین، ویتامین A و B6 و بتا کاروتن بسیار اهمیت دارد. ظرف حاوی این نمونه‌ها جهت محافظت از نور باید در پوششی از کاغذ آلومنییوم پیچیده شده یا درظرف شیشه‌ای قهوه‌ای نگه-داری شوند.

*** جمع‌آوری نمونه خارج از محل آزمایشگاه**

در صورتی که در مرکزی فقط نمونه‌گیری انجام گیرد، نمونه‌های خون باید حداکثر تا دو ساعت پس از نمونه‌گیری با رعایت تمهیدات لازم نظیر شرایط پایداری متغیرهای مورد آزمایش و رعایت اصول ایمنی، در دمای اتاق (مگر در موارد خاص که نیاز به زنجیره سرد دارد) به آزمایشگاه منتقل شوند. در صورتی که نتوان در محدوده زمانی فوق، نمونه خون را ارسال نمود باید پس از جداسازی سرم و پلاسما، آن را دردمای ۸°C-۲ نگه‌داری و با رعایت پایداری نمونه به آزمایشگاه ارسال کرد.

*** دریافت نمونه**

نمونه خون پس از دریافت و کامل شدن مرحله لخته، جهت سانتریفیوژ آماده می‌گردد. در صورتی که خون در لوله فعال‌کننده لخته جمع‌آوری شده باشد در طی مدت ۳۰-۵ دقیقه پس از نمونه‌گیری می‌تواند سانتریفیوژ گردد. نمونه در لوله حاوی ماده ضد انعقاد سریعا قابل سانتریفیوژ می‌باشد.
جهت اندازه‌گیری بعضی متغیرها در خون نظیر سرب، سیکلوسپورین و هموگلوبین گلیکوزیله، خون کامل مورد استفاده قرار می‌گیرد. ولی اگر نمونه اشتباها سانتریفیوژ شود مشکلی ایجاد نشده و می‌توان آن را با همان شرایط به بخش مربوطه ارسال نمود.
نمونه‌هایی که باید در شرایط سرما نگه‌داری شوند (۸°C-۲) تا آماده شدن جهت سانتریفیوژ باید در این درجه حرارت باقی بمانند. سانتریفیوژ یخچال‌دار در این خصوص پیشنهاد می‌گردد.

*** معیارهای رد نمونه خون**

•• مشخصات ناکافی از بیمار یا نوع آزمایش (نظیر عدم وجود برچسب یا برچسب با اطلاعات ناقص)
•• حجم ناکافی
•• نشت نمونه به خارج از ظرف
•• استفاده از لوله نامناسب جمع‌آوری نمونه
•• ضد انعقاد نامناسب (مثلا فلوراید سدیم در اندازه‌گیری اوره با روش اوره‌آز تداخل می‌کند)
•• ترتیب نادرست جمع‌آوری نمونه در صورتی که در طی یک بار نمونه‌گیری از لوله‌های متعدد خلاء استفاده شود.
•• وجود همولیز یا لیپمی
•• نگه‌داری و انتقال نمونه در دمای نامناسب
•• وجود لخته در نمونه‌های جمع‌آوری شده با ماده ضد انعقاد

●● عدم تطابق برگه درخواست آزمایش با نوع نمونه و مشخصات آن

● مرحله سانتریفیوژ

همان‌طور که ذکر شد استفاده از اپلیکاتور چوبی یا پلاستیکی جهت جداسازی لخته از دیواره لوله پیشنهاد نمی-گردد. در صورت استفاده باید احتیاط لازم برای جلوگیری از ایجاد همولیز و تولید آئروسل صورت گیرد. هم‌چنین باید در تمام مراحل جداسازی نمونه، رعایت اصول ایمنی و استفاده از وسایل حفاظت فردی صورت گیرد. قابل ذکر است که درب لوله‌ها در طی سانتریفیوژ حتما باید بسته باشد.

امروزه با تنوع سانتریفیوژها از نظر قسمت گردان (Rotor)، سر (Head)، شعاع موثر و قطر داخلی دیگر از اصطلاح (Round Per Minute) استفاده نمی‌شود و نیروی نسبی سانتریفیوژ (Relative Centrifugal Force) یا RCF جایگزین آن شده است.

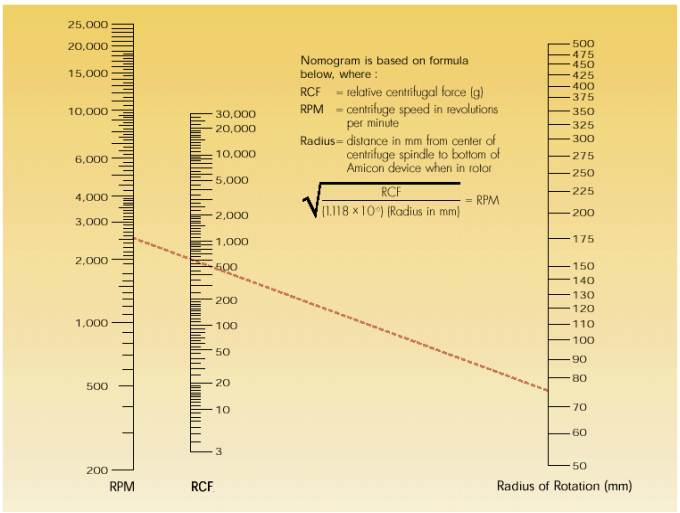
$RCF= 1.118\times10^{-5}\times r\times(RPM)^2$

r : شعاع گردان (سانتی متر)

شعاع موثر بیشترین فاصله افقی از محور گردان تا انتهای مایع موجود در لوله می‌باشد.

RPM : سرعت گردان (تعداد دور در دقیقه)

می‌توان بـرای محاسبه نیروی نسبی سانتریفیوژ به‌جای استفاده از فرمول بالا با استفاده از نمودار ۱-۳ سانتریفیوژ با توجه به شعاع و میزان دور سانتریفیوژ، نیروی نسبی سانتریفیوژ را به‌دست آورد.



نمودار ۱-۳: نموگرام تعیین نیروی نسبی سانتریفیوژ به کمک شعاع و میزان دور (PPM)

برای مطالعه بیشتر به دستورالعمل فنی سانتریفیوژ (فصل دهم – جلد دوم) مراجعه شود.

قـابـل ذکـر است جهت برخی فاکتورها که به دما حساس هستند، باید از سانتریفیوژهایی‌کـه دمای آن‌ها قـابل کنترل است استفاده نمـود. بـه‌طور مثال تـرکیباتی نظیر ACTH و cAMP به گرما حساس هستند و انتقال و سانتریفیوز آن‌ها نیز باید در دمای ۴°C صورت گیرد.

نکته: در صورتی‌که اندازه‌گیری پتاسیم هم به همراه ترکیباتی که حساس به دما هستند درخواست شده باشد باید توجه نمود که نمونه مذکور سریعا از سانتریفیوژ خارج شود (دمای پایین‌تر از ۱۵ ℃ سبب افزایش کاذب پتاسیم پس از ۲ ساعت می-گردد). لازم به ذکر است جهت اندازه‌گیری پتاسیم نمونه نباید بیش از یک‌بار سانتریفیوژ گردد.

*** زمان مورد نیاز جهت سانتریفیوژ نمونه**

- **تهیه سـرم و پلاسما:** نمونه در ظـرف درپوش‌دار بـایـد بـه مـدت ۱۵-۱۰دقیقه در ۱۲۰۰g-۱۰۰۰ سانتریفیوژ شود. در صـورتـی‌کـه آزمـایش تا ۴ ساعـت بعـد از جداسازی سرم انجام نگیرد، سرم یا پلاسما باید در دمای ۶°C-۴ نگه‌داری گردد.
- **تهیه پلاسما جهت آزمون‌های انعقادی:** نمونه در ظرف درپوش‌دار باید به مدت ۱۵دقیقه در ۱۵۰۰g سانتریفیوژ گردد.
-

● مرحله پس از سانتریفیوژ

- **نگه‌داری نمونه**

پلاسما و سرم حداکثر تا ۸ ساعت پس از جداسازی در دمای اتاق قابل نگه‌داری است. در صورتی‌که سنجش مورد نظر تا ۸ ساعت صورت نگیرد نمونه باید در یخچال نگه‌داری گردد.

درصورتی‌که امکان انجام آزمایش تا ۴۸ ساعت مقدور نباشد یا در صورت نیاز به نگه‌داری طولانی‌تر، سرم یا پلاسما باید در دمای ۲۰°C- نگه‌داری شود.

نکته: باید از آب شدن و یخ زدن مکرر نمونه‌های فریز شده جدا پرهیز گردد، زیرا این امر سبب از بین رفتن بعضی ترکیبات در سرم یا پلاسما می‌شود. استفاده از فریزرهای بدون برفک نیز جهت نگه‌داری نمونه پیشنهاد نمی‌گردد.

در صورت استفاده از مواد آنتی گلیگولیتیک (نظیر فلوراید) گلوگز پلاسما تا ۲۴ ساعت در دمای ۲۵°C و تا ۴۸ ساعت در دمای ۸°C-۲ پایدار می‌ماند. (حتی در صورت عدم جداسازی پلاسما از سلول‌ها) قابل ذکر است در صورتی‌که گلبول‌های قرمز، پلاکت و گلبول‌های سفید نمونه بالاتر از حد طبیعی باشند، اثر گلیکولیتیک این مواد کاهش می‌یابد. به‌دلیل مشکل بودن مهار گلیکولیز در نوزادان، باید پلاسما در اسرع وقت از سلول‌ها جدا گردد.

- در صورت استفاده از لوله‌های جمع‌آوری خلاء دارای ژل جداکننده همراه با افزودنی یا فعال کننده لخته، باید ملاحظات زیر صورت گیرد:

•• به محض جمع‌آوری خون جهت سرعت بخشیدن، تکمیل عمل لخته شدن و روند ضد انعقاد، لوله‌ها باید۱۰-۵ بار تکان داده شوند.

•• نیروی نسبی سانتریفیوژ و زمان لازم جهت جداسازی سرم یا پلاسما بسته به کارخانه سازنده ممکن است متفاوت باشد.

•• به‌طور کلی می‌توان سرم را در لوله‌های محتوی ژل تا ۴۸ ساعت در دمای ۴°C نگه‌داری نمود، ولی باید قوام ژل به‌طور چشمی نیز بررسی گردد.

تداخلات:

از لوله‌های جمع‌آوری خون حاوی ژل جداکننده جهت اندازه‌گیری میزان پروژسترون، داروهای سه حلقه‌ای ضدافسردگی، اندازه‌گیری سطح دارویی و آزمون‌های ایمونوهماتولوژی (بانک خون) نباید استفاده شود.

اسمیر خون محیطی

تهیه گستره خون محیطی باید توسط کارکنان آموزش دیده صورت گیرد. تهیه گستره با استفاده از نمونه تهیه شده از نوک انگشت، پاشنه پا یا نمونه همراه با ماده ضد انعقاد EDTA صورت می‌گیرد.

در صورت استفاده از نمونه همراه با ماده ضد انعقاد، باید گسترش خون محیطی حداکثر تا یک ساعت پس از نمونه گیری تهیه گردد.

● گسترش ضخیم

۱- بند اول انگشت سوم یا چهارم در بزرگسالان و یا پاشنه پا در نوزادان (مراجعه به نمونه‌گیری مویرگی) ضد عفونی شده و با لانست یک‌بار مصرف موضع سوراخ می‌گردد.

۲- یک یا دو قطره خون را با مرکز لام مماس می‌کنیم، باید توجه شود که لام با پوست تماس پیدا نکند.

۳- با گوشه یک لام دیگر یا اپلیکاتور قطره خون را به‌طور یکنواخت پخش کرده تا دایره‌ای به قطر حدود ۱سانتی‌متر ایجاد شود. گسترش باید به سرعت و با ضخامت یکنواخت تهیه گردد.

۴- لام را در وضعیت افقی قرار داده تا در حرارت محیط (۲۵°C) خشک شود. برای تسریع در عمل خشک شدن نباید از شعله یا منبع دیگر حرارتی استفاده نمود.

نکته:

●● ضخامت گسترش باید به گونه‌ای باشد که نوشته‌های روزنامه از زیر آن به سختی خوانده شود.

●● گسترش ضخیم نباید به‌وسیله مواد تثبیت‌کننده ثابت گردد.

●● گسترش ضخیم ممکن است از بافی کوت نیز تهیه گردد (با استفاده از نمونه خون در ماده ضد انعقاد)

● گسترش نازک

۱- یک قطره خون (حدود ۰/۰۵ میلی‌لیتر) به فاصله حدود ۲ سانتی‌متر از انتهای لام قرار داده شود. باید توجه شود که لام با پوست دست بیمار تماس پیدا نکند.

۲- لام بر روی سطح افقی و صاف قرار داده می‌شود.

۳- با یک لام تمیز دیگر (ترجیحا لام صیقلی) با زاویه ۴۵°C-۴۰ با حرکت سریع بر روی قطره خون موجود بر روی لام اول کشیده شود (نظیر تهیه گسترش خون در آزمون CBC).

۴- گسترش باید سریعا در حرارت محیط خشک شود.

۵- گسترش خشک شده باید در محلول متانول به مدت چند ثانیه تثبیت گردد.

۶- گسترش نازک باید به گونه‌ای تهیه شود که در یک انتها ضخیم و در انتهای دیگر به حدی نازک باشد تا گلبول-های قرمز با هم همپوشانی نداشته باشند.

نکته:

●● باید از لام شیشه‌ای تمیز، بدون گرد و غبار و عاری از چربی استفاده نمود. علت ایجاد ناهمواری و یا حفراتی در گسترش چرب بودن لام یا کثیف بودن یا ناهموار بودن لبه لام دوم می‌باشد.

●● هر دو گسترش نیز می‌تواند بر روی یک لام تهیه گردد، در این‌صورت باید فضایی بین دو گسترش وجود داشته باشد به-طوری که بتوان گسترش نازک را بدون آن‌که گسترش ضخیم را متاثر سازد تثبیت نمود.

●● مشخصات بیمار باید باید با مداد سربی یا ماژیک غیر قابل شست‌وشو در ناحیه ضخیم گسترس نازک نوشته شود.

●● برای تسریع در عمل خشک شدن می‌توان از پنکه استفاده نمود (نباید از شعله یا منابع دیگر حرارتی استفاده شود).

●● در مناطقی که رطوبت بالا است استفاده از گرمخانه ۲۵ ℃ جهت خشک نمودن لام‌ها پیشنهاد می‌گردد.

ادرار

نمونه ادرار برای بررسی‌های شیمیایی، سلول‌شناسی و میکروب‌شناسی مورد استفاده قرار می‌گیرد. نحوه نمونه‌گیری و ظروف جمع‌آوری ادرار از عوامل مهم در کیفیت نمونه می‌باشد.

نمونه ادرار باید در ظرف تمیز دهان گشاد با قطر حداقل ۱۰سانتی‌متر، با اندازه مناسب و غیر قابل نشت، جمع‌آوری گردد. بهتر است ظرف جمع‌آوری ادرار یک‌بار مصرف بوده و درغیر این‌صورت عاری از هرگونه آلودگی با مواد شوینده باشد. قابل ذکر است که نمونه ادرار نباید به مدفوع آلوده باشد.

جهت کشت ادرار ظرف نمونه باید حتما استریل باشد. برای نمونه‌گیری از نوزادان و اطفال باید از کیسه‌های ادراری استفاده شود.

جهت بررسی‌های معمول و میکروبیولوژیک نمونه ادرار باید حداکثر تا دو ساعت پس از جمع‌آوری (در دمای اتاق) مورد بررسی قرار گیرد. پس از این مدت ترکیبات شیمیایی ادرار تغییر کرده و عناصر تشکیل دهنده آن شروع به تخریب می‌کنند. سیلندرها، گلبول‌های قرمز و گلبول‌های سفید در نمونه‌های با وزن مخصوص پایین و PH قلیایی بسیار مستعد لیز هستند.

هنگامی که ارزیابی سلولی سدیمان ادراری مدنظر است باید مراحل آماده‌سازی ادرار هرچه سریع‌تر صورت گیرد. جهت تهیه رسوب ادرار باید نمونه در ظروف درپوش‌دار به مدت ۵ دقیقه در ۴۰۰g سانتریفیوژ گردد.

در بررسی‌های میکروبیولوژیک در صورتی‌که نتوان نمونه را به سرعت به آزمایشگاه منتقل نمود و آزمایش کرد می‌توان آن را به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۸°C-۲ نگه‌داری کرده و یا می‌توان از نگه‌دارنده‌های باکتریواستاتیک نیز استفاده نمود.

ظرف محتوی نمونه باید به‌درستی برچسب‌گذاری شود، اطلاعات مورد نیاز شامل: نام بیمار، زمان نمونه‌گیری، نام نگه‌دارنده، در موارد خاص ذکر نوع نمونه (کاتتر .....) می‌باشد. هم‌چنین در صورتی‌که نمونه از محل دیگری ارسال گردد باید نحوه نگه‌داری و زمان دریافت نیز ذکر گردد.

حداقل حجم مورد نیاز جهت بررسی‌های معمول کمی و کیفی ادرار به‌طور متوسط ۱۲ میلی‌لیتر است، البته در اطفال و نوزادان ممکن است حجم کمتر نیز مورد بررسی قرار گیرد، ولی باید حتما در برگه گزارش ذکر گردد.

- **انواع مختلف جمع‌آوری ادرار و موارد استفاده آن**

۱- ادرار اتفاقی جهت بررسی شیمیایی کیفی و نیمه کمی

۲- اولین ادرار صبحگاهی (ادرار ۸ ساعته) جهت بررسی اجزای سلولی، سیلندر و کست

۳- دومین ادرار صبحگاهی (۷-۱۰صبح) جهت بررسی‌های کمی

۴- ادرار با زمان مشخص مثلا ادرار ۲۴ ساعته جهت بررسی‌های کمی

۵- ادرار تمیز (ادرار میانی، کاتتر و سوپراپوبیک)

*** ادرار اتفاقی**

این نمونه جهت آزمون غربالگری روزمره مورد استفاده قرار می‌گیرد و در هر موقع از روز قابل جمع‌آوری می‌باشد، ولی زمان نمونه‌گیری باید روی ظرف درج گردد. بهتر است قبل از جمع‌آوری ادرار فرد چند ساعت ادرار خود را تخلیه نکرده باشد. برای این منظور اولین ادرار صبحگاهی به‌دلیل غلظت مناسب و PH پایین مناسب‌تر است.

*** ادرار صبح‌گاهی (ادرار ۸ ساعته)**

این نمونه معمولا در اول صبح پس از بیدار شدن فرد جمع‌آوری می‌گردد.

این نمونه جهت بررسی پروتئین‌اوری اورتواستاتیک مناسب است. ابتدا شب قبل از خواب ادرار تخلیه شده و نمونه صبح پس از بیدار شدن فرد جمع‌آوری می‌گردد. در صورت تخلیه ادرار در طول شب، باید در ظرف جمع‌آوری نمونه ریخته شود.

*** ادرار زمان‌دار**

این نمونه در یک زمان مشخص در طول شبانه روز تهیه می‌گردد، مثلا نمونه ناشتا، دو ساعت پس از غذا یا بلافاصله پس از ماساژ پروستات

*** ادرار ۲۴ ساعته**

بـه‌دلیـل تغییرات دوره‌ای تـرشـح مـواد در ادرار، در بـعضـی مـواقع نیـاز است که ادرار ۲۴ ساعته جمع‌آوری گردد. به‌عنوان نمونه می‌توان از کاتکول آمین‌ها، ۱۷هیدروکسی استروئید و الکترولیت‌ها نام برد که پایین‌ترین غلظت آن‌ها در صبح و بالاترین غلظت این ترکیبات در ظهر یا کمی پس از آن می‌باشد.

•• **جمع آوری نمونه:** ظرف نمونه باید پلاستیکی و دهان گشاد به گنجایش تقریبی ۳ لیتر باشد.

جهت جمع‌آوری نمونه ادرار ۲۴ ساعته ابتدا اولین ادرار صبحگاهی دور ریخته شده و در طی ۲۴ ساعت بعدی ادرار در ظرف نمونه‌گیری جمع‌آوری می‌شود به‌طوری که آخرین نمونه جمع‌آوری شده، اولین نمونه صبحگاهی روز بعد (در همان ساعت اولین نمونه تخلیه شده روز قبل) باشد.

بر روی برچسب روی ظرف محتوی نمونه علاوه بر نام و نام خانوادگی باید تاریخ، ساعت شروع و پایان نمونه‌گیری نیز یاداشت گردد و در صورت استفاده از ماده نگه‌دارنده درج نام ماده نیز ضروری است.

در طول مدت جمع‌آوری، ظرف نمونه باید در یخچال یا درون یخ نگه‌داری شود.

ممکن است جهت ادرار ۲۴ ساعته از مواد نگه‌دارنده استفاده گردد که با توجه به خطر زیستی این مواد، باید هشدارهای لازم به بیمار داده شود.

*** ادرار تمیز**

جهت بررسی‌های باکتری‌شناسی از نمونه ادرار تمیز استفاده می‌شود.

•• **نحوه جمع‌آوری نمونه**

بیمار ابتدا دست‌های خود را با آب و صابون شسته و سپس ناحیه تناسلی خود را با پنبه آغشته به آب و صابون تمیز می‌نماید، بخش اول ادرار را دور ریخته و بخش میانی ادرار را با رعایت شرایط استریل در درون ظرف جمع‌آوری ادرار می‌ریزد و سپس بقیه ادرار را دور می‌ریزد.

•• ادرار تهیه شـــده تـوسـط کـاتـتـر و فـوق عـانـه (سوپرا پوبیک) نیز از روش‌هایی هستند که جهت جمع‌آوری ادرار استریل در مواقع خاص و با در خواست پزشک تهیه می‌شوند.

•• جهت نمونه‌گیری از نوزادان و اطفال باید از کیسه جمع‌آوری ادرار استفاده نمود. در صورتی‌که بیمار در خواست کشت ادرار نیز داشته باشد، باید نواحی شرمگاهی و پرینه‌آل قبل از وصل کردن کیسه ادرار بـا آب و صابـون شسته شود. قابل ذکر است که کیسه ادرار باید هر ۱۵ دقیقه کنترل شده و پس از جمع‌آوری، ادرار باید در ظرف دیگری نگه‌داری شود.

• **مواد نگه‌دارنده ادرار**

مواد نگه‌دارنده جهت نگه‌داری ادرار بیش از ۲ ساعت، بررسی ترکیبات ناپایدار در ادرار و پایداری نمونه جهت مطالعات میکروبیولوژیک کاربرد دارد.

نگه‌دارنده‌های رایج اسید استیک، اسید بوریک و اسید کلریدریک ۶ نرمال می‌باشند. این ترکیبات توکسیک بوده و دارای خطر زیستی می‌باشند. هم‌چنین به‌دلیل امکان پاشیده شدن ادرار به هنگام تخلیه در ظرف، بهتر است ابتدا نمونه در ظرف دیگری جمع‌آوری شده و سپس به ظرف اصلی حاوی ماده نگه‌دارنده منتقل گردد.

- **نگه‌داری و انتقال نمونه**
- جهت انتقال نمونه باید درب ظرف کاملا محکم باشد تا امکان نشت نمونه به خارج از ظرف و محیط اطراف به حداقل برسد (در صورت امکان جهت انتقال می‌توان ظرف نمونه را درون ظرفی دیگری قرارداد).
- نمونه ادرار باید در سریع‌ترین زمان ممکن به آزمایشگاه منتقل شده و حداکثر در ظرف ۲ ساعت در دمای اتاق بررسی گردد. در غیر این‌صورت باید نمونه پس از جمع‌آوری در یخچال نگه‌داری شود (دمای ۸°C-۲).
- در بررسی‌های میکروبیولوژیک در صورتی‌که نتوان نمونه را به آزمایشگاه منتقل نمود و مورد بررسی قرارداد تمهیدات زیر باید صورت گیرد:
- •• نمونه را می‌توان به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۸°C-۲ تا قبل از کشت نگه‌داری نمود.
- •• می‌توان قسمتی از نمونه ادرار را جهت بررسی‌های بیوشیمیایی در ظرف دیگری که حاوی نگه-دارنده باکتریو استاتیک است، نگه‌داری نمود.

مدفوع

- مدفوع نمونه مناسبی جهت تشخیص عوامل پاتوژن مولد اسهال باکتریایی، ویروسی و انگلی است. نمونه-گیری در زمان مناسب (عوامل ویروسی تا ۴۸ ساعت و عوامل باکتریایی تا ۴ روز از زمان شروع اسهال)، نحوه انتقال نمونه و شرایط بیمار در هنگام نمونه‌گیری از عواملی هستند که رعایت آن‌ها در شناسایی عامل پاتوژن بسیار کمک‌کننده است. جهت جمع‌آوری نمونه مدفوع باید مواردی را در نظر داشت که به برخی از آن‌ها در زیر اشاره می‌گردد:
- •• بیمار نباید از ۱۵ روز قبل از نمونه‌گیری آنتی‌بیوتیک (نظیر تتراسایکلین و سولفانامید)، داروهای ضد تک‌تاخته، بیسموت، سولفات باریم، ترکیبات کائولین، روغن کرچک، هیدروکسید منیزیم یا هرگونه داروی ملین مصرف کرده باشد.
- •• تعداد دفعات نمونه‌گیری بر اساس درخواست پزشک می‌باشد.
- •• در صورت مشکوک بودن به عوامل باکتریایی سه نمونه در فاصله سه روز و در خصوص عوامل انگلی ۳ نمونه که در طول ۱۰ روز جمع‌آوری شده مناسب است.
- •• نباید در یک روز بیش از یک نوبت نمونه از بیمار گرفته شود.
- •• نمونه‌گیری در بیمارانی که بیش از سه روز بستری شده‌اند توصیه نمی‌شود.
- •• در نوزادان و اطفال می‌توان از سواپ رکتال در محیط انتقالی استفاده نمود ولی این کار معمولا برای تشخیص ویروس‌ها و عوامل انگلی پیشنهاد نمی‌شود.

• نمونه‌گیری جهت عوامل باکتریایی مولد اسهال

*** نمونه مدفوع:** حداقل ۵ گرم مدفوع باید در ظرف در پیچ‌دار تمیز، عاری از مواد ضدعفونی‌کننده و یا شوینده جمع‌آوری گردد.

*** سواپ مقعدی:** سواپ را با فروبردن در محیط انتقالی سترون، مرطوب کرده به اندازه ۲-۳ سانتی‌متر در داخل اسفنگتر رکتوم فرو برده و بچرخانید. سواب را بیرون کشیده پس از اطمینان از آغشتگی به مدفوع، سریعا به داخل محیط انتقال (کری بلر) فرو برید. سپس لوله‌های انتقال را در یخچال یا یخدان قرار دهید.

در موارد اسهال ناشی از باکتری‌های مهاجم مانند شیگلا، ساییدن سواپ به مخاط انتهایی روده جهت جمع‌آوری نمونه بسیار مهم است.

* **سواپ مدفوع:** در صورت لزوم به نگه‌داری نمونه مدفوع بیش از ۲ ساعت، مقدار اندکی از مدفوع و هرگونه بلغم یا تکه‌های مخاط پوششی روده را با فروکردن سواپ سر پنبه‌ای یا سر پلی‌استری به‌درون مدفوع سریعا به لوله حاوی محیط انتقالی تلقیح کنید و در یخچال یا یخدان قرار دهید.

- **محیط‌های انتقالی**

•• **کری بلر:** این محیط برای انتقال بسیاری از عوامل بیماری‌زا کاربرد دارد. این محیط نیمه جامد بوده، حمل و نقل آن آسان و پس از تهیه تا یکسال در دمای اتاق قابل نگه‌داری است (به شرطی که حجم آن کاهش نیافته، علایم آلودگی و تغییر رنگ در آن مشاهده نگردد).

•• **آب پپتونه قلیایی (Alkalane Peptone Water=APW):** این محیط را می‌توان را برای انتقال ویبریو استفاده نمود ولی این محیط نسبت به کری بلر برتری ندارد و فقط در صورت عدم دسترسی به محیط کری بلر باید مورد استفاده قرار گیرد (در صورتی که کشت بیش از ۶ ساعت از زمان نمونه‌گیری به تعویق بیافتد نباید از این محیط استفاده گردد). محیط فوق در دمای ۴°C تا ۶ ماه قابل نگه‌داری است.

•• **سالین گلیسرول بافره (Buffered Glycerol Saline=BGS):** این محیط برای شیگلا مورد استفاده قرار می‌گیرد و برای انتقال ویبریو مناسب نمی‌باشد. این محیط مایع بوده، لذا در حمل آن باید دقت شود. هم‌چنین تا ۱ ماه پس از تهیه قابل استفاده است.

- **نگه‌داری:**

•• نمونه‌های مدفوع حداکثر تا ۲ ساعت در یخچال قابل نگه‌داری است. نمونه‌هایی را که نمی‌توان به فاصله ۲ ساعت از نمونه‌گیری کشت داد، باید در محیط انتقالی قرار داده و سریعا در یخچال نگه‌داری نمود.

•• محیط انتقالی حاوی سواپ مدفوع یا مقعد را می‌توان حداکثر ۷۲-۴۸ ساعت در دمای ۴°C نگه‌داری کرد. در غیر این‌صورت این محیط می‌بایست ترجیحا در دمای (۷۰°C-) و یا در صورت عدم دسترسی، در دمای (۲۰°C-) قرار داد (یا حداقل در فریزرهای خانگی نگه‌داری شود).

•• نمونه‌های مدفوع که از بیماران مبتلا به وبا گرفته می‌شود و در محیط انتقالی قرار می‌گیرد نیازی به نگه‌داری در دمای یخچال ندارند، مگر آن که نمونه‌ها در معرض دمای بالا (بیش از ۴۰°C) قرار داشته باشند.

- **نمونه‌گیری جهت عوامل انگلی**

- **جمع‌آوری نمونه**

•• برای انجام این آزمایش حداقل ۵ گرم مدفوع در ظرف دهان گشاد در پیچ‌دار تمیز و خشک مورد نیاز است (در صورت آبکی بودن مدفوع معادل ۵ سی‌سی).

•• در صورتی که نتوان فاصله زمانی مناسب بین جمع‌آوری نمونه تا انجام آزمایش را رعایت نمود باید نمونه در ماده نگه‌دارنده جمع‌آوری شود (یک قسمت مدفوع و سه قسمت ماده نگه‌دارنده فرمالین ۱۰٪).

•• باید توجه داشت که بررسی خصوصیات ظاهری نمونه در نمونه تازه صورت می گیرد.

•• نمونه مدفوع نباید با گرد و خاک، آب و ادرار آلوده گردد، زیرا آلودگی اتفاقی با خاک و آب ممکن است باعث آلودگی نمونه با ارگانیسم‌های دارای زندگی آزاد شود. ادرار نیز سبب تخریب تروفوزوئیت‌ها می‌شود. ترجیحا نباید نمونه از کاسه توالت جمع‌آوری گردد.

•• چون مرحله تروفوزوئیت تک یاخته خیلی زود از بین می‌رود، ثبت تاریخ و ساعت نمونه‌گیری ضروری است.

➢ **نگه‌داری**

•• نمونه باید هر چه سریع‌تر به آزمایشگاه ارسال گردد. در صورت تاخیر بیش از ۲ ساعت، نمونه در محل خنک (ترجیحا در یخچال) نگه‌داری شود.

توجه: جهت آزمایش‌های شیمیایی (مانند خون در مدفوع) به ۵۰ گرم مدفوع نیاز می‌باشد.

مایع مغزی نخاعی Cerebro-Spinal Fluid (CSF)

جمع‌آوری مایع مغزی نخاعی توسط پزشک و به روش پونکسیون نخاعی (Lumber Puncture=LP) و به صورت کاملا استریل انجام می‌گیرد.

معمولا مایع جهت آزمون‌های شیمیایی، میکربیولوژیک و آنالیز سلولی در ۳ تا ۴ لوله جمع آوری می‌شود.

جهت آزمون‌های باکتری‌شناسی نمونه باید در لوله درپوش‌دار و استریل جمع‌آوری گردد. لوله‌ها بر اساس ترتیب جمع‌آوری برچسب‌گذاری می‌شوند (لوله شماره ۱ جهت آزمایش‌های بیوشیمیایی، لوله شماره ۲ جهت آزمایش‌های میکروب‌شناسی، لوله شماره ۳ جهت بررسی سلولی).

جهت جمع‌آوری نمونه نیازی به ماده ضد انعقاد نمی‌باشد زیرا مایع مغزی نخاعی لخته نمی‌شود، مگر آن که نمونه-گیری همراه با صدمه باشد (نمونه‌گیری تروماتیک).

الزامات مورد نیاز جهت تهیه نمونه مایع مغزی نخاعی در جدول ۱-۳ بیان شده است.

جدول ۱-۳: الزامات مورد نیاز جهت تهیه نمونه مایع مغزی – نخاعی

نوع بررسی	ضد انعقاد	حجم مورد نیاز	ملاحظات
آزمون بیوشیمیایی (پروتئین، قند...)	-	۳-۵	لوله شماره ۱ در صورت نمونه گیری تروماتیک شمارش سلولی نیز از لوله شماره ۱صورت می‌گیرد.
کشت و رنگ‌آمیزی گرم	-	۳-۵	لوله شماره ۲
شمارش سلولی و تشخیص افتراقی	-	۳-۵	لوله شماره ۳یا ۴
سایر بررسی‌ها (سیتولوژی)	-	۳-۵	لوله شماره ۴

نمونه باید در اسرع وقت به آزمایشگاه ارسال گردد. دژنراسیون سلولی در طی یک ساعت اتفاق می‌افتد، لذا حداکثر زمان گردش کاری نباید بیش از ۱ ساعت به طول انجامد. نقل و انتقال نمونه در دمای اتاق صورت می‌گیرد. جهت آزمون‌های باکتریولوژیک نباید نمونه در یخچال نگه‌داری شود. از قرار دادن نمونه در معرض نور خورشید و گرما باید خودداری نمود. در صورت نیاز به حمل نمونه تا مسافت دور، استفاده از یخدان ضروری است. در این صورت نمونه تا ۳ ساعت پایدار می‌باشد. جهت نگه‌داری طولانی مدت، نمونه ابتدا سانتریفیوژ شده پس از جداسازی سلول‌ها، مایع-رویی در ظرف درپوش‌دار شیشه‌ای یا پلی‌پروپیلن در دمای (-۷۰°C) قابل نگه‌داری است.

جهت مطالعات سیتولوژیک رسوب CSF باید بلافاصله پس از جمع‌آوری به‌وسیله سانتریفیوژ مخصوص (۲۰ دقیقه در ۱۸۰g) تهیه و به آزمایشگاه ارسال شود.

مایع سروز

مایعات سروزی نظیر مایع جنب و صفاقی را می‌توان در یک لوله جمع‌آوری و سپس در محل نمونه‌گیری یا آزمایشگاه به لوله‌های مختلف و با حجم‌های کمتر تقسیم نمود. قابل ذکر است که نمونه قبل از تقسیم و شمارش سلولی باید کاملا مخلوط گردد. EDTA ضد انعقاد پیشنهادی در خصوص شمارش و افتراق سلولی است.

جهت شمارش و افتراق سلولی، نمونه‌ها تا ۲۴ ساعت در دمای ۶°C-۲ قابل نگه‌داری هستند. در خصوص بررسی-های میکروبی نمونه باید در ظرف استریل جمع‌آوری گردد.

جهت بررسی سیتولوژی ممکن است نمونه در حجم‌های متفاوت به آزمایشگاه ارسال گردد (۱۰۰-۱۵میلی-لیتر) ولی حجم پیشنهادی ۵۰ میلی‌لیتر است و نیاز به استفاده از لوله‌های استریل و ماده ضد انعقاد نیز نمی‌باشد. البته می‌توان از هپارین و EDTA هم استفاده کرد.

الزامات مورد نیاز جهت تهیه و آزمایش بر روی مایع سروز در جدول ۲-۳ بیان شده است.

جدول ۲-۳: الزامات مورد نیاز جهت تهیه و آزمایش بر روی مایع سروز

نوع بررسی	ضد انعقاد	حجم مورد نیاز (میلی لیتر)
اندازه‌گیری پروتئین توتال، لاکتات دهیدروژناز، گلوکز و آمیلاز	هپارین یا بدون ضد انعقاد	۵-۸
کشت و رنگ‌آمیزی گرم	سدیم پلی سولفانات (SPS) یا بدون ضد انعقاد یا ضدانعقاد بدون اثر باکتریوسیدی و باکتریواستاتیکی	۸-۱۰
شمارش سلولی (گلبول قرمز وسفید) و تشخیص افتراقی	EDTA	۸-۱۰
کشت باکتری اسید فست	SPS یا بدون ضد انعقاد یا ضد انعقاد بدون اثر باکتریوسیدی و باکتریواستاتیکی	۱۵-۵۰
رنگ آمیزی PAP- بلوک سلولی	بدون ضدانعقاد، هپارین یا EDTA	۱۵-۵۰

مایعات سروزی باید در اسرع وقت و در دمای اتاق به آزمایشگاه منتقل شوند.

بررسی‌های سیتولوژی نیز باید هر چه سریع‌تر صورت گیرند، و در صورت نیاز می‌توان نمونه را در دمای ۴°C و بدون ماده تثبیت کننده تا چند روز نگه‌داری نمود.

مایع سینوویال

حجم نمونه جهت بررسی‌های آزمایشگاهی بسته به اندازه مفصل و نوع مایع تجمع یافته در مفصل متفاوت است. معمولا حجم ۵-۳ میلی‌لیتر ایده‌ال است. در مفاصل کوچک ممکن است این مقدار نمونه قابل تهیه نباشد، لذا حجم کمتر نیز قابل قبول است. قابل ذکر است که نمونه قبل از بررسی‌های آزمایشگاهی باید به‌خوبی مخلوط گردد. در بعضی از مراجع ذکر شده که ضد انعقاد لیتیم هپارین و EDTA به‌دلیل ایجاد کریستال در نمونه و امکان اشتباه با کریستال‌های پاتولوژیک، نباید مورد استفاده قرار گیرد. نقل و انتقال نمونه باید در دمای اتاق صورت گیرد.

الزامات مورد نیاز جهت تهیه نمونه مایع سینوویال در جدول ۳-۳ بیان شده است.

نوع بررسی	ضد انعقاد	حجم موردنیاز (میلی‌لیتر)	ملاحظات
شمارش سلولی و تشخیص افتراقی، کریستال‌ها انکلوزیون‌ها	هپارین -EDTA	۳-۵	بر روی حجم کمتر (چندین قطره) نیز قابل انجام است
گلوکز پروتئین	فلوراید یا بدون ضد انعقاد بدون ضد انعقاد	۳-۵ ۳-۵	ترجیحا ۸ ساعت ناشتایی
CH50	بدون ضد انعقاد	۳-۵	در صورت عدم انجام سریع آزمایش نمونه منجمد گردد.
C3,C4	بدون ضد انعقاد یا EDTA		نیاز به ۱ میلی‌لیتر نمونه است.
کشت	SPS، بدون ضدانعقاد یا ضد انعقاد بدون اثرباکتریوسیدی و باکتریواستاتیکی	۳-۵	نیاز به لوله استریل است.

جدول ۳-۳: الزامات مورد نیاز جهت تهیه نمونه مایع سینوویال

نمونه‌های دستگاه تنفسی

بهترین زمان جمع‌آوری نمونه در اکثر عفونت‌های تنفسی در طول ۳ روز اول ایجاد علایم بیماری می‌باشد.
نمونه‌ها بسته به محل عفونت، از قسمت فوقانی و تحتانی دستگاه تنفسی جمع‌آوری می‌شوند. عوامل بیماری‌زای دستگاه تنفسی فوقانی (ویروسی و باکتریایی) در نمونه‌های گرفته شده از قسمت نازوفارنژیال گلو و عوامل بیماری-زای دستگاه تنفسی تحتانی در نمونه خلط قابل بررسی هستند. کشت ارگانیسم‌هایی نظیر لژیونلا مشکل است لذا بهتر است که تشخیص بر اساس شناسایی آنتی‌ژن‌های جدا شده از ادرار باشد. در صورت شک به التهاب حاد اپیگلوت، نمونه‌گیری از گلو یا فارنژیال نباید صورت گیرد زیرا استفاده از این شیوه ممکن است سبب انسداد شدید تنفسی شود. معمولا التهاب اپیگلوت به‌وسیله رادیوگرافی گردن تایید می‌گردد ولی عوامل اتیولوژیک ایجاد کننده آن ممکن است از کشت خون هم جدا گردند.

● دستگاه تنفسی فوقانی

●● نمونه‌برداری از گلو و لوزه‌ها

از بیمار خواسته می‌شود تا دهان خود را باز نماید و با آبسلانگ زبان وی را به پایین فشار داده، برای مشاهده نواحی ملتهب و اگزودا از چراغ قوه استفاده می‌شود. سواپ استریل داکرونی یا آلژینات کلسیم را چندین بار بر روی نواحی ملتهب و اگزودای حلق می‌کشیم. باید توجه شودکه سواپ با سطح داخلی حفره دهانی تماس پیدا نکند. چنانچه سواب در طی ۲-۱ساعت پس از نمونه‌گیری مورد آزمایش قرار نگیرد در یک لوله استریل درپوش‌دار حاوی محیط انتقالی باکتریایی یا ویروسی قرار داده می‌شود (انتهای سواپ که با دست در تماس بوده باید شکسته شود و درپوش در جای خود قرار گیرد).
جهت تهیه گسترش مستقیم با سواپ استریل دیگری به روش ذکر شده نمونه‌گیری صورت می‌گیرد.

●● نمونه‌برداری از انتهای بینی و نازوفارنکس

به‌وسیله یک سواپ انعطاف‌پذیر استریل وارد سوراخ بینی شده و از نازوفارنکس نمونه تهیه گردد. سر بیمار باید کمی به عقب برده شود. در افراد بالغ سواپ را حدود ۵-۶ سانتی‌متر وارد بینی کرده تا مطمئن شوید که سواپ وارد ناحیه خلفی فارنکس شده است، در همان وضعیت سواب را چند ثانیه نگه‌داشته و سپس به آرامی بچرخانید. از هر سوراخ بینی دو سواپ گرفته می‌شود که یکی جهت گسترش مستقیم و دیگری جهت کشت استفاده می‌گردد.

➢ آسپیراسیون نازوفارنکس

این روش در کودکان و نوزادان از سواپ راحت‌تر و کارآمدتر است. با کاتتر سیلیکون ترشحات را آسپیره نمایید.

● دستگاه تنفسی تحتانی

➢ روش جمع‌آوری خلط

یک نمونه خلط مناسب حاوی مواد ترشحی حاصل از ریه‌ها پس از سرفه عمیق است (نمونه حاوی آب دهان، ترشحات حلق و بینی مناسب نمی‌باشد).

●● زمان نمونه‌گیری

به‌دلیل این‌که تعداد باسیل سل دفع شده در زمان‌های مختلف متفاوت می‌باشد، آزمایش یک نمونه خلط برای تشخیص کفایت نمی‌کند و حتما باید سه نمونه تهیه گردد. برای تهیه نمونه بیمار باید ناشتا باشد. در خصوص تعداد نمونه جمع‌آوری شده جهت سایر عوامل باکتریایی یک نمونه کفایت می‌کند ولی درصورت شک به‌وجود عوامل قارچی و عفونت مایکوباکتریوم سه نمونه جداگانه صبحگاهی مناسب می‌باشد.

نمونه اول: در اولین مراجعه بیمار به واحد درمانی تهیه می‌گردد و ظرف جهت نمونه‌گیری دوم نیز تحویل داده می‌شود.

نمونه دوم: خلط صبحگاهی که بیمار قبل از برخاستن از جای خود و به‌صورت ناشتا در منزل تهیه می‌نماید.

نمونه سوم: خلط صبحگاهی که همزمان با مراجعه بیمار برای تحویل نمونه دوم از بیمار گرفته می‌شود.

نمونه باید در ظرف دهان گشاد از جنس پلاستیک قابل سوختن شفاف و محکم با قطر حدود ۷-۵ سانتی‌متر جمع‌آوری گردد (نمونه داخل آن از نظر مقدار و کیفیت قابل رویت بوده و هم‌چنین به‌راحتی سوزانده و معدوم گردد). جهت جلوگیری از نشت خلط از داخل ظرف به بیرون، باید از ظرف در پیچ‌دار استفاده نمود. در صورت عدم دسترسی به ظرف پلاستیکی با مشخصات فوق می‌توان از ظروف شیشه‌ای دهان گشاد در پیچ‌دار استفاده نمود (با رعایت اصول استریلیزاسیون).

➢ نحوه نمونه‌گیری

بیمار صبح ناشتا در فضای باز ابتدا یک نفس عمیق کشیده و با سرفه‌های عمیق خلط را درون ظرف (در حالی که ظرف نزدیک لب‌های بیمار قرار دارد) تخلیه می‌کند. سپس درب آن را بسته و در کیسه نایلونی قرار می‌دهد. بهتر است حجم خلط بین ۵-۳ میلی‌لیتر باشد.

در صورتی که بیمار نتواند با سرفه کردن برای انجام آزمایش، نمونه خلط بدهد باید به روش زیر عمل شود:

بیمار روی تخت معاینه طوری بخوابد که صورت او رو به پایین بوده و سر او پایین‌تر از سینه قرار گیرد. سپس پس از دم عمیق نفس خود را نگه‌داشته با یک بازدم محکم خلط را خارج کند. این عمل باید تا تهیه نمونه کافی از خلط ادامه یابد.

- **نگه‌داری:** باید نمونه هر چه سریع‌تر به آزمایشگاه ارسال گردد. در غیر این‌صورت در محل خنک (ترجیحا در یخچال) نگه‌داری شود.

•• همه نمونه‌های تنفسی به جز خلط، باید در محیط کشت انتقالی مناسب باکتری‌ها/ ویروس‌ها منتقل گردند.

••نمونه‌های باکتریایی تا مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط و ویروس‌ها در محیط انتقالی مناسب در دمای ۸°C-۴ قابل انتقال می‌باشند.

جمع‌آوری نمونه چشم

سواپ‌ها و گسترش‌های قرنیه و ملتحمه نمونه‌های معمول جهت تشخیص کونژکتیویت حاد ناشی از عوامل باکتریایی و ویروسی می‌باشند. تمام نمونه‌های گرفته شده از ترشحات قرنیه و ملتحمه باید از نظر این‌که از چشم چپ یا راست تهیه شده، برچسب‌گذاری گردند. جهت جمع‌آوری این نمونه‌ها باید شرایط استریل رعایت گردد. قبل از نمونه‌برداری بیمار نباید دارو یا قطره‌ای استفاده کرده باشد. قابل ذکر است که نمونه‌برداری از تراشه‌های قرنیه باید توسط پزشک متخصص چشم صورت گیرد.

روش جمع‌آوری سواپ‌های ملتحمه

مراحل جمع‌آوری سواب‌های ملتحمه به شرح زیر است:

۱- پوست اطراف چشم را با یک ماده ضد عفونی‌کننده ملایم تمیز کنید.

۲- سواپ استریل آلژینات کلسیم یا نخی را در سرم استریل مرطوب کرده و به‌طور دورانی بر روی ملتحمه بمالید.

۳- سواپ را در لوله در پیچ‌دار حاوی محیط انتقالی مناسب قرار دهید.

۴- بر روی لوله مذکور علاوه بر نام بیمار، نوع نمونه و زمان جمع‌آوری نمونه نیز ذکر گردد.

۵- از سواپ ملتحمه نیز دو گسترش بر روی یک لام تهیه می‌گردد. این کار بهتر است در محل نمونه‌برداری صورت گیرد. جهت شناسایی کلامیدیا مهم است که گسترش‌ها در محل نمونه‌برداری و قبل از انتقال تهیه شود. گسترش‌ها برچسب‌گذاری شده و نباید در دمای یخچال نگه‌داری شده یا منجمد گردند.

- **نقل و انتقال نمونه**

نمونه جهت شناسایی باکتری‌های پاتوژن در دمای محیط، در محیط انتقالی مناسب انتقال داده می‌شوند.

نمونه جهت شناسایی ویروس‌های پاتوژن در دمای ۸°C-۲ در محیط انتقالی مناسب انتقال داده می‌شوند.

گسترش‌های تهیه شده در هوا خشک شده و در دمای محیط در جعبه لام منتقل می‌شوند.

تهیه نمونه جهت کشت خون

ضروری است دقت بیشتری جهت ضد عفونی‌کردن محل نمونه‌گیری صورت گیرد. ابتدا موضع با الکل ۷۰٪ تمیز شده سپس با محلول povidne–iodine ۱۰-۱٪ (یا کلرهگزیدین گلوکونات) ضد عفونی شده و پس از خشک شدن موضع مجددا جهت حذف ید و کلرهگزیدین با الکل تمیز می‌گردد. کلرهگزیدین گلوکونات جهت نوزادان دو ماهه و بزرگ‌تر و هم‌چنین بزرگسالان دارای حساسیت نسبت به ید پیشنهاد می‌گردد. به‌دنبال خون‌گیری باید خون در عرض ۱ دقیقه به محیط کشت تلقیح شود. درب شیشه‌های کشت خون نیز باید قبل از تلقیح با الکل ۷۰٪ و سپس با محلول povidne–iodine ۱۰-۱٪ (بتادین) ضدعفونی گردد.

محیط کشت تلقیح شده را چندین بار تکان داده، بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شده و در انکوباتور ۳۵°C قرار داده شود.

• حجم خون مورد نیاز

•• کـودکـان: حجم ۳-۱ میلی‌لیتر ختون کـافـی مـی‌باشد. این مقدار خون در ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت خون رقیق می‌گردد.

•• بزرگسالان: حجم خون جمع‌آوری شده به میزان ۱۰-۵ میلی‌لیتر است که در ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت خون رقیق می‌گردد.

• روش خنثی‌سازی عوامل ضد میکروبی در خون

با اضافه نمودن مهار کننده‌های شیمیایی نظیر سدیم پلی آنتول سولفانات (SPS) ۰/۰۵٪-۰/۰۲۵٪ به محیط کشت و رقیق‌سازی خون، ویژگی‌های باکتریسیدال خون و آنتی بیوتیک‌های احتمالی خنثی می‌گردد. قابل ذکر است که سدیم پلی آنتول سولفانات (SPS) فعالیت‌های ضد فاگوسیتی، ضد کمپلمانی، ضد انعقادی و ضد لیزوزمی دارد و اگر این ماده در مقادیر خیلی بالا استفاده شود، اثر مهارکنندگی در رشد میکروب‌ها خواهد داشت.

• کشت مجدد

شیشه‌های کشت خون را ظرف ۲۴-۶ ساعت (صرف نظر از وجود علایم رشد) کشت مجدد داده و سپس تا هفت روز هر روز بررسی کنید. هر نوع کدورت یا لیز گلبول‌های قرمز ممکن است نشانگر رشد میکروبی باشد و به‌طور حتم باید بلافاصله کشت مجدد انجام شود.

قابل ذکر است که ممکن است علی‌رغم عدم وجود کدورت، رشد میکروبی وجود داشته باشد، لذا ضروری است در فواصل۲۴-۶ ساعت اولیه بعد از تلقیح، راس ۴۸ ساعت و نیز در روز هفتم نیز کشت مجدد صورت گیرد.

•• قبل از انجام کشت مجدد شیشه کشت خون باید چند بار تکان داده شود.

•• جهت برداشت خون از محیط کشت، درپوش محیط کشت را با الکل و بتادین ضد عفونی کرده و حدود ۰/۵ میلی‌لیتر از نمونه را به محیط آگار انتخاب شده منتقل کنید.

نمونه‌برداری از مجاری ادراری تناسلی مردان

با دو سواپ استریل از ترشحات چرکی نمونه‌برداری کنید. یکی از سواپ‌ها جهت تهیه گسترش و دیگری جهت کشت مورد استفاده قرار می‌گیرد. در صورتی‌که ترشحی مشهود نباشد با سواپ نازک به اندازه ۳-۲ سانتی‌متر درون مجرا وارد شده و قبل از بیرون آوردن در مجرا چرخانده شود.

در صورتی‌که آزمایش با تاخیر انجام گیرد، سواپ باید در محیط انتقالی نگه‌داری شود.

نمونه‌برداری از دهانه رحم- ترشحات واژن

جهت نمونه‌گیری ابتدا سرویکس با کمک اسپیکولوم که با آب گرم مرطوب شده مشاهده می‌شود (بدون استفاده از مواد Lubricant). قبل از نمونه‌گیری باید تمامی ترشحات از دهانه خارجی رحم پاک شود. با یک سواپ استریل تا حدود ۳-۲ سانتی‌متر درون دهانه رحم وارد شده و چند ثانیه در محل چرخانده شود تا ترشحات جذب سواپ گردد سپس بدون تماس با سطح واژن سواپ باید خارج شده و در لوله درپوش‌دار استریل قرار گیرد. سواپ باید فورا در محیط کشت مناسب کشت داده شود و یا به کمک محیط انتقالی به آزمایشگاه ارسال گردد. جهت تهیه گسترش مستقیم با سواپ استریل دیگری به روش ذکر شده نمونه‌گیری صورت می‌گیرد.

تـرشحـات واژن بـا استفاده از اسپیکـولوم (بـدون استفـاده از مواد Lubricant) و سواپ استریل از فـورنیکس خـلفـی گـرفته می‌شود. نمونه با سه سوآپ گرفته می‌شود، یکی را جهت تهیه گسترش مرطوب در لوله درپوش‌دار

محتوی سرم فیزیولوژی استریل قرار داده و دو تای دیگر جهت کشت و تهیه گسترش مستقیم مورد استفاده قرار می‌گیرند.
در صورت مشکوک بودن به نایسریا نمونه پس از تهیه سریعا در دمای اتاق به آزمایشگاه ارسال می‌شود.
سواپ‌های آلژینات کلسیم و بعضی سواپ‌های پنبه‌ای مهار کننده نایسریا بوده، لذا بهتر است از سواپ داکرون یا ریون استفاده شود.

جمع‌آوری نمونه جهت ضایعات پوستی

در اکثر ضایعات پوستی تشخیص ممکن است بر اساس مشاهده ظاهری و تاریخچه‌ی بیماری بدون جمع‌آوری نمونه‌های تشخیصی صورت گیرد. در مشاهده ظاهری ضایعه، نکات مهمی از قبیل نوع ضایعه پوستی (اریتماتوس، ماکولار، پاپولار، ماکولوپاپولار، وزیکولار، بولوس، پتشیال، پورپوریک و غیره) و نحوه پراکندگی آناتومیک ضایعه (مرکزی، محیطی منتشر و غیره) باید در نظر گرفته شود. در مواردی با تشخیص نامعلوم، غیرمعمول و نادر ممکن جمع‌آوری نمونه از راش‌ها یا ضایعات پوستی نیاز باشد. در موارد راش‌های وزیکولار، نمونه‌ها جهت بررسی میکروسکوپی و کشت نمونه مستقیما از وزیکول‌ها تهیه می‌گردد. در خصوص سایر ضایعات اگزانتوماتو (ماکولار یا پاپولار) ممکن است تشخیص بیشتر بر پایه سایر روش‌ها، نظیر کشت خون و سرولوژی صورت گیرد.
در موارد مشکوک به آنتراکس پوستی یا ضایعات خیارکی ممکن است نمونه‌ها از زخم‌های پوستی و هم‌چنین نمونه برای کشت خون تهیه شود.

• روش جمع‌آوری

*** راش‌های وزیکولو - پوستولار (جهت تشخیص عفونت‌های ویروسی)**

زخم یا وزیکول تازه و رسیده را با اتانول ۷۰٪ تمیز نمایید.
وزیکول: سرنگ توبرکولین با سوزن ۲۷-۲۶ را در حالی که سر سوزن آن به سمت بالا قرار دارد، در پایه وزیکول وارد کنید.
مایع را آسپیره نموده و سریعا و با دقت به داخل ظرف حاوی ۲-۱ میلی‌لیتر محیط انتقال ویروسی تخلیه نمایید (یک‌بار سرنگ را با محیط انتقالی شست‌وشو دهید).
زخم: پوسته زخم را بالا آورده و به کمک سواپ استریل داکرونی بر روی پایه زخم بمالید (سواپ آلژینات کلسیم نباید استفاده شود). سپس سوآپ به سرعت در ظرف حاوی محیط انتقال قرار گیرد.
تهیه گسترش: پایه زخم به کمک اسکالپل یا کورت تراشیده شده و سوسپانسیونی از ضایعات در دو تا سه قطره از محیط انتقالی تهیه نمایید. از سوسپانسیون فوق دو تا سه قطره بر روی لام بگذارید. پس از خشک شدن در هوا در استون سرد فیکس نمایید.

*** نمونه کبره**

•• به وسیله لانست و فورسپس یک‌بار مصرف، کبره‌ها را از محل خودش جدا نمایید.
•• ۱۰-۵ لایه کبره را برداشته و در ظرف پلاستیکی در پیچ‌دار قرار دهید.
•• اگر مشکوک به آنتراکس جلدی هستید، مایع وزیکولی زیر محل زخم نمونه تشخیصی بهتری نسبت به تکه‌های زخم می‌باشد.

*** آسپیراسیون آبسه‌ها**

•• آسپیراسیون آبسه فقط باید توسط پزشک صورت گیرد.
•• پوست روی آبسه / خیارک بوسیله ایزو پروپیل الکل ۷۰٪ ضد عفونی شده و مایع به وسیله آسپیراسیون توسط سرنگ استریل جمع آوری می گردد.

•• نمونه را به‌طریق آسپتیک به لوله استریل حاوی محیط انتقالی منتقل کنید.

• انتقال نمونه

نمونه‌ها جهت بررسی باکتریولوژیک باید در محیط آستوارت یا آمیس و سواپ‌های مشکوک به عوامل ویروسی در محیط انتقالی ویروس منتقل گردد.

در صورتی که نتوان نمونه‌ها را تا مدت ۲ ساعت بررسی نمود، نمونه‌های باکتریایی به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط قابل نگه‌داری هستند. نمونه‌ها جهت جداسازی عوامل ویروسی در محیط انتقالی مناسب در دمای ۸°C-۴ قابل نگه‌داری بوده و در اسرع وقت باید به آزمایشگاه منتقل گردد.

نگه‌دارنده‌ها، ضد انعقادها و مواد افزودنی

مواد نگه‌دارنده جهت نمونه‌های خون، ادرار، مغز استخوان، مدفوع و مایعات بدن استفاده می‌گردند.

• ضد انعقادهای رایج جهت نمونه خون

ضد انعقادهای رایج مورد استفاده جهت نمونه خون شامل موارد زیر می‌باشند:

•• اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA)، سیترات سدیم، هپارین، سدیم پلی سولفانات (SPS)، فلوراید سدیم و اسید سیترات دکستروز (ACD) می‌باشد.

اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) که به اشکال نمک‌های سدیم و پتاسیم و لیتیم موجود است. مورد استفاده آن در بخش‌های خون‌شناسی، بیوشیمی و بانک خون می‌باشد. جهت شمارش سلول‌های خونی و تشخیص افتراقی نمک پتاسیک آن توصییه می‌گردد.

•• سیترات سدیم جهت آزمون‌های انعقادی و سرعت رسوب گلبولی کاربرد دارد.

•• هپارین به فرم نمک‌های لیتیم و سدیم در اندازه‌گیری بسیاری از پارامترهای خون و بررسی‌های ایمونولوژیک به همراه آزمون مقاومت گلبولی کاربرد دارد.

•• فلوراید سدیم جهت اندازه‌گیری گلوکز کاربرد دارد.

•• سدیم پلی سولفانات به‌عنوان ضد انعقاد جهت شیشه‌های کشت خون استفاده می‌گردد.

•• اسید سیترات دکستروز به‌عنوان ماده ضد انعقاد در کیسه‌های خون در انتقال خون کاربرد دارد.

• نگه‌دارنده‌ها در خصوص نمونه‌های ادرار و مدفوع

انواع نگه‌دارنده‌ها در خصوص نمونه‌های ادرار و مدفوع به شرح زیر می‌باشد:

•• جهت کشت ادرار و شمارش کلنی اسید بوریک مناسب می‌باشد. با استفاده از نگه‌دارنده نمونه ادرار تا ۲۴ ساعت در دمای اتاق جهت بررسی باکتریولوژیک قابل نگه‌داری است.

•• نمونه مدفوع جهت کشت عوامل باکتریایی را در صورتی که نتوان سریعا به آزمایشگاه ارسال نمود تا ۲ ساعت در دمای ۴°C قابل نگه‌داری است، در غیر این‌صورت نمونه‌ها را می‌توان در محیط‌های نگه‌دارنده و انتقالی نظیر استوارت، آمیس و کری‌بلر منتقل نمود. در بعضی مواقع می‌توان با اضافه نمودن زغال به محیط استوارت و آمیس اسیدهای چرب موجود در سواپ‌های پنبه‌ای، که بازدارنده ارگانیسم‌های سخت رشد نظیر نایسریا گونوره و بوردتلا پرتوسیس می‌باشند را جذب نمود.

•• مدفوع از نظر توکسین کلستردیوم دیفیسیل باید بدون مواد نگه‌دارنده جمع‌آوری گردد و این نمونه تا ۴۸ ساعت در دمای ۴°C قابل نگه‌داری است. در صورت تاخیر بیشتر، نمونه باید در دمای ۷۰°C- نگه‌داری گردد.

•• نگه‌دارنده مناسب جهت تخم انگل، تروفوزیت وکیست تک یاخته فرمالین ۱۰٪، پولی وینیل الکل و سدیم استات فرمالین (Sodium Acetate Formalin = SAF) است.

● مواد ضد انعقاد در بررسی‌های میکروبیولوژی

جهت جلوگیری از ایجاد لخته در نمونه‌های خون، مغز استخوان و مایع سینوویال از مواد ضد انعقاد استفاده می‌شود. باند شدن میکروارگانیسم‌ها به لخته، شناسایی آن‌ها را مشکل می‌سازد، لذا استفاده از ضد انعقاد ضروری است. انتخاب نوع و غلظت ضد انعقاد به‌دلیل اثر ضد میکروبی بعضی از آن‌ها از اهمیت زیادی برخوردار است.

•• سدیم پلی آنتول سولفات (SPS) معمول‌ترین ضد انعقاد مورد استفاده جهت نمونه‌های میکروبی می‌باشد. غلظت مورد استفاده نباید بیشتر از ۰/۰۲۵ (وزنی/ حجمی) باشد. گونه‌های نایسریا و بعضی باکتری‌های بی‌هوازی به غلظت‌های بالای سدیم پلی آنتول سولفات (SPS) حساس هستند. نسبت نمونه به ضد انعقاد سدیم پلی آنتول سولفات بسیار مهم است، لذا لازم است حجم‌های متفاوت از ضد انعقاد در لوله با سایز بزرگ (جهت نمونه بزرگسال) و کوچک (جهت نمونه اطفال) و هم‌چنین جهت مقادیر کم ارگانیسم در نمونه‌های مغز استخوان و مایع سینوویال موجود باشد.

•• هپارین دیگر ماده ضد انعقاد متداول می‌باشد و اغلب جهت کشت ویروسی و جداسازی گونه مایکوباکتریوم از خون مورد استفاده قرار می‌گیرد. البته هپارین مهارکننده رشد باکتری‌های گرم مثبت و قارچ هاست.

سیترات سدیم و EDTA جهت نمونه‌های میکروبیولوژیک نباید مورد استفاده قرار گیرد.

نگه‌داری نمونه

در صورتی‌که نتوان نمونه‌ها را در اسرع وقت پس از دریافت نمونه مورد بررسی قرار داد، باید آن‌ها را در شرایط مناسب نگه‌داری کرد. دماهای متفاوت مورد استفاده، دمای اتاق (۲۲°C)، دمای یخچال (۴°C)، دمای بدن (۳۷°C) و دمای فریزر (۲۰°C- ۷۰°C-) می‌باشند که بسته به نوع محیط انتقالی (درصورت استفاده) و عامل اتیولوژیک عفونت متفاوت است.

بعضی نمونه‌ها نظیر ادرار، مدفوع، نمونه جهت بررسی عوامل ویروسی، خلط، سواپ‌ها (به‌غیر از عوامل بی‌هوازی)، وسایل خارجی نظیر کاتتر را می‌توان در دمای ۴°C نگه‌داری نمود.

•• پاتوژن‌هایی که به سرما حساسند باید در دمای اتاق نگه‌داری شوند. این عوامل ممکن است در نمونه‌هایی که حاوی باکتری‌های بی‌هوازی بوده و هم‌چنین در اکثر مایعات استریل بدن، نمونه‌های ژنیتال، سواپ گوش و چشم نیز موجود باشند.

•• سرم جهت بررسی‌های سرولوژیک تا یک هفته در دمای ۲۰°C– قابل نگه‌داری است.

•• نگه‌داری طولانی مدت بافت‌ها یا نمونه‌ها در دمای ۷۰°C- صورت می‌گیرد.

•• مایع مغزی نخاعی در صورتی‌که سریعا مورد بررسی قرار نگیرد تا ۶ ساعت در دمای ۳۵°C قابل نگه‌داری است.

جدول ۴-۳ شرایط نگه‌داری نمونه‌های مختلف را نشان می‌دهد.

جدول ۴-۳: شرایط نگه‌داری نمونه

دمای ۴°C	دمای اتاق (۲۲-۲۶°C)
نوک کاتتر (IV)	آبسه- زخم- ضایعه
مایع مغزی نخاعی جهت شناسایی ویروس	مایعات بدن
گوش خارجی	مایع مغزی نخاعی جهت شناسایی باکتری
مدفوع (بدون نگه‌دارنده)	گوش داخلی
مدفوع جهت توکسین کلستردیوم دیفیسیل تا ۳ روز (بیشتر از ۳ روز نگه‌داری در ۷۰°C-)	مدفوع (با ماده نگه‌دارنده)
خلط	تناسلی
ادرار (بدون نگه‌دارنده)	بینی- نازوفارنکس – گلو
	بافت
	ادرار (با ماده نگه‌دارنده)

موارد رد نمونه

موارد رد نمونه به شرح زیر بیان می‌گردد:

- عدم هم‌خوانی اطلاعات برگه درخواست آزمایش و برچسب روی نمونه
- استفاده از محیط انتقالی نامناسب
- جمع‌آوری نمونه در ظرفی که دارای نشت است
- نمونه ناکافی
- زمان انتقال بیش از ۲ ساعت در نمونه‌های بدون مواد نگه‌دارنده
- انتقال نمونه در دمای نامناسب
- خشک شدن نمونه
- دریافت نمونه در محلول فیکساتیو نظیر فرمالین (نمونه مدفوع مستثنی می‌باشد)
- درخواست کشت بی‌هوازی بر روی نمونه‌هایی که باکتری‌های بی‌هوازی فلور طبیعی آنهاست. (مثل واژن، دهان)
- نمونه حاصل از کاتتر فولی
- بیش از یک نمونه با یک منشا از یک مریض در همان روز (به‌غیر از موارد کشت خون)
- نمونه سواپ با درخواست‌های متعدد برای ارگانیسم‌های مختلف
- نمونه خلط که در رنگ‌آمیزی گرم کمتر از ۲۵ سلول سفید و بیش از ۱۰ سلول اپی‌تلیال در بزرگ نمایی پایین داشته باشد.

در جدول ۵-۳ تحت عنوان مدیریت نمونه و راهنمای برخورد با آن به‌طور خلاصه مباحث این فصل بیان گردیده است.

آزمایشگاه مرجع سلامت	**راهنمای انجام آزمایش**	کد:**W-LM01/00**
	سیتوکروم اکسیداز	صفحه **1** از **2**

۱- هدف:

- جداسازی انتروباکتریاسه ها (که همه اکسیداز منفی هستند) از باکتری هایی مثل ویبریوناسه، آئروموناس، سودوموناس، نیسریا، کمپیلوباکتر و پاستورلا(که همه اکسیداز مثبت اند)
- شناسایی ارگانیسم هایی که فاقد آنزیم سیتوکروم اکسیدازند یا بی هوازی اجباری می باشند.

۲- اساس آزمایش:

سیتوکروم ها، هوموپروتئین های حاوی آهن می باشند که در زنجیره تنفسی عامل انتقال الکترون (هیدروژن) به اکسیژن هستند. در این تست از یک معرف رنگی استفاده می شود که بجای اکسیژن به عنوان پذیرنده نهائی الکترون جایگزین می گردد.

۳- نمونه اولیه :

- کشت ۲۴-۱۸ ساعته از ارگانیسم مورد نظر از محیط های کشت مناسب

٤- مواد و ابزار لازم :

- محلول ۱٪ تترامتیل پارافنیلن دی آمین دی هیدروکلراید در آب مقطر استریل یادیسک تجاری آماده اکسیداز
- کاغذ صافي
- اپلیکاتور چوبی یا لوپ پلاستیکی یا پلاتینیوم

۵- مراحل انجام کار:

الف ـ روش مستقیم روی پلیت:

دو تا سه قطره از معرف تازه تهیه شده را مستقیماً روی کلنی های باکتری بر روی پلیت اضافه می کنیم. کلنی های باکتری های اکسیداز مثبت بلافاصله به رنگ بنفش تغییر رنگ می دهند.

ب ـ روش غیر مستقیم:

- از پودر معرف ، محلول ۱٪ در آب مقطر تهیه کنید و۱۰ ml از محلول را در مقادیر۱ ml تقسیم کرده در بروودت ۲۰- درجه در فریزر نگهداری نمایید. موقع مصرف یک ویال از فریزر خارج کرده ، پس از ذوب شدن ، به تعداد مورد نیاز کاغذ صافی را به معرف آغشته کرده در پلیت تمیز قرار دهید. البته می توان ازدیسک های آماده تجاری نیز استفاده نمود .
- مقداری از کلنی باکتری را روی کاغذ حاوی معرف می کشیم. (توصیه می شود که از مشتق تترامتیل پارافنیلن دی آمین بجای مشتقات دی متیل استفاده شود، زیرا این معرف برای ذخیره کردن پایدارتر و برای تعیین سیتوکروم اکسیداز حساس تر است و نسبت به مشتق دی متیل، کمتر سمي مي باشد.)

- در باکتری های اکسیداز مثبت در محل تلقیح کلنی در عرض ۱۰ ثانیه رنگ آبی تیره (مایل به بنفش) ایجاد می شود (زمان بسیار مهم است). اما باکتری های اکسیداز منفی در عرض ۱۰ ثانیه بیرنگ باقي مي مانند. باکتری هایی که در مدت ٦۰ –۱۰ ثانیه رنگ بنفش ایجاد می کنند، نیاز به انجام تست های بیشتری دارند، زیرا احتمالاً متعلق به خانواده آنتروباکتریاسه نمی باشند.

٦- برنامه QC:

کنترل کیفی باید برای هر سری جدید و هر زمان که این تست انجام می شود، صورت گیرد.

کنترل مثبت: Pseudomonas aeruginosa

کنترل منفی: E.Coli

۷- تداخلات:

- نباید از کشت کهنه (بیشتر از ۲٤ ساعت) استفاده شود.
- محلول ۱٪ اکسیداز باید بصورت تازه و روزانه تهیه شود مگر اینکه محلول ساخته شده در فریزر نگهداری گردد.
- نباید از محیط های کشت رنگی مثل مک کانکی استفاده شود زیرا نتیجه مثبت کاذب می دهد.
- برای انتقال باکتری روی کاغذ صافی یا دیسک اکسیداز نباید از لوپ فلزی مثل استیل یا نیکروم استفاده شود، زیرا بر اثر سوزاندن لوپ، مقدار کمی اکسید آهن بر روی آن ایجاد می شود، که ممکن است نتیجه مثبت کاذب دهد.

۸- ایمنی

بدلیل ایجاد تحریک ، از تماس معرف با پوست و چشم خودداری نمایید . در صورت تماس اتفاقی پوست یا چشم را با مقادیر زیادی آب حداقل به مدت ۱۵ دقیقه شستشو دهید .

آزمایشگاه مرجع سلامت	راهنمای انجام آزمایش	کد: W-LM03/00
	متیل رد **Methyl Red Test**	صفحه 1 از 2

۱- هدف :

تشخیص و تمایز اعضای خانواده آنتروباکتریاسه براساس میزان فرآورده نهائی ناشی از متابولیسم گلوکز و تولید اسید از طریق مسیر Mixed Acid Fermentation

۲- اساس آزمایش :

معرف متیل رد یک اندیکاتور pH است که در محدوده بین pH 6 (زرد) و pH 4.4 (قرمز) واکنش نشان می دهد. اسیدیته ای که در آن معرف متیل رد قادر است تا تغییر رنگ ایجاد نماید بسیار کمتر از سایر معرفهای بیولوژیکی بوده و تنها در مجاورت اسیدیته بالا، در مسیر تخمیر چند اسید از گلوکز می تواند ایجاد واکنش نماید.

برخی از انتروباکتریاسه ها فقط در ابتدای دوره انکوباسیون تولید اسید مینمایند ولی تنها باکتری هایی که قادر باشند برای مدت طولانی طی انکوباسیون ۷۲-۴۸ ساعت pH محیط را در حد پایین حفظ نمایند دارای واکنش مثبت میباشند.

۳- نمونه اولیه :

کشت خالص و تازه از باکتری مورد نظر (کشت ۲۴ -۱۸ ساعته)

٤- مواد و معرفها :

- MR/VP Broth با pH نهایی ۶/۹
- معرف متیل رد که عبارت است از 0.1 g پودر متیل رد در 300ml الکل اتیلیک ۹۵٪ و 200ml آب مقطر

توجه : بتدا پودر متیل رد را باید در الکل حل نمود و سپس آب به آن اضافه کرد. محلول تهیه شده را باید در شیشه تیره و در یخچال نگهداری نمود. جهت مصرف روزانه و هفتگی آنرا در لوله های در پیچدار به حجم ۲/۵میلی لیتر ریخته و در یخچال بگذارید.

٤- روش انجام آزمایش :

- ابتدا چند کلنی از کشت خالص باکتری را در لوله حاوی ۲/۵ میلی لیتر MR/VP Broth تلقیح نمایید.
- 72 - 48 ساعت (حداکثر ۵ روز) در 35^0C انکوبه نمائید.
- سپس ۵ قطره از معرف متیل رد را به Broth اضافه نمایید و نتیجه واکنش را براساس تغییر رنگ حاصله بررسی کنید.

ایجاد رنگ زرد ← واکنش منفی
ایجاد رنگ قرمز ← واکنش مثبت در نتیجه تولید اسید زیاد و ایجاد pH<4.5 است.
ایجاد رنگ نارنجی ← واکنش منفی

جهت کوتاه تر کردن زمان نتیجه گیری می توان حدود ۰/۵ میلی لیتر MR/VP Broth را در لوله ای ریخته و مقدار نسبتاً زیادی از میکروب را در آن تلقیح نمود و پس از انکوباسیون ۲۴-۱۸ ساعته در 35^0C ، ۱-۲ قطره معرف متیل رد را به آن اضافه کرده، واکنش را مشاهده نمود.

۵- برنامه **کنترل کیفی**:

کنترل مثبت: Ecoli ATCC 25922
کنترل منفی: انتروباکتر آئروژینوزا 13048، Klebsiella Pneumoniae ATCC 13883

توجه : در هر روز کاری، قبل از انجام آزمایش، کنترل کیفی باید با سویه های مثبت و منفی انجام شود.

آزمایشگاه مرجع سلامت	راهنمای انجام آزمایش **آزمایش VP** **(Voges Proskauer-Test)**	کد: **W-LM04/00** صفحه **1** از **1**

۱- هدف :

شناسایی میکروارگانیسم هایی که قادرند در مسیر تخمیر گلوکز از اسید پیرورویک، تولید استوئین (استیل متیل کربونیل) نمایند.

۲- اساس آزمایش :

اسید پیرورویک حاصل از تخمیر گلوکز ، از چندین راه متابولیکی ممکن است توسط باکتریها هیدرولیز گردد. باکتری هایی مانند کلبسیلا، انتروباکتر و سراشیا می توانند تولید استوئین نمایند، در حضور اکسیژن هوا و هیدروکسید پتاسیم 40% استوئین به دی استیل تبدیل می شود و آلفا نفتول به عنوان یک کاتالیزور عمل نموده و تولید رنگ قرمز می نماید.

۳- نمونه اولیه :

کشت تازه میکروبی (کشت خالص ۲۴-۱۸ ساعته)

۳- مواد و معرفها :

- محیط MR/VP
- معرفها :

الف) آلفا نفتول 5gr در تیل الکل خالص 100ml

ب) هیدروکسید پتاسیم 40% در آب مقطر 100ml

٤- روش انجام کار :

یك لوله درپیچ دار حاوی MR/VP Broth ، 2.5ml را توسط کشت خالص باکتری مورد نظر تلقیح میکنیم و مدت ۴۸-۲۴ ساعت در اتوو 35^0 C قرار می دهیم. سپس یک قطره آلفا نفتول ۵٪ و دو قطره 40% KOH به آن اضافه می نماییم. لوله را به آرامی تکان داده و آن را به طور ثابت به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه قرار می دهیم. ایجاد واکنش و تولید رنگ قرمز در مدت ۱۵ دقیقه یا بیشتر نشانگر وجود دی استیل و مثبت بودن تست VP می باشد. رنگ زرد یا عدم واکنش نشانگر منفی بودن تست VP است.

این آزمایش نباید بیش از یک ساعت بعد از ریختن معرف ها خوانده شود زیرا می تواند نتیجه مثبت کاذب دهد.

۵- برنامه QC :

سوش کنترل مثبت: انتروباکتر آئروژینوزا ، کلبسیلا پنومونیه

سوش کنترل منفی: E coli ATCC 25922

آزمایشگاه مرجع سلامت	راهنمای انجام آزمایش	کد: W-LM08/00
	فنیل آلانین دآمیناز	صفحه 1 از 1

۱- هدف:

کمک در تشخیص پروتئوس، مورگانلا و پرووِیدنسیا از سایر باکتری های گرم منفی

۲- اساس آزمایش:

فنیل آلانین اسید آمینه ای است که ضمن دآمنیه شدن به فنیل پیرووِیک اسید تبدیل می شود، این اسید با افزودن کلرورفریک ۱۰٪ و ایجاد رنگ سبز مشخص می شود.

۳- مواد و ابزار لازم :

- لوله حاوی فنیل الانین آگار
- کلرورفریک ۱۰ درصد

۴- مراحل انجام کار:

- سطح محیط با کلنی ایزوله تلقیح شده ، در لوله به صورت شل بسته شود.
- بعد از انکوباسیون محیط در 35° C به مدت ۲۴-۱۸ ساعت یا تا هرزمان که رشد واضحی مشاهده گردد ، (۰/۵CC) ۵-۴ قطره کلرورفریک ۱۰٪ مستقیماً به سطح آگار اضافه می کنیم. لوله را می چرخانیم تا کلنی ها در آن غوطه ور شوند.

۵- تفسیر:

ظهور بلافاصله رنگ سبز بعد از ریختن معرف، بیانگر مثبت بودن این تست است. در عرض ۱۰ دقیقه رنگ سبز، کم رنگ تر می شود، که با افزودن مقادیر اضافی معرف، دوباره رنگ سبز ایجاد می شود.
بعضی گونه ها به قدری سریع فنیل آلانین را دآمینه می کنند که بعد از ۴ ساعت انکوباسیون محیط کشت، نیز تست مثبت می شود.

۶- کنترل کیفی:

کنترل مثبت: پروتئوس ولگاریس ATCC 33420
کنترل منفی: Ecoli ATCC 25922

- کنترل کیفی فوق باید برای هر سری ساخت جدید محیط یا معرف انجام گیرد.

۱- هدف آزمایش:

افتراق باکتری های مختلف براساس توانایی حرکت آنها

۲- اصول انجام کار:

این آزمایش جهت افتراق ارگانیسم های متحرک از غیر متحرک به کار میرود. باکتری ها توسط فلاژل حرکت می کنند. فلاژل اغلب در باسیل ها دیده می شود، هر چند که تعداد اندکی از کوکسی ها نیز متحرکند. گاه باکتری های متحرک واریانت های غیر متحرک ایجاد می کنند که ممکن است در نهایت به فرم متحرک بر گردند. ارگانیسم های غیر متحرک فلاژل ندارند.

۳- نمونه اولیه :

کشت خالص ۲۴-۱۸ ساعته

٤- مواد و ابزار لازم:

- جهت انجام روش قطره معلق مواد و وسایل زیر مورد نیاز است:
  ۱- اسلاید (لام)
  ۲- لامل
  ۳- خمیر هماتوکریت
  ۴- سرم فیزیولوژی

-جهت بررسی حرکت در محیط نیمه جامد از لوله حاوی محیط SIM یا Motility test medium (Semisolid) **یا محیطهای مشابه میتوان استفاده نمود .**

٥- روش کار :

قطره معلق

۱- یک قطره سرم فیزیولوژی یا آب مقطر روی لامل قرار دهید
۲- با استفاده از آنس از راس کلنی های تازه باکتری ، مقدار اندکی برداشته با قطره فوق مخلوط نمایید .
۳- با استفاده از خمیر هماتوکریت یا پنبه ، حلقه ای به ضخامت تقریبی۲ میلی متر و به قطر تقریبی۱-۱/۵ cm روی لام درست کنید.

۴- لامل حاوی سوسپانسیون میکروبی را به شکلی که با خمیر یا پنبه تماس پیدا نکند(به سرعت) روی لام برگردانید.

۵- نمونه فوق را زیر میکروسکوپ با عدسی ۴۰ مشاهده نمایید.

تفسیر : افتراق حرکت باکتری از حرکت براونی حائز اهمیت است. در صورت متحرک بودن باکتری ، هریک از باکتریها نسبت به باکتریهای همجوار در حال تغییر موقعیت مداوم هستند و بعضا با سرعت زیاد در میدان دید میکروسکوپ حرکت میکنند.این حرکت ممکن است به شکلهای مختلف از چرخش ،خم و راست شدن و حرکت سریع مانند گلوله یا تیر دیده شود . در حرکت براونی ، عده زیادی از باکتریها بدون چرخش و تغییر موقعیت و همگی در یک مسیر حرکت مینمایند (حرکت کاذب) .

محیط های نیمه جامد

جهت تلقیح ارگانیسم در محیط های مربوطه(SIMیا MTM) از کشت خالص ۲۴-۱۸ ساعته بر روی محیط KIA یا سایرمحیط های مناسب استفاده شود.

با استفاده از آنس تلقیح، مرکز محیط را سوراخ کرده تا عمق 1cm فرو ببرید. محیط مربوطه را در حرارت35^oC به مدت ۴۸-۲۴ ساعت انکوبه کرده در صورت منفی بودن به مدت ۷ روز در حرارت اتاق $21-25^oC$ نگهداری کنید.

حرارت انکوباسیون اهمیت فوق العاده زیادی دارد. چون بسیاری از ارگانیسم های متحرک در $15-25^oC$ متحرک بوده و در حرارت 37^oC که حرارت مطلوب رشد آنهاست غیر متحرکند. اگر به متحرک بودن ارگانیسم در حرارت پائین تر مشکوک هستید، ۲ لوله را همزمان تلقیح کنید، یکی را در حرارت 35^oC و دیگری را در $21-25^oC$ نگهداری نمائید.

تفسیر :

در صورت متحرک بودن باکتری (حرکت مثبت) علاوه بر رشد در خط تلقیح ، محیط اطراف این خط نیز رشد واضح و یا کدورت نشان میدهد

انکوباسیون در حرارت های مختلف:

- انکوباسیون در حرارت 37^oC

a- انتروباکتر (معمولاً +) کلبسیلا (ـ)

b- ویبریو (معمولاً +) اکتینوباسیلوس (-)

c- آئروموناس مدیا (-) و آئروموناس سالمونی سیدا (-) سایر گونه های آئروموناس (+) و پلزیوموناس شیگلوئیدس (+)

- انکوباسیون در حرارت 25^0C (حرارت اتاق)

جهت کمک در افتراق بین جنس ها: لیستریامونوسیتوژن (+) کورینه باکتریوم معمولاً (-)
در صورت نیاز از املاح تترازولیوم در محیط مربوطه استفاده کنید، هر چند ممکن است این ماده رشد گروهی از ارگانیسم ها را مهار کند. نمک های تترازولیوم بی رنگ اند ولی با رشد ارگانیسم، رنگ به سلول ها چسبیده و به پیگمان قرمز رنگ نامحلولی به نام فورمازان احیا می شود. رنگ قرمز صرفاً در نواحی از محیط که باکتری در آن رشد کرده ایجاد خواهد شد.
بعد از گذشت ٢٤ ساعت انکوباسیون، میزان مثبت شدن "حرکت" بر روی محیط نیمه جامد مشابه قطره معلق خواهد بود. اما بعد از گذشت ٤٨ ساعت ، میزان مثبت شدن واکنش حرکتی در محیط نیمه جامد در ٤% موارد بیشتر خواهد بود.

٦- برنامه QC :

حرکت مثبت: E.coli ATCC 25922

حرکت منفي : Staphylococcus Aureus ATCC 25923

درصورت استفاده از محیط های نیمه جامد جهت کنترل منفی می توان از روش عدم تلقیح میکروب استفاده کرد.

آزمایشگاه مرجع سلامت	راهنمای انجام آزمایش محیط **Kligler Iron Agar**	کد: **W-LM13/00** صفحه **1** از **2**

۱- هدف:

تفکیک اعضاء خانواده انتروباکتریاسه (بر پایه توانایی در تخمیر دکستروز (گلوکز) و لاکتوز و تجزیه سولفیدها)

۲- اساس آزمایش:

محیط کشت KIA، علاوه بر کازئین و پپتون های گوشت (Meat Peptones)، محتوی لاکتوز و دکستروز است که و در طی تخمیر این قندها به واسطه تغییر رنگ معرف pH (فنل رد) در پاسخ به اسید تولید شده ، قادر است گونه باسیل های روده ای را تفکیک نماید. غلظت دکستروز فقط در این محیط۱۰٪ غلظت لاکتوز است. ترکیب سیترات آمونیم فریک و تیوسولفات سدیم، شناسایی تولید سولفید هیدروژن را میسر می سازد.

توجه: به هنگام تهیه محیط کشت باید دقت شود که طول سطح شیب دار و عمق محیط کشت در لوله حدوداً ۳ سانتی متر باشد.

۳- نمونه اولیه:

کشت ارگانیسم مورد نظر بر روی محیط پلیتی روده ای یا کشت Broth خالص

۳- مواد مورد نیاز:

لوله محیط کشت KIA بصورت شیب دار

۴- روش انجام کار:

محیط کشت را با مقدار زیادی از کلونی باکتری مورد نظر، با کشت مارپیچی روی تمام سطح شیب دار و سپس سوراخ کردن عمق آگار (و یا بالعکس) تا فاصله ۵-۳ میلی متری عمق لوله، تلقیح نمایید. لوله ها را به مدت ۲۴-۱۸ ساعت و در صورت عدم واکنش تا ۴۸ ساعت ، در دمای $35 \pm 2^{\circ} C$ در شرایط هوازی انکوبه نمایید. بعد از انکوباسیون، نتیجه واکنش در سطح شیب دار و عمق را ثبت نموده، تشکیل گاز و تولید سولفید هیدروژن را یادداشت نمایید.

غیرتخمیرکننده های لاکتوز (مثل سالمونلا و شیگلا) در ابتدا رنگ زرد تولید می کنند که ناشی از اسید تولید شده به دلیل تخمیر مقدار کمی دکستروز است. وقتی دکستروز تمام می شود در سطح محیط شیب دار (منطقه هوازی)، به علت اکسیداسیون اسیدها واکنش به حالت قلیایی (سطح قرمز) برمی‌گردد. این تغییر رنگ در عمق (منطقه بی هوازی) رخ نمی دهد، پس اسیدی (عمق زرد) باقی می ماند.

تخمیرکننده های لاکتوز، سطح و عمق زرد تولید می کنند، چون اسید کافی در سطح شیب دار تولید می شود تا pH اسیدی را تحت شرایط هوازی حفظ کند. ارگانیسم هایی که توانایی تخمیر هیچ یک از دو کربوهیدرات را ندارند، سطح و عمق قرمز تولید می کنند.

تولید سولفید هیدروژن با ایجاد رنگ سیاه در تمام عمق یا با تشکیل حلقه سیاه در نزدیکی عمق اثبات می شود. تولید گاز با ایجاد حباب یا با شکافتن یا جابجا شدگی آگار نشان داده می شود.

۵- برنامه کنترل کیفی (QC):

ارگانیسم	سطح شیب دار	عمق	سولفیدهیدروژن (H_2S)
Escherichia Coli ATCC 25922	اسیدی	اسیدی با گاز	–
Salmonella typhimurium ATCC 14028	قلیایی	اسیدی با گاز	+
Shigella flexneri ATCC 12022	قلیایی	اسیدی	–
Pseudomonas aeruginosa	قلیایی	قلیایی	–
Citrobacter freundii	اسیدی	اسیدی	+

۶- تداخلات:

- سولفات فروس موجود در این محیط به عنوان معرف H_2S گاهی دارای حساسیت کمتری نسبت به سایر نمک های فریک می باشد. بنابراین ممکن است در ایجاد H_2S در TSI و KIA با سایر محیط های کشت مثل SIM مغایرت هایی دیده شود.
- برای بالا بردن شرایط قلیایی در سطح شیب دار باید با شل کردن در پیچ لوله، اجازه داده شود تا تبادل هوا صورت گیرد. اگر در پیچ لوله محکم بسته شود، یک واکنش اسیدی که فقط با تخمیر دکستروز ایجاد شده، سطح شیب دار را نیز دربرمی گیرد.
- عمق لوله های KIA و TSI، با تخمیر گلوکز، اسیدی می شود و در صورت تولید H_2S ، اغلب سیاه شدن از ته لوله شروع می شود،(بویژه با باکتریهای غیر تخمیر کننده لاکتوز) بنابراین اگر عمق سیاه است باید آن را اسیدی در نظر گرفت.

آزمایشگاه مرجع سلامت	راهنمای انجام آزمایش کشت روی محیط **MacConkey Agar**	کد: **W-LM 14/00** صفحه **1** از **2**

۱- **هدف:**

- این محیط کشت، یک محیط انتخابی و افتراقی برای تشخیص ارگانیسم های کلی فرم و پاتوژن های روده ای است.
- برای جداسازی انواع مایکوباکتریوم از مک کانکی آگار بدون کریستال ویوله، استفاده می شود.

۲- اساس آزمایش:

کریستال ویوله رشد میکروارگانیسم های گرم مثبت بویژه انتروکوک ها و استافیلوکوک ها را مهار می کند. جهت تفکیک میکروارگانیسم های روده ای، از ترکیب لاکتوز و معرف قرمز استفاده میشود. بسته به توانائی تخمیر لاکتوز، کلونی های بی رنگ یا صورتی قرمز تولید می شوند. اگر یک باسیل گرم منفی روی بلاد آگار رشد کند اما روی مک کانکی آگار رشد نکند یا بطور ضعیف رشد کند، مشکوک به گروه وابسته به غیرتخمیر کننده ها (نان فرمنترها) است.

۳- ویژگی های تست:

غلظت نمک های صفراوی در این محیط در مقایسه با دیگر محیط های پلیتی جهت کشت آنتروباکتریاسه ها ، نسبتاً کم است. بنابراین انتخابی بودن این محیط برای باکتری های گرم منفی، از بعضی فرمول های دیگر (مثل Salmonella Shigella Agar و Hektoen Enteric Agar) بیشتر نیست. به عنوان مثال استرپتوکوک فکالیس به طور جزئی توانایی رشد روی این محیط را دارد .

۴- مواد و ابزار لازم:

محیط کشت مک کانکی

۵- روش انجام کار:

به محض دریافت نمونه در آزمایشگاه، پلیت های محیط کشت را به روش کشت خطی یا سواب کشیدن، تلقیح نمایید. توصیه می شود برای افزایش شانس جداسازی باکتری های گرم منفی، وقتی تعداد آنها کم است و نیز جهت تعیین ارگانیسم های دیگری که در نمونه وجود دارند، باید به یک محیط غیر انتخابی نیز تلقیح نمود .

پلیت ها را دور از نور نگه داشته و در دمای $35 \pm 2^{\circ} C$ یا دمای مناسب دیگری به مدت ۲۴-۱۸ ساعت انکوبه نمایید. اگر بعد از ۲۴ ساعت منفی بود، دوباره برای ۲۴ ساعت دیگر انکوبه نمایید. انکوباسیون در دمای اتاق، شانس جداسازی یرسینیا انتروکولیتیکا را افزایش می دهد. پلیت ها را نباید بیش از ۴۸ ساعت انکوبه کرد، چون در تفسیر نتایج اشکال پیش می آید.

۶- برنامه کنترل کیفی (QC):

Escherichia coli ATCC 25922: رشد می کند، کلنی های قرمز گل سرخی می دهد.

Proteus marbilis ATCC 12453: رشد می کند، کلنی های بی رنگ می دهد.

Salmonella typhimurium ATCC 14028: رشد می کند، کلنی های بی رنگ می دهد.

Streptococcus faecalis ATCC 29212: رشد بطور جزئی مهار می شود.

ادامه ←

۷- تداخلات:

- بعضی از انتروباکتریاسه ها و سودوموناس آئروژینوزا وقتی در محیط دارای Co2 انکوبه شوند، رشدشان روی این محیط، مهار میشود.
-

۱- هدف:

جداسازی انتخابی ویبریوهای کلرا و ویبریو پاراهمولیتیکوس

۲- اساس آزمایش:

TCBS آگار Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar محیطی انتخابی برای جداسازی ویبریوکلرا و ویبریوپاراهمولیتیکوس و نیز دیگر ویبریوها است.

- مهار باکتری های گرم مثبت با افزودن Oxgall (صفرای گاوی، محتوی مخلوطی از نمک های صفراوی و Sodium Cholate) انجام می شود.
- تیوسولفات سدیم به عنوان منبع سولفور عمل می کند و در ترکیب با سیترات فریک، تولید سولفید هیدروژن می کند.
- ساکاروز بعنوان کربوهیدرات قابل تخمیر برای متابولیسم ویبریوها موجود است.
- pH قلیائي محیط، جداسازی ویبریوکلرا را افزایش می دهد. تیمول بلو و برم تیمول بلو به عنوان معرف های تغییر pH موجودند.

۳- نمونه اولیه :

- سواب های محتوی ماده نمونه در محیط کشت انتقالی کری ـ بلر (Cary & Blair)

٤- مواد و ابزار لازم :

- آب پپتونه قلیایي
- محیط کشت TCBS

٥- روش انجام کار:

حتی الامکان به محض دریافت نمونه، آن را کشت دهید. نمونه هایی مثل سوابهای مقعد، مدفوع، ماده استفراغ شده، ماهی یا غذاهای دیگر را می توان با سواب به طور مستقیم روی محیط تهیه شده در پلیت برد. تلقیح زیاد، مخصوصاً اگر نمونه ها تازه نیستند، توصیه می شود. اگر تأخیری در رسیدن نمونه به آزمایشگاه پیش بینی می شود، سواب های محتوی ماده نمونه را باید در محیط انتقالی کری ـ بلر به آزمایشگاه منتقل نمود.

برای جداسازی ویبریوکلرا و دیگر گونه های ویبریو از مدفوع، آب پپتونه قلیایی و TCBS به کار می رود. یعنی نمونه را ابتدا داخل آب پپتونه قلیایی حاوی ۱% NaCl (pH = ۸/۵) برده و به مدت ۸-۵ ساعت در دمای ۳۵ ° C انکوبه نمایید و سپس روی محیط TCBS کشت دهید.

اما در مواقع اورژانس و کمبود وقت توصیه می شود قبل از قرار دادن سواب در آب پپتونه قلیایی، سواب را بر روی یک پلیت TCBS بکشید، پلیت را کشت داده و انکوبه نمایید و سپس سواب را در آب پپتونه قلیایی برده و به مدت ۸-۵ ساعت در دمای ۳۵ ° C انکوبه نمایید و پس از آن ساب کالچر مجددی بر روی پلیت TCBS تهیه نمایید.

پلیت ها را دور از نور نگهداشته و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۵± ۲° C انکوبه نمایید. اگر بعد از ۲۴ ساعت منفی بود برای ۲۴ ساعت دیگر انکوبه نمایید.

- *توجه : از زمان تهیه محیط TCBS نباید بیش از یک هفته گذشته باشد. همچنین محیطهای TCBS باید در کیسه های فریزر در بسته در یخچال نگهداری شوند.*

نکته: برای کشت ویبریوها نباید نمونه ها را فریز کرد.

٦- برنامه کنترل کیفی (QC):

Vibrio Cholerae ATCC 9459: رشد متوسط تا زیاد، کلونی های زرد

Vibrio parahaemolyticus ATCC 17802: رشد متوسط تا زیاد، کلونی های آبی

Escherichia coli ATCC 25922: اگر رشد کند،کلونی ها کوچک و شفاف هستند.

Pseudomonas aeruginosa ATCC 10145: رشد به طور جزئی یا کامل مهار می شود. اگر رشد کند، کلونی ها آبی هستند.

Streptococcus faecalis ATCC 29212: رشد به طور جزئی یا کامل مهار می شود. اگر رشد کند، کلونی ها کوچک و زرد هستند.

آزمایشگاه مرجع سلامت	راهنمای انجام آزمایش محیط **Triple Sugar Iron Agar (TSI Agar)**	کد : W-LM16/00 صفحه 1 از 2

۱- هدف:

تفکیک باسیل های روده ای گرم منفی (بر اساس تخمیر کربوهیدرات و تولید سولفید هیدروژن)

۲- اساس آزمایش:

در این محیط کشت، ساکاروز به دو قندی (دکستروز و لاکتوز) که در محیط کلایگلر آیرون آگار (KIA) وجود دارد، اضافه می شود. افزودن ساکاروز، با تسهیل در جداسازی باسیل های تخمیر کننده ساکاروز و نیز تخمیر کننده های لاکتوز و یا دکستروز، حساسیت محیط را افزایش می دهد. تخمیر کربوهیدرات، با تغییر رنگ قابل مشاهده معرف pH یعنی فنل رد (از قرمز به زرد) نشان داده می شود. تولید سولفید هیدروژن با ایجاد رسوبی که محیط را در عمق لوله سیاه می کند و نتیجه افزودن سولفات فروس به محیط است، نشان داده می شود.

برای تسهیل در جداسازی ارگانیسم هایی که فقط دکستروز را تخمیر می کنند، غلظت دکستروز یک دهم (۰/۱) غلظت لاکتوز یا ساکاروز است. مقدار کم اسید تولید شده در سطح شیب دار لوله در طی تخمیر دکستروز، به سرعت اکسید می شود و باعث می شود محیط به pH قلیایی(قرمز) برگردد. در مقابل، بدلیل فشار پایین تر اکسیژن در عمق، واکنش اسیدی (زرد) حفظ می شود.

توجه: به هنگام تهیه محیط کشت باید دقت نمود که طول سطح شیب دار و عمق محیط کشت در لوله، حدوداً ۳ سانتی متر باشد.

۳- نمونه اولیه :

- کشت ارگانیسم بر روی یک پلیت محیط مورد استفاده برای کشت انتروباکتریاسه

۴- مواد و تجهیزات مورد نیاز:

- لوله محیط کشت TSI بصورت شیب دار

۵- روش انجام کار:

با استفاده از آنس سوزنی استریل خنک، رشد را از مرکز یک کلونی که به تازگی روی پلیت محیط مورد استفاده برای کشت انتروباکتریاسه رشد کرده است، به سطح شیب دار TSI Agar انتقال دهید و آن را با حرکت آنس در امتداد سطح شیب دار، کشت دهید و سپس عمق را با سوراخ کردن محیط، تلقیح نمایید. لوله ها را با در پوش های شل شده به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای $35 \pm 2^{\circ} C$ در اتمسفر هوازی انکوبه نمایید.

واکنش های تولید شده توسط ایزوله مجهول را با ارگانیسم های کنترل، مقایسه نمایید. تخمیر کربوهیدرات با رنگ زرد محیط نشان داده می شود.

اگر محیط در عمق لوله زرد شود (اسیدی) اما در سطح شیب دار قرمز شود (قلیایی)، ارگانیسم تحت بررسی فقط دکستروز (گلوکز) را تخمیر می کند.

رنگ زرد (اسیدی) در سطح شیب دار و عمق نشان می دهد که ارگانیسم تحت بررسی، دکستروز، لاکتوز و یا ساکاروز را تخمیر می کند.

رنگ قرمز (قلیایی) در سطح شیب دار و عمق، نشان می دهد که ارگانیسم تحت بررسی، یک غیر تخمیر کننده (Nonfermenter) است.

تولید سولفید هیدروژن سبب تولید رسوب سیاه در عمق لوله می شود.

تولید گاز با شکاف و ترک خوردگی محیط نشان داده می شود.

۶- برنامه کنترل کیفی (QC):

ارگانیسم	سطح شیبدار	عمق	گاز	H_2S
Escherichia coli ATCC 25922	A	A	+	–
Pseudomons aeruginosa ATCC 27853	K	K	–	–
Salmonella typhimurium ATCC 14028	K	A	+	+
Shigella flexneri ATCC 12022	K	A	–	–

A: اسیدی (زرد) K: قلیایی (قرمز)

۷- تداخلات:

- برای حفظ شرایط قلیایی سطح شیب دار باید با بستن درپیچ لوله بصورت شل، اجازه داد که تبادل آزاد هوا صورت گیرد. اگر لوله محکم بسته شود، واکنش اسیدی (ایجاد شده فقط با تخمیر دکستروز) سطح شیب دار را درگیر خواهد کرد.
- بعضی از ارگانیسم ها ممکن است تولید سولفید هیدروژن را روی KIA نشان دهند، اما روی TSI نشان ندهند، چون استفاده از ساکاروز در TSI Agar، مکانیسم آنزیمی را که در تولید H_2S اثر می گذارد مهار می کند. بویژه سالمونلای تولید کننده H_2S و بعضی از اعضاء انتروباکتریاسه نمی توانند روی TSI Agar، H_2S تولید کنند.
- سولفات فروس موجود در این محیط(به عنوان معرف H_2S) گاهی دارای حساسیت کمتری نسبت به سایر نمک های فریک می باشد. بنابراین ممکن است در ایجاد H_2S در TSI و KIA با سایر محیط های کشت مثل SIM مغایرت هایی دیده شود.
- چون عمق لوله های KIA و TSI، با تخمیر گلوکز اسیدی می شود ، سیاه شدن اغلب در ته لوله وجود دارد یا به همان جا محدود می شود (بویژه با باکتریهای غیر تخمیر کننده لاکتوز) بنابراین اگر عمق سیاه است باید آن را اسیدی در نظر گرفت.

آزمایشگاه مرجع سلامت	راهنمای انجام آزمایش کشت روی محیط **Malonate Broth**	کد: W-LM18/00 صفحه 1 از 1

۱- هدف:
تشخیص گونه های انتروباکتریاسه بویژه سالمونلا

۲- اساس آزمایش:
این محیط کشت محتوی مالونات سدیم (منبع کربن اولیه)، مقادیر کمی گلوکز و عصاره مخمر (مواد مغذی)، برم تیمول بلو (معرف pH)، انواع نمک ها و یک سیستم بافر است. ارگانیسم هایی که رنگ آبی نیلي (رنگ آبی آهن دار Prussian blue) تولید مي کنند، قادرند مالونات را به عنوان منبع کربن استفاده کنند. اگر بتوانند از مالونات به عنوان منبع کربن استفاده کنند، پس می توانند از سولفات آمونیم نیز به عنوان نیتروژن استفاده کنند، در نتیجه محصولات قلیایی تولید می کنند که دلیل افزایش pH و تغییر رنگ محیط به آبی است. ارگانیسم هایی که قادر نیستند از مالونات به عنوان منبع کربن استفاده کنند، معمولاً رشد نمی کنند و محیط سبز باقي مي ماند.

۳- نمونه اولیه:
کلونی های ناشی از کشت ارگانیسم بر روی TSI ، KIA یا Broth

٤- مواد و ابزار لازم:
محیط کشت مالونات Broth

٥- روش انجام کار:
از کشت ارگانیسم بر روی TSI, KIA یا KI Broth به محیط مالونات Broth تلقیح نمایید. مایع تلقیح باید شفاف و رقیق باشد. کشت را در دمای C ° ۳۵ انکوبه نموده و آن را بعد از ۲٤-۱۸ ساعت و سپس بعد از ٤۸ ساعت برای تولید رنگ آبی بررسی نمایید. بعضی از ارگانیسم ها فقط مقادیر کمی قلیا تولید می کنند. هر نشانی از رنگ آبی را مثبت تلقی نمایید. مقایسه با لوله ای که تلقیح نشده، می تواند مفید باشد. تولید رنگ زرد نشانگر واکنش منفی است. این واکنش احتمالاً ناشی از تخمیر مقدار کم گلوکز در محیط است.

٦- برنامه کنترل کیفی (QC):
_ سوش کنترل منفی : *E. coli* ATCC 25922 فاقد رشد (سبز)

- سوش کنترل مثبت: *Klebsiella pneumonia sub sp. Pneumonia* ATCC 13882 رشد خوب، آبی (مثبت)
- سوش کنترل مثبت : *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 رشد خوب، آبی (مثبت)

آزمایشگاه مرجع سلامت	**راهنمای انجام آزمایش**	کد:**W-LM20/00**
	کاتالاز	صفحه **1** از **2**

۱- هدف :

- تشخیص استافیلوکوک و میکروکوک (کاتالاز مثبت) از استرپتوکوک (کاتالاز منفی)
- افتراق کلستریدیوم از باسیلوس ها (کاتالاز مثبت)
- افتراق لیستریامونوسیتوژنز (کاتالاز مثبت) از استرپتوکوک بتاهمولیتیک

۲- اساس آزمایش:

کاتالاز آنزیمی است که H_2O_2 را به آب و اکسیژن تجزیه می کند. H_2O_2 یکی از محصولات نهایی اکسیداسیون در متابولیسم کربوهیدرات است.

۳- نمونه ا ولیه:

کشت ۲۴-۱۸ ساعته از ارگانیسم مورد نظر

٤- مواد و تجهیزات مورد نیاز :

- پراکسید هیدروژن ۳% (این ماده باید در شیشه های قهوه ای یا تیره رنگ ودر یخچال نگهداری شود)
- پلیکاتور چوبی یا شیشه ای یا لوپ پلاتینی
- لام شیشه ای

٥- مراحل انجام کار:

- با یک اپلیکاتور چوبی از مرکز یک کلنی به سطح لام شیشه ای منتقل کنید.
- یک قطره H_2O_2 را بلافاصله به کلنی روی لام اضافه کنید و ا یجاد حباب روی لام را بررسی نمایید. نتیجه را به صورت مثبت یا منفی گزارش کنید.
- ایجاد حباب های سریع و ماندگار با حالت جوش زدن (کف) نشانگر مثبت بودن تست است.

٦- برنامه QC :

پراکسید هیدورژن باید هر روز یا قبل از تست نمودن باکتری مجهول با سوش های کنترل مثبت و منفی تست شود.

سوش کنترل مثبت : Staphylococcus. aureus

سوش کنترل منفی : Streptococcus. pyogenes

۷- تداخلات :

- جهت نست کاتالاز باید از روی محیطی کلنی برداشته شود که فاقد خون باشد. زیرا گلبول های قرمز واکنش کاتالاز مثبت ضعیف ایجاد می کنند. اما از آنجائی که اکثر نمونه های کلینیکی روی محیط های خون دار کشت داده می شوند، برای انجام تست میتوان نمونه را از قله کلنی ها بدون تماس با محیط برداشت تا واکنش مثبت کاذب ایجاد نشود.
- بهتر است از یک اپلیکاتور چوبی برای برداشتن کلنی استفاده شود. استفاده از لوپ آهنی واکنش مثبت کاذب ایجاد می کند.
- از آنجائی که بعضی از باکتری ها دارای آنزیم هایی غیر از کاتالاز هستند که موجب تجزیه پراکسیدهیدروژن می شود، ایجاد حباب های ریز به تعداد کم، بعد از ۳۰ – ۲۰ ثانیه به معنی واکنش مثبت نمی باشد.

۱- هدف :

تشخیص استرپتوکوک بتاهمولیتیک گروه A از سایر استرپتوکوک ها

۲- اساس آزمایش:

استرپتوکوک بتاهمولیتیک گروه A به دیسک باسیتراسین 0.04Uحساس ولی به تریمتوپریم ـ سولفامتوکسازول (SXT) 1.25Ug مقاوم است. استرپتوکوک بتاهمولیتیک گروه B به هر ۲ آنتی بیوتیک مقاوم است.

۳- ویژگی های تست:

بیش از ۱۰٪ سویه های گروه C و G به باسیتراسین حساسند بنابراین این تست جهت گروه A چندان اختصاصی نیست. به همین دلیل، این تست اغلب همراه با تست حساسیت به SXT انجام می شود که گروه هایC و G عموماً به آن (SXT) حساس بوده و گروه های A و B مقاومند.

۴- نمونه اولیه :

کشت ۲۴ – ۱۸ ساعته از باکتری مورد نظر

5- لوازم و ابزار مورد نیاز:

-بلاد آگار با خون گوسفند
-دیسک باسیتراسین (0.04 U)
-دیسک SXT
-پنس استریل
-سواب استریل

۵- روش انجام کار:

کلنی ایزوله استرپتوکوک بتاهمولیتیک را در وسط یک پلیت بلادآگار قرار داده و سپس با یک سواب یا لوپ استریل آن را بطور یکنواخت روی پلیت کشت می دهیم. یک دیسک باسیتراسین و یک دیسک SXT را روی ناحیه کشت داده شده، قرار می دهیم. باید توجه نمود که دیسک ها از همدیگر فاصله داشته باشند. پلیت را دراتوو$35\ ^0C$ قرار می دهیم.

حساس = عدم رشد در اطراف دیسک ها

مقاوم = رشد تا لبه دیسک ها

۶- برنامه QC:

ATCC 19615 استرپتوکوک گروه A : باسیتراسین = S و R = SXT

ATCC 27956 استرپتوکوک گروه B : باسیتراسین = R و R = SXT

استرپتوکوک بتاهمولیتیک گروههای C و F یا G: باسیتراسین = S و S= SXT

۷- تداخلات :

- این تست تنها باید برای تشخیص استرپتوکوک های بتاهمولیتیک انجام شود زیرا بعضی از استرپتوکوک های آلفاهمولیتیک (مثل پنوموکوک) به باسیتراسین حساسند.
- کشت روی بلاد آگار باید کاملاً یکنواخت و به مقدار کافی انجام شود. تلقیح کم میکروارگانیسم روی بلادآگار باعث می شود استرپتوکوک non-A به باسیتراسین حساس شود و نتیجه مثبت کاذب دهد.

آزمایشگاه مرجع سلامت	راهنمای انجام آزمایش	کد:W-LM23/00
	تستCAMP	صفحه 1 از 1

۱- هدف :

شناسایی و افتراق استرپتوکوک گروه B (آگالاکتیه) از سایر استرپتوکوکها

۲- اساس آزمایش :

استرپتوکوک گروه B پروتئین خارج سلولی به نام CAMP factor ترشح می نماید که با بتا لیزین استافیلوکوک ارئوس بصوررت سینرژیک عمل نموده وسبب افزایش لیز گلبول های قرمز خون می شود.

- حساسیت این تست بسیار بالا است و حتی سویه های بدون همولیز استرپتوکوک گروه B (در۱۱ ٪ موارد)، CAMP مثبت می باشند.

۳- نمونه اولیه :

- کشت تازه میکروبی (۲۴-۱۸ ساعته)

۴- مواد و ابزار لازم :

- پلیت بلاد آگار حاوی ۵٪ خون گوسفند
- استاف اورئوس بتا همولیتیک ATCC (25923) یا استاف اورئوس بتا همولیتیک جدا شده از بیمار

۵- روش انجام کار :

- ابتدا در وسط پلیت بلادآگار یک خط مستقیم از استاف اورئوس مولد بتا لیزین راکشت می دهیم.
- سپس استرپتوکوک مورد نظر را عمود بر خط کشت استاف ارئوس کشت داده بطوریکه این دو با هم برخورد و تداخل نکنند. (می توان چند میکروار گانیسم را به فاصله ۴-۳میلیمتر کشت داد.)
- پلیت را به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در اتوو 35^0 C در حضور O_2 انکوبه می نماییم.
- مشاهده همولیز بتا، شبیه نوک فلش، در محلی که دوسویه استاف اورئوس و سویه مشکوک به هم نزدیک می شوند، نشان دهنده تشدید همولیز بتا و **تست** CAMP **مثبت** است.

۶-تداخلات :

اگر پلیت تست در کندل جار یا اتو CO_2 و یا در شرایط بی هوازی انکوبه شود بعضی از استرپتوکوک های گروه A ایجاد واکنش CAMP مثبت می کنند، بنابراین پلیت تست، باید حتماً در حضور O_2 اتوو گذاری شود.

۷- برنامه QC :

سویه کنترل مثبت : استرپتوکوک گروه B

سویه کنترل منفی : استرپتوکوک گروه A و استرپتوکوک Bovis

آزمایشگاه مرجع سلامت	**راهنمای انجام آزمایش** محیط **DNase Test Agar**	کد:**W-LM29/00** صفحه **1** از **2**

۱- هدف:

این محیط کشت در ارزیابی فعالیت دزوکسی ریبونوکلئاز (DNase) باکتری ها و قارچ ها و خصوصاً به عنوان کمک در تشخیص استافیلوکوک های بیماری زا بکار می رود.

DNase Test Agar with Toluidine Blue برای کمک در تفکیک و تشخیص گونه سراشیای بدون پیگمان که ممکن است به اشتباه بعنوان گونه انتروباکتر و کلبسیلا تشخیص داده شوند، به کار می رود.

۲- اساس آزمایش:

اگر استافیلوکوک آنزیم DNase داشته باشد این آنزیم، اسیدنوکلئیک را هیدرولیز می نماید که با استفاده از معرف و ایجاد هاله شفاف در اطراف محل رشد باکتری می توان به این موضوع پی برد.

ویژگی های آزمایش:

حساسیت: ۹۹٪ استافیلوکوک های کواگولاز مثبت، DNase مثبت نیز هستند.

اختصاصیت: ۲۰٪ استافیلوکوک های کواگولاز منفی، DNase مثبت هستند.

۳- نمونه اولیه:

پلیت های LEMB Agar یا Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood حاوی ارگانیسم مورد نظر

٤- مواد و ابزار مورد نیاز:

- پلیت DNase Test Agar
- معرف اسید کلریدریک 1N (یک نرمال) یا معرف تولوئیدین بلو ۰/۱%

توجه : پلیت های DNase Test Agar with Toluidine Blue را می توان مستقیماً بدون افزودن معرف بررسی نمود، چون خود محیط کشت حاوی ۰/۰۵ g/lit از ماده Toluidine Blue O می باشد. مقدار این ماده در محیط کشت نباید از ۰/۰۰۵ ٪ تجاوز کند چون در غلظت های بالاتر ممکن است شناسایی فعالیت DNase را مشکل سازد.

۵- روش انجام کار:

پلیت های DNase Test Agar یا DNase Agar with Toluidine Blue را با نمونه مورد نظر به صورت نقطه ای (یا خطی) تلقیح نمایید. پلیت ها را به مدت ۲٤-۱۸ ساعت در دمای ۲ ± ۳۵ سانتی گراد انکوبه نمایید. پس از انکوباسیون، روی پلیت های DNase Test Agar ساده، اسید کلریدریک ۱ نرمال و یا تولوئیدین بلو ۰/۱% بریزید به گونه ای که سطح پلیت را کاملاً بپوشاند و سپس آن را بر روی زمینه تیره قرار داده و بررسی نمایید. تلقیح باید نقطه ای باشد، چون بعضی از سویه های استافیلوکوک اورئوس به خوبی بر روی محیط، رشد نمی کنند و در نتیجه میزان رشد برای ارزیابی فعالیت DNase کافی نخواهد بود. در صورت تلقیح نقطه ای، حتی اگر در محل تلقیح، رشدی ایجاد نشود می توان فعالیت DNase را ارزیابی نمود.

- DNase Test Agar که اسید کلریدریک یک نرمال روی آن ریخته شده است .

a) مثبت : فوراً هاله های شفاف کاملاً مشخصی اطراف کلني یا محل تلقیح را در محیط کشت احاطه مي کنند.

b) منفي : اطراف کلني ها یا محل تلقیح شفاف نمی شود.

- DNase Test Agar که تولوئیدین بلو ۰/۱% روی آن ریخته شده است :

a) مثبت: هاله های شفاف قرمز صورتی ،اطراف کلني یا محل تلقیح را احاطه می کنند. محیط در جایي که DNA باقی مانده باشد آبی می شود.

b) منفي: هاله های کدر قرمز صورتی اطراف کلنی یا محل تلقیح را احاطه می کنند.

- پس از انکوباسیون روی پلیت های DNase Test Agar With Toluidine Blue ، معرف ریخته نمي شود و مستقیماً بررسی می گردد.

a) مثبت (+): هاله شفاف قرمز صورتی واضحی اطراف کلني یا محل تلقیح را در یک محیط آبی (نیلي) احاطه می کند.

b) منفي (-): بدون تغییر، محیط به رنگ آبی نیره شفاف باقی می ماند.

٦- برنامه کنترل کیفی (QC):

DNase Test Agar:

Staphylococcus aureus ATCC 25923: رشد متوسط تا زیاد، احاطه شده با هاله شفاف صورتی تا قرمز (کنترل مثبت)

Staphylococcus Epidermidis ATCC 12228: رشد متوسط تا زیاد، بدون هاله (کنترل منفی)

DNase Test Agar with Toluidine Blue:

Klebsiella Pneumoniae ATCC 33495: رشد متوسط تا زیاد، بدون هاله (کنترل منفی)

Serratia marcescens ATCC 13880: رشد متوسط تا زیاد، احاطه شده با هاله صورتی شفاف (کنترل مثبت)

۷- تداخلات:

بعضی از سویه های استافیلوکوک ممکن است روی DNase Test Medium with Toluidine Blue مهار شوند.

پروتئوس ولگاریس، سودوموناس آئروژینوزا و آئروموناس، واکنش های مثبت زیادی برای تولید DNase نشان می دهند.

آزمایشگاه مرجع سلامت	**راهنمای انجام آزمایش** **حساسیت به باسیتراسین**	کد:**W-LM 30/00** صفحه **1** از **1**

۱- هدف:
افتراق میکروکوک و استوماتوکوک از استافیلوکوک

۲- اساس آزمایش:
باسیتراسین آنتی بیوتیکی است که سبب مهار رشد میکروکوک ها می گردد ولی بر رشد استافیلوکوک ها اثر مهاری ندارد .

۳- نمونه اولیه:
- کشت ۲٤- ۱۸ ساعته از ارگانیسم مورد نظر روی Trypticase Soy Broth

٤- مواد و ابزارلازم :
- دیسک باسیتراسین (4U %)
- محیط کشت بلاد آگار یا مولر هینتون آگار
- محلول میکروبی با کدورت نیم مک فارلند
- سواب استریل

٤- روش انجام کار:
می توان از محیط بلاد آگار یا مولر هینتون آگار استفاده نمود.
بعداز یک شبانه روز انکوباسیون، قطر هاله عدم رشد اندازه گرفته می شود، استافیلوکوک ها به باسیتراسین مقاومند و هیچ هاله عدم رشدی مشاهده نمی شود. اما میکروکوک ها به آن حساسند. (قطر هاله عدم رشد (>10mm)

۵- برنامه کنترل کیفی (QC):
کنترل مثبت : *Micrococcus Luteus* با هاله عدم رشد بزرگتر از ۱۰ میلي متر (از یک نمونه میکروکوک لوتئوس موجود در آزمایشگاه استفاده کنید.)
کنترل منفی :*Staphylococcus Epidermidis* ATCC 14995: هاله ای از عدم رشد وجود ندارد.

۱- هدف آزمایش:

افتراق استافیلوکوک اورئوس از سایر میکروکوکاسه ها

۲- اساس آزمایش:

غلظت بالای نمک (۷/۵%) رشد اکثر سوش های گرم منفی و گرم مثبت بجز استافیلوکوک اورئوس را مهار می کند. استافیلوکوک می تواند مانیتول را تخمیر کرده (مانیتول تنها کربوهیدرات موجود در محیط است) و اسید تولید کند. این مسئله منجر به افت pH و تغییر رنگ فنل رد به زرد می شود، در این آزمایش کلنی های استافیلو کوک به طور مشخص زرد رنگ شده و توسط هاله زردی احاطه می شوند ما سایر استافیلو کوک ها و میکروکوک ها که قدرت تخمیر مانیتول را ندارند با شکستن پپتون موجود در محیط کلنی های قرمز رنگ با هاله ای ارغوانی - قرمز ایجاد می کنند.

۳- نمونه اولیه :

کشت ۲٤ - ۱۸ ساعته از ارگانیزم مورد نظر (استافیلوکوک)

٤- مواد و ابزار مورد نیاز :

محیط مانیتول سالت آگار (لوله یا پلیت)

٥- مراحل انجام کار :

کلنی های مورد نظر را روی محیط تلقیح کرده به مدت ٤٨-۲٤ ساعت در حرارت $35\ ^{\circ}C$ انکوبه نمایید (محیط بدون CO_2) و سپس نتیجه را بررسی کنید .

از آنجا که بعضی از گونه های استافیلوکوک آهسته تر مانیتول را تخمیر می کنند، بنابراین لازم است حتماً تا ٤٨ ساعت پلیت ها نگهداری شود.

- کلنی های استافیلوکوک زرد رنگ بوده و توسط هاله زردی احاطه می شود.

٦- تداخلات :

انتروکوک می تواند روی این محیط رشد کرده و مانیتول را نیز کمی تخمیر کند. افتراق از استافیلوکوک بر اساس رنگ آ میزی گرم و تست کاتالاز خواهد بود.

اگر مدت انکوباسیون از ٤٨ ساعت طولانی تر شود ارگانیزم های دیگر نیز قدرت رشد و تخمیر مانیتول را دارند.

نکته:

تمام کلنی های مشکوک به استافیلوکوک باید به کمک تست کواگولاز یا سایر تست های افتراقی تایید شوند. بعضی فرمولاسیون ها توصیه می کنند 20CC زرده تخم مرغ استریل به محیط اضافه شود، استافیلوکوک های کواگولاز مثبت همزمان لیپاز نیز دارند بنابراین رسوب کدری در اطراف کلنی ها ظاهر خواهد شد. استافیلو کوک هایی که کواگولاز تولید نمی کنند لیپاز نداشته و هاله ایجاد نمی کنند.

۷- کنترل کیفی:

سوش کنترل مثبت : استافیلوکوک اورئوس ATCC 25923

سوش کنترل منفي : استافیلوکوک اپیدرمیدیس ATCC 12228 و پروتئوس میرابیلیس

آزمایشگاه مرجع سلامت	**راهنمای انجام آزمایش** **دیسک نووبیوسین** **جهت افتراق استافیلوکوکهای کوآگولاز منفی**	کد: **W-LM32/00** صفحه **1** از **1**

۱- هدف:

تعیین حساسیت به نووبیوسین، جهت غربالگری استافیلوکوکهای کوآگولاز منفی جدا شده از کشتهای ادرار، بکار می رود.

۲- نمونه اولیه :

- کشت ۲٤-۱۸ ساعته از ارگانیسم مورد نظر

۳- مواد و معرفها:

- دیسک نووبیوسین ۵ میکروگرمی
- پلیت بلاد آگار خون گوسفند
- سوآب استریل

٤-روش انجام آزمایش:

- یک سوسپانسیون از ارگانیسم مورد نظر در آب مقطر استریل یا Broth تهیه نمایید.
- کدورت سوسپانسیون باید مطابق با استاندارد نیم مک فارلند باشد .
- با یک سوآب استریل روی نصف پلیت بلاد آگار کشت دهید.
- تحت شرایط استریل یک دیسک نووبیوسین روی ناحیه تلقیح شده قرار دهید. با پنس استریل به آرامی روی دیسک فشار آورید تا مطمئن شوید با سطح آگار تماس پیدا کند.

۵- نتایج :

- S.saprophyticus به نووبیوسین مقاوم بوده و هاله عدم رشد ۶ mm تا ۱۲ mm ایجاد می کند.
- سایر استافیلوکوکهای کوآگولاز منفی و S.aureus ، به نووبیوسین حساس بوده و هاله عدم رشد ۱۶ mm یا بزرگتر ایجاد می کنند.

٦- کنترل کیفی :

- سوش کنترلی مقاوم به نووبیوسین S.saprophyticus
- سوش کنترلی حساس به نووبیوسین S.epidermidis

کنترل کیفی با هر Lot جدید از دیسک یا بطور هفتگی با سویه های فوق باید انجام شود.

آزمایشگاه مرجع سلامت	**راهنمای انجام آزمایش**	کد: **W-LM34/00**
	PYR	صفحه **1** از **1**

۱- هدف :

تست با حساسیت بالا جهت تشخیص استرپتوکوک های گروهA و انتروکوک های گروه D

۲- اساس آزمایش :

آنزیم آمینو پپتیداز توسط سوبسترایی به نام L-pyrolidonyl-β-naphthylamide هیدرولیز می شود و در نتیجه β-naphthylamide آزاد می شود که با افزودن N,N-dimethylaminocinnamaldehyde و با ایجاد رنگ قرمز مشخص می شود.

۳- نمونه اولیه :

- کشت تازه میکروبی (۲٤-۱۸ ساعته)

٤- مواد و ابزار لازم :

- PYR Broth (Todd Hewitt Broth با پیرولیدونیل بتا نفتیل آمید ۰/۰۱٪) به مقدار ۰/۲ ml در لوله)
- معرف PYR (دی متیل آمینو سینا مالدئید ۰/۰۱%)
- لوله آزمایش

٥- روش انجام آزمایش :

- ابتدا ۲ تا۳ کلنی ازکشت مورد نظر را در لوله محتوی 0.2^{ml} PYR Broth حل مي كنيم.
- لوله را به مدت ٤ ساعت در حرارت $35^{0}C$ انکوبه می کنیم.
- یک قطره معرف PYR به آن اضافه می نماییم.
- سرانجام واکنش را که بر اساس تغییر رنگ می باشد مشاهده و تفسیر می نماییم.
- زمان لازم برای خواندن نتایج یک دقیقه می باشد که رنگ زرد یا عدم تغییر رنگ نشانگر منفی بودن تست و ایجاد رنگ قرمز پررنگ نشانگر واکنش مثبت است.

٦- کنترل کیفی

سوش کنترل مثبت: *Streptococcus Pyogenes* ATCC 19615

سوش کنترل منفي: *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813 و آنتروکوک فکالیس

در هر روز کاری، قبل از انجام آزمایش، کنترل کیفی باید با سوش های مثبت و منفی انجام شود.

۷- تداخلات :

قبل از انجام این آزمایش باید مطمئن بود که ارگانیسم مورد نظر استرپتوکوک است یعنی کوکسی گرم مثبت و کاتالاز منفی در اختیار داریم. زیرا ارگانیسم های دیگر مانند بعضی از کوکسی ها، استافیلوکوک ها و استرپتوکوک های ویریدانس نیز PYR مثبت هستند.

آزمایشگاه مرجع سلامت	**دستورالعمل**	کد:**W-LM35/00**
	تهیه کدورت استانداردنیم مک فارلند	صفحه **1** از **1**

۱- هدف:

جهت استاندارد کردن غلظت تلقیح برای آزمایش تعیین حساسیت میکربی، باید از استاندارد سولفات باریوم ($BaSo_4$)، برابر با استاندارد نیم مک فارلند استفاده شود.

۲- مواد و ابزار لازم:

کلرور باریوم دهیدراته، اسیدسولفوریک، مزور ، بالن ژوژه، لوله آزمایش در پیچ دار استریل

۳- روش انجام کار:

استاندارد نیم مک فارلند سولفات باریوم به روش زیر تهیه می شود :

۱) ۰/۵ ml از کلرور باریوم ($BaCl_2$) ۰/۰۴۸ mol/l (%۱/۱۷۵ W/V$BaCl_2.2H_2O$) را به ۹۹/۵ml اسید سولفوریک ۰/۱۸ mol/l (۱ V/V%) اضافه کنید و با هم زدن مداوم سوسپانسیون بدست آورید.

۲) چگالی صحیح کدورت استاندارد با استفاده از اندازه گیری جذب در اسپکترو فوتومتر با طول مسیر نوری ۱cm ، مشخص شود. جذب در ۶۲۵nm باید بین ۰/۰۸ تا ۰/۱۳ باشد.

۳) سوسپانسیون سولفات باریوم باید به مقدار ۴-۶ml در لوله های در پیچ دار هم اندازه با لوله های سوسپانسیون باکتریایی ریخته شود.

۴) درب این لوله ها باید محکم بسته شوند و در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری گردند.

۵) استاندارد سولفات باریوم قبل از هربار استفاده باید به شدت (ترجیحا با ورتکس مکانیکی) همزده شود، تا کدورت یکنواختی ایجادگردد.در صورت مشاهده ذرات بزرگ ، باید استاندارد تازه ای تهیه گردد .

۶) استاندارد سولفات باریوم باید به صورت ماهانه جایگزین شود یا جذب آن اندازه گیری گردد.

۱- هدف :

- نگهداری و استفاده از کشت های ذخیره به روش طولانی مدت و کوتاه مدت به شیوه ای همگون در بخش میکروب شناسی آزمایشگاه
- نگهداری کشت های ذخیره که برای اهداف کنترل کیفی استفاده می شوند، باید به روشی استاندارد شود که احتمال آلوده شدن یا تغییرات خصوصیات کشت به حداقل برسد.

٤- مواد و ابزار لازم :

نیاز به موارد زیر با توجه به نوع سویه مورد نظرجهت ذخیره سازی تعیین میگردد .

- گلیسرول استریل
- کشت خالص میکروب روی محیط جامد مناسب
- لوله های شیشه ای یا پلاستیکی کوچک درپیچ دار استریل
- محیط کشت هارت اینفیوژن آگار خون دار لوله ای درپیچ دار
- روغن معدنی (یا پارافین) استریل
- محیط کشت Cooked Meat لوله ای درپیچ دار
- محیط کشت شکلات آگار لوله ای (Slant) درپیچ دار
- یخچال
- دیپ فریز ۷۰° C- یا فریزر ۲۰ ° C-
- پلیت TSAخون دار
- یک محیط محافظت کننده از سرما مانند TSB یا Skim milk حاوی ۱۵ – ۱۰٪ گلیسرول
- استاندارد نیم ویک مک فارلند

٥- روش انجام آزمایش:

A) نگهداری طولانی مدت :

نگهداری طولانی مدت باکتری ها این امکان را می دهد که نمونه میکروبی، ماه ها و حتی سال ها به صورت زنده باقی بماند. بهترین روش های نگهداری طولانی مدت، لیوفیلیزاسیون و نگهداری در۵۰- تا ۷۰ c – یا پایین تر در دیپ فریز یا در نیتروژن مایع می باشد. با این حال در صورت عدم دسترسی به فریزر با برودت فوق میتوان از فریزرهای خانگی با برودت ۲۰ °c- استفاده نمود. فقط بایستی توجه داشت در سرمای ۲۰ °c- احتمال از بین رفتن باکتری ها بیشتر است .

الف ـ استفاده از گلیسرول در فریزر۲۰ ° c- یا دیپ فریز (۷۰ °c- یا پایین تر)

برای تهیه سوسپانسیون از باکتری مورد نظر اولیه که ممکن است به صورت لیوفیلیزه از یک منبع تجاری مانند ATCC تهیه شود، باید مطابق دستورات سازنده عمل شود.

- با استفاده از یک لوپ استریل، دو یا سه پلیت TSA با ۵٪ خون گوسفند را با این سوسپانسیون تلقیح کنید. این پلیت ها را به مدت ۲٤ – ۱۸ ساعت در محیط و دمای توصیه شده مناسب برای هر باکتری انکوبه نمایید.
- بعد از انکوباسیون، خالص بودن کلنی ها باید چک شده و مورفولوژی کلني ها بررسی شود و در صورت نیاز، آزمایش های شیمیایی انجام گیرد. از نواحی از پلیت که رشد زیادی دارد، تعدادی کلني برداشته و در ml ۱۰۰ – ۵۰ از یک محیط محافظت کننده از سرما (Cryoprotective) سوسپانسیون نمایید. محیط محافظت کننده ممکن است خون گوسفند یا خرگوش دفیبرینه، Skim milk یا TSB حاوی گلیسرول در غلظت نهایی ۱۵ – ۱۰ ٪ باشد.
- حجم کمي (ml ۱- ۰/۵) از سوسپانسیون باکتریایی را در ویال های شیشه ای یا پلاستیکی کوچک توزیع کنید. تعداد کافی ویال ذخیره کشت به مدت یک سال آماده نمایید. قبل از این که ویال ها برای آزمایش کنترل کیفیت به کار برده شوند، خالص بودن آنها باید کنترل شود.
- ویال ها را می توان در دمای کمتر از c °۷۰- به مدت زیادی نگهداری نمود . نگهداری در دمای c °۵۰- تا c °۷۰- برای یک سال و نگهداری سویه ها در دمای c °۲۰- به مدت کوتاهتری امکان پذیر خواهد بود .
- هنگام نیاز، یک ویال از فریزر یا تانک نیتروژن مایع در آورده و سریع محتویات آن را زیر آب جاری ولرم ذوب نمایید. محتویات ویال یا برای شروع انجام آزمایش و یا برای تهیه کنترل کاری (Working Control) به کار می رود. سوسپانسیون استفاده شده باید دور انداخته شود، هرگز برای استفاده بعدی آنها را دوباره فریز نکنید.

کشت های کنترل کاری(Working Control): عبارتست از کشت مجدد از کشت ذخیره فریز شده که برای کنترل کیفیت محیط های کشت استفاده می شود .

- تا ۳ کشت مجدد پشت سرهم از کشت ذخیره فریز شده می توان انجام داد. بعد از انجام حداکثر ۳ کشت مجدد پشت سرهم، آن را با یک کشت ذخیره فریز شده دیگر جایگزین کنید. کشتهای مجدد پشت سرهم به تعداد بیشتر، ریسک تغییرات فنوتیپی باکتری را افزایش می دهد.
- برای تهیه کشت کنترل کاری (Working Control)، یک آگار شیب دار یا پلیت را با کشت ذخیره فریز شده تلقیح کنید و آن را به مدت یک شبانه روز یا تا زمانی که رشد مناسبی به دست آید، انکوبه نمایید. این کشت های پلیت یا آگار شیب دار کنترل کاری(Working Control) را می توان در c °۸-۲ یا در حرارت اتاق تا مدت ٤ هفته نگهداری نمود. بعد از هر ساب کالچر، خالص بودن و مورفولوژی کلنی ها باید کنترل شود.

ب) استفاده از روغن معدنی در حرارت اتاق :

- محیط کشت برین هارت اینفیوژن آگار را با شیب کم در لوله تهیه نمایید. برای باکتری های مشکل پسند، به محیط، خون تازه یا خون حرارت داده شده، اضافه نمایید.

- سپس روغن معدنی (یا پارافین مایع) را در حرارت خشک (۱۷۰ درجه به مدت یک ساعت) استریل نمایید.
- از میکروب مورد نظر روی سطح محیط، کشت دهید.
- بعد از بدست آوردن رشد کافی روغن استریل را به مقدار 1^{cc} روی سطح محیط بریزید.
- در صورت انجام کشت مجدد، نمونه از قسمت زیرین روغن برداشته می شود.
- بعد از ۱۲ – ٦ ماه کشت مجدد تهیه نمایید.

ج) کشت عمقی و نگهداری در حرارت اتاق :

این روش فقط برای باکتری هایی که مشکل پسند نیستند، مانند استافیلوکک و انترباکتریاسه ها به کار می رود.

- محیط کشت آگار بدون کربوهیدرات مانند محیط TSA را با عمق زیاد در لوله، تهیه کنید.
- باکتری را به صورت عمیق(کشت عمقی) در این محیط تلقیح کنید.
- این محیط را ٢٤ ساعت در اتوو 35^oC نگهداری نمایید.
- در لوله را با درپیچ یا چوب پنبه ببندید.
- سپس لوله درپیچ دار را در پارافین مذاب فرو ببرید، طوریکه کاملاً در لوله را بپوشاند.
- کشت ها را در حرارت اتاق نگهداری کنید.
- هر ساله سوش مورد نظر را مجدداً کشت دهید .

د) کشت عمقی روی محیط سیستین تریپتیکیس آگار (CTA) برای نیسریا و استرپتوکک :

- محیط پایه ای CTA را در لوله تهیه نمایید.
- باکتری را به طور عمقی در این محیط کشت دهید.
- محیط را به مدت ۲۴ ساعت در اتوو 35^oC نگهداری کنید.
- در لوله را با چوب پنبه یا درپیچ ببندید.
- سپس لوله درپیچ دار را در پارافین مذاب فرو ببرید، طوریکه که کاملاً در لوله را بپوشاند.
- برای نیسریاها لوله را در 35^oC نگهداری کنید و هر دو هفته یکبار مجددا کشت دهید . برای استرپتوکوک ها لوله را در حرارت اتاق نگهداری کرده و هر ماه مجددا کشت دهید.

ه) محیط کشت Cooked Meat برای باکتری های بیهوازی :

- باکتری را در لوله های حاوی محیط Cooked Meat کشت دهید.
- لوله را به مدت ٢٤ ساعت در اتوو 35^oC قرار دهید.
- در لوله ها را با درپیچ یا چوب پنبه ببندید.
- لوله ها را در حرارت اتاق نگهداری کنید.
- هر ۲ ماه یک بار مجددا کشت دهید.

B) نگهداری کوتاه مدت :

کشت هایی که برای کارهای روتین روزانه استفاده می شوند به روش های زیر نگهداری می شوند :

الف ـ برای باکتری های با رشد سریع :

- سوش مورد نظر را در سطح محیط TSA لوله ای درپیچ دار کشت دهید.
- لوله را به مدت ۲٤ ساعت در اتوو ۳۵°C نکوبه کنید.
- پس از رشد کامل، لوله را در یخچال نگهداری نمایید.
- هر ۲ هفته یک بار مجددا کشت دهید.

ب ـ استرپتوکك ها :

- سوش مورد نظر را در سطح محیط بلاد آگار لوله ای درپیچ دار کشت دهید.
- لوله را به مدت ۲٤ ساعت در ۳۵°C نکوبه کنید.
- پس از رشد لوله را در یخچال نگهداری کنید.
- هر ۲ هفته یک بار مجددا کشت دهید.

ج ـ منگوکک، هموفیلوس :

- سوش مورد نظر را در سطح محیط شکلات آگار لوله ای یا پلیتی کشت دهید.
- لوله یا پلیت را به مدت ۲٤ ساعت در ۳۵°C نکوبه کنید و بعد از رشد در حرارت اتاق نگهداری کنید.
- هر ۲ هفته یک بار مجددا کشت دهید.

د ـ گنوکك :

- سوش مورد نظر را روی شکلات آگار کشت دهید.
- به مدت ۲٤ ساعت در ۳۵°C نکوبه کنید.
- نمونه کشت داده شده را پس از این مدت نیز ، در این درجه حرارت (۳۵°C) نگهداری نمایید.
- هر ۲ روز یک بار تجدیدکشت کنید.

۱- هدف:

تهیه محیط های کشت استریل جهت رشد و جداسازی سویه های میکروبي از نمونه های مربوط به بیمار

۲- تعاریف و اصطلاحات:

شرایط آسپتیک: ایجاد شرایط سترون با کار کردن در کنار شعله و رعایت نکات لازم جهت جلوگیری از آلودگي نمونه

۳- شرح اقدامات:

۳-۱) آب:

آب مورد استفاده باید دارای کیفیت مناسب باشد، یعني عاری از موادی باشد که مي توانند از رشد میکروارگانیسم ها جلوگیری کنند (یونهای فلزی سمي مثل مس) یا در شرایط آزمایش بر رشد آنها تاثیر بگذارند. آب خوب و تازه باید از راه تقطیر یا دیونیزاسیون تهیه شود. برای نگهداری آب مقطر باید از ظروفي استفاده شود که از مواد خنثي تهیه شده اند (شیشه خنثي، پلي اتیلن و غیره). ضریب هدایت آب باید کمتر از µs ۱۵ باشد. pH آب معمولاً کنترل نمي شود مگر آنکه مشکلي در pH محیط های کشت تهیه شده بوجود آید. ممکن است آب دارای مقادیر زیادی میکروارگانیسم باشد، بنابراین توصیه مي شود از آبي استفاده شود که تعداد میکروارگانیسم آن کم است .

۳-۲) توزین محیط کشت و افزودن آب:

طبق دستورالعمل تهیه محیط کشت که بر روی قوطي نصب گردیده است، مقدار مناسبي از پودر محیط کشت را با دقت وزن نمایید. ظرف محیط کشت را دور از کوران هوا و رطوبت باز کنید. از استنشاق پودرها به خصوص آنهایي که دارای مواد سمي هستند و تماس طولاني مدت آنها با پوست اجتناب کنید. پودر را به سرعت، به دقت و بدون ایجاد توده ای از غبار وزن کنید. هرچه زودتر درب ظرف را ببندید.

نصف حجم آب مورد نیاز را داخل ظرف بریزید. سپس مقدار وزن شده محیط کشت را به آن اضافه نمایید. برای چند دقیقه به تندی تکان دهید. باقیمانده آب را به دیواره ظرف بریزید تا ذرات محیط کشت چسبیده به دیواره نیز وارد محلول شوند. این مرحله بسیار مهم است، چون پودر خشک محیط کشت در بالای سطح آب، ممکن است در اتوکلاو استریل نشود و منبع آلودگي گردد.

۳-۳) حل کردن محیط کشت:

محیط های کشت بدون آگار، معمولا با تکان دادن آهسته و ملایم حل خواهند شد. اما محیط های کشت حاوی آگار باید قبل از حرارت دادن به مدت چند دقیقه با آب مخلوط شوند. سپس حرارت داده شوند تا آگار قبل از اتوکلاو کردن، حل شود. محیط های کشت را بجوشانید بدون آنکه بسوزند.

محیط های کشتي که نباید اتوکلاو شوند، بعد از این مقدار حرارت دادن، برای تقسیم داخل پلیت ها یا ظروف دیگر آماده خواهند بود. اکثر محیط های کشت به استریلیزاسیون نهایي (در دمای $121^{\circ}C$ به مدت ۱۵ دقیقه) نیاز خواهند داشت.

۳-۴) استریلیزاسیون:

بعضی از محیط های کشت به استریلیزاسیون با اتوکلاو احتیاجی نداشته و با جوشاندن استریل می شوند که دستور ساخت آنها بر روی برچسب قوطی محیط کشت قید گردیده است. استریلیزاسیون سایر محیط های کشت توسط حرارت مرطوب یا صافی غشایی انجام می گردد که این موارد نیز بر روی بر چسب قوطی محیط کشت قید گردیده است.

الف) استریلیزاسیون با حرارت مرطوب:

استریلیزاسیون محیط کشت تا حجم یک لیتر، در اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای $121^{\circ}C$ (فشار ۱/۲ کیلوگرم بر سانتی متر مربع) انجام می گیرد. برای حجم های بیشتر از یک لیتر باید چرخه استریلیزاسیون را بطور مناسب تغییر داد. اما چون اکثر مشکلات در استریلیزاسیون محیط های کشت وقتی رخ میدهد که مقادیر بیشتر از دو لیتر محیط کشت باید استریل شود، لذا توصیه می شود که مقادیر زیاد محیط کشت را در حجم های کوچکتر تقسیم نمایید.

ب) استریلیزاسیون با صافی غشایی:

از صافی غشایی برای استریل کردن محیط های کشت و ترکیبات حساس به حرارت استفاده می شود. استریلیزاسیون بوسیله صافی غشایی تحت شرایط خلاء یا افزایش فشار انجام می پذیرد. از غشاء ها و صافیهای با قطر منفذ ۰/۲۲ یا ۰/۴۵ میکرومتر استفاده نمایید. این فیلترها باید قبل از استفاده، در اتوکلاو استریل شوند. در مورد غشاء ها و صافیهایی که در بسته بندیهای استریل به فروش می رسند، به دستورالعمل سازنده مراجعه نمایید. قسمت های مختلف دستگاه صافی را با صافی یا بدون صافی در اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه در دمای $121^{\circ}C$ استریل نمایید.

۳-۵) آماده سازی جهت مصرف:

بعد از استریلیزاسیون، زمانیکه دمای محیط کشت به حدود $50^{\circ}C$ رسید، با رعایت شرایط آسپتیک در ظروف نهایی تقسیم نمایید. هیچ وقت محیط کشت را در دمای بالاتر از $50^{\circ}C$ تقسیم نکنید. مکمل های حساس به گرما و حرارت باید بعد از این که دمای محیط کشت به حدود $50^{\circ}C$ رسید، به آن اضافه شوند. دمای مکمل (ساپلمنت) قبل از این که به محیط کشت اضافه شود، به دمای اتاق برسد. سپس مکمل را با رعایت شرایط آسپتیک به محیط کشت اضافه نموده، خوب مخلوط کنید.

۳-۶) توزیع:

سپس در ظروف نهایی که از قبل استریل شده اند، تقسیم نمایید.

۷-۳) اندازه گیری و تنظیم pH:

محیط های کشت دهیدراته اگر بطور مناسب تهیه شوند نیازی به تنظیم pH ندارند. pH نهايي محصول استریل شده را مي توان روی پلیت یا بطری اندازه گیری کرد، اما باید آنها را بعد از سنجش pH دور ریخت. بنابراین بعد از استریل شدن و خنک شدن محیط کشت تا دمای ۲۵° C، مقدار pH را در حد مورد نظر (۰/۲ ±) تنظیم نمایید. تنظیم pH معمولا با استفاده از هیدروکسیدسدیم ۴۰ گرم در لیتر (تقریباً یک مولار) و یا با استفاده از اسید کلریدریک ۳۶/۵ گرم در لیتر (تقریباً یک مولار) انجام مي شود.

دستورالعمل تهیه انواع محیط های کشت، معرفها و رنگ های مصرفي در آزمایشگاه میکروب شناسي، به شرح ذیل می باشد:

روش تهیه انواع محیط های کشت دهیدراته و استریلیزاسیون آنها

روش کار بر اساس دستورالعمل موجود بر روی قوطی های حاوی انواع محیط های کشت مي‌باشد. 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.

محیط های کشت دهیدراته شامل:

آگار بی هوازی، بلاد آگار(B.A)، برین هارت آگار و براث (BHB/BHA)، بایل اسکولین آگار، بیسموت سولفیت آگار، بروسلا مدیوم، کوکدمیت براث، کمپیلوباکتر سلکتیو آگار، کری بلر، کازو آگار و براث (TSA/TSB)، CTA مدیوم، DNase نست 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 براث، مانیتول سالت آگار، مک کانکی آگار، مالونات براث، نوترینت آگار و براث (N.A/N.B)، نیترات براث، اورنی تین دکربوکسیلاز آرژینین دهیدرولاز تست براث، OF بازال مدیوم، پپتون واتر، فنیل آلانین آگار، فنل رد براث و آگار، پپتون آگار، سیمون سیترات 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

Beef Extract = ۳ g

ژلاتین= ۱۲۰ g

مقادیر فوق را به ۱۰۰۰cc 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°C در فشار ۱۵ پوند (۱۵ Lb) استریل نمایید. سپس در لوله تقسیم کرده و PH محیط کشت را به ۶/۸ برسانید

روش تهیه محیط کشت آب پپتونه قلیایی یا APW (ترکیبی)

پپتون= ۱۰g

کلرور سدیم (Nacl)= ۱۰g

آب‌مقطر= ۱۰۰۰cc

سپس pH را به ۹-۸/۶ برسانید و در شرایط ۱۵ دقیقه، فشار ۱۵ Lb در اتوکلاو قرار داده و استریل نمایید. دما نیز ۱۲۱ °C است. (برای تنظیم از سود N ۱ استفاده کنید)

روش تهیه محیط کشت حاوی گلیسرین جهت دیپ فریز

از 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 (۲-۱ ml) در لوله های درپیچ دار تقسیم نموده و در شرایط ۱۲۱ °C ، ۱۵ دقیقه و فشار ۱۵ Lb توکلاو نمایید.

روش تهیه محیط کشت مصرفی در لیوفیلیزاسیون(ترکیبی)

ژلاتین= ۱۰۰g

اینوزیتول = ۵۰g

نوترینت براث= ۲۵ g

مقادیر فوق را به ۱۰۰۰cc آب‌مقطر اضافه کرده و در بن ماری جوش حرارت دهید تا کاملاً حل شوند (از قرار دادن در حرارت مستقیم شعله خودداری شود). در لوله تقسیم کرده و در شرایط فشار ۱۵ Lb، دمای ۱۲۱ °C و مدت زمان ۱۵ دقیقه استریل نمایید.

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

محیط پایه همان محیط برین هارت اینفیوژن براث/آگار است. از آنجا که این محیط کشت حاوی ۰/۵% نمک می‌باشد، بنابراین ۶% نمک به این محیط پایه اضافه نمایید تا مقدار ۶/۵% نمک حاصل شود. شرایط استریلیزاسیون همان دمای ۱۲۱°C، فشار ۱۵ Lb و زمان ۱۵ دقیقه می‌باشد.

روش تهیه انواع قندها:

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

روش استریلیزاسیون قندها استفاده از فیلتراسیون می‌باشد. در غیر اینصورت می توان همه انواع قندها را در فشار ۵ Lb به مدت ۵ دقیقه استریل نمود.

اگر بخواهید قندها را از هم تفکیک نمایید، شرایط استریلیزاسیون برای انواع لاکتوز، مالتوز، گزیلوز، سالیسین، سوکروز، ترهالوز و آرابینوز شامل فشار ۱۵ Lb، دمای ۱۲۱ ^{o}C به مدت ۳ دقیقه و شرایط استریلیزاسیون برای سایر قندها شامل فشار ۱۲-۱۰ Lb، دمای ۱۱۸-۱۱۶ ^{o}C و زمان ۱۵ دقیقه می باشد.

روش تهیه انواع معرف ها و رنگ ها

روش تهیه معرف های VP

- تهیه آلفا نفتول (معرف A):

پودرآلفا نفتول: ۵ g

اتانول: ۱۰۰cc

- تهیه KOH (پتاس) (معرف B):

KOH: ۴۰g

کراتین (cr): ۰/۳ g

آب‌مقطر: ۱۰۰cc

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= ۰/۱ g

اتانول= ۳۰۰cc

پودر متیل رد را در اتانول حل کرده سپس با آب مقطر حجم آنرا به ۵۰۰cc برسانید. معرف در ظرف تیره و در یخچال نگهداری می‌شود. چون دارای پایداری متغیر است، لازم است بطور هفتگی (بر حسب میزان کار) کنترل کیفی گردد.

روش تهیه معرف کواکس

P-دی متیل آمینو بنز آلدئید= ۱۰g

آمیل الکل: ۱۵۰cc

اسید کلریدریک غلیظ و تازه: ۵۰cc

دی متیل آمینو بنزآلدئید را به آمیل لکل 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 می شود. چون دارای پایداری متغیر است، لازم است بطور هفتگی (برحسب میزان کار) کنترل کیفی گردد.

روش تهیه معرف کلرور فریک

کلرور فریک= ۱۰g

آب مقطر = ۱۰۰cc (روش غیر اسیدی)

(روش دیگر تهیه این معرف شامل کلرور فریک: ۱۲g، اسید کلریدریک غلیظ: ۲/۵cc و آب مقطر ۱۰۰cc می‌باشد، که این روش، روش اسیدی است). معرف در ظروف تیره و در یخچال نگهداری می‌شود. چون دارای پایداری متغیر است، لازم است بطور هفتگی (برحسب میزان کار) کنترل کیفی گردد.

روش تهیه معرف های احیاء نیترات

-تهیه معرف A:

N، N دی متیل آلفا نفتیل آمین: ۶g

اسیداستیک گلاسیال۵N، (۳۰%): ۱۰۰۰cc

مقدار فوق از N، N دی متیل آلفا نفتیل آمین را در کمتر از ۱۰۰۰cc اسید استیک گلاسیال ۵N حل کرده و کمی حرارت ملایم دهید تا حل شود. حجم را به یک لیتر رسانیده، محلول را از صافی رد کنید.

-تهیه معرف B:

سولفانیلیک اسید (P- آمینو بنزن سولفونیک اسید): ۸g

اسیداستیک گلاسیال ۵N، (۳۰%): ۱۰۰۰ cc

مقدار فوق از سولفانیلیک اسید را در کمتر از ۱۰۰۰ cc اسیداستیک حل کرده و سپس حجم را به یک لیتر برسانید. معرف ها در ظروف تیره و در یخچال نگهداری می شوند. آلفا نفتیل آمین سرطان زا است.

روش تهیه معرف نین هیدرین

پودر نین هیدرین= ۳/۵ g

استن= ۵۰ cc

بوتانول = ۵۰ cc

استن و بوتانل را مخلوط کرده و سپس پودر نین هیدرین را اضافه نمایید. معرف در ظرف تیره و در دمای اتاق نگهداری می شود. درب آن باید کاملاً محکم بسته شود.

روش تهیه ویتامین K_1

پودر ویتامین k_1 = ۰/۲g

اتانول = ۲۰cc

محلول در ظرف تیره و در یخچال نگهداری می‌شود. درب ظرف باید کاملاً محکم بسته شود. غلظت نهایی محلول ۰/۱ µg/ml برای محیط های مایع و ۱۰µg/ml برای محیط های آگاردار است. ۰/۲g پودر ویتامین K_1 را روی یک قطعه کوچک فویل آلومینیومی استریل وزن کرده و در شرایط آسپتیک به ۲۰ml اتانول در یک بطری استریل اضافه کنید. برای رقیق سازی بیشتر از آب مقطر استریل استفاده کنید. محلول ذخیره ۱۰mg/ml است. ۱ml از محلول ذخیره را به یک لیتر آگار و ۰/۰۱ ml/l براث اضافه کنید. محلول را دور از نور و در یخچال ذخیره کنید.

روش تهیه همین(Haemine)

پودر همین= ۰/۵ g

سود (NaOH) ۱N =۱۰cc

مقدار فوق از پودر همین را به ۱۰ccسود ۱ نرمال اضافه کرده و حل کنید، سپس با آب مقطر به حجم ۱۰۰ccبرسانید. در شرایط ۱۵ دقیقه، ۱۲۱°C، فشار ۱۵ Lb در اتوکلاو استریل نمایید.

محلول در ظرف تیره و در یخچال نگهداری می شود. این محلول ذخیره ۵ mg/ml غلظت دارد، ولی هنگام مصرف به عنوان ساپلمنت، باید دارای غلظت نهایی ۵ µg/ml باشد.

روش تهیه آب اکسیژنه (H_2O_2) ۳%

محلول آب اکسیژنه ۳۰٪ را به نسبت ۱:۱۰ با آب مقطر رقیق نمایید. (یعنی ۱cc آب اکسیژنه ۳۰٪ را به ۹cc 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 = ۲۰g

اتانول= ۱۰۰cc

-تهیه اگزالات آمونیوم

پودر اگزالات آمونیوم= ۱g

آب مقطر= ۱۰۰cc

هنگام مصرف، محلول کریستال ویوله ذخیره را به نسبت ۱:۱۰ با آب مقطر رقیق نمایید. (۱cc از محلول کریستال ویوله و ۹ cc آب مقطر) سپس این محلول را با چهار حجم از محلول اگزالات آمونیم رقیق کنید (۱cc محلول کریستال ویوله رقیق شده و ۴cc اگزالات آمونیم).

محلول ذخیره و مصرفی کریستال ویوله، در ظرف تیره و در دمای اتاق نگهداری می‌شود.

روش تهیه لوگل

ید= ۱g

یدور پتاسیم = ۲g

آب مقطر= ۲۴۰cc

محلول آبی بیکربنات سدیم۵%= ۶۰cc

در مقدار کمی از آب مقطر، ید و یدور پتاسیم را کاملاً حل نمایید، بعد حجم را با آب مقطر به ۲۴۰cc برسانید.

محلول ۵% بیکربنات سدیم (بیکربنات سدیم: ۵g آب مقطر: ۱۰۰c) را نیز به آن اضافه نمایید. محلول در دمای اتاق نگهداری می شود . درب آنرا باید کاملا" محکم ببندید.

روش تهیه محلول الکل-استون

اتانول= ۲۵۰cc

استون= ۲۵۰cc

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

روش تهیه فوشین/ یا سافرانین ذخیره

پودر فوشین= ۲g

اتانول= ۱۰۰cc

و یا

پودر سافرانین= ۲/۵g

اتانول= ۱۰۰cc

به هنگام مصرف، محلول ذخیره فوشین یا محلول ذخیره سافرانین را به نسبت ۱:۱۰ با آب مقطر رقیق نمایید.

محلولها در ظروف تیره، تهیه و در دمای اتاق ذخیره می شوند.

آزمایشگاه مرجع سلامت

جدول راهنمای مدیریت پسماندهای آزمایشگاهی

پسماندهای عفونی (تفکیک در مبدأ تولید از انواع پسماندهای دیگر)		
نوع پسماند	**طریقه آمایش**	**نحوه دفع**
ظروف یکبار مصرف حاوی کشت میکروبی	قرار دادن در کیسه مخصوص اتوکلاو و سپس اتوکلاو نمودن تحت شرایط استاندارد	دفع در کیسه زباله ضخیم سیاه رنگ
لوله‌های یک بار مصرف حاوی لخته خون، سرم و یا دیگر مایعات بدن	ترجیحاً قرار دادن در کیسه مخصوص اتوکلاو، و اتوکلاو نمودن و یا در صورت رعایت اصول ایمنی تخلیه لخته و مایعات بدن (در صورت حجم زیاد) در سینک مخصوص. این کار با جریان ملایم آب و قرار دادن در محلول سفید کننده خانگی با رقت ۱/۱۰ به مدت حداقل یک ساعت و یا حمل در شرایط استاندارد توسط شهرداری و آمایش در پسماندسوز و یا دفن بهداشتی در عمق زمین	دفع در کیسه زباله ضخیم سیاه‌رنگ، دفع در کیسه زباله زرد رنگ (با علامت خطر زیستی) جهت حمل توسط شهرداری
ظروف حاوی ادرار	با رعایت اصول ایمنی، تخلیه در سینک مخصوص این کار با جریان ملایم آب و سپس ترجیحاً اتوکلاو نمودن و یا قرار دادن در ماده ضد عفونی کننده و یا حمل در شرایط استاندارد توسط شهرداری و آمایش در پسماندسوز و یا دفن بهداشتی در عمق زمین	دفع در کیسه زباله ضخیم سیاه‌رنگ، دفع در کیسه زباله زرد رنگ (با علامت خطر زیستی) جهت حمل توسط شهرداری
دستکش آلوده به خون و یا سرم، پنبه آلوده به خون، سواب و اپلیکاتور آلوده، دیسک‌های تشخیصی آلوده و نظایر آن	قرار دادن در کیسه مخصوص اتوکلاو و سپس اتوکلاو نمودن تحت شرایط استاندارد و یا حمل در شرایط استاندارد توسط شهرداری و آمایش در پسماندسوز و یا دفن در زیر زمین طبق شرایط استاندارد (در مورد سواب، اپلیکاتور آلوده و دیسک‌های تشخیصی آلوده، می‌توان قبل از حمل توسط شهرداری، آنها را در محلول سفید کننده خانگی با رقت ۱/۱۰ قرار داد.)	دفع در کیسه زباله ضخیم سیاه‌رنگ، دفع در کیسه زباله زرد رنگ (با علامت خطر زیستی) جهت حمل توسط شهرداری
نوار ادرار استفاده شده	قرار دادن در محول سفید کننده خانگی با رقت ۱/۱۰ به مدت حداقل یک ساعت و یا حمل در شرایط استاندارد توسط شهرداری و آمایش در پسماندسوز یا دفن بهداشتی در عمق زمین	دفع در کیسه زباله زرد رنگ (با علامت خطر زیستی) جهت حمل توسط شهرداری
پسماندهای تیز و برنده آلوده و غیرآلوده	قرار دادن در ظروف ایمن (Safety Box) و اتوکلاو نمودن	دفع در کیسه زباله ضخیم سیاه رنگ
سرنگ‌ها	ترجیحاً قرار دادن در ظروف ایمن (Safety Box) و یا قرار دادن در کیسه مخصوص اتوکلاو و سپس اتوکلاو نمودن تحت شرایط استاندارد	دفع در کیسه زباله ضخیم سیاه رنگ
نمونه‌های مدفوع	حمل در شرایط استاندارد توسط شهرداری و آمایش در پسماندسوز (ریختن فرمالین ۵ یا ۱۰ درصدر در ظرف مدفوع حاوی انگل به نسبت سه به یک و نگه‌داری به مدت حداقل نیم ساعت از ایجاد آلودگی در زمان حمل و نقل و دفع جلوگیری می‌نماید)	دفع در کیسه زباله زرد رنگ (با علامت خطر زیستی) جهت حمل توسط شهرداری

آزمایشگاه مرجع سلامت

جدول راهنمای مدیریت پسماندهای آزمایشگاهی

پسماندهای شیمیایی (تفکیک در مبدأ تولید از انواع پسماندهای دیگر)		
نوع پسماند	**طریقه آمایش**	**نحوه دفع**
کیت‌های تشخیصی و یا کیت‌های تاریخ گذشته	دفع طبق توصیه شرکت تولید کننده، توزیع‌کننده و یا وارد کننده و یا رقیق‌سازی با آب و دفع در فاضلاب	
پسماندهای شیمیایی پر خطر	دفع طبق توصیه شرکت تولیدکننده، توزیع کننده و یا وارد کننده و یا جمع‌آوری به طور جداگانه در ظروف شیشه‌ای و پلاستیکی و رقیق‌سازی با آب، خنثی‌سازی با مواد خنثی کننده و استفاده از روش‌های دیگر طبق توصیه شرکت سازنده و یا وارد کننده و سپس دفع در فاضلاب	

پسماندهای پرتوزا (تفکیک در مبدا تولید از انواع پسماندهای دیگر)		
نوع پسماند	**طریقه آمایش**	**نحوه دفع**
پسماندهای مایع و جامد پرتوزا	رقیق‌سازی با آب و دفع در فاضلاب، ذخیره‌سازی جهت تجزیه و یا حمل توسط سازمان انرژی اتمی ایران	

پسماندهای عادی و یا خانگی (تفکیک در مبدأ تولید از انواع پسماندهای عفونی، تیز و برنده، شیمیایی، رادیواکتیو و نظایر آن)		
نوع پسماند	**طریقه آمایش**	**نحوه دفع**
پسماندهای جامد یا مایع بخش‌های غیرفنی و اداری و آبدارخانه	این گروه از پسماندها باید در محل تولید از پسماندهای عفونی جدا شوند، در غیر اینصورت در گروه پسماندهای عفونی قرار می‌گیرند	دفع در کیسه زباله ضخیم سیاه رنگ

نحوه شستشوی وسایل آلوده شامل:		
پلیت‌ها و لوله‌های شیشه‌ای حاوی کشت میکروبی	قرار دادن در کیسه مخصوص اتوکلاو و اتوکلاو نمودن تحت شرایط استاندارد و سپس شستشو و قرار دادن در فور جهت سترون‌سازی	
لوله‌ها و یا سایر ظروف شیشه‌ای حاوی لخته خون، سرم و یا دیگر مایعات بدن	ترجیحاً قرار دادن در کیسه مخصوص اتوکلاو و اتوکلاو نمودن و یا در صورت رعایت اصول ایمنی تخلیه لخته و یا مایعات بدن (در صورت حجم زیاد) در سینک با جریان ملایم آب و قرار دادن در ماده سفیدکننده خانگی با رقت ۱/۱۰ به مدت حداقل یک ساعت، سپس شستشو و قرار دادن در فور جهت سترون‌سازی	

اتوکلاو

اگر چه اتوکلاو بهترین وسیله برای استریلیزاسیون است، باید تصدیق کنیم که طولانی شدن مرحلهٔ گرمایی، سبب کاهش کیفیت مواد مغذی در محیط های کشت کمپلکس محتوی قند، مواد معدنی و فلزی می شود و در نتیجه به محیط های کشت زیان وارد می کند. بنابراین در چرخهٔ استریلیزاسیون باید از زمان کوتاهتر و دمای بالاتر استفاده کنیم تا علاوه بر آنکه آسیب کمتری به محیط کشت وارد می شود، برای ارگانیسم نیز کشنده تر باشد.

چرخهٔ استریلیزاسیون

- مرحلهٔ ۱ : زمان بالا رفتن دما در محفظهٔ اتوکلاو (۲۰ ˚C-۱۲۱˚C)
- مرحلهٔ ۲ : زمان نفوذ گرما به داخل ظرف محیط کشت (۱۰۰˚C <-۱۲۱˚C)
- مرحلهٔ ۳ : زمان نگهداری در دمای مقرر (۱۲۱˚C)
- مرحلهٔ ۴ : زمان پایین آمدن دمای محفظه (۸۰˚C-۱۲۱˚C)

انواع استریلیزاسیون

- استریلیزاسیون محیط های کشت و محلول ها
- استریلیزاسیون مواد مصرفی آلوده
- استریلیزاسیون مواد خشک بسته بندی شده

استریلیزاسیون محیط های کشت و محلولها

- بهتر است از لوله و ارلن درپیچ دار استفاده شود. بیشتر از ۲/۳ آنها را پر نکنید. درپیچ آنها را شل کنید.
- از قرار دادن اشیاء بر روی یکدیگر بپرهیزید. باید فاصلهٔ اشیاء از یکدیگر و از دیواره های اتوکلاو حداقل ۵ سانتي متر باشد تا بخار جریان یابد.
- درب اتوکلاو را ببندید. زمان و دما را طبق دستور شرکت سازنده (معمولاً ۱۵ دقیقه در ۱۲۱˚C) تنظیم کنید.
- در بعضی از محیط های کشت که به دمای بالا حساس هستند (محتوی مقدار قند بالا یا عوامل مهار کننده مثل دزوکسی کولات سدیم یا نمکهای صفراوی هستند) تحت تأثیر دمای بالا، pH محصول نهایی کاهش می یابد.

- دمای استریلیزاسیون به دمای چمبر اتوکلاو برمیگردد نه به دمای محیط کشت. زمان لازم برای رسیدن به این دما باید در حد ممکن کوتاه باشد.
- چرخهٔ استریلیزاسیون باید متناسب با زمان نفوذ گرما در نظر گرفته شود. برای مثال محتویات یک ظرف یک لیتری محیط کشت باید طی ۱۵ دقیقه از زمان رسیدن محفظه به دمای ۱۲۱°C، به این دما برسد.

استریلیزاسیون مواد مصرفی آلوده

- مواد مصرفی آلوده را جدا نموده و در کیسه های قابل اتوکلاو شدن قرار دهیدو بر روی آنها برچسب Biohazardنصب کنید.
- برای اطمینان از نفوذ بخار به همهٔ قسمتهای کیسه، یا گرهٔ آنرا شل کنید یا قبل از محکم کردن گره، یک پیمانه (۰/۳ لیتر) آب به آن اضافه کنید. بیش از ۳/۴ کیسه را پر نکنید.
- برای جلوگیری از مسدود شدن آبگذر اتاقک اتوکلاو توسط آگار مذاب، کیسه ها را داخل سطل قرار دهید.
- زمان لازم برای استریلیزاسیون زباله، ۶۰-۳۰ دقیقه در ۱۲۱°Cیا ۳۰-۱۵ دقیقه در ۱۳۴°C می باشد.
- وقتی آگار ذوب شده، سفت شد آنرا مثل زبالهٔ طبیعی دور بریزید. اما محیط کشت محتوی سلنیت را باید بصورت زبالهٔ مخصوص منهدم کنید.

استریلیزاسیون مواد خشک بسته بندی شده

- بسته ها را طوری در اتوکلاو قرار دهید که حداکثر چرخش بخار در بین آنها ایجاد شود و با دیواره های اتوکلاو نیز تماسی نداشته باشند.
- زمان لازم برای استریلیزاسیون مواد خشک بسته بندی شده ، ۲۵ دقیقه با خروج سریع بخار یا ۳۰ دقیقه بدون خروج بخار در دمای ۱۲۱°C می باشد.

نحوهٔ نگهداری

- روزانه: صفحهٔ کف اتوکلاو را از سوراخ آبگذر اتاقک جدا کرده، تمیز کنید. لوازم فرعی مثل طبقات و سینی ها را با آب و صابون بشویید. سطح آب ژنراتور را کنترل کنید.
- هفتگی: آبگذر و درزها را تمیز کنید. سوپاپ اطمینان را بررسی کنید.
- ماهانه: آب دستگاه را تعویض نمایید.
- هر ۳ ماه: داخل و خارج دستگاه و قسمت بیرونی آبگذر را تمیز کنید.
- هر ۶ ماه: دستگاه توسط نمایندهٔ سرویس تعمیر، بازرسی شود.

کنترل کیفیت

تست شیمیایی:

- نوار کاغذی TST: سه عامل زمان، بخار و دما را کنترل می کند و از زرد به بنفش تغییر رنگ می دهد. در هر سری کاری از این نوار استفاده کنید.
- برچسب Sterility-Record: علاوه بر سنجش استریلیتی، امکان ثبت تاریخ استریلیزاسیون، نام فرد استریل کننده و نام محیط کشت بر روی این برچسب وجود دارد. در هر سری کاری از این برچسب استفاده کنید.

تست بیولوژیک:

استفاده از ویال حاوی اسپور باسیلوس استئاروترموفیلوس ATCC 7953 بطور هفتگی توصیه می شود.

ایمنی

- از دستکش مقاوم به حرارت و محافظ چشم استفاده کنید.
- بعد از آنکه فشار اتاقک اتوکلاو به صفر و دمای آن به حدود ۶۰ °C رسید کنار درب اتوکلاو بایستید و آنرا باز کنید. منتظر بمانید تا ظروف کمی خنک شوند، سپس آنها را حمل کنید.
- هرگز در هنگام روشن بودن دستگاه اقدام به بارگذاری یا خارج نمودن وسایل و مواد ننمایید.
- هرگز در هنگام روشن بودن دستگاه و اتصال آن به پریز اقدام به تمیز نمودن آن نکنید.
- هرگز پیچ های محکم کنندهٔ درب را در هنگام کار دستگاه شل و سفت نکنید.

فور(اون)

اون برای استریل کردن موادی که نمی توانند بطور کامل تحت نفوذ بخار قرار گیرند، اما می توانند دمای بالای مورد نیاز مثل ۱۸۰°C - ۱۶۰ را تحمل کنند، به کار می رود. اون بویژه برای ظروف شیشه ای مثل لوله آزمایش، پتری دیش، پی پت و نیز برای آلات فلزی مثل پنس، اسکالپل و قیچی به کار می رود.

اون باید دارای فن (جهت چرخش هوای متراکم در سراسر اتاقک)، نشانگر درجه حرارت، ترموستات و تایمر، طبقات مشبک، قفل داخلی درب و عایق بندی مناسب جداره ها باشد.

استریلیزاسیون در اون

۱- برای بسته بندی وسایل فوق‌الذکر جهت استریل نمودن آنها در اون میتوان از فویل آلومینیومی یا کاغذ کرافت و سربطریهای پنبه ای استفاده نمود.

۲- باید دقت شود که کاغذ و پنبه نسوزند چون پنبهٔ نیم سوز مواد ضد باکتری فرّاری را متصاعد مي كند.

۳- حدود ۲ سانتی متر از انتهای فوقانی پی پتها را با پنبهٔ غیر جاذب ببندید و آنها را در ظروف فلزی قرار داده، درب آنها را ببندید.

۴- درپوش لوله های آزمایش را با کاغذ آلومینیومی بپوشانید و آنها را بطور عمودی در جا لوله ای قرار دهید. درپوش، لبهٔ لوله را از آلودگی از طریق هوا در طی ذخیره سازی حفظ می کند.

۵- در صورتی می توان بطری های درپیچ دار را در اون استریل نمود که درپوش و آستری آنها از موادی مثل فلز، پلی‌پروپیلن یا لاستیک سیلیکون ساخته شده باشد تا در دمای استریلیزاسیون از شکل طبیعی خارج نشود.

۶- پودر، روغن، چربی و گریس مثل Petroleum Jelly را در ظرف شیشه ای یا فلزی ودر اندازه های کوچک که از وزن ۱۰ گرم یا عمق یک سانتی متر تجاوز نکند، استریل نمایید.

۷- قبل از قرار دادن ظروف شیشه ای در اون، از خشک بودن آنها مطمئن شوید. مواد را به گونه ای در اون قرار دهید که هوای داغ در اطراف و مابین آنها در جریان باشد.

۸- زمان نگهداری استریلیزاسیون از زمانی آغاز می شود که اتاقک به دمای استریل انتخابی برسد و نیز مدتی هم بیشتر درنظر گرفته می شود تا همهٔ قسمتهای اتاقک و مواد داخل آن به دمای مورد نظر برسند(۱۶۰-۱۸۰°C به مدت ۲ ساعت).

۹- به دلیل عایق بودن دستگاه، چند ساعت طول می کشد تا اشیاء داخل آن خنک شود، مگر آنکه مجهز به فن باشد. درب اون را باز نکنید تا اتاقک، ظروف و مواد داخل آن تا دمای حدود ۶۰°C خنک شوند. اگر هوای سرد ناگهان وارد دستگاه شود ممکن است ظروف شیشه ای ترک بخورند.

نحوهٔ نگهداری :

بطور ماهانه داخل آن تمیز وهر ۶ ماه توسط نمایندهٔ سرویس تعمیر، بازرسی شود.

کنترل کیفیت :

تست شیمیایی: ویال شیشه ای Browne و مشاهدهٔ تغییر رنگ مناسب از قرمز به سبز. از این ویال در هرسری کاری استفاده کنید.

تست بیولوژیک: استفاده از نوار کاغذی حاوی اسپور باسیلوس سوبتیلیس واریتهٔ نایجر ATCC 9372 بطور هفتگی توصیه می شود.

ایمنی:

استفاده از دستکش مقاوم به حرارت و محافظ چشم.

انکوباتور

انکوباتور محفظه عایق بندی شده ایست که برای نگهداری دما و رطوبت کنترل شده محیط برای رشد میکروارگانیسم ها نیاز است . بعضی انکوباتورها برای نگهداری میزان دلخواه از CO_2 برای میکروارگانیسم هایی که دی اکسید کربن دوست (Capnophilic) هستند، تجهیز شده اند.

الف _ انکوباتورهای بدون CO_2:

- تنظیم کننده دما را روی دمای مورد نظر قرار دهید.
- وقتی درجه حرارت به دمای مورد نظر رسید، دما را در هر روزکاری که از انکوباتور استفاده می‌شود، روی برگه QC ثبت کنید.
- نمونه ها را به طور ایمن روی سینی ها یا قفسه ها قرار دهید.
- می توانید با قراردادن یک تشتک پر از آب متناسب با اندازه اتاقک در کف انکوباتور ، محیط مرطوب ایجاد نمایید .

ب _ انکوباتورهای CO_2 دار:

- سطح دما و CO_2 در برگه QC در هر روز استفاده ثبت می شوند.

نکته:

در صورت اتمام کپسول گاز CO_2، تا زمان شارژ مجدد آن می توانیم جهت انکوباسیون نمونه های نیازمند CO_2 از کندل جار بصورت جایگزین استفاده نماییم.

نحوه نگهداری:

- همه انکوباتورها باید به طورماهانه با محلول صابون ملایم تمیز شوند.
- به منظور رعایت موارد ایمنی، کپسولهای CO_2 باید به صورت ایستاده با زنجیر سنگین به دیوار محکم شود. زمانیکه از سیلندرها استفاده نمی شود ، سوپاپها و درپوشها باید به طور محکم بسته شوند. سیلندرهای خالی را روی حمل کننده سیلندر گازبه طور محکم با زنجیر نگهداری کنید . هرگز سیلندرهای گاز را در دمای بالاتر از ($۵۲^{O}C$) $۱۲۵^{O}F$ نگهداری نکنید . سیلندرها را در وضعیت افقی قرار ندهید.

الف _ انکوباتورهای بدون CO_2:

زمانیکه دمای انکوباتور خارج از محدوده قابل قبول برای واحد مورد نظر باشد ، باید اقدامات اصلاحی باید مطابق موارد ذیل انجام شود:

- منبع برق ، پریز برق و Circuit Panel را بررسی کنید.
- دمای تنظیمی (Set Point) را بررسی کنید.
- اگر دستگاه هنوز درست کار نمی کند، به نماینده سرویس دهنده اطلاع دهید.

ب _ انکوباتورهای CO_2 دار:

یک کشت از نیسریا گونوره در انکوباتور قرار دهید. هر روز آن را پاساژ داده و رشدش را بررسی نمایید. این ارگانیسم به CO_2 نیاز کامل دارد.

آزمایشگاه مرجع سلامت	(پیش نویس) **نحوه آمایش و امحاء پسماندهای آزمایشگاهی(۱)**	**کد: پیش نویس** **صفحه1 از 4**

برنامه مدیریت پسماند شامل مراحل **تفکیک** (جداسازی) درمحل تولید، **جمع آوری وبرچسب گذاری، حمل ونقل تامحل بی خطرسازی، مرحله بی خطرسازی یا آمایش (Treatment)، بسته بندی ، ذخیره (انبارش) موقت، حمل ونقل ازمحل تولید وبارگیری ونیز مرحله دفع نهایی** می باشد. که در این مبحث، ما به مرحله آمایش و دفع نهایی (امحاء) از مراحل مدیریت پسماند ونیز فرآیند شستشو می پردازیم.

نوع پسماند:

۱- پسماندهای عادی ویا خانگی : این گروه از پسماندها باید در محل تولید ازپسماندهای عفونی جداشوند، درغیر این صورت در گروه پسماندهای عفونی قرار می گیرند . همچنین این نوع پسماندها باید از انواع پسماندهای تیزوبرنده، شیمیایی، رادیواکتیو و نظایر آن درمبداء تولید تفکیک شوند. وگرنه تمامی حجم پسماند آلوده تلقی می شود.این گونه پسماندها در کیسه های ضخیم سیاه رنگ دفع می شوند.

۲- پسماندهای عفونی :حاوی تعداد کافی باکتری ، ویروس ، قارچ ،انگل وغیره برای ایجاد بیماری می باشند . مانندسرم و سایر مایعات آلوده بدن، مدفوع، کشتهای میکروبی، اجسام تیزوبرنده آلوده، سواب آلوده ، حیوانات آزمایشگاهی آلوده درآزمایشگاههای تحقیقاتی وغیره

به تفکیک نحوه مدیریت پسماندهای عفونی ونیز فرآیند شستشو در مورد وسایلی که وارد چرخه کاری می شوند، به طریق ذیل می باشد:

آمایش ودفع پسماندهای آلوده :

تمامی **ظروف یک بار مصرف حاوی محیط های کشت میکروبی** باید در کیسه مخصوص اتوکلاو (ترجیحاً زرد رنگ وبا علامت خطر زیستی) قرار داده شده و تحت شرایط استاندارد آنها را اتوکلاو نموده وسپس در کیسه زباله ضخیم سیاه رنگ دفع شوند.

لوله های یک بار مصرف حاوی لخته خون ، سرم ودیگر مایعات بدن را ترجیحاً در کیسه مخصوص اتوکلاو قرار داده و اتوکلاو نموده ودر کیسه زباله ضخیم سیاه رنگ دفع می نماییم ویا در صورت رعایت نمودن اصول ایمنی، لخته ومایعات بدن (با حجم زیاد) را در سینک مخصوص این کار با جریان ملایم آب تخلیه نموده وسپس در ماده سفید کننده خانگی با رقت ۱/۱۰به مدت حداقل یک ساعت قرار می دهیم ویا در شرایط استاندارد توسط شهرداری حمل و در پسماند سوز آمایش گردیده ویا در زیر زمین دفن بهداشتی می شود.وسایل فوق جهت حمل درکیسه زباله زرد رنگ(با علامت خطر زیستی) قرار می گیرند.

دستکش آلوده به خون ویا سرم، پنبه آغشته به خون، سواب واپلیکاتور آلوده، دیسک های تشخیصی آلوده ونظایر آن را را در کیسه مخصوص اتوکلاو، قرارداده و تحت شرایط استاندارد اتوکلاو نموده و در کیسه زباله ضخیم سیاه رنگ دفع می نماییم ویا درکیسه زباله زرد رنگ(با علامت خطر زیستی) جهت حمل در شرایط استاندارد توسط شهرداری قرار داده و در پسماند سوزآمایش شده ویا در زیر زمین دفن بهداشتی می شود. (در مورد سواب ، اپلیکاتور ، دیسک های تشخیصی آلوده ونظایر آن می توان قبل از حمل توسط شهرداری آنها رادر محلول سفید کننده خانگی با رقت ۱/۱۰قرار داد.)

نوارادراراستفاده شده را در محلول سفید کننده خانگی با رقت ۱/۱۰به مدت حداقل یک ساعت قرار داده و ویا درکیسه زباله زرد رنگ(با علامت خطر زیستی) قرار داده ودر شرایط استاندارد توسط شهرداری حمل و در پسماند سوز آمایش شده ویا در زیر زمین طبق شرایط استاندارد دفن می شود.

از آنجا که **مدفوع** می تواند به عنوان یک منبع مهم ویروس، باکتری و انگل وغیره محسوب شود، معمولاً جهت آمایش نمونه های مدفوع باید از روش سوزانیدن استفاده شودبنابراین ترجیحاً باید ظروف حاوی نمونه های مدفوع در شرایط استاندارد توسط شهرداری حمل و در پسماند سوزآمایش شود. به منظور جلوگیری از ایجاد آلودگی در زمان حمل ونقل ودفع ، محلول فرمالین ۵ یا ۱۰ در صد در ظرف مدفوع حاوی انگل به نسبت سه حجم فرمالین و یک حجم مدفوع ریخته و به مدت حداقل نیم ساعت آن را نگهداری می نماییم وسپس آنها را جهت حمل توسط شهرداری درکیسه زباله زرد رنگ(با علامت خطر زیستی) قرار می دهیم .

نباید بیش از سه چهارم حجم کیسه ها ی حاوی پسماند پر شود، تا بتوان به آسانی درآنها را بست. بدیهی است که مایعات نباید مستقیما در داخل کیسه ریخته شوند، بلکه باید ظروف حاوی آنها در کیسه قرار گیرد. درصورت لزوم جهت دفع پسماند، می توان ازدوکیسه استفاده نمود.

باید بوسیله استفاده از اندیکاتورهای شیمیایی وبیولوژیکی از صحت عملکرد دستگاه اتوکلاو در مورد پارامترهای زمان، درجه حرارت وفشاراطمینان حاصل نمود.

۳- پسماندهای تیزوبرنده : این گونه پسماندها می توانندر بدن ایجاد جراحت نمایند مانندسرسوزن، لانست ،تیغه اسکالپل، تیغه میکروتوم، شیشه های شکسته، لوله های مویینه(میکروهماتوکریت)، سرسمپلر،لام، اسلایدهای رنگ آمیزی شده و غیره که می توانند**آلوده** و**یاغیرآلوده** باشند. این گونه پسماندها باید درظروف ایمن (Safety Box) ریخته شوند. این ظروف باید دربرابرضربه و سوراخ شدگی مقاوم باشند.در آنها کاملاً بسته شده و نشت ناپذیر بوده و قابل اتوکلاو شدن باشند . وقتی که سه چهارم محفظه پرشد، اتوکلاو و سپس به طریقه بهداشتی دفع شوند.

سرسوزن ها ترجیحاً همراه با سرنگ ها درمحفظه مقاوم (ظروف ایمن) قرارداده شوند. در غیر این صورت جهت جدا نمودن سرسوزن از سرنگ باید از محل های تعبیه شده در قسمت در این ظروف استفاده کرد وسرنگ ها رادر کیسه مخصوص اتوکلاو قرار داده واتوکلاو نموده ودر کیسه زباله ضخیم سیاه رنگ دفع می نماییم.

همچنین نباید اقدام به شکستن، بریدن ویا خم کردن سر سوزن ها نمود، زیرا خطر فرورفتن سر سوزن وایجاد آئروسل وجود دارد.

نحوه دورریز تیغ های برنده در تجهیزاتی مانند میکروتوم وکرایواستات نیز باید مورد توجه قرار گیرد و تیغ ها ی غیرقابل استفاده درظروف ایمن قرار داده شده و دفع گردد.

- **نکته مهم : پسماندهای تیز وبرنده نباید درکیسه های پلاستیکی جمع آوری شوند. پسماندهای تیزوبرنده آلوده علاوه برخطر بریدگی وایجاد جراحت، خطر انتقال آلودگی را نیز به دنبال دارند.**

۴- پسماندهای شیمیایی : شامل انواع موادومعرفهای آزمایشگاهی،کیتهای تشخیصی، موادضدعفونی کننده، مواد خورنده وسوزاننده ، موادآتش زا، سمی ، سرطان زا، واکنش زا، قابل انفجار و غیره می باشند.

پسماندهای شیمیایی در سه گروه کم خطر و پرخطر وبی خطر قرار می گیرند و مرحله تفکیک باید در باره این پسماندها نیز به خوبی اجرا شود.

پسماندهای **کم خطر** : حاصل کار با برخی از محلول ها وکیتهای تشخیصی بوده وهمچنین کیت های تاریخ گذشته را نیزشامل می شود. که باید طبق توصیه شرکت سازنده ویا وارد کننده با توجه به برگه اطلاعات ایمنی مواد شیمیایی

(Material Safety Data Sheet = MSDS)

موجود درکیت عمل نمود ویاجهت **آمایش** پسماندهای شیمیایی حاصل از کار با کیت های تشخیصی می توان آنها را بامقادیرزیادی آب رقیق کرده ودر فاضلاب دفع نمود. باید توجه نمود که قبل از این عمل نباید پسماندها باهم مخلوط شوند. ترجیحاً یک سینک مخصوص به این امر اختصاص داده شود.

پسماندهای شیمیایی **پرخطر** : حاصل کار با مواد شیمیایی قابل انفجار، قابل اشتعال، خورنده، سوزاننده، سمی ، بسیار سمی ،واکنش زا، سرطان زا ،التهاب زاو مضرمی باشد. که برای دفع انها باید طبق توصیه شرکت سازنده ویا وارد کننده با توجه به برگه اطلاعات ایمنی مواد شیمیایی(MSDS) مربوطه عمل نمود. همچنین آزمایشگاه ها می توانند با توجه به نوع پسماند، آنها را در ظروف شیشه ای و یا پلاستیکی مقاوم به طور جداگانه جمع آوری نموده وسپس طبق توصیه مراکزتولیدکننده، توزیع کننده ویاواردکننده موادشیمیایی اقدام به رقیق سازی با آب، خنثی سازی با مواد خنثی کننده وروش های دیگربر حسب نوع ماده نمایند. اجرای این مراحل نیاز به برنامه های آموزشی دارد.

پسماندهای **بی خطر** : حاصل کاربا موادی مانند اسیدهای آمینه، قندها وغیره می باشند که خصوصیات پسماندهای کم خطرو پرخطر را ندارند.

۵- پسماندهای پرتوزا

پسماندهای پرتوزا شامل مواد و وسایلی هستند که آلوده به موادپرتوزا می باشند. مسئولیت برنامه ریزی در مورد چگونگی مدیریت پسماندهای پرتوزا وحمل ونقل ودفع این مواد به عهده سازمان انرژی اتمی است.

میزان ونحوه دفع پسماندهای پرتوزا باید طبق قوانین سازمان باشد واگر میزان پسماند تولیدی بسیار زیاد باشد، سازمان در ارتباط با نوع وحجم این گونه پسماندها ، خودرا موظف به حمل آنها می داند.

نکته مهم این است که پسماندهای آلوده به موادپرتوزا باید در مبدأ تولید، از سایر پسماندها **تفکیک** شوند، زیرا در غیر این صورت کلیه پسماندهای تولید شده جزء پسماندهای پرتوزا تلقی می گردند. **بسته بندی و جمع آوری** پسماندهای پرتوزا باید با استفاده از ظروف مورد تایید سازمان انرژی اتمی ایران استفاده شودکه این ظروف باید دارای برچسب مخصوص حاوی علامت خطر اشعه وهمچنین نوع پسماند باشند.

معمولاً درآزمایشگاههای تشخیص طبی ایران از روش های **دفع در فاضلاب، ذخیره جهت تجزیه و یا حمل توسط سازمان انرژی اتمی** استفاده می شود. معمولاً **دفع پسماندهای مایع پرتوزا** در فاضلاب انجام می شود که باید ازسینک مخصوص این کار استفاده شود و قبل از دفع، متناسب با میزان و غلظت پسماند ، باآب رقیق گردد . این سینک باید با علائم هشدار دهنده خطر اشعه مشخص شود.

باید توجه نمود که اگر نیمه عمر ماده پرتوزا کوتاه بوده و با نگهداری صحیح تجزیه می گردد، نباید از طریق سیستم فاضلاب دفع شود، بلکه باید مطابق با استانداردهای سازمان در محل مخصوصی جهت فرآیند تجزیه **ذخیره** شود.

آزمایشگاه مرجع سلامت	(پیش نویس) **نحوه آمایش و امحاء پسماندهای آزمایشگاهی(۱)**	**کد: پیش نویس** **صفحه4 از 4**

نحوه شستشوی وسایل آلوده :

از آنجا که بخشی از فرآیند مدیریت پسماند در ارتباط با فرآیند شستشو می باشد، به طور خلاصه به نحوه شستشوی وسایل آلوده می پردازیم.

پلیت هاولوله های شیشه ای حاوی کشت میکروبی را در کیسه مخصوص اتوکلاو قرار داده و تحت شرایط استانداردداتوکلاو نموده سپس فرآیند شستشورا انجام داده و جهت سترون سازی در فور تحت شرایط ۱۸۰-۱۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲ تا ۴ ساعت قرار می دهیم.

لوله ها ویا سایر ظروف شیشه ای حاوی لخته خون، سرم ویا دیگر مایعات بدن را ترجیحاً در کیسه مخصوص اتوکلاو قرار داده و اتوکلاو نموده ویا در صورت رعایت نمودن اصول ایمنی، لخته ومایعات بدن (با حجم زیاد) را در سینک مخصوص این کار با جریان ملایم آب تخلیه نموده وسپس در ماده سفید کننده خانگی با رقت ۱/۱۰به مدت حداقل یک ساعت قرار می دهیم ، سپس شستشوداده و جهت سترون سازی در فور می گذاریم.

باید بوسیله استفاده از اندیکاتورهای شیمیایی وبیولوژیکی از صحت عملکرد دستگاه فوردر مورد پارامترهای زمان ودرجه حرارت اطمینان حاصل نمود.

دکتر شهلا فارسی

مدیر ایمنی وبهداشت آزمایشگاه مرجع سلامت

مهر ۱۳۸۸

این دستورالعمل با هدف ارائه اصول صحیح دفع پسماند های آزمایشگاهی و به منظور حفظ سلامت کارکنان ، بیماران و سایر مراجعین و همچنین حفاظت از محیط زیست تدوین گردیده است و دامنه کاربرد آن کلیه آزمایشگاه ها اعم از پزشکی و تحقیقاتی می باشد.

طبق **تعریف** بند۲ قانون مدیریت پسماند مصوب ۱۳۸۳/۲/۱۵ مجلس شورای اسلامی ، به کلیه پسماندهای عفونی وزیان آور ناشی ازبیمارستانها، مراکزبهداشتی درمانی، آزمایشگاههای تشخیص طبی وسایرمراکزمشابه که یکی ازخواص بیماری زا بودن ، سمی بودن ،قابلیت خورندگی ،قابلیت اشتعال ومشابه آن را داشته باشند، پسماندهای پزشکی ویژه گفته می شود . دفع این پسماندها نیاز به برنامه مدیریتی دارد که شامل مراحل تفکیک یا جداسازی در مبدا یا محل تولید ، جمع آوری و برچسب گذاری ، انتقال تا محل بی خطرسازی یا آمایش ، بسته بندی ، ذخیره (انبارش) موقت ، انتقال به محل دفع نهایی و انجام اقدامات مربوط به دفع نهایی می باشد. پسماندهای فوق تا زمانی که عملیات بی خطرسازی برروی آن اجرا نشود، پسماندویژه محسوب می شود.
مسئولیت مدیریت و بی خطرسازی پسماندها به عهده تولیدکننده پسماند بوده و مسئول ایمنی آزمایشگاه نیز مسئولیت برنامه ریزی جهت اجرای مراحل مختلف آن را بر عهده دارد و **نظارت** بر چگونگی اجرای دستورالعمل های آزمایشگاه مرجع سلامت در آزمایشگاه های پزشکی به عهده مسئولین مربوطه دردانشگاهها است.

اصطلاحات و تعاریف

- **آزمایشگاه پزشکی (آزمایشگاه بالینی) :** آزمایشگاهی که آزمایش های زیست شناسی ، میکروب شناسی ، ایمنی شناسی ، شیمیایی ، ایمنی _ خون شناسی ، خون شناسی ، فیزیک حیاتی ، سلول شناسی ، آسیب شناسی و دیگر آزمایشگاه ها را روی مواد بدست آمده از بدن انسان به منظور فراهم کردن اطلاعات برای تشخیص ، پیشگیری و درمان بیماری ها یا ارزیابی سلامت انسان ها انجام می دهد و مجاز است خدمات مشاوره ای را در تمام زمینه های بررسی آزمایشگاهی شامل تفسیر نتایج و توصیه در جهت اقدامات تشخیصی بیشتر ارائه دهد. این آزمایش ها هم چنین شامل روش های اجرایی برای تعیین ، اندازه گیری یا توصیف وجود یا فقدان مواد یا ریزجانداران مختلف می باشند. تسهیلاتی که فقط جمع آوری یا آماده سازی نمونه ها و یا ارسال و توزیع آنها را برعهده دارند به عنوان آزمایشگاه پزشکی یا بالینی شناخته نمی شوند ولی می توانند بخشی از یک سیستم یا شبکه بزرگتر آزمایشگاهی به شمار آیند.

- **آلودگی زدایی** (Decontamination) : فرآیندی است که باعث حذف ویا کشتن میکروارگانیسم ها می گردد. این اصطلاح در موارد حذف ویا خنثی سازی مواد شیمیایی ومواد پرتوزای خطرناک نیز به کارگرفته می شود.

- **آمایش**(Treatment)شامل فرآیندی است که باعث کاهش میکروارگانیسمها تا حدی می شودکه نتواندباعث بروزبیماری گردد.

انواع پسماندهای آزمایشگاهی

۱- **پسماندهای عادی ویاخانگی** : این پسماندها که حجم زیادی ازپسماندهای تولیدی را در آزمایشگاه تشکیل می دهند شامل پسماندهای جامدیا مایع آبدارخانه، بخش های غیرفنی و اداری می باشند. چنانچه پسماندهای آلوده با روش صحیح ، آمایش شوند نیز در گروه پسماندهای معمولی قرار می گیرند.

این گروه از پسماندها باید در محل تولید ازپسماندهای عفونی جداشوند، درغیر این صورت در گروه پسماندهای عفونی قرار می گیرند .

همچنین این گونه پسماندها باید از انواع پسماندهای تیزوبرنده، شیمیایی، رادیواکتیو و نظایر آن درمبداء تولید تفکیک شوند.

۲- **پسماندهای عفونی** : حاوی تعداد کافی باکتری ، ویروس ، قارچ ،انگل وغیره برای ایجاد بیماری می باشند . مانندسرم و سایر مایعات آلوده بدن، مدفوع ، کشتهای میکروبی، اجسام تیزوبرنده آلوده، سواب آلوده ، حیوانات آزمایشگاهی آلوده درآزمایشگاههای تحقیقاتی وغیره

۳- **پسماندهای تیزوبرنده** : این گونه پسماندها می توانندر بدن جراحت ایجاد نمایند مانندسرسوزن، لانست ،تیغه اسکالپل، تیغه میکروتوم، شیشه های شکسته، سرسمپلر،لام و غیره که می توانند**آلوده** و**یاغیرآلوده** باشند.

پسماندهای تیزوبرنده آلوده علاوه برخطر فوق خطر انتقال آلودگی را نیز به دنبال دارند.

۴- **پسماندهای شیمیایی :** شامل انواع موادومعرفهای آزمایشگاهی،کیتهای تشخیصی، موادضدعفونی کننده، مواد خورنده وسوزاننده ، موادآتش زا، سمی ، سرطان زا، واکنش زا، قابل انفجار و غیره می باشد.

۵- **پسماندهای آسیب شناسی تشریحی** : مانند بافتها، قطعات واجزای بدن انسان وغیره که جهت آزمایشهای آسیب شناسی به آزمایشگاه ارسال می گردد.

۶- **پسماندهای پرتوزا** : شامل پسماندهای حاوی موادپرتوزا می باشد.

۷- **پسماندهای ترکیبی** : این گونه پسماندها می تواند ترکیبی از پسماندهای عفونی، شیمیایی وپرتوزا باشدکه بیشتردرمراکزتحقیقاتی تولید شده و برنامه مدیریت آن پیچیده وسخت می باشد

برنامه مدیریت پسماند

مسئول ایمنی در آزمایشگاه ، با همکاری مسئول فنی و سایر کارکنان موظف به طراحی برنامه جامع و کاملی در ارتباط با مدیریت پسماند می باشد که شامل مراحل **تفکیک** (جداسازی) درمحل تولید، **جمع آوری وبرچسب گذاری، حمل ونقل تامحل بی خطرسازی، مرحله بی خطرسازی یا آمایش (Treatment)، بسته بندی ، ذخیره (انبارش) موقت، حمل ونقل ازمحل تولید وبارگیری ونیز مرحله دفع نهایی می باشد**. کلیه مراحل این برنامه که با در نظر گرفتن عملکرد و وسعت کاری آزمایشگاه و نیزنوع آزمایش ها طراحی می گردد ، باید مکتوب بوده ، در اختیار کلیه کارکنان اعم از فنی و خدماتی قرار گیرد و نحوه انجام آنها به ایشان آموزش داده شود.

در برنامه مدیریت پسماند باید به موارد ذیل توجه گردد:

- برآوردی از میزان تقریبی تولید پسماند ، می تواند در برنامه ریزی ها و همچنین نحوه اجرای مراحل دفع پسماند بسیار کمک کند
- این برنامه باید به نحوی طراحی گردد که نظارت کافی بر میزان مواد و وسایل مصرفی صورت پذیرد.
- بایدپسماندهای عادی از پسماندهای ویژه در مبدا تولید جدا شوند.
- بهتر است در برنامه ریزی ها به کاهش حجم پسماند تولیدی توجه گردد . این امر با انتخاب روش هایی که در حین کار پسماند کمتر یا کم خطری تولید می نمایندونیز تدوین روش های صحیح نمونه گیری و آموزش آنها جهت کاهش موارد نمونه گیری مجدد امکان پذیر است.
- باید سعی شود که درهنگام کاراز مواد و وسایل کم خطر استفاده شود. به طور مثال استفاده ازسرنگ ها وسوزن های زیرجلدی جهت انتقال مواد باید محدودشده و نباید جایگزین استفاده ازوسائلی مانند پی پت گردد.
- بایدفواید ومضار استفاده از وسایل یک بارمصرف درمقابل وسایلی که دوباره واردچرخه کاری می شوند، بررسی گردد.
- - باید از موادشیمیایی وضدعفونی کننده ای استفاده نمود که خطرکمتری برای افراد و محیط زیست داشته باشند.
- درتمامی مراحل باید از وسایل حفاظتی مخصوصا دستکش مقاوم و غیر قابل نفوذ، ماسک، روپوش، پیش بندمخصوص وغیره استفاده گردد.
- اجرای تمامی مراحل جمع آوری وحمل ونقل پسماندها با دست انجام پذیرد، زیرا وسایل مکانیکی باعث پاره شدن کیسه ها وترشح و پاشیدن مواد آلوده می‌گردد.
- دفع پسماندها حداقل به طور روزانه ودر صورت نیاز بیش از یک بار درروز انجام پذیرد.
- مراحل مختلف برنامه به نحوی انجام گیرد که احتمال آلوده شدن افرادی که مسئول جمع آوری و دفع پسماند در داخل یا خارج آزمایشگاه هستند، منتفی گردد.
- طبق قانون، بازیافت پسماندهای مراکز پزشکی مجاز نمی باشد. اما می توان با تمهیداتی پسماندهایی مانند ظروف پلاستیکی ، شیشه ای ونیز جعبه ها ی کیت ها ومعرف ها راکه طی کارآلوده به سرم و مایعات بدن نمی شوند، درمحفظه های جداگانه ای جهت مراحل بازیافت جمع آوری نمودکه نیاز به برنامه ریزی خاص وآموزش کارکنان دارد.

۷ مدیریت پسماندهای عفونی

۱. تفکیک یا جداسازی

پسماندهای عفونی در آزمایشگاه عمدتا شامل محیط های کشت حاوی انواع میکروبها، خون، سرم ویا سایر مایعات بدن، مدفوع ونیز ظروف حاوی این نمونه ها، نمونه های پوست ، مو و ناخن ، پسماندهای عفونی در آسیب شناسی تشریحی ، وسایل تیز وبرنده آلوده به مواد عفونی که مجددا غیر قابل استفاده هستند ، می باشد. تفکیک (جداسازی) پسماندهای آلوده از سایر پسماندها بسیار مهم است .

۲. جمع آوری

روش **جمع آوری** پسماند در ارتباط با نوع ومیزان پسماند متفاوت بوده ومی توان از ظروف وروش های متفاوتی جهت انجام این کار استفاده نمود. برای **بسته بندی وجمع آوری** وسایل تیز وبرنده آلوده باید ابتدا در ظروف ایمن (Safety Box) قرار داده شده سپس اتوکلاو و به طریقه بهداشتی دفع شوند.

تمامی پسماندهای آلوده باید در کیسه مخصوص اتوکلاو (ترجیحاً زرد رنگ وبا علامت خطر زیستی) قرار داده شده واتوکلاو گردند.نباید بیش از سه چهارم حجم کیسه ها پر شود، تا بتوان به آسانی درآنها را بست. بدیهی است که مایعات نباید مستقیما در داخل کیسه ریخته شوند ، بلکه باید ظروف حاوی آنها در کیسه قرار گیرد. درصورت لزوم جهت دفع پسماند، می توان ازدوکیسه استفاده نمود.

۳. برچسب گذاری

برچسب مورد استفاده بر روی ظروف ویا کیسه ها باید مقاوم به پارگی وآسیب دیدگی بوده و حداقل حاوی اطلاعات ذیل (بطور واضح و خوانا) باشد :

نوع پسماند(پسماند عفونی، تیزوبرنده و....) ، نام ومشخصات تولید کننده پسماند و علائم هشدار دهنده لازم بر حسب نوع پسماند.

۴. حمل ونقل تامحل بی خطرسازی

در صورتی که حجم پسماند زیادبوده ویا محل آمایش پسماند تا محل تولید آن فاصله داشته باشد، جهت انتقال آنها می توان از چرخهای دستی که به این امراختصاص یافته وسطلهایی که برروی آن ثابت شده است استفاده نمود. سطل ها وچرخهای دستی مورد استفاده باید نشت ناپذیر بوده وبراساس یک برنامه زمان بندی ضدعفونی وشسته شوند.

۵. آمایش

روش های مختلفی جهت مرحله بی خطرسازی یا آمایش(Treatment) ویا تصفیه پسماندهای آلوده آزمایشگاهی شامل : استفاده از اتوکلاو، اشعه مایکروویو، استفاده از زباله سوزاستاندارد و دارای تأییدیه معتبر ، دفن بهداشتی طبق اصول استاندارد، روش محفظه سازی، استفاده از مواد شیمیایی به خصوص در مورد پسماندهای مایع (مانند ماده سفیدکننده خانگی بارقت ۱/۱۰ به شرط اینکه دارای کلرفعال ۵% باشد) واستفاده از اشعه وجود دارد.

بهترین و رایج ترین روش مورد استفاده در آزمایشگاه، روش استفاده از اتوکلاو می باشد. هرچند استفاده از دستگاه زباله سوز درصورتی که ازاستانداردهای لازم کشوری وبین المللی جهت جلوگیری ازآلودگی هوا برخوردار باشد، نیز راهکار مناسبی است زیرا باعث کاهش وزن وحجم پسماند تا۹۵% می شود.

درمورد بی خطر سازی پسماندهای آلوده، استفاده از اتوکلاوهایی که دارای دستگاه متراکم کننده وخردکننده هستند، به دلیل کاهش حجم پسماند براستفاده از اتوکلاوهای معمولی ارجحیت دارد، به شرط اینکه قبل از مرحله متراکم سازی ویا همزمان با این عمل، فرآیند بی خطرسازی پسماند اجرا شود.

در هنگام استفاده از اتوکلاو باید به نوع و میزان پسماند، استفاده ازظروف وکیسه های مخصوص مقاوم به فشار و دمای بالا، نحوه قراردادن پسماندها دراتوکلاو و همچنین درجه حرارت، فشار و زمان لازم جهت انجام فرآیند دقت نمود.مدت نگهداری پسماندها در اتوکلاو جهت سترون سازی ، در درجه حرارت ۱۲۱ درجه سانتیگراد باید حداقل ۳۰ دقیقه وترجیحاً ۶۰ دقیقه باشد.

در صورت امکان محل آمایش پسماند باید نزدیک محل تولید پسماندهای آلوده (به طور مثال آزمایشگاه میکروب شناسی) باشد.

باید بوسیله استفاده از اندیکاتورهای شیمیایی وبیولوژیکی از صحت عملکرد دستگاه اتوکلاو در مورد پارامترهای زمان، درجه حرارت وفشاراطمینان حاصل نمود.

آمایش ودفع پسماندهای آلوده :

تمامی **ظروف یک بار مصرف حاوی محیط های کشت میکروبی** باید در کیسه مخصوص اتوکلاو (ترجیحاً زرد رنگ وبا علامت خطر زیستی) قرار داده شده و تحت شرایط استاندارد آنها را اتوکلاو نموده وسپس در کیسه زباله ضخیم سیاه رنگ دفع شوند.

لوله های یک بار مصرف حاوی لخته خون ، سرم ودیگر مایعات بدن را ترجیحاً در کیسه مخصوص اتوکلاو قرار داده و اتوکلاو نموده ودر کیسه زباله ضخیم سیاه رنگ دفع می نماییم ویا در صورت رعایت نمودن اصول ایمنی، لخته ومایعات بدن (با حجم زیاد) را در سینک مخصوص این کار با جریان ملایم آب تخلیه نموده وسپس در ماده سفید کننده خانگی با رقت ۱/۱۰به مدت حداقل یک

ساعت قرار می دهیم ویا در شرایط استاندارد توسط شهرداری حمل و در پسماند سوز آمایش گردیده ویا در زیر زمین دفن بهداشتی می شود.وسایل فوق جهت حمل درکیسه زباله زرد رنگ(با علامت خطر زیستی) قرار می گیرند.

دستکش آلوده به خون ویا سرم، پنبه آغشته به خون، سواب واپلیکاتور آلوده ،دیسک های تشخیصی آلوده ونظایر آن را در کیسه مخصوص اتوکلاو قرارداده و تحت شرایط استاندارد اتوکلاو نموده و در کیسه زباله ضخیم سیاه رنگ دفع می نماییم ویا درکیسه زباله زرد رنگ(با علامت خطر زیستی) جهت حمل در شرایط استاندارد توسط شهرداری قرار داده و در پسماند سوزآمایش شده ویا در زیر زمین به طریق بهداشتی دفن می شود. (در مورد سواب ، اپلیکاتور ، دیسک های تشخیصی آلوده ونظایر آن می توان قبل از حمل توسط شهرداری آنها رادر محلول سفید کننده خانگی با رقت ۱/۱۰قرار داد.)

نوارادرار استفاده شده را در محلول سفید کننده خانگی با رقت ۱/۱۰به مدت حداقل یک ساعت نگهداری نموده و ویا درکیسه زباله زرد رنگ(با علامت خطر زیستی) قرار داده ودر شرایط استاندارد توسط شهرداری حمل و در پسماند سوز آمایش شده ویا در زیر زمین به طریق بهداشتی دفن می شود.

از آنجا که **مدفوع** می تواند به عنوان یک منبع مهم ویروس، باکتری و انگل وغیره محسوب شود، معمولاً جهت آمایش نمونه های مدفوع باید از روش سوزانیدن استفاده شود.بنابراین ترجیحاً باید ظروف حاوی نمونه های مدفوع در شرایط استاندارد توسط شهرداری حمل و در پسماند سوزآمایش شود. به منظور جلوگیری از ایجاد آلودگی در زمان حمل ونقل ودفع ، محلول فرمالین ۵ یا ۱۰ در صد در ظرف مدفوع حاوی انگل به نسبت سه حجم فرمالین و یک حجم مدفوع ریخته و به مدت حداقل نیم ساعت آن را نگهداری می نماییم وسپس آنها را جهت حمل توسط شهرداری درکیسه زباله زرد رنگ(با علامت خطر زیستی) قرار می دهیم .

ظروف حاوی ادرار با رعایت اصول ایمنی، در سینک مخصوص این کار باجریان ملایم آب تخلیه شده وسپس ترجیحاً آنها را اتوکلاو نموده ودر کیسه ضخیم سیاه رنگ دفع می نماییم ویا بعد از تخلیه ادرار، ظروف را در محلول سفید کننده خانگی بارقت ۱/۱۰ به مدت حداقل یک ساعت قرار می دهیم ویا اینکه در شرایط استاندارد توسط شهرداری حمل و در پسماند سوز آمایش گردیده ویا در زیر زمین دفن بهداشتی می شود.ظروف فوق جهت حمل درکیسه زباله زرد رنگ(با علامت خطر زیستی) قرار داده می شوند.

لازم به ذکراست که می توان در اجرای فرایند ضدعفونی، از محلول های تجاری که دارای تاییدیه های معتبر خارجی و داخلی باشند، نیزاستفاده نمود.

شایان ذکر است، پسماندهایی که جهت آمایش در محلول سفید کننده خانگی قرار می گیرند، قبل از حمل محلول سفید کننده کاملاً تخلیه شود، زیرا ترکیبات کلردار نباید در پسماند سوز قرار داده شوند.

۶. ذخیره

پسماندها نباید به مدت طولانی ذخیره شوند و در صورت لزوم به ذخیره سازی، باید این عمل درحداقل مدت زمان انجام شود. مرحله ذخیره سازی پسماند می تواند بسته به نوع و حجم پسماند ها قبل از فرآیندآمایش ویا بعدازآن باشد. توجه به این نکته ضروری است که پسماندهای عادی به طور جداگانه از پسماندهای ویژه ذخیره شوند.

پسماندها نباید در معرض شرایط جوی قرار داده شوند وبنابراین درمناطقی که بالاجبار باید پسماند برای مدتی ذخیره شود، می توان ازسطل هایی با در کاملاً بسته که در محلی خاص قرار داده شده، یخچال مخصوص این کار و غیره استفاده نمود. در صورتی که حجم پسماند تولیدی زیاد باشد، بهتر است محل مناسبی با مشخصات ذیل جهت ذخیره آنها ساخته شود :

دور از محل های عمومی وپر رفت وآمدبوده ودارای فضایی با ابعاد مناسب ، نور کافی و دمای مناسب ، سیستم تهویه وفاضلاب بوده وامکان شست وشوی تمامی سطوح وآلودگی زدایی آن وجود داشته باشد .همچنین محل نگهداری انواع پسماند به تفکیک در آن مشخص باشد.

محل ذخیره سازی دور از دسترس جوندگان،حشرات و غیره بوده و تابلوی واضح داشته باشد. همچنین این مکان باید دارای در قفل دار بوده واز لحاظ امنیتی دور از دسترس سایر افراد باشد.

۷. دفع نهایی پسماند

این کار به روش های متفاوتی انجام می گیرد که یکی از رایج ترین آنها دفن در عمق زمین است . به دنبال واکنش های شیمیایی که در پسماندها رخ می دهند ، دما افزایش یافته (بیش از ۵۵ درجه سانتیگراد) و محیط اسیدی (pH کمتر از ۵) می گردد و عوامل بیماریزا از بین می روند . دفع پسماندمایع بعد از طی مراحل آمایش ویا رقیق سازی می تواند در سیستم فاضلاب انجام شود.نقش سازمان حفاظت محیط زیست در مورد صدورمجوزهای لازم براساس نوع، مقدار و غلظت پسماند دفع شده در سیستم فاضلاب بسیارتعیین کننده می باشد.

۷ مدیریت پسماندهای تیزوبرنده

این گونه پسماندها باید درظروف ایمن (Safety Box) ریخته شوند. این ظروف باید دربرابرضربه و سوراخ شدگی مقاوم باشند.در آنها کاملاً بسته شده و نشت ناپذیر بوده و قابل اتوکلاو شدن باشند . وقتی که سه چهارم محفظه پرشد، اتوکلاو و سپس به طریقه بهداشتی دفع شوند.

سرسوزن ها ترجیحاً همراه با سرنگ ها درمحفظه مقاوم (ظروف ایمن) قرارداده شوند در غیر این صورت جهت جدا نمودن سرسوزن از سرنگ باید از محل های تعبیه شده در قسمت در این ظروف استفاده گرددوسرنگ ها رادر کیسه مخصوص اتوکلاو قرار داده واتوکلاو نموده ودر کیسه زباله ضخیم سیاه رنگ دفع می نماییم.

همچنین نباید اقدام به شکستن، بریدن ویا خم کردن سر سوزن ها نمود، زیرا خطر فرورفتن سر سوزن وایجاد آئروسل وجود دارد.
نحوه دورریز تیغ های برنده در تجهیزاتی مانند میکروتوم وکرایواستات نیز باید مورد توجه قرار گیرد و تیغ ها ی غیرقابل استفاده درظروف ایمن قرار داده شده و دفع گردد.

۷ مدیریت پسماندهای شیمیایی

پسماندهای شیمیایی در سه گروه بی خطر ، کم خطر و پرخطر قرار می گیرند و مرحله تفکیک باید در باره این پسماندها نیز به خوبی اجرا شود.

- پسماندهای **کم خطر** : حاصل کار با برخی از محلول ها وکیتهای تشخیصی بوده وهمچنین کیت های تاریخ گذشته را نیز شامل می شود.

در هنگام کار با این مواد باید اصول کلی حفاظت را مد نظر قرار داد و از وسایل حفاظت فردی لازم مانند روپوش مناسب، دستکش لاتکس، ماسک وغیره استفاده نمود.

- پسماندهای شیمیایی **پرخطر** : حاصل کار با مواد شیمیایی قابل انفجار، قابل اشتعال، خورنده، سوزاننده، سمی ، بسیار سمی ،واکنش زا، سرطان زا ،التهاب زا (Irritant) و مضر (Harmful) می باشد که درزمان ایجاد و دفع می توانند سلامت کارکنان ،محیط زیست وحتی جامعه را تهدید نمایند

نمونه هایی از این مواد عبارتند از :.

- پسماندهای شیمیایی **سمی** (Toxic) مانندفلزات سنگین، فنل، سیانیدها و سدیم آزاید
- پسماندهای شیمیایی **واکنش دهنده** (Reactive) مانند سولفات هاو پراکسیدها که آماده ایجاد واکنش با آب می باشند.
- پسماندهای شیمیایی **خورنده** (Corrosive) مانند اسیدهای با pH کمتراز۲ (اسیدهای معدنی) ویا قلیاهای با pH بیشتر از ۱۲
- پسماندهای شیمیایی **قابل احتراق**(Flammable) مانندالکل، استون
- پسماندهای شیمیایی **قابل انفجار** (Explosive) مانند موادی که در شرایط عادی باثبات نمی باشند مانند اتر
- پسماندهای شیمیایی **سرطان زا**(carcinogen) که خواص موتاژن و سرطان زا دارند ، مانند فرمالدییید ، بنزن، اتیدیوم بروماید
- پسماندهای حاوی **فلزات سنگین** از دیگر پسماندهای شیمیایی می باشند که از بین آنها می توان به پسماندهای حاوی جیوه اشاره نمود که خطرناک وسمی هستند.

در هنگام کار ویا آمایش مواد فوق به عنوان پسماند، باید علاوه براستفاده از وسایل حفاظت فردی فوق الذکراز عینک حفاظ دار، حفاظ صورت ودر صورت لزوم ماسک هایی که در برابر نفوذ بخار و گازهای آلوده حفاظت تنفسی کامل ایجاد می کنند، استفاده نمود و همچنین محیط کار باید از تهویه مطلوبی برخوردار بوده و ترجیحاً کار در زیر هودهای مخصوص بخار (Fume Hood) انجام شود.

- پسماندهای **بی خطر** : حاصل کاربا موادی مانند اسیدهای آمینه، قندها وغیره می باشند که خصوصیات پسماندهای کم و پرخطر را ندارند.

دربرنامه مدیریت پسماندهای شیمیایی باید به نکات ذیل توجه نمود :

- در بخش هایی از آزمایشگاه که از مواد شیمیایی استفاده می نمایند، نقطه سفارش جهت خرید به درستی تعریف شده و به میزان خرید مواد شیمیایی و کیت های حاوی این مواد توجه و از انبار کردن آنها در حجم زیاد پرهیزگردد.
- برنامه هایی جهت مدیریت تولید پسماند و کاهش حجم آن اعمال شود.
- در صورت امکان از روش های تشخیصی ویا موادجایگزین کم خطر استفاده شود (به طور مثال در آزمایش تغلیظ مدفوع ، اتیل استات جایگزین اتر شود).
- کارکنان با علائم ونشانه های هشداردهنده ایمنی موجود بر روی ظروف حاوی موادشیمیایی ونحوه تفسیرآنها آشنایی کامل داشته باشند.
- درصورت ساخت مواد شیمیایی ترکیبی و یا انتقال آنها ازظرف اصلی به ظرف ثانویه، باید برروی ظرف : نام فرد انجام دهنده، نام ماده، تاریخ ساخت، تاریخ انقضاء ،pH، محل ذخیره ، نوع و در صد ترکیبات ماده شیمیایی، علائم و نشانه های هشداردهنده ایمنی و همچنین شماره ارجاع به برگه اطلاعات ایمنی موادشیمیایی (Material Safety Data Sheet = MSDS) درج گردد، تا بتوان در زمان استفاده و بعد از آن که به عنوان پسماند تلقی می شوند، به اطلاعات لازم دست یافت.
- پسماندها را باید به نحوی بسته بندی نمود که خطرشکستن ظروف ، نشت، سوراخ شدن وپارگی وجود نداشته باشد.

آمایش پسماندهای شیمیایی حاصل از کار با کیت های تشخیصی:

می توان طبق توصیه شرکت تولید کننده، توزیع کننده ویا وارد کننده وبا توجه به برگه اطلاعات ایمنی موادشیمیایی عمل نمودویاآنها را بامقادیرزیادی آب رقیق کرده ودر فاضلاب دفع نمود. باید توجه نمود که قبل از این عمل نباید پسماندها باهم مخلوط شوند. ترجیحاً یک سینک مخصوص به این امر اختصاص داده شود.

پسماندهای حاوی فلزات سنگین، نباید داخل فاضلاب دفع شوند.

آمایش پسماندهای پرخطر:

می توان طبق توصیه شرکت تولید کننده ، توزیع کننده ویا وارد کننده وبا توجه به برگه اطلاعات ایمنی موادشیمیایی عمل نمود. همچنین آزمایشگاه ها می توانند با توجه به نوع پسماند، آنها را در ظروف شیشه ای و یا پلاستیکی مقاوم به طور جداگانه جمع آوری نموده وسپس طبق توصیه مراکزتولیدکننده، توزیع کننده ویاواردکننده موادشیمیایی اقدام به رقیق سازی با آب، خنثی سازی با مواد خنثی کننده وروش های دیگربر حسب نوع ماده نمایند. اجرای این مراحل نیاز به برنامه های آموزشی دارد.

۷ .مدیریت پسماندهای آسیب شناسی تشریحی

جهت کسب اطلاعات دراین مورد و نیز نحوه دفع این گونه پسماندها، می توان به مطالب تدوین شده دردستورالعمل ایمنی و دفع پسماند کمیته آسیب شناسی تشریحی آزمایشگاه مرجع سلامت مراجعه نمود.

۷ مدیریت پسماندهای پرتوزا

پسماندهای پرتوزا شامل مواد و وسایلی هستند که آلوده به موادپرتوزا می باشند . مسئولیت برنامه ریزی در مورد چگونگی مدیریت پسماندهای پرتوزا وحمل ونقل ودفع این مواد به عهده سازمان انرژی اتمی است و آزمایشگاهها جهت کار با مواد پرتوزا باید مجوزهای لازم رابا توجه به نوع فعالیت از این سازمان دریافت کنند ودر دوره های آموزشی مربوطه نیز شرکت نمایند.

این سازمان در ارتباط با میزان آزمایش های انجام شده دستورالعملی با عنوان نحوه دورریزی پسماندهای مرتبط با کیت های حاوی ۱۲۵ -I تدوین وبه آزمایشگاهها ابلاغ نموده است.

باید قرارداد ، میزان فعالیت آزمایشگاه، نوع وحجم پسماندهای تولیدی، نحوه آمایش پسماندها و کلیه فعالیتهای مرتبط تعیین ومستند شود.

معمولاً آزمایشگاهها از کیت های حاوی ۱۲۵- I جهت انجام آزمایش های هورمونی اسفاده می کنند. نیمه عمر این ماده حدود۶۰ روز می باشد. بعضی از آزمایشگاهها از کیت های حاوی کبالت ۶۰ جهت تشخیص آزمایشگاهی استفاده می نمایند که نیمه عمرطولانی دارد وجهت مدیریت پسماندهای حاوی آنها باید با سازمان هماهنگی های لازم به عمل آید.

میزان ونحوه دفع پسماندهای پرتوزا باید طبق قوانین سازمان باشد واگر میزان پسماند تولیدی بسیار زیاد باشد، سازمان در ارتباط با نوع وحجم این گونه پسماندها ، خودرا موظف به حمل آنها می داند.

نکته مهم این است که پسماندهای آلوده به موادپرتوزا باید در مبدأ تولید، از سایر پسماندها **تفکیک** شوند، زیرا در غیر این صورت کلیه پسماندهای تولید شده جزء پسماندهای پرتوزا تلقی می گردند.

انواع روش های **آمایش** پسماندهای پرتوزا شامل محفظه سازی(Encapsulation) که تحت شرایط خاصی انجام می شود، دفع در فاضلاب، ذخیره جهت تجزیه، سوزانیدن وغیره می باشد که معمولاً درآزمایشگاههای تشخیص طبی ایران از روش های دفع در فاضلاب، ذخیره جهت تجزیه و یا حمل توسط سازمان انرژی اتمی استفاده می شود.

جهت اجرای برنامه **بسته بندی و جمع آوری** پسماندهای پرتوزا ، مراکز باید از ظروف مختلف مورد تایید سازمان انرژی اتمی ، شامل محفظه های مخصوص مقوایی با پوشش داخلی مقاوم جهت پسماندهای جامد ، ظروف مقاوم به سوراخ شدن جهت پسماندهای نوک تیز و نیز ظروف پلاستیکی با در محکم برای نگهداری پسماندهای مایع استفاده نمایندکه این ظروف باید دارای برچسب مخصوص حاوی علامت خطر اشعه وهمچنین نوع پسماند باشند.

باید توجه نمود که اگر نیمه عمر ماده پرتوزا کوتاه بوده و با نگهداری صحیح تجزیه می گردد، نباید از طریق سیستم فاضلاب دفع شود، بلکه باید مطابق با استانداردهای سازمان در محل مخصوصی جهت فرآیند تجزیه **ذخیره** شود.

جهت دفع پسماندهای پرتوزا در فاضلاب باید ازسینک مخصوص این کار استفاده شود و قبل از دفع، متناسب با میزان و غلظت پسماند ، باآب رقیق گردد . این سینک باید با علائم هشدار دهنده خطر اشعه مشخص شود.

نحوه شستشوی وسایل آلوده :

از آنجا که بخشی از فرآیند مدیریت پسماند در ارتباط با فرآیند شستشو می باشد، به طور خلاصه به نحوه شستشوی وسایل آلوده می پردازیم.

پلیت هاولوله های شیشه ای حاوی کشت میکروبی را در کیسه مخصوص اتوکلاو قرار داده و تحت شرایط استانداردداتوکلاو نموده سپس فرآیند شستشورا انجام داده و جهت سترون سازی در فور تحت شرایط ۱۸۰-۱۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲ تا ۴ ساعت قرار می دهیم.

لوله ها ویا سایر ظروف شیشه ای حاوی لخته خون، سرم ویا دیگر مایعات بدن را ترجیحاً در کیسه مخصوص اتوکلاو قرار داده و اتوکلاو نموده ویا در صورت رعایت نمودن اصول ایمنی، لخته ومایعات بدن (با حجم زیاد) را در سینک مخصوص این کار با جریان ملایم آب تخلیه نموده وسپس در ماده سفید کننده خانگی با رقت ۱/۱۰به مدت حداقل یک ساعت قرار می دهیم ، سپس شستشوداده و جهت سترون سازی در فور می گذاریم.

باید بوسیله استفاده از اندیکاتورهای شیمیایی وبیولوژیکی از صحت عملکرد دستگاه فوردر مورد پارامترهای زمان ودرجه حرارت اطمینان حاصل نمود.

آزمایشگاه مرجع سلامت

وزارت بهداشت ، درمان و آموزش پزشکی

معاونت سلامت

آزمایشگاه مرجع سلامت

اداره مدیریت آزمایشگاههای بهداشتی

دستورالعمل نمونه گیری وتشخیص آزمایشگاهی

ویبریو کلرا

بسمه تعالی

جمهوری اسلامی ایران

وزارت بهداشت ، درمان و آموزش پزشکی

آزمایشگاه مرجع سلامت

دستورالعمل تهیه نمونه رکتال سوآب

۱- محیط کشت کری بلر را طبق دستور شرکت سازنده تهیه و در لوله های در پیچ دار می ریزیم به طوری که ارتفاع آن حدود ۵-۴ سانتی متر باشد.

۲- یک عدد سوآب رکتال را با فرو کردن در محیط انتقالی مرطوب نموده و حدود ۴-۳ سانتی متر داخل اسفنکتر رکتوم فرو برده و با یک حالت دورانی ۳۶۰ درجه می چرخانیم.

۳- سوآب را بیرون کشیده ، نگاه می کنیم تا مطمئن شویم که سوآب به مدفوع آغشته شده باشد.

۴- سوآب را داخل محیط کری بلر فرو می بریم به طوری که حدود ۴ سانتی متر در داخل محیط انتقالی فرو رود ، سپس اضافه سوآب را می شکنیم به طوری که درب لوله به راحتی بسته شود.

۵- سوآب را به همراه مشخصات کامل بیمار شامل نام و نام خانوادگی ، نام پدر ، سن و جنس ، زمان شروع علائم ، آدرس و تلفن بیمار در کوتاهترین زمان ممکن به نزدیکترین آزمایشگاه انجام دهنده کشت التور ارسال می نماییم.

۶- در صورت عدم امکان ارسال در زمان نمونه گیری ، لوله را تا زمان ارسال در یخچال(۸-۲ درجه سانتی گراد) نگهداری می کنیم.

آدرس : خیابان حافظ ، نرسیده به جمهوری ، کوچه زرتشتیان ، کوچه محمد بیک ، پلاک ۴۸ ، طبقه دوم ، آزمایشگاه مرجع سلامت
Tel : ۶۶۷۶۰۵۲۶-۶۶۷۲۳۳۴۶-۶۶۷۲۸۱۲۱- ۶۶۷۲۸۱۱۳ ۶۶۷۲۸۱۱۲ Fax : ۶۶۷۲۸۱۲۱

بسمه تعالی

جمهوری اسلامی ایران

وزارت بهداشت ، درمان و آموزش پزشکی

آزمایشگاه مرجع سلامت

دستورالعمل تشخیص آزمایشگاهی ویبریو کلرا

۱- سوآب رکتال منتقل شده به آزمایشگاه (که در محیط کری بلر قرار داده شده) را بلا فاصله روی محیط TCBS اول ، کشت دهید و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷- ۳۵ درجه سانتیگراد گرماگذاری(انکوبه) کنید. سپس سوآب را وارد محیط آب پپتونه قلیایی Alkaline Peptone Water)APW) نموده پس از ۸-۶ ساعت گرماگذاری(انکوباسیون) در دمای ۳۷-۳۵ درجه سانتیگراد، **ازسطح و بالاترین بخش محیط** برداشت نموده در محیط TCBS دوم کشت دهید.

- ***توجه : از زمان تهیه محیط TCBS نباید بیش از یک هفته گذشته باشد. همچنین محیطهای TCBS باید در کیسه های فریزر در بسته در یخچال نگهداری شوند.***

- ***توجه : باید مقدار نمونه نسبت به حجم محیط رعایت شود . یک عدد رکتال سوآب در ۲ml محیط APW تلقیح شود.***

۲- اگر نمونه آب پپتونه قلیاییAPWرا نتوان پس از ۸-۶ ساعت انکوباسیون به TCBSمنتقل کرد، تا ۱۸ ساعت صبر کنید سپس نمونه را به داخل لوله تازه محتوی آب پپتونه قلیایی APWببرید ؛ ۸-۶ ساعت انکوبه نموده و سپس روی محیط TCBS کشت دهید.

۳- پس از مدت زمان انکوباسیون در صورت مشاهده کلنی های صاف، زردرنگ و براق به قطر ۴-۲ میلی متر در محیط TCBS، کلنی را در محیط KIA کشت داده به مدت ۲۴-۱۸ساعت در دمای ۳۷-۳۵ درجه سانتی گراد گرماگذاری نمایید.

- ***توجه : محیط KIA باید به عمق ۳cm وسطح ۳cm ساخته شود.***

- ***توجه : اگر جهت تهیه محیط KIA از لوله درپیچ دار استفاده می کنید، هنگام انکوباسیون درب لوله را شل کنید که امکان تهویه هوا در لوله وجود داشته باشد.***

۴- در صورت مشاهده واکنش alk/acid بدون گاز، تست اکسیداز را انجام دهید.

- ***توجه : جهت انجام تست اکسیداز از کلنیهای رشد کرده بر روی محیط TCBS استفاده نکنید زیرا ممکن است نتایج مثبت یا منفی کاذب در پی داشته باشد.***

- ***روش انجام تست اکسیداز:***

دو تا سه قطره از معرف اکسیداز را روی تکه ای کاغذ صافی در پتری دیش قرار دهید . کشت را با لوپ پلاتینی یا اپلیکاتور چوبی در سرتا سر کاغذ مرطوب بگسترانید. در واکنش مثبت ، باکتری بی درنگ به رنگ ارغوانی تیره در می آید . ارگانیسم های اکسیداز منفی بی رنگ می مانند یا پس از ۱۰ ثانیه به رنگ ارغوانی در می آیند. در صورتی که دیسک اکسیداز آماده « **تترا متیل** پارا فنیلن دی آمین دی هیدرو کلرید» (تجارتی) با باکتریهای مشخص اکسیداز مثبت و اکسیداز منفی کنترل کیفیت شده باشد، می توان از آن استفاده کرد.

آدرس : خیابان حافظ ، نرسیده به جمهوری ، کوچه زرتشتیان ، کوچه محمد بیک ، پلاک ۴۸ ، طبقه دوم ، آزمایشگاه مرجع سلامت
Tel : ۶۶۷۶۰۵۲۶-۶۶۷۲۳۳۴۶-۶۶۷۲۸۱۲۱-۶۶۷۲۸۱۱۳- ۶۶۷۲۸۱۱۲ Fax : ۶۶۷۲۸۱۲۱

بسمه تعالی

جمهوری اسلامی ایران

وزارت بهداشت ، درمان و آموزش پزشکی

آزمایشگاه مرجع سلامت

- ***توجه : برای قرائت نتیجه واکنش اکسیداز باید زمان مناسب (کمتر از ۱۰ ثانیه) رعایت شود.***

- ***روش ساخت معرف اکسیداز:***

تترا متیل پارا فنیلن دی آمین دهیدرو کلرید : ۰/۰۵ گرم ، آب مقطر : ۵ سی سی

معرف را در آب مقطر حل کنید (برای حل کردن گرما ندهید).

- ***توجه : هر بار که معرف تهیه می شود باید با شاهدهای مثبت و منفی کنترل کیفیت شود.***

- ***توجه : محلول اکسیداز باید هر روز ، تازه تهیه شود و قابل نگهداری نمی باشد.***

۵- در صورت مثبت بودن تست اکسیداز مراحل زیر را انجام دهید. (با توجه به جدول ضمیمه)

۶- باکتری را روی محیط SIM کشت دهید که در صورت مثبت بودن واکنشهای ذیل مشاهده می شوند:

- SH2 : منفی
- ا، ایندول: مثبت
- Motility : مثبت

- ***توجه : تست ایندول را با استفاده از محیط APW نیز می توان انجام داد.***

۷- انجام تستهای سرولوژی :

- ***توجه : قبل از انجام تستهای سرولوژی با آنتی سرمها لازم است حتماً تست اتو آگلوتیناسیون انجام شود:***

بخشی از کلنی رشد کرده بر روی محیط KIAیا SIM را برداشت کرده در یک قطره سرم فیزیولوژی بر روی لام شیشه ای خوب مخلوط کنید. سپس لام را به مدت ۱ دقیقه به جلو و عقب تکان دهید تا مطمئن شوید آگلوتیناسیون خودبه خودی صورت نگرفته است. اگر آگلوتیناسیون خود به خودی رخ دهد ، در این صورت باکتری rough است و نمی توان سروتیپ آن را تعیین کرد.

الف)بررسی با آنتی سرم پلی والان O1 :

اگر نتیجه مثبت شد : با آنتی سرم تک ظرفیتی اوگاوا- اینابا بررسی نمایید.

اگرنتیجه منفی شد : درصورت شک به اپیدمی سوش O139 با آنتی سرم تک ظرفیتی O139بررسی نمایید.

- ***توجه : جهت انجام تستهای سرولوژی ضروری است از کلنی های تازه که در محیط KIA یا SIM رشد کرده اند استفاده نموده و از کلنیهای موجود در محیط TCBS استفاده نشود.***

آدرس : خیابان حافظ ، نرسیده به جمهوری ، کوچه زرتشتیان ، کوچه محمد بیک ، پلاک ۴۸ ، طبقه دوم ، آزمایشگاه مرجع سلامت
Tel : ۶۶۷۶۰۵۲۶-۶۶۷۲۳۳۴۶-۶۶۷۲۸۱۲۱-۶۶۷۲۸۱۱۳-۶۶۷۲۸۱۱۲ Fax : ۶۶۷۲۸۱۲۱

بسمه تعالی

جمهوری اسلامی ایران

وزارت بهداشت ، درمان و آموزش پزشکی

آزمایشگاه مرجع سلامت

۹- کشت روی محیط مولر هینتون و انجام آنتی بیوگرام

- دیسکهای مورد استفاده در تست آنتی بیوگرام:

فورازولیدون(Fr) – آمپی سیلین (Am) – کوتریموکسازول (SXT) – نالیدیکسیک اسید(NA) – سیپروفلوکساسین(CIP)- تتراسایکلین (Te)

۱۰- پس از انجام مراحل فوق ضروری است نمونه ها نگهداری شده تا در مراحل بعدی جهت انجام ژنوتایپ منتقل شوند.جهت نگهداری باکتری به مدت حدود یک ماه از محیطTSA(Trypticase Soy Agar) در یخچال ، استفاده نموده و برای نگهداری به مدت طولانی تر می توان نمونه را در محیط TSB(Trypticase Soy Broth) به همراه ۱۵-۱۰٪ گلیسرول ، کشت داده ، در فریزر منفی۷۰درجه سانتی گراد نگهداری نمود.

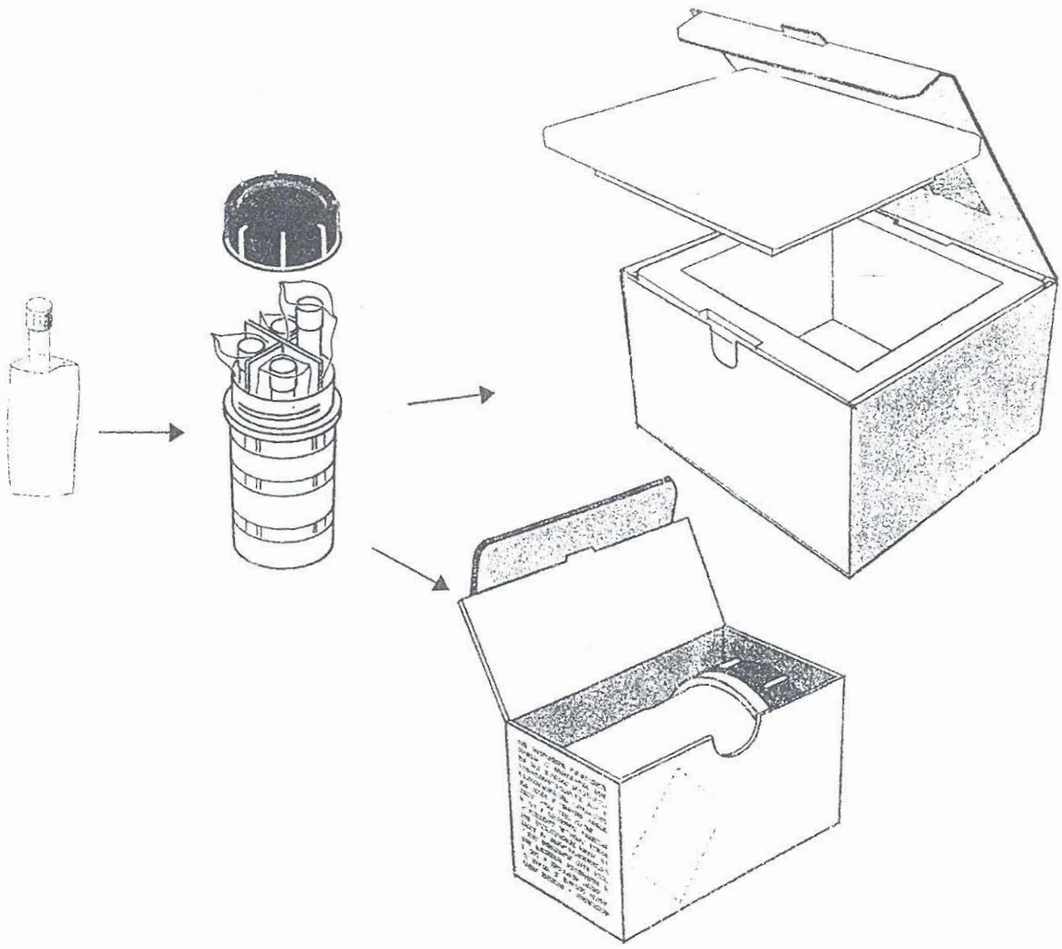
۱۱-برای انتقال موارد مثبت به آزمایشگاه مرجع کشوری جهت تائید تشخیص ، نمونه رشد کرده در محیط KIA با رعایت اصول ایمنی و شرایط استاندارد بسته بندی*، ارسال شود. از ارسال نمونه های مدفوع یا سوآب رکتال به آزمایشگاه مرجع کشوری خودداری نمایید.

* **توجه :** جهت رعایت اصول ایمنی و شرایط استاندارد بسته بندی ، ترجیحاً محیط KIA بایددر لوله درپیچ دار غیرقابل نفوذ به مایعات ساخته شود. در غیر اینصورت درب لوله KIA را با پارافیلم کاملاً بسته و آن را در محفظه پلاستیکی مقاوم درپیچ دار قرار داده و اطراف آن را ماده جاذب الرطوبه ای مانند تکه های ابر بگذاریدکه لوله تکان نخورد. سپس آن را در داخل cold box قرار دهید. برای راهنمایی می توانید از شکل ضمیمه استفاده کنید.

آدرس : خیابان حافظ ، نرسیده به جمهوری ، کوچه زرتشتیان ، کوچه محمد بیک ، پلاک ۴۸ ، طبقه دوم ، آزمایشگاه مرجع سلامت
Tel : ۶۶۷۶۰۵۲۶-۶۶۷۲۳۳۴۶-۶۶۷۲۸۱۲۱-۶۶۷۲۸۱۱۳-۶۶۷۲۸۱۱۲ Fax : ۶۶۷۲۸۱۲۱

آزمایشگاه مرجع سلامت

راهنمای انتقال نمونه



بسمه تعالی

جمهوری اسلامی ایران

وزارت بهداشت ، درمان و آموزش پزشکی

آزمایشگاه مرجع سلامت

جدول

خصوصیات افتراقی باسیلهای گرم منفی تخمیری اکسیداز مثبت

CHARACTERISTIC	AEROMONAS HYDROPHILIA	PLESIOMONAS SHIGELLOIDES	CHROMOBACTERIUM VIOLACEUM	VIBRIO CHOLERAE
Kligler iron agar (slant/deep/hydrogen sulfide)	K/A/-	K-A/A/-	K/A/-	K/A/-
Catalase	+	+	+	+
Esculin	+	-	-	-
Motility	+	+	+	+
ONPG	+	+	-	+
Indole	+	+	-	+
Voges-Proskauer	(+)	-	-	(-)
Lysine decarboxylase	+	+	-	+
Ornithine decarboxylase	-	+	-	+
Carbohydrate:				
Lactose	(-)	(+)	-	-
Sucrose	+	-	(-)	+
Manitole	+	-	-	+
Inositole	-	+	-	-
Growth in Peptone,1% with:				
0% NaCL	+	+	+	+
7% NaCL	-	-	-	-
11% NaCL	-	-	-	-

+: 90% or more of strains are positive

(+): 51% - 89% of strains are positive

(-): 10% - 50% of strains are positive

- : less than 10% of strains are positive

آدرس : خیابان حافظ ، نرسیده به جمهوری ، کوچه زرتشتیان ، کوچه محمد بیک ، پلاک ۴۸ ، طبقه دوم ، آزمایشگاه مرجع سلامت
Tel : ۶۶۷۶۰۵۲۶-۶۶۷۲۳۳۴۶-۶۶۷۲۸۱۲۱- ۶۶۷۲۸۱۱۳- ۶۶۷۲۸۱۱۲ Fax : ۶۶۷۲۸۱۲۱

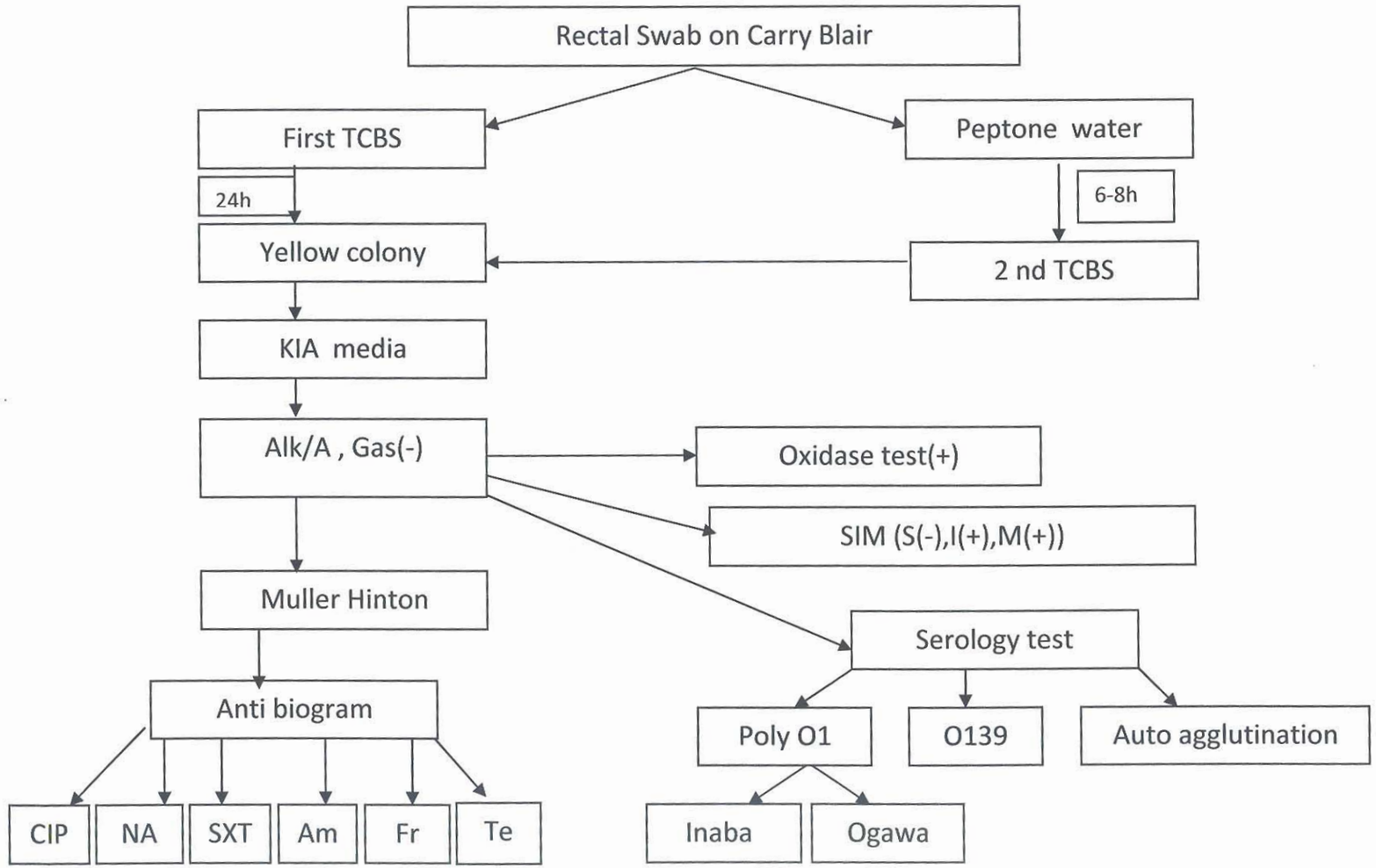
بسمه تعالی

جمهوری اسلامی ایران

وزارت بهداشت ، درمان و آموزش پزشکی

آزمایشگاه مرجع سلامت

Flow chart of cholera testing in laboratory



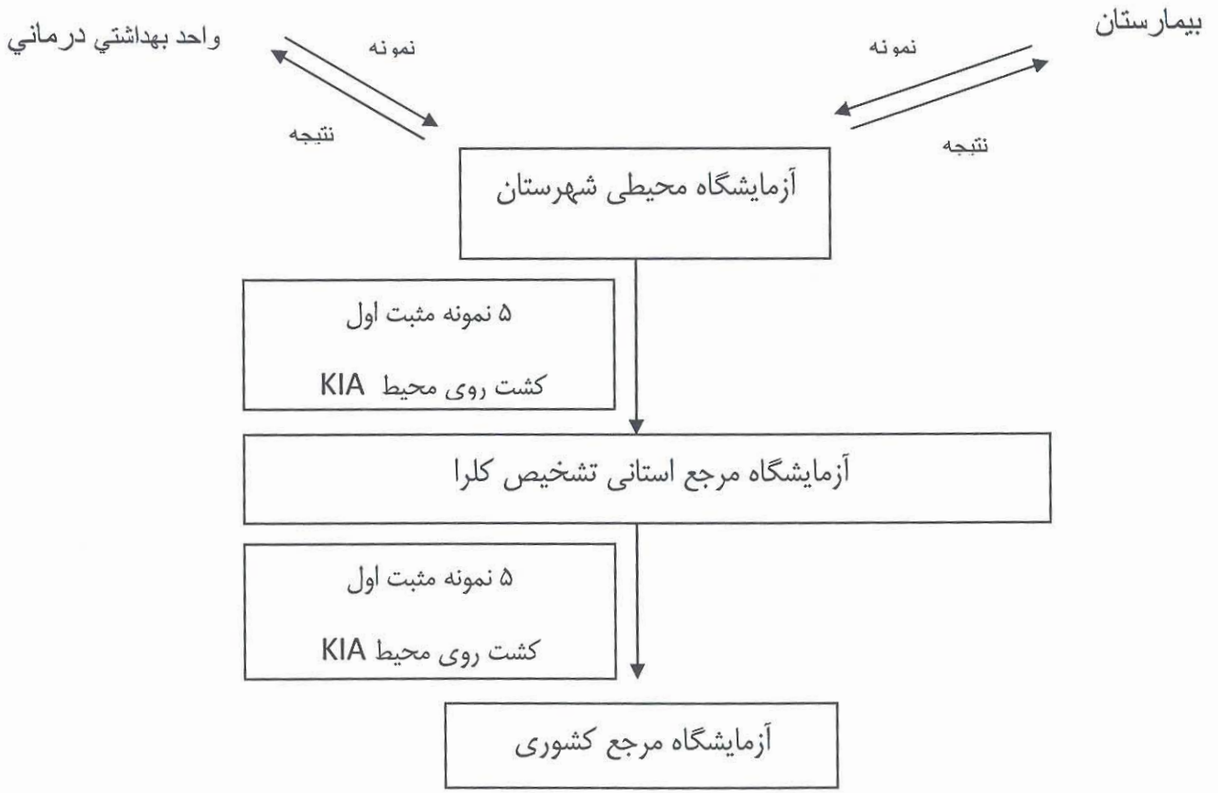
بسمه تعالی

جمهوری اسلامی ایران

وزارت بهداشت ، درمان و آموزش پزشکی

آزمایشگاه مرجع سلامت

مراحل ارجاع نمونه های مشکوک به کلرا جهت تائید تشخیص



هر آزمایشگاه پس از تائید ۵ نمونه توسط آزمایشگاه مرجع کشوری کلرا ، اجازه گزارش تشخیصهای بعدی خود را دارد.

فرم ثبت و نگهداری نتایج آزمایشات ویبریو کلرا در آزمایشگاه

نام استان ..... نام شهرستان ..... نام آزمایشگاه .....

ردیف	نام و نام خانوادگی	تاریخ نمونه برداری	تاریخ تحویل نمونه به آزمایشگاه	تاریخ انجام آزمایش	First TCBS	2nd TCBS	KIA	Gas	Oxidase test	SIM			O1				O139	Antibiogram					
										M	I	S	poly	Inaba	Ogawa	Auto agg		Fr	Am	SXT	NA	CIP	Te
۱																							
۲																							
۳																							
۴																							
۵																							
۶																							
۷																							
۸																							
۹																							
۱۰																							
۱۱																							
۱۲																							
۱۳																							
۱۴																							
۱۵																							

بسمه تعالی تعالی

جمهوری اسلامی ایران

وزارت بهداشت ، درمان و آموزش پزشکی

آزمایشگاه مرجع سلامت

جدول برآورد تقریبی

مقادیر محیطهای کشت مورد نیازدر تشخیص آزمایشگاهی ویبریو کلرا

ردیف	نام محیط	مقدار پودر محیط در یک لیتربرحسب گرم	حجم مورد نیاز پلیت/لوله بر حسب میلی لیتر	تعداد پلیت/لوله حاصله از یک لیتر محیط آماده	تعداد پلیت /لوله حاصله از نیم کیلوگرم پودر محیط تجارتی
۱	Carry Blair	۱۲/۶ gr در ۹۹۱/ml	۶ml/tube	۱۶۵Tube	۶۵۵۰ Tube
۲	TCBS	۸۹	۲۵ml/plate	۴۰Plate	۲۳۰Plate
۳	APW	۲۵/۵	۲ml/tube	۵۰۰Tube	۹۸۰۰Tube
۴	مولر هینتون آگار	۳۸	۳۰ml/plate	۳۳Plate	۴۴۰Plate
۵	KIA	۳۵	۵ml/tube	۲۰۰Tube	۲۸۵۰Tube
۶	TSI	۶۵	۵ml/tube	۲۰۰Tube	۱۵۴۰Tube
۷	SIM	۳۰	۵ml/tube	۲۰۰Tube	۳۳۳۰Tube

* **توجه:** مقادیر فوق تقریبی بوده و فقط جهت تخمین مقدار محیطهای کشت مورد نیاز ارائه گردیده است. لذا ضروری است جهت تهیه کلیه محیطهای کشت حتماً به دستورالعمل روی محیطها مراجعه شود.

آدرس : خیابان حافظ ، نرسیده به جمهوری ، کوچه زرتشتیان ، کوچه محمد بیک ، پلاک ۴۸ ، طبقه دوم ، آزمایشگاه مرجع سلامت

Tel : ۶۶۷۶۰۵۲۶-۶۶۷۲۳۳۴۶-۶۶۷۲۸۱۲۱- ۶۶۷۲۸۱۱۳- ۶۶۷۲۸۱۱۲ Fax : ۶۶۷۲۸۱۲۱

روش نمونه برداری برای جداسازی ویروس آنفلوانزا

نمونه سرم :

۵ سی سی نمونه خون از بیمار گرفته و حدود ۲ سی سی سرم جمع آوری شده را در لوله های در پیچ دار و با رعایت زنجیره سرد به آزمایشگاه استان انتقال دهید(برای نگهداری طولانی مدت در ۲۰- درجه سانتی گراد فریز نمایید.)

نمونه ترشحات گلو و بینی :

به طور همزمان با استفاده ازسواب استریل، ازبینی وگلوی افرادمشکوک به آنفلوانزا نمونه برداری کنید.

یک نمونه خوب برای شناسایی ویروس آنفلوانزا بایدحاوی مقادیرقابل توجهی ازسلول های اپی تلیال دستگاه تنفسی باشد که این نمونه گیری را می توان با سواب بینی وگلو انجام داد. سواب گلو به تنهایی ،حاوی سلول های اپی تلیال سنگفرشی است که ویروس آنفلوانزا درآن به خوبی تکثیر نمی یابد. بنا براین بهتر است از دو سواب بینی و گلو همزمان استفاده شود.

روش نمونه برداری:

۱- سواب داکرون را داخل یکی ازسوراخ های بینی برده وبه بالا وپایین شاخک های بینی بمالید(استفاده ازسواب استریل داکرون یا ریون با دسته پلاستیکی)

۲- برای نمونه گیری ازلوزه ها وحلق ، ازسواب دیگری استفاده نمایید .

هردوسواب رادریک لوله حاوی محیط انتقال ویروس (ایگل) قراردهید. (در صورت استفاده از محیط **UTM** سواب را وارد محیط **UTM** کنید)

۳- دسته هردوسواب رابشکنید .

۴- درپوش لوله ها را به خوبی ومحکم ببندید.

۵- مشخصات بیمار را بر روی لوله ها ثبت نمایید.

۶ - لوله ها با رعایت زنجیره سرد ارسال نمایید.

۷- برای نگهداری تا ۲۴ ساعت دریخچال ۲ تا ۸ درجه و بیش از آن از فریزر ۲۰- استفاده گردد.

- **نمونه برداری از نوزادان:**

از سواپ های مخصوص و استریل داکرون استفاده کرده و از قسمت بالای کام و پشت لوزه ها و از ترشحات مخاطی ناحیه حلق نمونه گیری کرده و وارد محیط ویروکالچر یا محیط ترانسپورت ایگل یا **UTM** کرده و در کنار یخ (زنجیره سرد) به آزمایشگاه ارسال نمایید.

- **نمونه برداری از بزرگسالان:**

از محیط ترانسپورت ایگل حاوی ۲ سی سی محیط با **pH** برابر ۷/۴و به روش غرغره کردن استفاده شود .نمونه ایگل را داخل لیوان یک بار مصرف بریزید و بیمار غرغره و دو باره در لیوان خالی کند و آن را وارد لوله در پیچ دار کرده و با نوشتن مشخصات بیما ر در کنار یخ (۸-۲)درجه سانتی گراد با رعایت زنجیره سرد به آزمایشگاه استان ارسال کنید .