

A large, circular petri dish filled with a green, viscous bacterial culture. The surface of the culture is uneven, with various shades of green and some darker, more concentrated areas. A thin, vertical orange line runs down the center of the dish, slightly to the right of the text.

راهنمای آزمایشگاهی تشخیص عفونت‌های بیمارستانی

وزارت بهداشت، درمان، و آموزش پزشکی
معاونت سلامت

مرکز مدیریت بیماری‌ها - مرکز تحقیقات آزمایشگاه‌های رفرنس کشور

راهنمای آزمایشگاهی

تشخیص عفونت‌های بیمارستانی

نویسندگان (به ترتیب حروف الفبا):

دکتر پیمان تربتی

پاتولوژیست، عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

دکتر سهیلا حکمت‌پزیدی

پاتولوژیست، کارشناس مسئول بخش میکروب‌شناسی آزمایشگاه رفرانس

مژگان دلدار

باکتریولوژیست، کارشناس ارشد بخش میکروب‌شناسی بیمارستان میلاد

دکتر محمد رهبر

میکروبیولوژیست، عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات آزمایشگاه رفرانس

دکتر افشین صفایی

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

دکتر محمدجواد کاویانی

دکترای علوم آزمایشگاهی، کارشناس مسئول اداره کل امور آزمایشگاه‌ها

دکتر بابک ولی‌زاده

دکترای علوم آزمایشگاهی، مسئول بخش میکروب‌شناسی آزمایشگاه بهار

دکتر مهرداد ونکی

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

ویراستار:

دکتر بابک ولی‌زاده

سرشناسه: ولی زاده، بابک. . . [و دیگران].
عنوان و پدیدآور: راهنمای آزمایشگاهی تشخیص عفونت‌های بیمارستانی/
تألیف: بابک ولی زاده . . . [و دیگران].
زیر نظر: محمدمهدی گویا.
مشخصات نشر: تهران: مرکز نشر صدا، ۱۳۸۶.
مشخصات ظاهری: ۲۰۰ ص: جدول، مصور.
شابک: 978-964-359-195-3
یادداشت: فیپا.
موضوع: عفونت‌های بیمارستانی -- تشخیص.
موضوع: دستنامه‌های آزمایشگاهی.
رده‌بندی کنگره: ۷۹ع/۶۴۴ RA
رده‌بندی دیویی: ۶۱۴/۴۴



تلفن: ۸۸۵۵۳۴۲۹ و

دورنگار:

مرکز مدیریت بیماری‌ها

۸۸۵۵۳۴۰۳

۸۸۷۱۳۶۵۳

راهنمای آزمایشگاهی تشخیص عفونت‌های بیمارستانی

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

خدمات چاپ و نشر: مرکز نشر صدا

نوبت چاپ: اول (۱۳۸۶)

شمارگان: ۵۰۰۰ نسخه

شابک: ۹۷۸-۹۶۴-۳۵۹-۱۹۵-۳ ISBN: 978-964-359-195-3

«حق چاپ برای مرکز مدیریت بیماری‌ها محفوظ است.»

سراغاز

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

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

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

دکتر محمدمهدی گویا

پیش‌گفتار

عفونت‌های بیمارستانی همواره از مشکلات گروه پزشکی بوده‌است و نقش آزمایشگاه در شناسایی، کنترل و پایش این عفونت‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. با توجه به این مهم، کتاب حاضر تحت عنوان *راهنمای آزمایشگاهی تشخیص عفونت‌های بیمارستانی* برای اولین بار تدوین شده‌است. کتاب شامل ۹ فصل است. فصل‌های ۲، ۳، ۴ و بخش اول فصل ۵ با تقسیم‌بندی عفونت‌های بیمارستانی براساس استاندارد NNIS در ارتباط است. بخش دوم فصل ۵ و فصل‌های ۶، ۷، ۸ و ۹ به مباحث نمونه‌برداری از کاتترهای خونی، لوازم و محیط‌های بیمارستانی، هوا، آب و مایعات دیالیز اختصاص دارد. در این کتاب، نویسندگان برای سهولت استفاده و با توجه به تخصصی بودن بسیاری از اصطلاحات، تعدادی از جدول‌ها و شکل‌ها را به زبان اصلی آورده‌اند. امید آن که راهنمای تشخیص ارگان‌های بااهمیت در عفونت‌های بیمارستانی مانند MRSA، VRE، کسترییدیوم دیفیسیل نیز منتشر شود. در پایان از زحمات و همکاری «مرکز نشر صدا» سپاسگزاری می‌شود.

دکتر بابک ولی‌زاده

«ویراستار»

۱۳۸۶

◀ فصل پنجم

کشت خون، کاتترهای خونی و فرآورده‌های بانک

خون

بخش اول

کلیات

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

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

باکتری به سه گروه تقسیم می‌شود:

۱. گذرا (Transient)،
۲. پیوسته (Continuous)،
۳. متناوب (Intermittent).

۱. گذرا: باکتری‌می به صورت تصادفی در مواقعی چون مسواک زدن و جویدن غذا، دستکاری بافت‌های عفونی، Instrumentation سطوح مخاطی آلوده و جراحی بافت‌های غیراستریل به وجود می‌آید که در بعضی موارد به سپتی سمی منجر می‌شود.

۲. پیوسته: در مواردی که منشأ عفونت داخل عروقی^۱ باشد، مانند اندوکاردیت و کاتترهای خونی، باکتری به‌طور پیوسته به داخل خون آزاد می‌شود. همچنین، در مراحل ابتدایی تیفوئید و بروسلاز نیز این حالت دیده می‌شود.

۳. متناوب: در مواردی که عفونت خارج عروقی^۲ باشد، مانند آبسه، زخم، پنومونی، مننژیت، استئومیلیت، UTI، آرتریت عفونی و عفونت‌های مجاری صفراوی دیده می‌شود. در بیشتر موارد باکتری از طریق سیستم لنفاوی و از موضع عفونی به جریان خون وارد می‌شود که معمولاً ۴۵ دقیقه قبل از شروع تب است. همچنین، در بیش از ۲۵ درصد موارد منشأ عفونت مشخص نیست.

عامل ایجادکننده باکتریی اکثراً یک ارگانیزم است، ولی در ۳-۵ درصد موارد ممکن است چند میکروب عامل آن باشد؛ به‌ویژه در معتادان تزریقی، افراد دچار سوختگی وسیع و عفونت‌های با منشأ دستگاه گوارش (جدول‌های ۱-۵ و ۲-۵).

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

جداسازی *Clostridium perfringens* به احتمال ۷۷ درصد نشانه آلودگی است، ولی درباره سایر کلستریدیوم‌ها به احتمال ۸۰ درصد عفونت واقعی رخ داده است. باید توجه داشت که اگر میزان آلودگی کشت خون را ۳ درصد در نظر بگیریم، احتمال جداشدن دو آلوده‌کننده یکسان و شایع از دو شیشه کشت خون برابر $0/0009 = 0/03 \times 0/03$ یا به عبارتی کمتر از ۱ در ۱۰۰۰

1. Intravascular
2. Extravascular

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

جدول ۵-۱: Bacteria Commonly Isolated from Blood Cultures

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

منبع: ۱

جدول ۵-۲: Agents of Infective Endocarditis

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

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

منبع: ۳

مواد ضد عفونی کننده برای نمونه گیری

۱. بتادین ۱۰ درصد Povidone - Iodine.

۲. محلول الکلی ۲ درصد کلرهگزیدین (Chlorhexidine).

در حال حاضر، کلرهگزیدین بهترین ماده ضد عفونی کننده توصیه شده است. به ویژه در نمونه گیری از کاتترها، این ماده در بخش های کودکان نتایج بهتری دارد (آلودگی کمتر) و عوارض پوستی که در کودکان با مصرف ترکیبات یددار ایجاد می شود در مصرف کلرهگزیدین کمتر است.

نمونه گیری با Povidone – Iodine 10%

۱. ورید مورد نظر را انتخاب کنید.

۲. در ابتدا پوست ناحیه را با الکل ۷۰ درصد با حرکت محکم دورانی از داخل به خارج به قطر تقریبی ۵cm ضد عفونی کنید.

۳. پس از خشک شدن الکل همین کار را با بتادین (۱۰ درصد Povidone - Iodine) تکرار و حداقل یک دقیقه (ترجیحاً ۲-۱/۵ دقیقه) صبر کنید تا محل ضد عفونی شود. برای جلوگیری از آلودگی رعایت زمان توصیه شده بسیار اهمیت دارد.

۴. در صورت لزوم به لمس مجدد ورید باید نوک انگشت درحالی که با دستکش پوشیده شده است با بتادین ضد عفونی شود.

۵. پس از نمونه گیری، خون را مستقیماً و بدون تعویض سوزن به درون شیشه کشت خون که درپوش لاستیکی آن قبلاً با الکل ۷۰ درصد ضد عفونی و خشک شده است، تلقیح کنید و شیشه را با ملایمت تکان دهید تا خون با ماده ضد انعقاد (SPS)^۱ مخلوط شود.

در گذشته روش استفاده از دو سوزن، یعنی تعویض سوزن اول پس از خروج از رگ و جایگزینی با سوزن استریل نو، توصیه می شد. اما در حال حاضر، با توجه به احتمال خطر این کار برای کارکنان این روش توصیه نمی شود.

1. Sodium Polyanethol Sulfonate

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

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

تعداد کشت خون، زمان نمونه‌گیری و حجم خون مورد نیاز

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

در صورتی که حجم مناسبی از خون به درون محیط کشت تلقیح شود، بسته به تعداد نمونه گرفته‌شده:

- در باکتری‌می متناوب (Intermittent): با یک کشت خون ۸۰ درصد و با سه کشت خون ۹۹ درصد عامل مشخص می‌شود.
- در موارد غیراندوکاردیت کشت خون اول ۹۲-۸۲ درصد، کشت خون دوم ۹۹-۹۰ درصد و در کشت خون سوم ۹۹/۶ درصد عامل مشخص می‌شود.
- در موارد اندوکاردیت با یک نمونه خون ۹۰ درصد و با دو نمونه خون ۹۵ درصد عامل مشخص می‌شود. در کسانی که آنتی‌بیوتیک دریافت کرده‌اند بیش از ۳ کشت خون نیاز است.

تعداد و زمان خون‌گیری

۱. تب حاد: قبل از شروع درمان، ۲ نمونه از ۲ رگ در ۱۰ دقیقه گرفته‌شود.
۲. بیماری غیرحاد: قبل از شروع درمان، ۳-۲ نمونه از رگ‌های جداگانه طی ۲۴ ساعت گرفته‌شود. فاصله بین نمونه‌ها نباید کمتر از ۳ ساعت باشد.
۳. اندوکاردیت حاد: قبل از شروع درمان، ۳ نمونه از ۳ رگ جداگانه در مدت ۱-۲ ساعت گرفته‌شود.

۴. اندوکاردیت تحت حاد: ۳ نمونه از ۳ رگ با فاصله زمانی حداقل یک ساعت طی ۲۴ ساعت گرفته شود. اگر کشت بعد از ۲۴ ساعت منفی بود، ۲-۳ نمونه دیگر با همین روش گرفته شود.
۵. اندوکاردیت تحت درمان: ۲ نمونه در روز اول و ۳ نمونه در سه روز متوالی گرفته شود.
۶. غیراندوکاردیت تحت درمان: ۶ نمونه در ۴۸ ساعت باید گرفته شود. نمونه‌گیری باید قبل از شروع دُز بعدی آنتی‌بیوتیک انجام شود. در موارد ۵ و ۶ استفاده از محیط‌های تجاری حاوی Resin ارجحیت دارد، به‌ویژه برای گرم مثبت‌ها.
۷. تب با منشأ ناشناخته (FUO): ۲-۳ نمونه از قسمت‌های مختلف با فاصله زمانی حداقل یک ساعت و طی ۲۴ ساعت گرفته شود. در صورت منفی بودن کشت در مدت ۴۸-۲۴ ساعت، ۲-۳ نمونه دیگر گرفته خواهد شد.

حجم نمونه

- در افراد بزرگسال در هر نوبت حداقل ۱۰ سی‌سی خون گرفته شود. باید توجه داشت به‌ازای هر ۱ سی‌سی خون احتمال جداسازی ۳/۲ درصد زیاد می‌شود.
- در کودکان کمتر از ۱۰ سال تقریباً به‌ازای هر سال حداقل ۱ سی‌سی توصیه می‌شود، هر چند اخیراً به معیار وزنی توجه شده است (جدول ۳-۵).

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

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

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

منبع: ۲

انتقال

در مدت ۴-۲ ساعت در حرارت RT^۱ ارسال شود. نمونه را نباید در یخچال گذاشت.

کشت

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

۱. متعارف (Conventional)،

۲. خودکار (Automated).

■ در نوع مرسوم و متعارف در شیشه کشت خون اغلب از محیط‌های کشت مایع TSB^۲ و BHI^۳ استفاده می‌شود.

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

برای جلوگیری از انعقاد خون و ایجاد لخته که احتمال جداسازی را کم می‌کند، باید SPS با غلظت ۰/۰۵-۰/۰۲۵ درصد به محیط اضافه شود که علاوه بر خاصیت ضدانعقادی با عمل ضدکمپلمان و ضدفاگوسیتوز به رشد باکتری‌ها کمک می‌کند. SPS بهترین ضدانعقاد موجود است و نباید از سدیم سیترات که باعث مهار رشد تعدادی از گرم مثبت‌ها می‌شود یا EDTA و هپارین استفاده کرد. در موارد

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

نمونه‌گیری از سوندهایی که از مجرای آن ماده تزریقی حاوی هپارین عبور می‌کند، باید قبل از نمونه‌گیری جریان هپارین قطع شود و سرنگ اول نمونه دور ریخته و از سرنگ دوم استفاده شود.

نسبت خون به محیط کشت

بهترین نسبت توصیه شده ۵:۱ است. با توجه به حداقل نمونه در بزرگسالان که ۱۰ سی‌سی است، نباید از محیط‌های کشت که کمتر از ۴۰ سی‌سی محیط مایع دارند در این موارد استفاده کرد.

اتمسفر

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

انکوباسیون

- در 35°C و حداقل به مدت یک هفته؛
 - در موارد شک به اندوکاردیت حداقل به مدت دو هفته و قارچ‌ها بیش از دو هفته؛
 - در موارد شک به بروسلا به مدت ۶-۴ هفته؛
 - ترجیحاً در ۲۴ ساعت اول شیشه‌های کشت خون چندبار تکان داده شوند.
- پس از ۱۸-۶ ساعت اولین کشت از محیط کشت خون (حدود ۰/۲۵ سی‌سی) روی محیط chocolate blood agar انجام می‌شود. محیط را در CO_2 گذاشته و برای

مدت ۳-۵ روز از نظر رشد بررسی می‌شود. می‌توان در زمان کشت یک قطره از محیط را روی لام نو قرارداد و پس از خشک‌شدن در زیر هود و کنار شعله با متانول فیکس کرد و با رنگ گرم یا متیلن بلو رنگ‌آمیزی نمود. در صورت مثبت‌بودن و رد احتمال آلودگی لام، نتیجه تلفنی به پزشک اطلاع داده‌شود.

— نوبت دوم کشت (Subculture) بین ۷۲-۴۸ ساعت بسته به شرایط بیمار توصیه می‌شود.

— کشت پس از ۷ روز در بعضی از منابع توصیه نمی‌شود، ولی انجام‌دادن آن ارجح است و احتمال جداسازی باکتری‌های دیررشد، سخت‌رشد و قارچ‌ها را زیاده می‌کند.

طی مدت ۷ روز و پس از آن شیشه‌های کشت خون باید به صورت ماکروسکوپی از نظر علائم رشد شامل کدورت، لیزشدن، ایجاد گاز و ایجاد کلنی‌های باکتری (اغلب در گرم مثبت‌ها) بررسی شود. در میان این موارد، کدورت قابل اعتمادترین مشخصه است و سایر موارد مانند لیزشدن به علت سرعت تخلیه خون از سوزن یا ایجاد گاز در شیشه‌های vent نشده که ممکن است به فشار اولیه محیط مربوط باشد، چندان قابل اعتماد نیست. همچنین تعدادی از ارگانیسیم‌ها مانند *N.meningitides* و هموفیلوس معمولاً کدورت ایجاد نمی‌کنند.

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

— در زمان استفاده از محیط‌های دوفازی باید در روز اول ۲ بار و در روزهای بعد با فواصل ۱-۳ روز به آرامی با کج کردن بطری برای چند لحظه، فاز مایع را با تمام سطح جامد تماس داد و پس از ۷۲-۲۴ ساعت، سطح محیط جامد

را از نظر وجود کلنی بررسی کرد. با این عمل subculture در خود محیط انجام می‌شود.

روش Lysis - Centrifugation (ISOLATOR)

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

سیستم‌های خودکار

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

بسته به نوع سیستم برای سنجش از روش‌های سنجش کلریمتریک و فلورسنت برمبنای تشخیص CO_2 غیررادیواکتیو استفاده می‌شود و در انواع هوازی، بی‌هوازی، میکوباکتریوم‌ها و برای رشد قارچ وجود دارد. معروف‌ترین این سیستم‌ها عبارت‌اند از:

1. Bactec System (Becton Dickinson)

2. Bact / Alert(bio Merieux)

خوانندگان می‌توانند برای اطلاعات کامل‌تر به منابع ۲، ۳ و ۴ مراجعه نمایند.

گزارش و تفسیر

۱. گزارش شفاهی (Verbal Report): هر زمان که کشت خون مثبت شد، نتیجه باید تلفنی به پزشک اعلام شود. باید توجه داشت میزان مرگ‌ومیر موارد سپتی سمی حاد که به Septic Shock منجر می‌شود، ۴۰-۲۰ درصد است.
۲. گزارش کتبی (Written Report): جواب کشت مثبت یا منفی پس از مدت معین است، مانند:

No growth after 7 days

or

No growth in 1 week

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

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

۱۰۰ شیشه کشت خون گرفته شده است). همچنین، حدود نصف کل کشت‌های خون که مثبت شده‌اند، به علت آلودگی است.

۵. در مواردی که فقط یک بار کشت خون انجام شود یا در یک نوبت کشت از چند نوبت کشت خون انجام شده آلوده‌کننده‌های شایع جدا شود، احتمال آلودگی زیاد است و پس از گزارش باکتری جمله **A Probable Contaminant** قید می‌شود. در این موارد به آزمایش تعیین حساسیت میکروبی نیاز نیست، مگر به درخواست پزشک.

۶. دو کشت خون مثبت در طول ۴۸ ساعت با استرپتوکوک گروه ویریدانس با ارزش است.

۷. درباره استاف‌های کواگولاز منفی، باتوجه به وضعیت بالینی بیمار، گاهی برای تأیید عفونت واقعی به ۴-۳ کشت خون مثبت نیاز است.

منابع بخش اول: ۲، ۳، ۴، ۵، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۲۰ و ۲۱.

بخش دوم

کاتترهای عروقی و عفونت‌های بیمارستانی

حدود ۱۵ درصد عفونت‌های بیمارستانی را عفونت‌های خونی بیمارستانی (NBI)^۱ تشکیل می‌دهند. حدود ۱ درصد تمام افراد بستری در بیمارستان به این نوع عفونت مبتلا می‌شوند. میزان این عفونت‌ها ۲۵۰,۰۰۰-۲۰۰,۰۰۰ مورد در سال گزارش شده است (۱۵ و ۱۸).

NBI حدود ۴۰ درصد کل موارد باکتری می‌ها را تشکیل می‌دهند که ۹۰-۵۰ درصد آنها در ارتباط با Intravascular Devices هستند (۱، ۶، ۷، ۸، ۱۶ و ۲۴). در دهه ۱۹۸۰ تعداد عفونت‌های خونی بیمارستانی چند برابر شده که علت

1. Nosocomial Bloodstream Infections

آن استفاده بیشتر از کاتترها است. میزان مرگ و میر NBI ۲۵-۱۰ درصد گزارش شده است (۱، ۶، ۱۰، ۱۶ و ۲۴).

سالانه در ایالات متحده بین ۱۵۰-۲۰۰ میلیون Intravascular Device استفاده می‌شود که ۷-۵ میلیون آن از نوع CVC^۱ است. نوع nontunneled CVC مهم‌ترین عامل ایجاد عفونت‌های خونی وابسته به کاتتر است (۷، ۱۴، ۱۵ و ۱۸). با توجه به احتمال مرگ و میر بسیار، عفونت‌های خونی مهم‌ترین عفونت بیمارستانی محسوب می‌شوند (۹) و از نظر شیوع پس از سوندهای ادراری و عفونت‌های ناشی از Ventilator، مقام سوم را در میان عفونت‌های در ارتباط با Devices دارند (۶). خوشبختانه در آخرین مطالعه انجام شده و با توجه به رعایت بسیاری از توصیه‌ها، شیوع عفونت‌های وابسته به کاتتر در یک مطالعه ۴ ساله کاهش یافته است (۶).

تشخیص عفونت‌های خونی وابسته به کاتتر مشکل است (۲۴). وجود تب از حساسیت بالا، ولی ویژگی کم برخوردار است (۱). با وجودی که تب اولین علامت است، ولی مشخص شده است که در بیش از ۸۰ درصد افرادی که پس از نصب CVC دچار تب می‌شوند، علت تب عفونت خونی نیست (۱ و ۲۴). در ۸۵-۷۵ درصد مواردی که کاتتر خارج شده، این کار غیرضروری بوده است (۱) و (۲۴) و فقط در ۲۵-۱۵ درصد مواردی که CVC برداشته شده، عامل عفونت کاتتر بوده است (۱۹ و ۲۳). باید توجه داشت که کاتترهای نوع محیطی Peripheral کمتر عفونت ایجاد می‌کنند. در جدول‌های ۵-۴ و ۵-۵ انواع IVD^۲ و در جدول ۵-۶ عفونت‌های در ارتباط با انواع IVD توضیح داده شده است.

1. Central Venous Catheter
2. Intra Vascular Device

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

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

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

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

NOTE: CVC, central venous catheter

منبع: ۱۸

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

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

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

منبع: ۱۸

CDC عفونت‌های خونی بیمارستانی را به دو گروه تقسیم می‌کند:

۱. عفونت‌هایی که با روش‌های میکروب‌شناسی تأیید شده‌اند؛
 ۲. عفونت‌هایی که تأیید میکروب‌شناسی ندارند و به‌عنوان Clinical Sepsis تقسیم می‌شوند (۸).
- ایجاد عفونت‌های وابسته به کاتتر به سه عامل بستگی دارد:

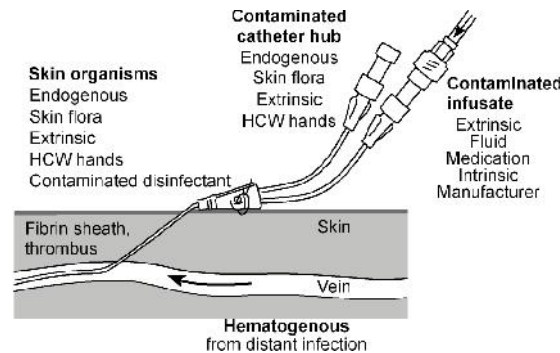
۱. وابسته به بیمار،
 ۲. وابسته به کاتتر،
 ۳. وابسته به بیمارستان.
- در عوامل وابسته به کاتتر که با ارگانیسم‌های مسئول نیز در ارتباط است، جنس کاتترها اهمیت دارد.

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

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

اخیراً سعی می‌شود که کاتترهایی از جنس Antithrombogenic Polyurethane تولید شود (۱۰ و ۱۵). همچنین، سوندهایی تولید شده‌اند که

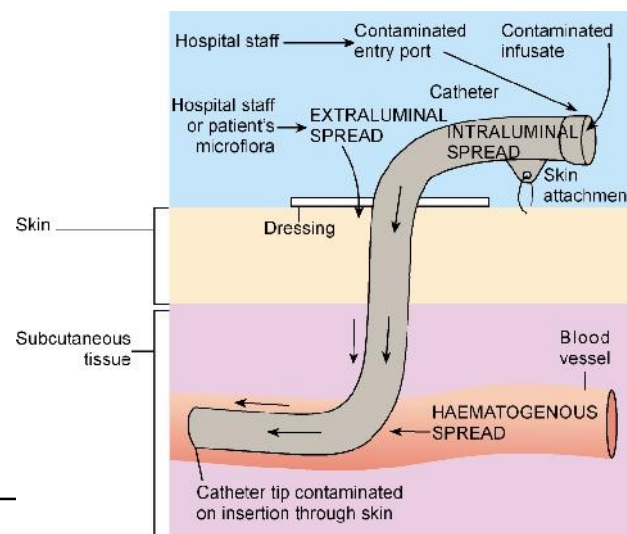
سطح آنها با مواد ضد میکروبی مانند Cholerhexidine یا Sulfadiazine - Silver یا Minocycline آغشته شده است (۱۴).
مسیرهای ورود ارگانیسم در شکل‌های ۱-۵، ۲-۵ و ۳-۵ نشان داده شده است، پوست و Hub مهم‌ترین مسیر و پس از آن مسیر خونی است (۱).



شکل ۱-۵:

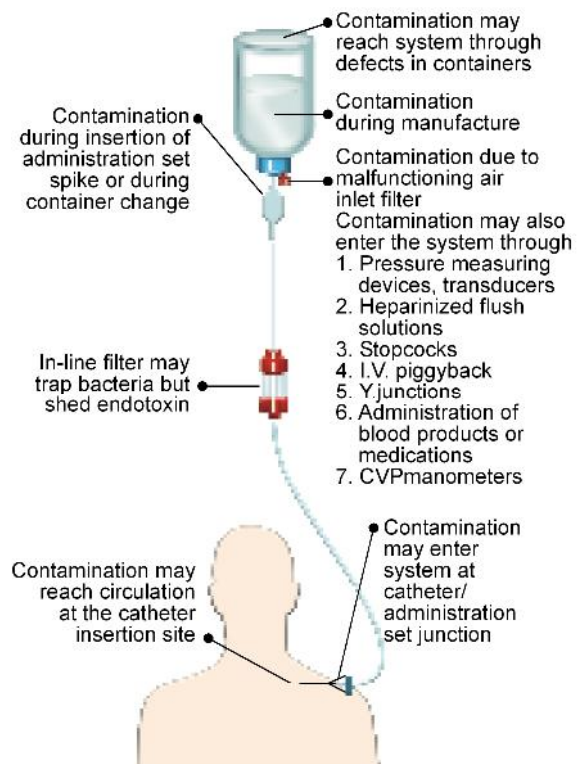
Potential sources of infection of a percutaneous intravascular device (IVD): the contiguous skin flora, contamination of the catheter Hub and lumen, contamination of infusate, and haematogenous colonization of the IVD from distant, unrelated sites of infection [1]. HCW, health care worker.

منبع: ۱۶



شکل ۵-۲

منبع: ۳



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

منبع: ۱

آلودگی از طریق مواد تزریقی (Infusate)

شروع علائم این آلودگی معمولاً سریع و حاد است (۱۸). غالب ارگانیسم‌های درگیر گرم منفی‌ها هستند، مانند *Entrobacter agglumerans*، *Serratia spp.*، *Citrobacter freundii*، *Acinetobacter spp.*، *Flavobacterium spp.*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Pseudomonas fluorescens*، *Burkholderia cepacia* که در دو مورد B.c و P.a می‌توانند از طریق آب مقطر نیز آلودگی ایجاد کنند. در نوزادانی که از محلول‌های حاوی Lipid استفاده می‌کنند، قارچ چربی دوست *Malassezia furfur* یا استاف کوagulاز منفی می‌تواند عامل باشد (۱ و ۱۸).

— آلودگی از طریق Catheter Hub and lumen:

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

— آلودگی از طریق پوست در محل ورود کاتتر:

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

میکروب‌شناسی

در بیماران دارای کاتترهای خونی در طول دو دهه گذشته استافیلوکوک‌های کوagulاز منفی مهم‌ترین عامل بوده‌اند. به‌خصوص در بیماران با مشکلات سیستم ایمنی و در افرادی که سوندهای طولانی مدت داشته‌اند (جدول ۵-۷).

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

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

فصل پنجم: کشت خون، کاتترهای خونی و فرآورده‌های بانک خون

<i>Coagulase-negative staphylococci</i>	27	37
<i>Staphylococcus aureus</i>	16	13
Enterococcus	8	13
Gram-negative rods	19	14
<i>Escherichia coli</i>	6	2
<i>Enterobacter</i>	5	5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4	4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	3
<i>Candida</i> spp.	8	8

منبع: ۱۵

با توجه به جدول مزبور، عامل $\frac{2}{3}$ عفونت‌ها / استافیلوکوک‌ها هستند که مهم‌ترین علت آن در توان ذاتی این باکتری در چسبیدن به سطح کاتترهاست (۱).

میزان مرگ در عفونت‌های وابسته به کاتترها ۱۹-۱۴ درصد است (۱۸) و / استافیلوکوک / اورئوس با ۸/۹ درصد مهم‌ترین عامل در میان سایر عوامل است. بیش از ۵۰ درصد / استافیلوکوک / اورئوس‌های جداشده از کاتترها مقاوم به oxacillin هستند (MRSA). این باکتری‌ها از طریق fibrinogen، fibronectin و laminin به سطح کاتترها می‌چسبند (۱، ۱۷ و ۱۸). در مقابل / استافیلوکوکس کوآگولاز منفی که شایع‌ترین عامل جداشده از کاتترها هستند، کمترین مرگ را ایجاد می‌کنند (۷/۰ درصد). این باکتری از طریق Fibronectin به کاتتر متصل می‌شود. همچنین، توانایی تولید پلی‌ساکارید خارج سلولی به نام Slime را دارد که در چسبندگی و مقاومت نسبت به سیستم دفاعی و داروهای ضد میکروبی نقش مهمی را ایفا می‌کند (۹، ۱۷ و ۱۸).

سایر عواملی که در جدول ۵-۷ ذکر نشده‌است:

Corynebacterium jeikeium: در بیماران با ضعف شدید ایمنی و تحت

درمان با آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف عفونت ایجاد می‌کند.

- باسیلوس و استرپتوکوک‌های غیرهمولیتیک و همولیتیک،
- قارچ‌ها شامل کاندیدا، آسپرژیلوس، فوزاریوم، *M.furfur* (۹ و ۱۲). بعضی از کاندیداها در حضور محلول‌های حاوی گلوکز موادی مشابه Slime تولید می‌کنند که در مقاومت آنها نسبت به درمان مؤثر است. مانند *C.albicans* و *C.tropicalis* که در افراد تحت درمان مایعات TPN^۱ عفونت ایجاد می‌کند (۱، ۹، ۱۲ و ۱۵).
- درباره کاندیداها مقاومت دارویی در حال افزایش است، به‌خصوص نسبت به داروی Fluconazole.

۴۸ درصد کاندیداهاى جدا شده از کشت خون، گروه Nonalbicans هستند که مقاومت نسبت به Fluconazole و Itraconazole در میان آنها شایع است مانند *C.glabrata*، *C.krusei* و *C.parapsilosis* (۱۲ و ۲۶).

روش‌های تشخیص

در ۳۰ سال گذشته بیش از ۱۶ روش مختلف برای تشخیص عفونت‌های وابسته به کاتتر استفاده شده است (۲۴) که تعدادی از آنها قابل اجرا در شرایط معمول در آزمایشگاه نیست و برای هر کدام باید به امکانات موجود و ارزش تشخیصی توجه کرد. در بیشتر منابع نتایج بسیار متغیر و در مجموع چند روش پیشنهاد شده است:

۱. کشت کیفی از خون و کاتتر،
۲. کشت نیمه‌کمی از نوک کاتتر،
۳. کشت کمی از نوک کاتتر،
۴. کشت‌های کمی و زمانی از خون و کاتتر.

۱. کشت کیفی^۱ از خون و کاتتر

در این روش، کشت از خون ورید و Hub کاتتر انجام می‌شود. پاسخ‌های مثبت در این روش به‌ویژه نمونه گرفته‌شده از Hub همیشه دلیل عفونت نیست. پاسخ‌های منفی این روش با ارزش‌تر است (۱ و ۲۲). یک مورد کشت خون مثبت از سوند با یک ارگانیسم پوستی نمی‌تواند نشان‌دهنده یک عفونت واقعی باشد و ممکن است نشان‌دهنده کلنیزه شدن باشد.

برای افزایش دقت، باید در هنگام نمونه‌گیری از Hub، در ابتدا محل ضدعفونی شود و با یک سرنگ مقداری از خون (تا حداکثر ۱۰ سی‌سی) کشیده و دور ریخته‌شود و با سرنگ دوم نمونه برای کشت تهیه‌شود. برای تشخیص صحیح در کشت کیفی علاوه بر علائم بالینی باید به این موارد توجه کرد:

۱. یک ارگانیسم در چند نوبت از کشت خون جدا شود.
۲. زمان مثبت شدن کشت خون ۴۸-۲۴ ساعت باشد (نشانه زیاده‌بودن باکتری) (۱ و ۲۲).

۲. کشت نیمه‌کمی^۲ از نوک کاتتر

کشت نوک کاتتر (tip) یا Roll - Plate: بیشترین روشی است که استفاده می‌شود (۱ و ۱۸) و با توجه به امکانات موجود در ایران در زمان حال، عملی‌ترین روش است. این روش اولین بار در سال ۱۹۷۷ ابداع شد (۲۷) و درباره ارزش آن اختلاف نظر زیادی هست. حساسیت آن تا ۸۵ درصد گزارش شده است، ولی ویژگی آن کم است.

در این روش نوک (tip) سوند روی محیط غلطانده می‌شود. باید توجه داشت در مواردی که کلینزاسیون در سطح خارجی سوند باشد، مانند

1. Qualitative
2. Semiquantitative

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

همچنین، محدودهٔ با ارزش $\text{tip} / \text{CFU} \geq 15$ cut off دربارهٔ /ستافیلوکوک‌ها با ارزش‌تر است تا مواردی که عفونت با گرم منفی‌ها، قارچ‌ها و استرپتوکوک گروه A ایجاد شده‌باشد که ممکن است در آن تعداد کمتر از $\text{CFU} / \text{tip} 15$ باشد درحالی که بیمار واقعاً دچار عفونت است (۱۸ و ۲۶). در بعضی مطالعات برای بالابردن حساسیت محدودهٔ با ارزش $\text{tip} / \text{CFU} 5$ در نظر گرفته شده‌است، ولی در این حالت ویژگی روش کاهش می‌یابد.

حساسیت تشخیصی (Diagnostic Sensitivity) که در این روش در مقالات مختلف متغیر ۸۶ درصد (۱۴)، ۲۰ درصد (۲۳) و ۶۰ درصد (۱۸) است. ویژگی تشخیصی (Diagnostic Specificity) ۷۶ درصد (۱) و ارزش اخباری مثبت (PPV)^۱ در جهت ثابت کردن عفونت ۳۳ درصد (۱۴) و ۱۶-۳۱ درصد (۱) است.

کشت خون هم‌زمان از رگ جداگانه برای مقایسه توصیه می‌شود.

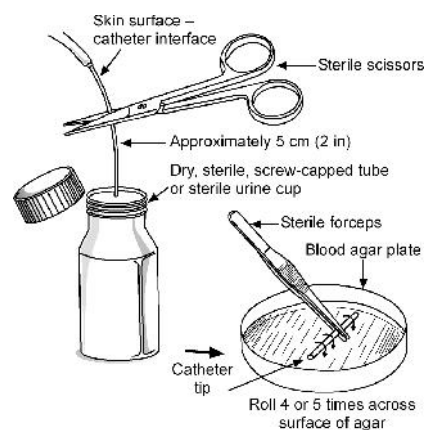
روش:

۱. محل ورود سوند به پوست را با الکل ضد عفونی و پس از خشک شدن سوند را خارج می‌کنیم.

۲. ۵-۴ cm آخر سوند کوتاه یا بلند را با قیچی استریل جدامی‌کنیم و در لولهٔ استریل قرار می‌دهیم و در زمانی کمتر از ۱۵ دقیقه و قبل از خشک شدن به آزمایشگاه می‌رسانیم. سوند نباید در سالین یا محیط ترانسپورت قرار گرفته‌باشد. در سوندهای بلند در صورت نیاز پزشک می‌توان سوند نزدیک به پوست را نیز به‌طور جداگانه کشت داد.

1. Positive Predictive Value

۳. در صورت رعایت نکردن زمان، می‌توان نمونه را تا ۲ ساعت در یخچال 4°C نگهداری کرد.
۴. نوک سوند را به وسیله پنس استریل (forceps) چندبار روی یک محیط بلاد آگار یا شکلات آگار با حرکت رفت و برگشت و غلتشی حرکت می‌دهیم (شکل ۴-۵).
۵. اندازه کوتاه‌تر یا بلندتر از ۵-۴ cm در نتیجه آزمایش تأثیر می‌گذارد و عدد ≥ 15 برای این اندازه استاندارد شده است.
۶. محیط را در انکوباتور 35°C و در جو CO_2 برای مدت ۷۲-۹۶ ساعت انکوبه و روزانه بررسی می‌کنیم. در صورت مثبت شدن و وجود چند نوع کلنی، هریک را جداگانه می‌شماریم و گزارش می‌دهیم (۲ و ۹).
۷. نیاز به تعیین حساسیت میکروبی نیست، مگر به درخواست پزشک یا مثبت شدن هم‌زمان کشت خون با همان باکتری.



شکل ۴-۵

۳. کشت کمی از نوک کاتتر

این روش در بین سه روش توضیح داده شده دقیق‌ترین است (۲۴)، ولی انجام آن مشکل‌تر از سایر روش‌هاست. در این روش از محیط مایع استفاده می‌شود و بسته به روش آزمایش محدوده قضاوت تعداد کلنی با ارزش $CFU/10^2 \geq$ یا $CFU/10^3 \geq$ است. در این روش بهتر است از Vortex یا Sonication استفاده شود ($10^2 \geq$). حساسیت و ویژگی بالاتر از ۹۰ درصد، ارزش اخباری مثبت (PPV) ۷۳ درصد و ارزش اخباری منفی (NPV) ۹۸^۱ درصد است (۱، ۱۷، ۱۸، ۲۳ و ۲۴).

با یک پنس استریل، نوک کاتتر را در یک لوله استریل درپچ‌دار قرار می‌دهیم و روی آن محیط مایع استریل مانند TSB می‌ریزیم تا کاملاً غوطه‌ور شود. با یک پیپت پاستور استریل چند بار محیط را با فشار از درون tip عبور می‌دهیم (pumping) یا از Sonication یا Vortex برای بهبود جداسازی استفاده می‌کنیم. مایع را که حاوی ارگانیسم‌های سطح داخل و خارج شوند است به روش کمی کشت می‌دهیم (۲ و ۵). در روش‌های بعدی که توضیح داده می‌شوند به خارج کردن کاتتر نیاز نیست (۱۰، ۱۸، ۱۹ و ۲۳).

۱-۴. کشت از نمونه خون گرفته شده از کاتتر و خون ورید محیطی و

مقایسه زمان مثبت شدن

این روش به دستگاه‌های کشت خون خودکار از نسل جدید نیاز دارد که پیوسته شیشه‌های کشت خون را از نظر رشد بررسی می‌کنند، مانند سیستم‌های Bactec و Bact/Alert. بدیهی است هرچه تعداد باکتری تلقیح شده بیشتر باشد،

1. Negative Predictive Value

کشت سریع‌تر مثبت می‌شود و باارزش‌تر است. زمان قضاوت در اینجا ۱۲۰ دقیقه در نظر گرفته می‌شود. به عبارتی، اگر کشت خون از کاتتر ۲ ساعت زودتر از نمونه خون گرفته شده از خون محیطی مثبت شود، باارزش است.

حساسیت = $91(18)$ درصد یا $96/4(23)$ درصد
 ویژگی = $94(18)$ درصد یا $100(23)$ درصد

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

۲-۴ کشت کمی خون گرفته شده از کاتتر و خون ورید محیطی

در این روش باید از سیستم lysis centrifugation استفاده کرد و نمونه پس از آماده سازی مستقیم روی محیط جامد در پلیت تلقیح شود و پس از زمان ۷۲-۲۴ ساعت تعداد کلنی شمارش شود.

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

NPV برابر ۹۹ درصد است و در صورت منفی شدن، عفونت خون رد می‌شود.
 PPV ۶۳-۷۳ درصد گزارش شده است. کشت خون مثبت باید با بالین بیمار مقایسه شود.

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

سواب و رنگ‌آمیزی گرم

در مواردی که به عفونت در محل ورود سوند مشکوک شویم، این روش با ارزش است. همچنین، از رنگ‌آمیزی گرم و رنگ فلورسنت Acridine Orange در روش Touch preparation از نوک سوند استفاده می‌شود که ارزش آن به‌ویژه درباره رنگ‌آمیزی گرم محدود است. در صورت مثبت شدن کشت از محل ورود سوند، کشت خون هم‌زمان برای تفسیر لازم است (۹).

عامل عفونت در ماده تزریقی^۱

نمونه در محیط کشت مایع تلقیح و به‌صورت هوازی و بی‌هوازی به مدت ۱۰ روز در حرارت $30-32^{\circ}\text{C}$ نگهداری می‌شود. هم‌زمان کشت خون از ورید بیمار انجام می‌شود.

۵. کشت فرآورده‌های بانک خون

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

جدول ۵-۸: Bacterial organisms implicated in transfusion reactions

Organism(s)

1. Infusate

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

منبع: ۴

تعدادی از گرم منفی‌ها توانایی رشد و تکثیر در حرارت 6°C – 0°C را دارند، مانند *Yersinia enterocolitica*، *Pseudomonas fluorescens*، *Pseudomonas putida* و *Enterobacter* spp. حتی تعداد کم این باکتری‌ها می‌توانند در فرآورده‌های خونی در مدت ۲–۳ هفته مقادیر زیادی اندوتوکسین تولیدکنند که به شوک‌های خطرناک پس از تزریق منجر می‌شود. گرم مثبت‌ها رشد ضعیفی در سرما دارند و از طریق محصولات نگهداری‌شده به مدت طولانی در سرما، به‌ندرت باعث ایجاد آلودگی و عفونت می‌شوند. لیستریا، باسیل گرم مثبتی است که توان رشد در سرما را دارد، ولی جزء عوامل معمول جداشده از این طریق نیست.

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

عفونت‌های پس از تزریق فرآورده‌های خونی ممکن است به‌علت تلقیح باکتری از پوست بیمار یا محیط در هنگام تزریق باشد. همچنین، آلودگی آب بن‌ماری^۱

1. Water bath

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

روش

برای تعیین عوامل آلودگی از شیشه‌های کشت خون استفاده می‌شود:

۱. ۲۰ ml از خون کیسه یا فرآورده‌های خونی مشکوک را برمی‌داریم و در چهار شیشه کشت خون تلقیح می‌کنیم، ۳-۵ ml برای هر بطری. حجم نهایی فرآورده تلقیح شده به محیط باید ۱:۱۰ باشد. بطری‌ها را در 35°C و حرارت اتاق 25°C قرار می‌دهیم (هوازی و بی‌هوازی).
 ۲. ۱-۰/۵ ml از فرآورده را برای رنگ‌آمیزی گرم استفاده می‌کنیم و در صورت مثبت شدن ۰/۵ سی‌سی از فرآورده را مستقیماً روی محیط شکلات تلقیح می‌کنیم.
 ۳. تا یک هفته رشد شیشه‌های کشت خون را بررسی می‌کنیم. پس از ۱۸ ساعت و ۴۸ ساعت ۰/۲-۰/۵ سی‌سی از محیط مایع را روی محیط شکلات و مکانیکی ساب‌کالچر می‌دهیم و هم‌زمان رنگ گرم تهیه می‌کنیم.
- کشت‌ها را حداقل به مدت ۴۸ ساعت (ترجیحاً ۳-۵ روز) در حرارت مناسب انکوبه می‌کنیم. در صورت منفی شدن نتایج کشت احتمال آلودگی فرآورده‌های خونی بسیار کم است و در صورت مثبت شدن برای تأیید، ارگانسیم باید به‌طور هم‌زمان از کشت خون وریدی بیمار نیز جدا شده باشد و به این دلیل، کشت هم‌زمان از بیمار ضروری است. در صورتی که بیمار کاتتر عروقی داشته باشد، کشت باید از کاتتر و سایر مایعات تزریقی نیز انجام شود تا بتوان منشأ واقعی عفونت را مشخص نمود.

References

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

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

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

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

فصل ششم ◀

ارزیابی میکروپشناسی و نمونه‌برداری از محیط‌های بیمارستانی و وسایل پزشکی

قبل از سال ۱۹۷۰، نمونه‌برداری دوره‌ای از سطوح در محیط‌های بیمارستانی مانند کف اتاق‌ها، دیوارها و سطوح میزها امری معمول بود. ولی در بررسی‌های انجام‌شده مشخص شد:

۱. میزان بروز عفونت‌های بیمارستانی در ارتباط مستقیم با میزان آلودگی میکروبی سطوح محیطی نمی‌باشد.

۲. استانداردهای قابل اعتمادی برای ارزیابی و ارتباط نتایج کشت از سطوح محیطی و میزان بروز عفونت‌های بیمارستانی وجود ندارد.

۳. روش‌های نمونه‌برداری از سطوح محیطی بسیار زمان‌بر و پرهزینه است. به‌خصوص در آزمایشگاه‌های میکروپشناسی بالینی که روش‌های آن براساس شناخت ارگانیسم‌های موجود در نمونه‌های بالینی طراحی شده‌است و نه میکروپشناسی محیطی.

از حدود ۳۰ سال پیش بنا به توصیه CDC نمونه‌برداری و کشت دوره‌ای (روتین) از محیط‌های بیمارستانی کنار گذاشته شده‌است.

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

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

سطوح محیطی به ۲ دسته تقسیم می‌شوند:

۱. سطوح ساختمانی و مبلمان؛

۲. سطوح وسایل پزشکی.

تعداد ارگانیسم‌های سطوح محیطی با عوامل زیر در ارتباط است:

۱. تعداد افراد حاضر در محیط؛

۲. میزان فعالیت افراد؛

۳. میزان رطوبت؛

۴. وجود موادی که رشد میکروبی را تسهیل می‌کند؛

۵. تعداد ارگانیسم‌های موجود در هوا و میزان تهویه؛

۶. تعداد موارد تماس با سطوح؛

۷. نوع سطح و جهت آن (عمودی یا افقی):

■ کوکسی‌های گرم مثبت مانند *استافیلوکوک‌ها* و *انتروکوک‌ها* نسبت به شرایط خشک مقاوم‌اند و در غبار روی سطوح تا مدت‌ها زنده می‌مانند و می‌توانند از راه قطرات کوچک در هوا (Droplet) نیز به بیمار منتقل شوند.

■ باکتری‌های گرم منفی در شرایط مرطوب و سطوح مرطوب بهتر باقی می‌مانند و از راه Droplet به‌ندرت منتقل می‌شوند.

■ قارچ‌ها در شرایط و سطوح مرطوب و ایاف رشته‌ای پایدار می‌مانند و تکثیر می‌شوند.

استافیلوکوک‌ها

استافیلوکوک‌ها و گونه‌های مقاوم استافیلوکوک اورئوس (MRSA)^۱

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

انتروکوک‌ها

انتروکوک‌های مقاوم به وانکومایسین (VRE)^۲

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

1. Methicillin Resistant Staphylococcus aureus

2. Vancomycin Resistant Enterococci

انتروکوک‌ها بسیار مقاوم هستند و می‌توانند در سطوح خشک به مدت طولانی پایدار بمانند (۷ روز تا ۴ ماه). در صورت آلوده شدن دست یا دستکش با این باکتری تا ۶۰ دقیقه می‌توان آن را از روی این سطوح جدا کرد. تمیز کردن دقیق اتاق بیمار و وسایل پزشکی در کنترل سوش‌های VRE و MRSA اهمیت دارد، ولی در این موارد به ضد عفونی‌کننده‌های قوی‌تر نیاز نیست. این باکتری‌ها در مقابل آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم است، نه مواد ضد عفونی‌کننده. وجود VRE و MRSA در سطوح محیطی به معنی آن نیست که بیمار با این باکتری‌ها آلوده خواهد شد. نمونه‌برداری دوره‌ای برای تشخیص VRE و MRSA توصیه نمی‌شود، ولی در مواقعی که بخواهیم اثربخشی روش‌های تمیز کردن و ضد عفونی را ارزیابی کنیم، توصیه می‌شود.

اسینتوباکترها^۱

باکتری‌های گرم منفی در محیط‌ها و سطوح مرطوب پایدار می‌مانند و به ندرت از راه هوا منتقل می‌شوند. ولی اسینتوباکتر استثنا است و از راه قطره‌های کوچک در هوا نیز قابل انتقال است که یکی از دلایل عمده شیوع باکتری در سال‌های اخیر است. این باکتری در بخش‌های ICU و سوختگی شایع است و بروز آن در ماه‌های گرم سال (تیر تا آبان) بیشتر می‌شود. می‌توان اسینتوباکتر را از سطوح خشک محیطی مانند میله تخت بیمار، پیشخوان، دستشویی و ظرفشویی، کابینت تخت بیمار، رختخواب، تشک، ملحفه، لحاف، تلفن و کف اتاق‌ها، چارت‌های پزشکی و سطوحی که بیشتر لمس می‌شوند، جدا کرد. همچنین، اسینتوباکتر از سطوح و فضای محیط‌های مرطوب مانند وان‌تیل‌تورهای تنفسی و دستگاه‌های بخور سرد و گرم جدami شود. اسینتوباکتر مانند استافیلوکوک اورئوس مقاوم است و روی سطوح خشک حدود ۲۶-۲۷ روز زنده می‌ماند. از آنجا که اسینتوباکتر از منابع مختلفی

1. Acinetobacter

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

نمونه‌برداری میکروپشناسی از سطوح محیطی

موارد کاربرد نمونه‌برداری از محیط:

۱. پیدا کردن مخزن‌های عوامل بیماری‌زای بالقوه در محیط (کاربرد تحقیقاتی دارد)؛

۲. ارزیابی زمان زنده ماندن ارگانیسم‌ها در محیط (کاربرد تحقیقاتی دارد)؛

۳. پیدا کردن منشاء آلودگی محیط (کاربرد تحقیقاتی دارد)؛

۴. در صورت بروز اپیدمی بیمارستانی و در مواردی که شواهد اپیدمیولوژیک بر انتشار عامل عفونت از سطوح محیطی و وسایل پزشکی به عنوان منبع - مخزن عفونت بیمارستانی دلالت کند، برای تأیید ارتباط بین عوامل جدا شده از محیط و بیمار به روش‌های مولکولی نیاز است؛

۵. کنترل کیفی و ارزیابی روش‌های ضد عفونی و تمیز کردن در زمانی که نیاز باشد.

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

۱. اطلاعات اولیه و دلایل اپیدمیولوژیک؛

۲. محل نمونه‌گیری، روش، وسایل مناسب و تعداد دفعات نمونه‌گیری و کشت.

مجموعه این عوامل باید با همکاری کمیته کنترل عفونت‌های بیمارستانی و در هر بیمارستان با توجه به بخش‌های آن تعیین شود.

روش‌های آزمایشگاهی

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

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

محیط‌های کشت برای روش‌های کمی و کیفی

۱. محیط جامد (آگار) مغذی و غیرانتخابی شامل TSA^۱ یا محیط پایه بلاد آگار یا BHI^۲ یا ۵٪ SBA^۳ یا شکلات آگار؛
۲. محیط‌های مایع TSB^۴ یا BHI؛
۳. محیط‌های انتخابی جامد و مایع شامل مکانکی آگار برای گرم منفی‌ها، Cetrinide Agar برای *Pseudomonas aeruginosa*، سابرودکستروز برای قارچ‌ها و ...

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

محلول‌ها

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

نمونه‌برداری به‌وسیلهٔ سواب استریل یا اسفنج استریل انجام می‌شود. روش نمونه‌گیری در قسمت‌های بعد توضیح داده خواهد شد. پس از نمونه‌گیری سواب را برای استخراج ارگانیسم در محلول‌های شستشو مانند سالین استریل یا محیط مایع TSB قرار می‌دهند. همچنین، به‌جای این روش می‌توان از محیط‌های کشت آماده استفاده کرد و سطح محیط آگار را به‌طور مستقیم با سطح محل نمونه‌برداری تماس داد. این نوع محیط‌ها RODAC^۱ نامیده می‌شوند.

■ محلول‌های شستشو برای سطوحی که ضدعفونی نشده‌اند شامل سالین یا TSB است.

■ محلول‌های شستشو برای سطوحی که ضدعفونی شده‌اند و احتمال باقی‌ماندن مواد ضدعفونی‌کننده وجود دارد باید حاوی مواد خنثی‌کننده مانند Lecithin + Tween 80 (برای آمونیوم چهارظرفیتی) یا Glycine (برای گلو تاروئید و فرمالدئید) یا Sodium Thiosulfate (برای ید و کلرین) باشد.

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

BHI یا $TSB \times 2$ ، برای مثال، برای ۱۰۰ سی‌سی محیط مایع DS-TSB، دو برابر حالت عادی محیط پایه را به ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر اضافه می‌کنیم.

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

کشت سطوح محیطی

روش کمی

۱. از محلولی که سواب داخل آن قرار گرفته است رقت $1/10$ و $1/100$ تهیه می‌کنیم و $0/1\text{ml}$ از محلول اولیه و رقت‌های $1/10$ و $1/100$ را روی سطح آگارمانند کشت ادرار کشت می‌دهیم. پس از انکوباسیون، پلیتی را که بین $30-300$ کلنی دارد، می‌شماریم و با توجه به ضریب رقت و حجم برداشت‌شده، تعداد باکتری را محاسبه و در واحد سطحی که نمونه‌گیری شده گزارش می‌کنیم.

۲. روش فیلتر: در این روش حجم مشخصی از محلول حاوی ارگانیسم را که در مراحل قبل تهیه‌شده از فیلتر $0/45$ یا $0/22$ عبور می‌دهیم و سپس فیلتر حاوی باکتری را مستقیم روی آگار می‌گذاریم و کشت می‌دهیم. این روش برای سطوحی که ضد عفونی شده‌اند مناسب است؛ چون به مواد خنثی‌کننده نیاز نیست. در این روش پلیتی شمرده می‌شود که بین $20-200$ کلنی دارد.

۳. روش Pour plate: روشی دقیق، ولی سخت و زمان‌بر است. $2-3$ سی‌سی محلول اولیه یا رقیق‌شده را با محیط کشت جامد ذوب‌شده در حرارت 46°C - 44 (مانند اضافه کردن خون به محیط بلاد آگار) مخلوط می‌کنیم و در پلیت می‌ریزیم. پس از جامد شدن، انکوبه می‌کنیم و باکتری‌های رشد کرده را می‌شماریم. باید توجه داشت که کلنی‌های عمقی به زمان بیشتری برای رشد نیاز دارند.

روش کیفی

روش انتخابی: در صورتی که به دنبال ارگانیسم‌های خاص در میان مجموعه‌ای از عوامل میکروبی باشیم می‌توانیم از محیط TSB استفاده کنیم. $0/5\text{ml}$ از محلول TSB را روی محیط‌هایی مانند مکانکی آگار یا ستریمید آگار یا محیط‌های انتخابی جهت کشت /ستافیلوکوک‌ها، /نتروکوک‌ها یا ... کشت دهیم.

محیط TSB اولیه را به مدت ۲۴-۴ ساعت انکوبه می‌کنیم تا در صورتی که تعداد اولیه باکتری کم باشد، تکثیر شود و در صورت کدورت، TSB را برای بار دوم روی محیط‌های جدید ساب کالچر می‌دهیم.

نمونه برداری از سطوح محیطی

روش سواب

سواب استریل را با محیط مایع استریل یا سالین استریل آغشته می‌کنیم. مایع اضافی را با فشردن سواب به قسمت داخلی لوله می‌گیریم و از سطح مورد نظر با حرکت گردشی و یک طرفه سواب نمونه برمی‌داریم. بهتر است این سطح اندازه مشخصی داشته باشد تا هنگام گزارش، تعداد کلنی در واحد سطح گزارش شود. پس از کوتاه کردن و دور انداختن قسمت چوبی که در تماس با دست بوده است، سواب را داخل مایع شستشو (سالین یا TSB) با حجم مشخص (۱۰-۵ سی سی) می‌گذاریم. درپوش لوله را می‌بندیم و ۵۰ بار آن را سروته یا به مدت ۳۰ ثانیه با دور بالا ورتکس می‌کنیم. از این محلول برای کشت‌های توضیح داده شده استفاده می‌کنیم.

روش غوطه‌ور کردن

می‌توان محلول شستشوی استریل را (سالین یا TSB) در ظرف بزرگ‌تر و استریل ریخت (مانند ظرف‌های ۵۰ سی سی جمع‌آوری نمونه BAL). در صورتی که نمونه مورد نظر به اندازه‌ای کوچک باشد که در این ظرف جاشود، آن را درون ظرف حاوی محلول می‌گذاریم و به مدت ۱ دقیقه به شدت تکان می‌دهیم. از محلول حاصل به روش‌های گفته شده کشت می‌دهیم. همچنین، می‌توان محلول TSB یا سالین استریل را مستقیم درون ظرف‌ها یا لوله‌های کوچکی که مشکوک به آلودگی هستند، بریزیم. به این صورت که ۵۰-۱۰ سی سی از محلول سالین یا

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

روش RODAC

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

در این روش، پس از برداشتن پوشش محافظ سطح آگار، آگار پلیت را به‌طور مستقیم با سطح نمونه برداری تماس می‌دهیم. پس از گذاشتن مجدد محافظ، پلیت‌ها را ۴۸ ساعت در انکوباتور قرار می‌دهیم و تعداد کلنی‌ها را می‌شماریم. باید توجه داشت اگر بخواهیم از یک اتاق بیمارستانی نمونه برداریم، برای ازبین بردن خطای انتخاب محل نمونه‌گیری حداقل به ۱۵ عدد محیط RODAC نیاز داریم.

برای تفسیر کشت محیط‌های RODAC جدول زیر پیشنهاد می‌شود.

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

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

تشخیص

حداقل روی ۲ کلنی از مجموع کلنی‌های با مورفولوژی مشابه کارهای تشخیصی انجام می‌دهیم. میزان کار تشخیصی انجام‌شده به اهداف ابتدایی، امکانات موجود و اهداف اپیدمیولوژیک در جهت ارزیابی شیوع یک بیماری خاص بستگی دارد. در بررسی‌های اپیدمیولوژیک تشخیص واحد گونه اجباری است. لازم به ذکر است که در حال حاضر، دقیق‌ترین روش برای تشخیص منبع

آلودگی و راه انتقال، روش‌های تأییدی مولکولی روی باکتری‌های جداشده است.

تفسیر

۱. لوازم پزشکی Critical: مانند وسایل جراحی و وسایلی که در بافت‌های استریل نفوذ می‌کنند؛ هیچ باکتری یا اسپوری نباید وجود داشته‌باشد.
۲. لوازم پزشکی Semicritical: مانند آندوسکوپ که با غشاهای مخاطی تماس دارد؛ هیچ باکتری نباید وجود داشته‌باشد، به‌جز باکتری‌های غیربیماری‌زای اسپوردار مانند باسیلوس و کلستریدیوم که گاهی دیده می‌شود.
۳. لوازم پزشکی Noncritical: مانند گوشی پزشکی که با پوست سالم تماس دارد؛ باکتری‌های بیماری‌زا نباید وجود داشته‌باشد. باید توجه داشت که این معیار از جنبه میکروپزشناسی است و از دیدگاه اپیدمیولوژیک، چنانکه در مباحث قبل گفته شد، فقط جداسازی یک باکتری بیماری‌زا بر راه انتقال دلالت نمی‌کند و برای تأیید به روش‌های بیوتا‌پینگ و مولکولی نیاز است.
۴. سطوح محیطی Noncritical: شامل سطوحی است که در تماس مستقیم با بیمار نیستند، مانند سطوح کف و دیوارها یا دستگاه‌هایی مانند X-ray و همودیالیز؛ اصولاً این سطوح در انتقال عوامل عفونی تأثیر کمی دارند و برای این سطوح تمیزی ظاهری و نبودن بیماری‌زاهای شناخته‌شده کافی است. برای تشخیص میزان رعایت اصول بهداشتی در این سطوح محیطی جدول ذیل پیشنهاد می‌شود.

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

Poor Sanitation	Gram negative rods present
-----------------	----------------------------

باید توجه داشت که رشد بیماری‌زاهای خاص همیشه نشانه آلودگی سطوح نیست و ممکن است با نمونه‌گیری نامناسب، خطا در حین کار و مراحل پس از آن در ارتباط باشد. برای جلوگیری از گزارش اپیدمی کاذب، انجام دادن روش‌های فوق نیازمند کارکنانی دقیق، با حوصله و آموزش دیده است که تمام مراحل را به‌نحو احسن انجام دهند. توصیه می‌شود آزمایشگاه به‌منظور جلوگیری از آلودگی در حین کار، کشت را در زیر کابینت بیولوژیک کلاس ۲ انجام دهد.

References

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

فصل هفتم ◀

نمونه‌برداری از هوا

آلوده‌کننده‌های بیولوژیک هوا که به‌عنوان آئروسل شناخته می‌شوند شامل باکتری‌ها، قارچ‌ها، ویروس‌ها و پولن‌ها هستند. آئروسل‌ها ذرات جامد، مایع یا ذرات معلق در هوا هستند. ۵ دقیقه صحبت کردن و سرفه کردن هر کدام ممکن است ۳۰۰۰ قطره تولید کند. همچنین، عطسه کردن حدوداً ۴۰۰۰۰ قطره ایجاد می‌کند که سپس بخار و به ذراتی حدود ۰/۵-۱۲ میکرومتر تبدیل می‌شوند. به‌طور معمول، اندازه ذرات تشکیل‌دهنده آئروسل‌های بیولوژیک متفاوت‌اند (کمتر از ۱ میکرومتر تا بیشتر از ۵۰ میکرومتر). ممکن است این ذرات شامل یک نوع ارگانیسم به‌صورت جدا از هم یا یک مجموعه به هم چسبیده مرکب از تعدادی باکتری باشد. این مجموعه‌ها معمولاً شامل ذرات گردوغبار، مواد آلی و غیرآلی خشک هستند. شکل‌های رویشی باکتری‌ها و ویروس‌ها نیز ممکن است در هوا وجود داشته باشند. همچنین، اسپور باکتری‌ها یا قارچ‌ها نیز به میزان کمتر در هوا وجود دارند.

عوامل تعیین‌کننده پایداری میکروارگانیسم در یک بیوآئروسل به‌شرح زیر است:

۱. محیط معلق در آن؛

۲. دما؛

۳. رطوبت مناسب؛

۴. حساسیت به اکسیژن؛

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

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

نمونه‌برداری میکروبیولوژیک هوا

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

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

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

ملاحظات اولیه برای نمونه‌برداری از هوا

۱. در نظر گرفتن مشخصات و شرایط آئروسل:

■ محدوده اندازه ذرات، ذرات بزرگ‌تر از ۵ میکرومتر به‌طور کامل در دستگاه

تنفسی فوقانی به دام می‌افتد و با عمل اولیه مژه‌ها برگردانده می‌شوند.

ذرات کوچک‌تر از ۵ میکرومتر به ریه می‌رسند، اما فقط ذرات با اندازه ۱-۲

میکرومتر در آلوئل‌ها به دام می‌افتند؛

■ غلظت میکروارگانیزم؛

■ عوامل محیطی.

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

۳. تعیین تعداد نمونه‌هایی که باید برداشته شوند.

۴. اطمینان از متناسب بودن ابزار در دسترس.

۵. تعیین روش سنجش که میزان جداسازی میکروارگانیزم‌ها را به‌طور مطلوب تضمین خواهد کرد.

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

۷. اطمینان از اینکه نمونه‌ها در یخچال نگهداری می‌شوند (در صورتی که نتوان آن را بلافاصله در آزمایشگاه بررسی کرد).

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

۱. عبور هوا از مایعات^۱،

۲. برخورد در سطوح جامد^۲،

1. Impingement in liquids
2. Impaction on solid surfaces

۳. رسوب دادن^۱،

۴. فیلتراسیون^۲،

۵. سانتریفوژ کردن^۳،

۶. پرسپیتاسیون الکتروستاتیک^۴،

۷. پرسپیتاسیون گرمایی^۵.

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

سدیمنتاسیون با استفاده از قرار دادن پلیت‌ها انجام می‌شود؛ بنابراین، به وسایل یا تجهیزات ویژه نیاز ندارد. انتخاب وسیله نمونه‌برداری هوا، نیازمند شناخت دقیق شرایط و داشتن اطلاعات کافی ذیل است:

۱. ارگانسیم ویژه یا ارگانسیم‌هایی که ممکن است در هوا وجود داشته باشند؛
۲. غلظت ارگانسیم‌های زنده؛
۳. تغییر غلظت ارگانسیم‌ها متناسب با زمان؛
۴. دامنه توزیع اندازه ذرات جمع‌آوری‌شده؛
۵. برای ارزیابی صحیح لازم است مقایسه‌ای بین تعداد میکروارگانسیم‌های محل نمونه‌گیری با هوای خارج از محل نمونه‌گیری انجام شود.

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

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

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

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

روش‌ها

الف) عبور هوا از مایعات (Impingement in liquids): اصول این روش بر مکش هوا از میان یک موتور کوچک و خروج آن در مقابل یک سطح مایع است. کاربرد آن برای تعیین ارگانیسم‌های زنده و غلظت آنها در مدت زمان معین است (مانند نمونه‌برداری آئروسول‌های آب برای گونه‌های لژیونلا).

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

۱. ارگانیسم‌های زنده‌ای که روی سطوح غیر مغذی وجود دارند؛
۲. ارگانیسم‌های مقاوم به شرایط خشک، مانند اسپورها (نمونه‌برداری هوا برای آسپرژیلوس و اسپوره‌های قارچ).
- ج) رسوب‌دادن (Sedimentation): ذرات و میکروارگانیسم‌ها بر اساس سنگینی‌شان روی سطوح می‌نشینند. کاربرد آن در نمونه‌برداری از ذرات زنده مانند نمونه‌برداری هوا برای باکتری‌ها است که باید در کنار سایر روش‌ها استفاده شود.

در انتخاب وسایل نمونه‌برداری عوامل زیر باید در نظر گرفته شود:

۱. نوع ارگانیسمی که باید نمونه‌برداری شود؛
۲. انطباق با روش انتخابی سنجش؛
۳. حساسیت ارگانیسم‌ها به روش نمونه‌برداری؛
۴. غلظت‌های احتمالی و اندازه ذرات؛
۵. در صورتی که نوع باکتری به گونه‌ای باشد که احتمال کلامپینگ^۱ وجود داشته باشد، باید شکسته شود؛
۶. حجم هوا و مدت زمان نمونه‌برداری؛
۷. میزان آلودگی پایه؛

1. Clumping

۸. شرایط محیط؛

۹. کارایی دستگاه نمونه‌برداری برای جمع‌آوری؛

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

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

نمونه‌بردارهای عبور هوا از مایعات و برخورد در سطح جامد کاربرد بیشتری برای نمونه‌برداری باکتری‌ها، ذرات و اسپورهای قارچی دارند؛ زیرا می‌توانند حجم بالایی از هوا را در زمان نسبتاً کوتاه جمع کنند. سیستم نمونه‌برداری که از طریق سطح جامد است به‌صورت غربالی و شکافی طراحی شده‌است. در نوع شکافی از یک صفحه دوار استفاده می‌شود و امکان تعیین غلظت را در طی زمان مشخص فراهم می‌آورد. نوع غربالی از صفحاتی استفاده می‌کند که دارای سوراخ‌ها و حفره‌های کالیبره‌شده با قطرهای مختلف است.

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

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

اندازه‌گیری آئروسول‌های زنده (بیوآئروسول‌ها) با استفاده از انواع غربالی یا شکافی ساده است؛ زیرا این نمونه‌بردارها ذرات و میکروارگانیسم‌ها را براساس دامنه اندازه آنها جدا می‌کنند. این نمونه‌بردارها باید در ابتدا کالیبره شوند.

روش قراردادن پلیت (برای مثال سدیمانتاسیون یا روش ته‌نشینی) برای سنجش اسپورهای قارچ توصیه نمی‌شود. در روش پلیت‌گذاری^۱، جداسازی ارگانیسم‌ها صرفاً براساس سنگینی آنها انجام می‌پذیرد و از سرعت جریان هوا متأثر نیست. این روش چند ساعت زمان می‌برد تا کامل شود و ممکن است در برخی مناطق قابل استفاده نباشد.

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

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

کشت هوا برای قارچ‌ها

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

1. Settle Plate

عارضه ایجاد نمی کنند. ضعف شدید سیستم ایمنی به ویژه در بیماران بستری در بیمارستان، عامل ابتلا به عفونت های قارچی است. بنابراین، اتاق های تمیز (Clean room) باید از فشار مثبت سیستم های فیلتراسیون و تهویه مناسب برخوردار باشد. پایش مستمر فعالیت های مندرج در دستورالعمل های کنترل شرایط محیطی و شناسایی و ارزیابی منشاء هرگونه قارچ بیماری زا یا فرصت طلب نوظهور باید در دستور کار کمیته کنترل عفونت بیمارستانی قرار داشته باشد. بروز این گونه عفونت ها ممکن است از رعایت نکردن روش های اجرایی کنترل محیط از یک سو یا انجام ناقص روش های کنترلی از سوی دیگر ناشی شود (برای مثال: انتقال بیمار بدون ماسک به خارج از محیط تحت کنترل). تفکیک این دو وضعیت اهمیت ویژه ای دارد.

یکی از روش های کنترل فعالیت های توصیه شده، مقایسه میزان آلودگی هوا در محیط های ایزوله با محیط های معمولی از نظر تراکم انواع قارچ ها است. نتایج مقایسه این دو گروه از یافته ها، مبنای پایش و سنجش های بعدی را تشکیل می دهد. هر چند نمونه برداری دوره ای از هوای محیط بیمارستان توصیه نمی شود، با این حال، موارد زیر از این قاعده مستثنی هستند:

۱. دریافت گزارش های مکرر مبنی بر شناسایی موارد عفونت ناشی از یک یا چند گونه قارچی محدود و مشابه.
۲. هرگونه فعالیت ساختمانی و ساخت و ساز که در مجاورت محل بستری بیماران حساس یا مستعد انجام می شود.
۳. پیش از بستری کردن بیمار حساس در اتاق جدید یا نوساز که تخمینی از میزان تراکم قارچی در آن وجود ندارد.
۴. وقتی روش های ضروری برای تمیزکردن هوا در حال پایه ریزی و انجام است.

در پروتکل‌های حفاظت از بیماران پیوندی توصیه شده است تا ارزیابی میکروبیولوژیک هوای محیط به فضاهایی محدود شود که بیماران دچار ضعف سیستم ایمنی بستری شده‌اند. چنانچه اتاق یا فضای دیگری در سایر بخش‌ها به سیستم تولید جریان خطی هوا^۱ یا تجهیزات فیلتراسیون اتاق‌های تمیز مجهز شده باشد (اتاق‌های عمل جراحی، اتاق‌های آماده‌سازی فرآورده‌های تزریقی و ...)، استفاده از شمارش‌گرهای الکترونیکی ذرات معلق در محیط^۲ قویاً توصیه می‌شود.

ملاحظات پیش از آزمایش^۳

نمونه

۱. انتخاب محل نمونه برداری

در عمل برای تعیین میزان اثربخشی فیلتراسیون باید تراکم عناصر قارچی در محیط‌های مختلف تحت کنترل و ایزوله با دیگر محیط‌های محافظت نشده مثل اتاق‌های عادی، راهروها و فضاهای عمومی مقایسه شود و نتیجه آن در یک سیستم Scoring به صورت کمی یا کیفی سطح‌بندی شوند. برای مثال، در صورت بروز عفونت‌های مکرر و مشابه که در مقطع زمانی محدود بروز کرده‌اند، مقایسه مذکور باید بین نمونه هوای اتاق‌های آلوده با اتاق‌هایی انجام شود که عفونتی در آن گزارش نشده است.

۲. حجم نمونه و انکوباسیون

حجم هوای لازم برای نمونه برداری براساس پیش‌بینی آلودگی قارچی در محیط تحت بررسی است و به وسیله حجم هوا در واحد زمان تعیین می‌شود.

1. laminar flow
2. Anerometer
3. Preanalytical Considerations

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

اگر فیلترها مناسب کار گذاشته و نگهداری شوند، سیستم‌های فیلتراسیون قسمت اعظم قارچ‌ها را فیلتر می‌کنند و برای ارزیابی، نمونه‌ای با حجم بالا (بیشتر از ۱ متر مکعب) لازم است. به هر حال، وقتی برف یا یخ محیط بیرون را برای زمان طولانی پوشانده باشد، میزان قارچ در محیط خارج بسیار کاهش می‌یابد.

۳. وسایل نمونه‌برداری از هوا

براساس اطلاعات موجود، انواع مختلفی از دستگاه‌های نمونه‌برداری در دسترس‌اند که مزایا یا معایب آنها در جدول ۷-۳ آورده شده است. بسیاری از دستگاه‌های نمونه‌برداری هوا برای ذرات مختلف به غیر از قارچ‌ها استفاده می‌شوند.

نمونه‌بردارهای حجم کم در حد $1\frac{\text{ft}^3}{\text{min}}$ یا کمتر عمل می‌کنند. بنابراین، زمان نمونه‌برداری ۳۵ دقیقه یا بیشتر طول خواهد کشید

تا حجم کافی هوا نمونه‌برداری شود. رفت‌وآمد زیاد کارکنان در یک قسمت و زیاد بودن پرستاران در بخش نمونه‌برداری شده ممکن است نمونه‌برداری را بی‌تأثیر نماید.

۴. پلیت‌گذاری

این روش در گذشته بیشتر استفاده می‌شد، اما اغلب اطلاعات باارزشی به‌دست نمی‌آمد. ذرات منتقله از هوا به‌طور مختلف روی سطوح قرار می‌گیرند و از آنجا که کوچک‌ترین ذرات قارچی اغلب مهم‌ترین بیماری‌زاها هستند، در این روش ممکن است عوامل بیماری‌زا را از دست داد. برای مثال، اسپورهای آسپرژیلوس فومیگاتوس ۲-۳/۵ میکرومتر قطر دارند و توان شناوری آنها در هوا در حضور سطوح ناصاف افزایش می‌یابد. بنابراین، فقط روش‌های حجم‌سنجی اطلاعات قابل اعتمادی به‌دست می‌دهند.

۵. نمونه‌برداری از سطوح

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

جدول ۷-۲ فهرست منابع محیطی قارچی را در بیمارستان‌ها نشان می‌دهد. زمانی که هدف فقط تعیین تعداد کلنی‌های قارچی است و انکوباسیون در دمای اتاق انجام شده است، گزارش تعداد کلنی‌ها بدون شناسایی گونه قارچ کافی است. وقتی منبع عفونت قارچی

در دمای 37°C بهتر رشد می‌کند، در صورت نیاز بررسی میکروسکوپی و تجدید کشت برای شناسایی بیشتر انجام می‌شود.

جدول ۷-۲: منابع محیطی قارچی در بیمارستان‌ها

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

۶. محیط‌های کشت

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

ملاحظات حین آزمایش^۱

۱. نمونه‌برداری

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

1. Analytical Considerations

۲. دمای انکوباسیون

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

تعیین می‌شود. تمیزترین محل اتاق باید برای انکوباسیون در دمای اتاق استفاده شود. این روش برای تعیین کارآیی فیلتراسیون در محیط‌های تحت کنترل مختلف مفید است، اما برای شناسایی قارچ‌های بیماری‌زا مفید نیست.

■ **انکوباسیون در ۳۷°C:** شرایط انتخابی را برای جداسازی قارچ‌های منتقله از هوا که شامل بیماری‌زاهای فرصت‌طلب است، برای مثال گونه‌های *آسپرژیلوس* ایجاد می‌نماید. قارچ‌هایی که در دمای اتاق بهتر رشد می‌کنند، ۱۰ برابر بیشتر از آنهایی هستند که در دمای ۳۷°C رشد می‌کنند.

۳. کنترل کیفی

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

ملاحظات پس از آزمایش

محاسبات

۱. عوامل تبدیل

$$1 \text{ ft}^3 = 28.3 \text{ liters}$$

$$1 \text{ m}^3 = 35.3 \text{ ft}^3$$

$$1 \text{ ft}^3/\text{min} = 0.0283 \text{ m}^3/\text{min}$$

۲. انجام محاسبات

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

تفسیر اطلاعات

به‌علت پراکندگی قارچ‌ها تعداد کم قارچ در محیط اهمیت ندارد. روش‌هایی که قارچ‌ها را بدون شناسایی تفکیک می‌کنند، نباید استفاده‌شوند. روش‌هایی مانند پلیت‌گذاری که حساسیت آن برای شناسایی بیماری‌زاهای قارچی ناکافی است، مفید نیستند. مقایسهٔ تعداد قارچ‌ها در محیط خارجی و محیط داخلی ایزوله می‌تواند برای تعیین خرابی دستگاه‌های فیلتراسیون، وقفه در فشار مثبت، نشت به خارج یا شناخت منابع اصلی اسپورهای قارچی مناسب باشند. همچنین، تفسیر باید با توجه به محیط، تأثیر شرایط جوی (برای مثال، وجود برف در محیط خارج) و دمای انکوباسیون انجام‌شود.

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

کل کلنی‌های قارچ‌های بیماری‌زا که در دمای اتاق رشد می‌کنند، نباید بیش از 15 CFU/m^3 و برای کشت‌هایی که در دمای 37°C رشد می‌کنند، نباید بیش از 2 CFU/m^3 باشد.

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

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

پیوست

ویژگی‌های وسایل نمونه‌برداری حجمی مکانیکی

۱. مکنده‌های آبکشی^۱

این دستگاه‌ها برای جمع‌آوری ذرات استفاده می‌شوند و در انواع تجاری در دسترس هستند (جدول ۷-۳). نمونه‌بردار Andersen رایج‌ترین وسیله حجمی است. این نمونه‌بردار با فشردن هوا روی سطح آگار موجب جداسازی ذرات زنده می‌شود. ذرات در هر مرحله نمونه‌برداری از میان ۴۰۰-۲۰۰ حفره عبور می‌کنند و به تدریج سوراخ‌ها کوچک‌تر می‌شوند تا تعداد ذرات در هر مرحله کاهش یابد. این روش اساس تمایز ذرات با اندازه‌های مختلف است. مکنده‌های آبکشی ذرات زنده قابل انتقال به عمق ریه را (کمتر از ۵ میکرومتر) از ذرات غیرقابل انتقال (بیشتر از ۵ میکرومتر) جداسازی می‌کند (حداقل پس از دو مرحله نمونه‌برداری). این نمونه‌بردار، ۶ مرحله دارد. ذرات عبوری قبل از مرحله ۳ بیش از ۵ میکرومتر و ذرات مرحله ۶ کمتر از ۵ میکرومتر هستند. به دلیل طراحی و طبیعت آیرودینامیک ذرات منتقله از هوا در مرحله ۳، ذراتی که قطر بزرگ‌تر از ۵ میکرومتر دارند برگردانده و اجازه عبور به ذرات کوچک‌تر داده می‌شود تا به مرحله ۶ داخل شوند. این توانایی به دستگاه نمونه‌بردار اجازه می‌دهد تا به‌طور صحیح از مناطق دارای غلظت بالای قارچ نمونه‌برداری کند.

معایب: نمونه‌بردار با سرعت $1 \frac{\text{ft}^3}{\text{min}}$ عمل می‌کند و در یک محیط بسته نسبتاً تمیز برای تعیین ۱ CFU از بیماری‌زاهای در هر مترمکعب ۳۵ دقیقه زمان نیاز است (برای جمع‌آوری $35/3 \text{ft}^3$ یا ۱ متر مکعب هوا). مکنده‌های

1. Sieve impactor

آبکشی که اغلب مانند یک پمپ مکش عمل می‌کند، صدای زیادی در اتاق بیمار تولید می‌کند.

۲. مکنده‌های شکافی^۱

این دستگاه نمونه‌برداری مناسب است که از نیروی اینرسی برای مکش ذرات زنده روی سطح آگار استفاده می‌کند و ذرات را براساس اندازه آنها تفکیک نمی‌کند. دستگاه یک صفحه چرخنده دارد که به اندازه پلیت است (۱۵۰mm یا ۱۵cm) و چرخش پلیت در زیر محل شکاف شرایط و زمان مناسب تغلیظ را ایجاد می‌کند.

این وسیله برای نمونه‌برداری حجم‌های ۳۰-۷۰۰ لیتر در دقیقه تنظیم شده است و اختلاف زمان نمونه‌برداری، شمارش کمی را ممکن می‌سازد. از آنجا که سرعت نمونه‌بردار تا ۲۵ft³/min است، نمونه‌برداری در چند دقیقه انجام می‌شود و در تعیین تغییرات غلظت ذرات در زمان‌های کوتاه کاربرد دارد.

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

۳. نمونه‌برداری‌های سانتریفوژی^۲

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

معایب: کالیبراسیون و تنظیم میزان حجم هوای نمونه‌برداری فقط توسط سازنده امکان‌پذیر است؛ بنابراین، فقط برای مقایسه آلودگی بین مناطق

1. Slit impactor
2. Centrifugal impactor

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

۴. Impingers

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

۵. فیلتراسیون

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

۶. پلیت‌گذاری

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

جدول ۷-۳: Air samplers for quantitation of viable fungal spores^۱

Sampler type	Principle	Rate (liters/min)	Comment(s)
(۱) Sieve impactor ^۲	Impaction on agar plate	28	Low volume precludes short-term collections that might relate to specific activities; effective for high concentrations of spores.

1. For additional information, see reference 3

2. Anderson Samplers Inc., 4215 Wendell Dr., Atlanta, GA 30336

فصل هفتم: نمونه‌برداری از هوا

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

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

References

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

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

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

فصل هشتم ◀

کشت آب بیمارستان برای جداسازی لژیونلا

اصول کار

الف) نحوه انتقال و اکولوژی لژیونلا

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

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

ب) معیارهای جداسازی و تأیید لژیونلا از منابع

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

۲. در ارتباط با منابع یک عفونت بیمارستانی ناشی از لژیونلا ۴ معیار به شرح ذیل وجود دارد:

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

معرف‌ها، محیط کشت و مواد مصرفی مورد نیاز

الف) ظرف‌ها و سواب‌های لازم برای جمع‌آوری نمونه

۱. ظرف‌های دهان‌گشاد پلاستیکی یا شیشه‌ای از جنس پلی‌پروپیلین با حداقل حجم معادل ۳۰ سی‌سی؛
۲. اپلیکاتور استریل از جنس پنبه یا پلی‌استر مانند اپلیکاتور داکرون استریل.

ب) فیلترها و ضمائم آنها

۱. فیلترهای غشای پلی کربنات با اندازه سوراخ ۰/۲ میکرومتر (نوکلی پور)؛
۲. فیلتر پلاستیکی با اندازه ۴۷mm (مانند فیلتر پلاستیکی ژلمن)؛
۳. نگه‌دارنده فیلتر (مانند نگه‌دارنده سه شاخه فانل)؛
۴. پنس (فورسپس) استیل ضدزنگ (مخصوص فیلترها).

ج) محیط کشت

محیط‌هایی که بیشتر استفاده می‌شوند شامل محیط استامیدو آمینواتان سولفونیک اسید (ACES)^۱ و محیط آگار حاوی عصاره مخمر، زغال بافری شده در $\text{pH} = 6/9$ و مکمل‌های اضافی نظیر سیستم، پیروفسفات و آلفاکتوگلوترات (محیط کشت $\text{BCYE}\alpha$)^۲ است. بسته به شرایط باید از محیط‌های انتخابی خاصی استفاده کرد که مانع رشد بیش از حد ارگانسیم‌های غیر لژیونلا می‌شود. نمونه‌هایی از محیط‌های انتخابی رایج عبارت‌اند از:

۱. محیط GPVA : محیط $\text{BCYE}\alpha$ حاوی مکمل‌های گلیسین، پلی میکسین، وانکومایسین و آنیزومایسین است.
۲. محیط DGVP: محیط BCYE حاوی مکمل‌های رنگدانه‌ای، گلیسین، وانکومایسین و پلی میکسین B است.
۳. سایر محیط‌های انتخابی نیز برای لژیونلا مناسب هستند و ممکن است سازندگان مختلف تغییرات جزئی در ترکیب آنتی‌بیوتیک‌ها و مکمل‌ها ایجاد کنند.

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

د) معرف‌ها

۱. معرف اسیدی با $\text{pH} = ۲$: این معرف اسیدی با تغییر pH سایر ارگانیس‌های غیرلژیونلا را مهار می‌کند. اکثر ارگانیس‌ها قدرت مقاومت در pH اسیدی شدید ($\text{pH} = ۲$) را ندارند.
۲. معرف فیلترهای غشایی: فیلتراسیون غشایی با معرف حاوی آنتی‌بادی فلئورسنس مستقیم برای جداسازی گونه‌های لژیونلاها از ارگانیس‌های مشابه توصیه می‌شود. این معرف‌ها می‌توانند نتایج مثبت کاذب واکنش سنجش مستقیم فلئورسنس را کاهش دهند.
- معرف‌هایی که این ارگانیس‌ها از آنها قابل جدا شدن است:
 - فسفات بافر سالین استریلیزه شده با فیلتر ($\text{pH} = ۷/۶$)؛
 - آب مقطر دیونیزه و استریلیزه شده با فیلتر.
۳. سدیم تیوسولفات که مانند خشی‌کننده کلر در ظرف‌های جمع‌آوری آب به کار می‌رود.
۴. مایع مانته‌کننده گلسیرین بافری ($\text{pH} = ۹$).
۵. محلول پلی‌کلونال آنتی‌بادی مورد استفاده در روش فلئورسنس مستقیم (برای لژیونلا) که به طور تجاری در دسترس است. مانند کنژوگه پلی‌کلونال پلی‌والان که می‌تواند سروگروپ‌های ۱ تا ۶ لژیونلا را شناسایی نماید.

ه) میکروسکوپ و ابزارهای مرتبط

۱. میکروسکوپ فلئورسنس با یک سیستم فیلتر شناسایی فلئورسئین ایزوتیوسیانات و فیلترهایی که در طول موج ۴۹۰-۵۲۰ نانومتر حداکثر ارتقای الکترونی را صورت می‌دهند.
۲. میکروسکوپ استرئوسکوپی؛

۳. روشن‌کننده یا ایلومیناتور (برای نوردهی مایل) مانند روشن‌کننده با کندانسور ثابت؛

۴. اسلایدهای میکروسکوپ فلئورسنس که حداقل ۲ دایره ۱۰ میلی‌متری داشته باشد.

ملاحظات پیش از آزمایش

نمونه‌های برداشت‌شده

الف) مکان برداشت نمونه و انتخاب آن

۱. مکان‌های نمونه‌برداری باید براساس اطلاعات اپیدمیولوژیک انتخاب شود که به‌طور عمده شامل منابع بالقوه آب و بیماران است.

۲. فهرست منابع آبی که ممکن است حاوی گونه لژیونلا برای انتخاب محل نمونه‌برداری باشند، عبارت‌اند از:

■ سیستم‌های عمومی آب آشامیدنی در بیمارستان:

— گرم‌کننده‌های آب،

— مخازن نگاه‌دارنده آب؛

■ خروجی‌های پایانی توزیع آب آشامیدنی (نواحی در تماس با بیمار):

— خروجی دوش آب،

— شیر آب سرد و گرم،

— آب ورودی به سیستم همودیالیز؛

■ تجهیزات:

— تجهیزات مرتبط با سیستم تنفسی،

— مرطوب‌کننده‌ها،

— یخ و یخ‌سازها،

— سیستم‌های چرخش آب حاوی رسوب، مانند رادیاتورهای آبی.

ب) جمع‌آوری نمونه‌ها

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

بهتر است سواب‌ها برای ارگانیزم‌های کلنیزه‌شده در بخش‌های انتهایی سیستم توزیع آب استفاده و نمونه‌ها از مناطق مختلف سیستم لوله‌کشی داخلی یا سطوح برج‌های خنک‌کننده گرفته شوند. در صورت لزوم، برداشت از مخزن ذخیره آب گرم به شرح ذیل انجام شود:

۱. نمونه‌های سواب

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

۲. نمونه‌های آب

- پس از برداشت نمونه‌ها توسط سواب، باید ۱ لیتر نمونه آب موردنظر را در ظرف استریل جمع نمود (تکنیک جمع‌آوری آسپتیک باشد).
- ظرف‌های جمع‌آوری نمونه آب باید دهان‌گشاد و استریل باشند و جنس آنها می‌تواند از پلاستیک یا شیشه باشد. در برداشت از نمونه‌های آب کلردار بهتر است از یک خنثی‌کننده کلر مانند سدیم تیوسولفات در ظرف استفاده کرد (۰/۸۳ سی‌سی سدیم تیوسولفات ۰/۱ نرمال به ازای هر لیتر آب کلردار).
- برای حمل نمونه‌ها به آزمایشگاه باید از ظرف‌های عایق‌بندی برای جلوگیری از مجاورت با حرارت بسیار بالا استفاده کرد.
- اگر نمونه‌های آب در همان روز انجام کشت آماده‌سازی نمی‌شوند، بهتر است نمونه در یخچال و دمای 4°C نگهداری شود تا از رشد بی‌رویه سایر باکتری‌ها و سوش‌های لژیونلا ممانعت شود. آماده‌سازی نمونه برای آزمایش باید در سریع‌ترین زمان ممکن صورت گیرد (حداکثر ۴۸ ساعت پس از نمونه‌گیری).

۳. نمونه مخزن‌های ذخیره آب

- ۱۰-۵ سی‌سی اول آب این مخزن‌ها باید به سرعت داخل یک ظرف استریل مناسب جمع شود. این نمونه منعکس‌کننده آب راکد داخل لوله‌ها است.
- پس از خروج آب به مدت ۳۰ ثانیه، نمونه دیگری از آب را (۵۰-۱۰ سی‌سی) در یک ظرف استریل مناسب جمع می‌کنیم. این نمونه آب منعکس‌کننده آب داخل مخزن است.
- هر دو نمونه بالا باید مستقیم روی پلیت‌ها کشت داده شود.

ملاحظات حین آزمایش

کنترل کیفی و اطمینان کیفیت

الف) محیط‌های کشت تجاری و آماده استفاده

براساس توصیه زیرکمیته بین‌المللی استانداردهای آزمایشگاهی (NCCLS)^۱، آزمایش مجدد کنترل کیفی روی محیط‌های تجاری آماده مصرف لازم نیست و این استانداردها باید توسط شرکت سازنده رعایت شود.

ب) محیط‌های کشت ساخته‌شده در آزمایشگاه

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

۱. اندازه‌گیری pH

- pH محیط کشت باید حدود $6/9 \pm 0/05$ باشد (بسیار اهمیت دارد).
- pH محیط‌های کشت جامد با استفاده از الکترودهای سطحی کنترل می‌شود (در صورت در دسترس بودن). می‌توان مقداری از آگار محیط را با آب مقطر در یک پلیت به صورت امولسیفیه درآورد و سپس، pH را با pH متر اندازه‌گیری نمود.

- اگر pH محیط در محدوده قابل قبول نبود، pH محیط‌ها باید مجدد تنظیم شود (با اسید کلریدریک ۱ نرمال یا پتاس ۱ نرمال).

۲. کنترل رشد لژیونلا روی محیط کشت غیرانتخابی

- سوش لژیونلا پنوموفیلا داخل آب مقطر استریل برده‌شود تا کدورتی معادل استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند به دست آید. NCCLS برای کنترل کیفی

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

محیط‌های کشت انتخابی، لژیونلا پنوموفیلا (ATCC-۳۳۱۵۲) یا لژیونلا بوزمانی^۱ (ATCC-۳۳۲۱۷) را پیشنهاد می‌کند.

- با مخلوط کردن باکتری در فسفات بافر سالین استریل یک سوسپانسیون رقیق شده تهیه و سپس هر پلیت به میزان ۱۰ لاند (توسط لوپ کالیبره) تلقیح شود تا کلنی معادل کانت ۱۰۰۰-۱۰۰۰۰ باکتری در پلیت به دست آید. پلیت‌ها در انکوباتور ۳۵ درجه (با رطوبت محیطی حدود ۵۰ درصد) انکوبه شود. اگر کلنی‌های ایزوله شده روی محیط کشت حاصل نشد، سوسپانسیون را ۱۰ برابر رقیق تر کرده و پلیت‌ها مجدداً تلقیح شود.
- بررسی روزانه محیط کشت، در صورتی که غلظت بالایی از باکتری به داخل پلیت تلقیح شده باشد. رشد اولیه پس از ۲۴ ساعت قابل مشاهده است و کلنی‌های ایزوله در طول ۲-۳ روز پس از کشت به طور ماکروسکوپی قابل تفکیک خواهند بود. در صورتی که سوسپانسیون اولیه منجمد یا در یخچال نگهداری شود، قابلیت رشد آن کاهش خواهد یافت.

۳. محیط کشت انتخابی مناسب

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

۴. کنترل عدم آلودگی

پلیت محیط کشت تلقیح نشده برای کنترل استریلیتی انکوبه (۳۵°C) و عدم رشد باکتری را بررسی کنید.

1. Legionella Bozemanii

ج) کنترل کیفی معرف‌ها

معرف آنتی‌بادی فلوئورسنت

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

د) اطمینان کیفی (QA)^۱

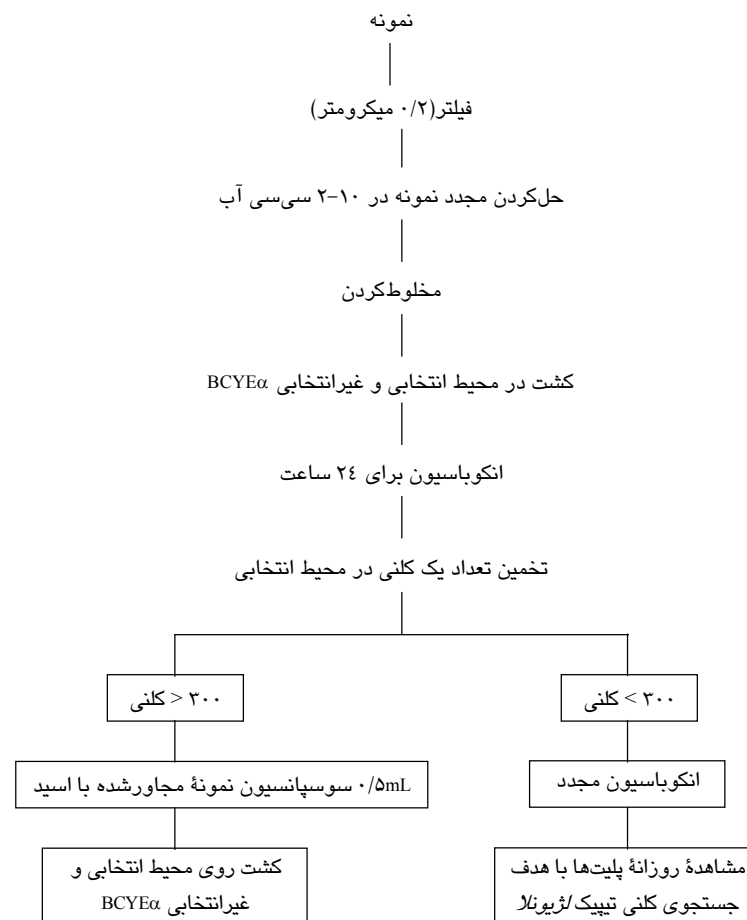
گزارش تمام موارد جدا شده لژیونلا در بیمارستان باید به اطلاع ICC (کمیته کنترل عفونت بیمارستان) رسانده شود.

آماده‌سازی نمونه‌ها**الف) تغلیظ از طریق فیلتراسیون (آب آشامیدنی)**

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

۱. توسط یک فیلتر (۴۷mm) استریل قیفی با اندازه سوراخ ۰/۲ میکرومتر نمونه آب را فیلتر می‌نماییم. غشاهای دارای منافذ موئینه ارجحیت دارند، مانند فیلتر نوکلی‌پور (Nuclepore) از جنس پلی‌کربنات که به علت منافذ ظریف یکسان بسیار مناسب است.

نمودار ۸-۱: تغلیظ با فیلتراسیون



۲. فیلتر را به سرعت با پنس استریل خارج می کنیم و از سمت آغشته آن داخل یک لوله استریل سانتریفوژ با حجم ۵۰ سی سی قرار می دهیم که حاوی ۱۰-۲ سی سی از نمونه اصلی است.
۳. اگر بیش از یک فیلتر برای تغلیظ یک نمونه نیاز باشد، همه فیلترها را داخل یک لوله قرار می دهیم.

ب) پلیت‌گذاری مستقیم^۱ برای آب و رسوبات غیرآشامیدنی

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

ج) یکنواخت کردن نمونه‌های آب تغلیظ‌شده و تغلیظ‌نشده

سرپیچ لوله‌های سانتریفوژ حاوی نمونه آب را محکم و سپس به مدت ۳۰ ثانیه خوب مخلوط می‌کنیم تا ارگانیسم‌های موجود در نمونه آب که مجتمع هستند، به‌طور کامل باز و پراکنده شوند.

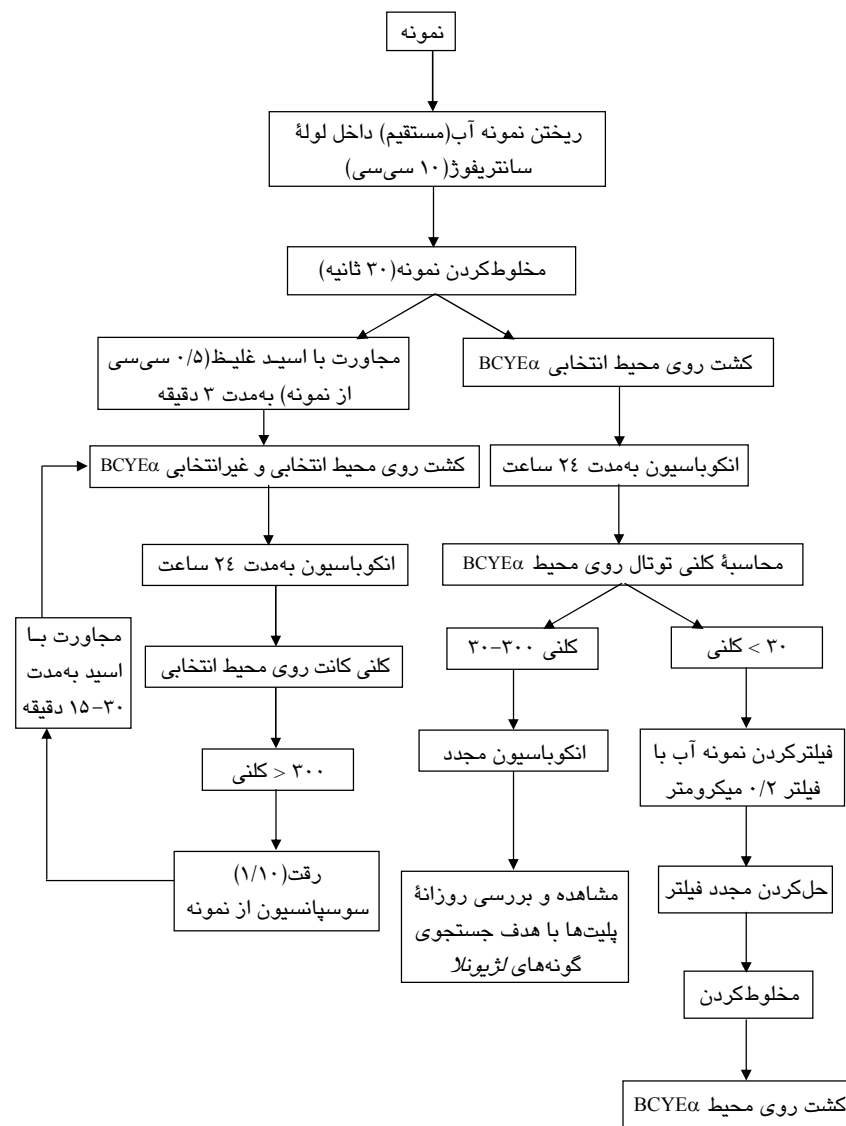
د) نمونه آب حاصل از تغلیظ و اضافه کردن اسید

۱. بهتر است نمونه‌های آب حاوی غلظت‌های بالای باکتری پس از پلیت‌گذاری برای بهبود جداسازی گونه‌های لژیونلا و جلوگیری از رشد سایر گونه‌ها با اسید غلیظ $\text{pH}=2$ آماده شوند.

۲. ۰/۵ سی‌سی از آب مرحله ج را با ۰/۵ سی‌سی معرف اسیدی داخل لوله درپیچ‌دار استریل مخلوط می‌کنیم (pH نهایی باید حدود ۲-۲/۲ باشد).

۳. منتظر می‌مانیم تا مخلوط اسیدی شده به مدت ۳ دقیقه در حرارت اتاق بماند. این زمان می‌تواند به مدت ۳۰-۱۵ دقیقه ادامه یابد، به‌ویژه زمانی که رشد کلنی بالای ۳۰۰ عدد در مجاورت ۳ دقیقه‌ای در مرحله اول به‌دست آمده باشد.

نمودار ۸-۲: کشت مستقیم پلیت‌ها



کشت نمونه‌ها روی پلیت

الف) نمونه تغلیظ‌شده به‌طریق فیلتراسیون

این نمونه‌ها را بدون مجاورت با اسید کشت می‌دهیم.

ب) نمونه‌های پلیت‌گذاری مستقیم

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

ج) روش کار

۱. ۰/۱ سی‌سی سوسپانسیون نهایی نمونه آب را در پلیت (BCYE) غیرانتخابی و انتخابی (نظیر GPVA یا DGPV) تلقیح می‌کنیم. برای جداسازی ارگانیزم‌هایی با مورفولوژی مشابه کلنی لژیونلا از بلاد آگار استفاده می‌کنیم. در مواردی که انتظار داریم گونه‌هایی به‌جز لژیونلا پنوموفیلا وجود داشته‌باشد، از دو پلیت اضافی (BCYE) (انتخابی و غیرانتخابی) حاوی آلومین (۱ درصد) استفاده می‌کنیم به‌خصوص برای گونه‌های لژیونلا میکدادای^۱ و لژیونلا بزمانی محیط حاوی آلومین (αBCYE) ارجح است.

۲. آب تلقیح‌شده را با میله شیشه‌ای یا پلاستیکی استریل در سطح پلیت پخش می‌کنیم.

د) ذخیره‌سازی نمونه‌ها

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

1. *Legionella Micdadai*

انکوباسیون

همه پلیت‌ها باید در حرارت 35°C و رطوبت بالای ۵۰ درصد به مدت حداکثر ۱۰ روز انکوبه و روزانه بررسی شوند. جار شمع‌دار یا انکوباتور مرطوب با CO_2 ۵-۲ درصد نیز قابل قبول است.

ارزیابی و تفسیر کشت

الف) شمارش باکتری

پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون پلیت‌های اولیه باید بررسی شوند تا کیفیت آماده‌سازی هر سری از نمونه‌ها تعیین شود. پلیت‌های با تعداد کلنی ۳۰-۳۰۰ عدد مناسب هستند.

۱. نمونه‌های اصلی (پلیت‌گذاری مستقیم)

- اگر در نمونه مجاورشده با اسید و روی محیط انتخابی (BCYE) بیش از ۳۰۰ کلنی غیر از لژیونلا رشد کند، باید نمونه آب نگهداری شده در یخچال را $\frac{1}{10}$ رقیق و پروسه مجاورت با اسید (۳۰-۱۵ دقیقه) را تکرار نمود. سپس مجدد کشت داد تا از رشد باکتری‌های غیر لژیونلا ممانعت شود.
- اگر شمارش کلی نمونه آب بدون اضافه‌شدن اسید کمتر از ۳۰ عدد کلنی روی محیط (BCYE) باشد، نمونه اصلی اولیه به روش فیلتراسیون تغلیظ و کشت مجدد شود.

۲. نمونه اصلی تغلیظ‌شده به روش فیلتراسیون

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

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

■ اگر شمارش کلی نمونه آب کمتر از ۳۰۰ کلنی (روی محیط BCYE) باشد، انکوباسیون مجدد همان پلیت ها توصیه می شود.

ب) بررسی کشت ها از لحاظ لژیونلا

۱. پس از انکوباسیون اولیه (۲۴ ساعت اول) همه کشت ها روزانه با استرئومیکروسکوپ

ارزیابی می شوند تا وجود کلنی های سفید خاکستری لژیونلا با ظاهر خاص و زمینه شیشه خردۀ تأیید شود.

۲. با استفاده از یک نیدل به طور آسپتیک از کلنی های مشکوک برمی داریم و روی محیط های BCYE آگار یا BCYE α بدون سیستم کشت می دهیم. اگر محیط آگار BCYE بدون سیستم در دسترس نبود، می توان در مواردی از محیط بلاد آگار استفاده نمود. زیرا برخی انواع لژیونلا در نبود سیستم توانایی رشد روی محیط بلاد آگار را دارند، هرچند برای اولین جداسازی به سیستم نیازمند هستند.

۳. هر پلیت را از ناحیه تلقیح شده با لوپ استریک و تا ۴۸ ساعت آنکوبه کنید. درضمن، می توان یک پلیت را چند قسمت کرد و چند کلنی مشکوک به لژیونلا را به لحاظ نیازمندی های رشد مورد ارزیابی قرارداد.

ج) تعیین هویت احتمالی لژیونلا

ویژگی های کلنی لژیونلا

■ ماکروسکوپی: کلنی های دارای رشد آهسته (۵-۳ روز) روی محیط آگار BCYE با رنگ سفید - خاکستری درخشانده، محدب با اندازه ۴-۱

میلی‌متر، گرد با حاشیه کامل و ظاهر شیشه‌خردده‌ای هستند. باکتری روی محیط BCYE آگار بدون سیستمین یا بلاد آگار گوسفند رشد نمی‌کند. کلنی‌های اولیه انعکاس رنگین‌کمانی سبزآبی یا صورتی دارند و کلنی‌های کهنه به رنگ سفید مایل به کرم و بدون انعکاس رنگین‌کمانی هستند.

■ استرئومیکروسکوپ: قادر است با تابش قوی و مایل نور، کلنی‌های با ظاهر شیشه‌خردده‌ای را که از ویژگی‌های لژیونلا است، به‌خوبی نشان‌دهد.

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

(د) فلوئورسنس کلنی

پللیت BCYE با کلنی‌های مشکوک لژیونلا را در طول موج ۳۶۶ نانومتر با لامپ اولترا ویوله بررسی می‌کنیم. برخی گونه‌های لژیونلا کلنی‌های با اتوفلوئورسنس رنگ قرمز درخشان یا سفید مایل به آبی درخشان دارند.

 **توجه:** لژیونلا پنوموفیلا شایع‌ترین گونه جداسده لژیونلاها و فاقد فلوئورسنس خودبه‌خودی است.

رنگ‌آمیزی گرم

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

■ باکتری لژیونلا باسیل گرم منفی کوچک به طول ۲-۱ میکرون و عرض ۰/۵ میکرون است که بسته به شرایط فیزیولوژیک رشد برخی از این

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

روش‌های تأییدی شناسایی لژیونلا

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

روش کار ایمونوفلوئورسنس

الف) آزمایش مستقیم آب (آماده‌سازی گسترش)

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

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

■ اگر تغلیظ ماده اولیه (آب) ضروری باشد، ۱۰۰ سی‌سی از نمونه را در دور ۳۵۰۰g به مدت ۳۰ دقیقه در حرارت اتاق سانتریفوژ می‌نماییم.

■ رسوب را در آب مقطر یا آب دیونیزه یا بافر فسفات سالین استریل مجدد حل می‌کنیم (pH ۷/۶).

۲. گسترش نمونه‌ها را در مقابل هوا خشک می‌کنیم.

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

۴. لام را با فرمالین ۱ درصد استریل‌شده با فیلتر، به مدت ۱۰ دقیقه مجاور می‌کنیم.

۵. لام را با بافر فسفات سالین استریل‌شده با فیلتر (pH ۷/۶) می‌شوئیم.

ب) تأیید کشت (آماده‌سازی گسترش)

۱. در شرایط آسپتیک کلنی مجزای مشکوک به لژیونلا را برداشت و در یک لوله آزمایش محتوی ۱-۰/۵ سی سی سالین - فرمالین ۱ درصد استریل، کدورتی معادل استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند تهیه می‌کنیم. کدورت‌های بیش از ۰/۵ مک‌فارلند باعث کاهش فلوئورسنس می‌شود که به دلیل پدیده پروزون ناشی از تعداد زیاد باکتری است.

۲. با استفاده از پیت پاستور ۲-۱ قطره از سوسپانسیون را داخل چاهک اسلاید ریخته و سپس دور می‌ریزیم به طوری که یک لایه نازک از سوسپانسیون روی چاهک باقی‌ماند.

۳. گسترش‌ها را در مجاورت هوا خشک می‌کنیم.

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

ج) روش رنگ آمیزی فلوئورسنس

۱. معرف آنتی بادی فلوئورسنت لژیونلایی را روی گسترش می ریزیم تا کاملاً آن را بپوشاند. کنژوگه های پلی کلونال از منوکلونال بهترند؛ زیرا توان شناسایی گونه های محیطی لژیونلا را دارند.
۲. دستورات سازنده را در ارتباط با زمان انکوباسیون حرارت و شستشو به دقت رعایت می کنیم (آب مورد استفاده توسط فیلتر $0.2\mu\text{m}$ استریلیزه شود).
۳. اسلایدها را در مجاورت هوا خشک می کنیم.
۴. ۲-۳ قطره مایع مونته کننده را روی اسلاید اضافه می کنیم و سپس روی آن را با لامل می پوشانیم.

د) آزمایش لام های رنگ آمیزی شده

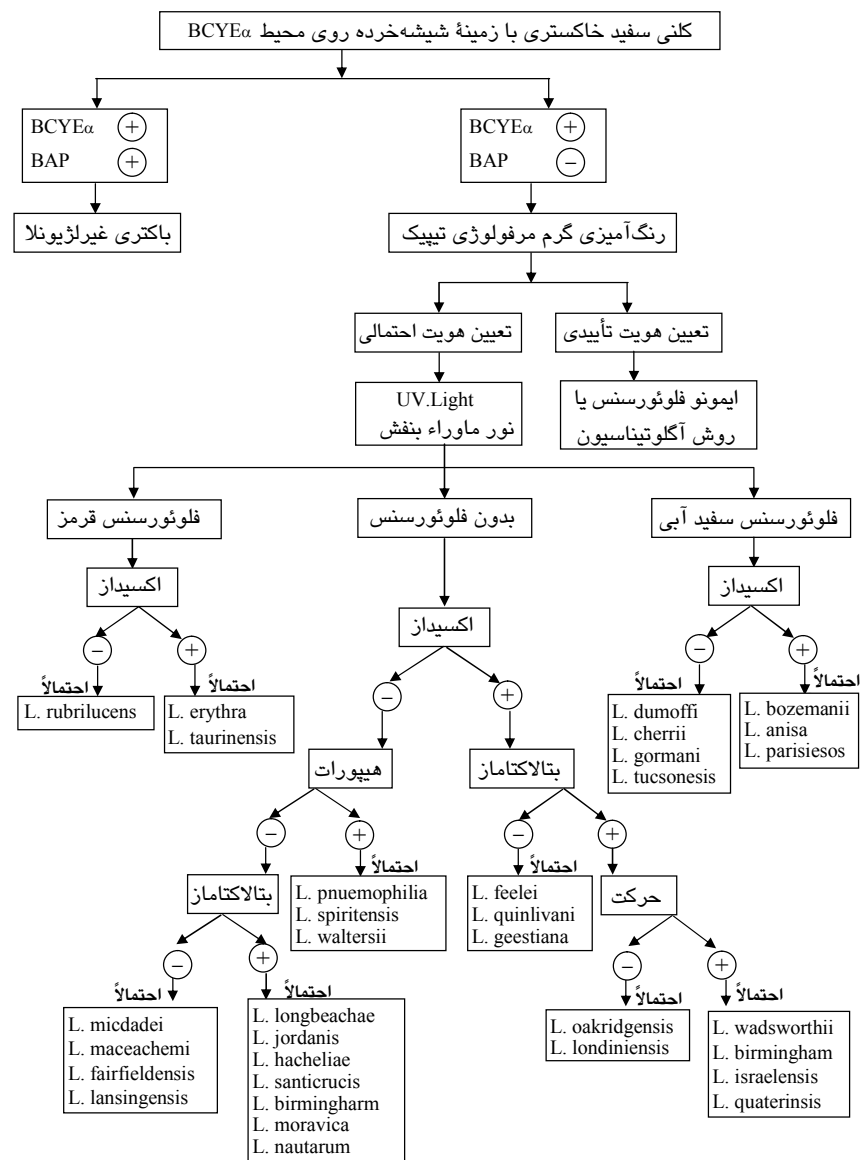
۱. مشاهده لام ها با میکروسکوپ فلوئورسنس با فیلتر شناسایی ایزوتیوسیانات؛
۲. استفاده از عدسی های $10\times$ و $40\times$ برای جستجو و غربال باسیل های فلوئورسنت در سطح لام؛
۳. استفاده از عدسی های $63\times$ و $100\times$ (oil) برای تأیید مرفولوژی باکتری ها؛
۴. مرفولوژی تیپیک لژیونلا با آنتی بادی فلوئورسنت: کوکوباسیل کوتاه از نمونه مستقیم آب یا باسیل های رشته ای طویل از کشت که فلوئورسنت سبز درخشان (4^+ - 3^+) در دیواره باکتری و تیره تر در نواحی مرکزی دارند.

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

ه) پیگیری آزمایش‌ها

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

نمودار ۸-۳: شناسایی فامیل لژیونلاها



Reference

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

فصل نهم ◀

کشت و اندازه‌گیری اندوتوکسین مایعات همودیالیز و دیالیز صفاقی

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

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

استنوتروفوموناس شایع‌ترین باکتری‌هایی هستند که می‌توانند در آب رشد و تکثیر نمایند و موجب مشکلاتی در سیستم همودیالیز شوند. از باکتری‌های دیگر که می‌توانند موجب آلودگی همودیالیز شوند، مایکوباکتریوم‌های غیرسلی (مایکوباکتریوم‌های آتیپیک)

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

بیماران تحت دیالیز در معرض واکنش‌های تب‌زای ناشی از اندوتوکسین، باکتری‌می توأم با سپسیس و سندروم‌های مزمن التهابی هستند. این واکنش‌ها ممکن است در ارتباط با آلودگی با باسیل‌های گرم منفی در آب همودیالیز باشند. این عوامل موجب شده است که دستورالعمل‌هایی برای ارزیابی آلودگی حمام دیالیز و آب دیالیز تدوین شوند که شامل دفعات نمونه‌برداری و روش‌های آزمایش کمی است. در ادامه، در خصوص اندازه‌گیری اندوتوکسین نیز توضیح داده خواهد شد که اغلب توسط آزمایشگاه‌های مرجع انجام می‌گیرد.

ملاحظات پیش از آزمایش

تعداد و زمان نمونه‌برداری

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

۱. منبع آب،
۲. از قسمت انتهایی سیستم سبک‌کننده آب،
۳. از قسمت انتهایی کارتریج شارکول فعال شده،
۴. از قسمت انتهای اسموز معکوس،
۵. آب خروجی از سیستم همودیالیز.

ابتدا محل نمونه‌گیری را ضد عفونی کنید و از آبی که در جریان است نمونه بردارید. حجم نمونه برداشت شده نباید از ۱ ml کمتر باشد و باید در ظرف استریل جمع شود. آب را باید سریعاً کشت

داد و در صورت نبود امکان کشت سریع، می‌توان آن را حداکثر تا ۲۴ ساعت در دمای 4°C نگهداری کرد.

الف) نمونه‌برداری روتین (در شرایطی که گزارشی از آلودگی یا عفونت وجود نداشته باشد)

نمونه‌ها را برای اهداف پایشی حداقل ماهیانه جمع‌آوری نمایید.

ب) نمونه‌برداری مکرر

کشت‌های مکرر را تا زمانی انجام دهید که شمارش تعداد باکتری‌ها از حد استاندارد بیشتر باشد. اگر رشد کشت‌ها از استاندارد مجاز بیشتر شد، از آب سیستم و ماشین دیالیز به‌طور **هفتگی** کشت دهید تا نتیجه قابل قبول حاصل شود.

ج) نمونه‌برداری موردی

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

د) زمان نمونه‌برداری

باید همیشه قبل از ضدعفونی کردن سیستم تصفیه آب و ماشین دیالیز نمونه‌ها جمع‌آوری شوند. اگر سیستم به‌تازگی ضدعفونی شده باشد، قبل از نمونه‌برداری آن را به‌خوبی آبکشی کنید. همچنین، مخزن ذخیره آب و قسمت توزیع‌کننده را بشویید و آبکشی کنید تا هیچ‌گونه ماده ضدعفونی‌کننده باقی‌نماند. کشت آب و مایع دیالیز دستگاه‌هایی که تازه نصب شده‌اند را در ابتدا **هفتگی** و سپس **ماهیانه**

انجام دهید؛ مگر آنکه طبق اطلاعات به‌دست‌آمده به تعداد بیشتری نمونه‌برداری نیاز باشد.

جمع‌آوری

الف) آب دیالیز

۱. نمونه را از ناحیه بعد از تصفیه آب (مانند قسمت اسمز معکوس و واحد دیونیزاسیون) برداشت‌نمایید.
۲. اگر از مخزن‌های ذخیره آب استفاده می‌شود، از آب مخزن ذخیره نمونه بردارید.
۳. از آب در محل ورود به ماشین دیالیز یا مخلوط‌کننده مرکزی نمونه بردارید.
۴. اگر سیستم همودیالیز را برای همان بیمار مجدد استفاده می‌کنید، از آبی که برای آبکشی دیالیز یا در تهیه ماده ضد عفونی‌کننده برای دیالیز استفاده می‌شود نمونه بردارید.

ب) مایع دیالیز

۱. پس از دیالیز، از فاضلاب خروجی دستگاه دیالیز نمونه بردارید.
۲. در بعضی ماشین‌های دیالیز جدید، جریان دیالیز زمانی متوقف می‌گردد که لوله انشعاب فاضلاب از خروجی جدامی شود. در این گونه موارد، دیالیز به محل نمونه‌برداری خروجی مجهز است که می‌توان با سرنگ نمونه برداشت.

ج) حجم

حداقل ۵۰ ml از هر قسمت نمونه بردارید. از ظرف‌های فاقد اندوتوکسین استفاده کنید. اغلب ظرف‌های پلاستیکی استریل که به‌صورت تجاری در دسترس هستند، فاقد اندوتوکسین است.

وسایل و مواد لازم جهت شمارش پلیت

۱. محیط TSA^۱ را در پلیت‌های به قطر ۱۰۰mm بریزید. محیط‌های کشت
 بلاد آگار و شکلات آگار مناسب نیستند، زیرا غنی هستند و اجازه رشد به
 باکتری‌های آسیب‌دیده را نمی‌دهند؛
۲. اتانول ۹۵ درصد؛
۳. انکوباتور ۳۵°C؛
۴. پیپت‌های استریل با حجم‌های ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر (یک سی‌سی).

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

ملاحظات حین آزمایش

روش کار

برای تعیین و شمارش باکتری‌ها در آب همودیالیز باید از روش‌های کمی استفاده کرد. یکی از بهترین روش‌ها روش فیلتر غشایی است؛ چون در این روش می‌توان مقادیر زیادی از حجم آب را از فیلتر عبورداد. ولی چون ابزار و وسایل فیلتر غشایی در بیشتر آزمایشگاه‌های میکروبی‌شناسی بالینی وجود ندارد، از روش‌های جایگزینی استفاده می‌شود. استفاده از لوپ‌هایی که برای کشت ادرار استفاده می‌شود برای کشت آب دیالیز توصیه نمی‌شود؛ زیرا حساسیت کمتری دارند. استفاده از پیپت که بتواند ۵-۱ ml آب را به محیط کشت انتقال دهد مناسب است. استفاده از محیط‌های خیلی غنی مانند بلاد آگار و شکلات آگار توصیه نمی‌شود. محیط کشت استاندارد برای کشت آب همودیالیز محیط TSA است. پلیت را پس از کشت دادن باید در دمای 35°C به مدت ۴۸ ساعت انکوباسیون کرد. طولانی کردن زمان انکوباسیون به مدت یک هفته در دمای اتاق شانس جداسازی باکتری‌ها را بیشتر می‌کند.

با این همه، در مطالعات مختلف کشت در محیط TSA و انکوباسیون در دمای 35°C به مدت ۴۸ ساعت روش استاندارد است. ولی این روش برای رشد مایکوباکتریوم‌های غیرسلی که در آب وجود دارند و همچنین، قارچ‌ها و مخمرها مناسب نیست. از سوی دیگر، بیوفیل‌هایی که در سطوح داخلی لوله‌ها تشکیل می‌شود، موجب می‌شود که تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌ها پنهان شوند و در کشت‌های روتین معلوم نشوند. فرآیندهای ضدعفونی کردن به ندرت موجب حذف بیوفیل می‌شوند و افزایش سریع تعداد باکتری‌ها پس از ضدعفونی کردن ممکن است نشان‌دهنده تشکیل بیوفیل باشد.

۱. نمونه‌های آب را ابتدا با استفاده از ورتکس کاملاً مخلوط نمایید. سپس حجم‌های ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر از نمونه آزمایش را روی پلیت‌ها

- تلقیح کنید (برای مایع دیالیز حجم ۱۰ میکرولیتر را هم کشت دهید) و با استفاده از یک لوپ استریل روی پلیت کشت دهید.
۲. پلیت‌ها را در دمای 35°C و به مدت ۴۸ ساعت انکوبه کنید.
۳. کلنی‌ها را بشمارید و تعداد آنها را در هر میلی‌لیتر نمونه محاسبه نمایید.
- برای این کار پلیت‌های با شمارش کلنی بین ۳۰-۳۰۰ را در نظر بگیرید.
۴. تعیین هویت ارگانیسم‌ها ضرورت ندارد (در بعضی از موارد تعیین هویت مشکل است). می‌توان پلیت‌ها را برای مطالعات بعدی باکتریولوژیک به مدت یک هفته نگهداری کرد.
۵. تعداد کلنی‌ها را به صورت واحد تشکیل‌دهنده کلنی (CFU) در هر میلی‌لیتر گزارش نمایید.
۶. توجه: فیلتراسیون غشایی روشی توصیه‌شده برای آزمایش مایع همودیالیز است. روش‌های نمونه‌برداری تجاری نیز برای آزمایش وجود دارند، ولی نباید از آنها به عنوان جایگزین روش‌های متداول و فیلتراسیون غشایی استفاده کرد.

تفسیر

الف) مایع دیالیز

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

ب) آب مورد استفاده در دیالیز

شمارش تعداد باکتری در آب مورد استفاده همودیالیز در مقایسه با مایع دیالیز پایین‌تر و باید کمتر از ۲۰۰CFU در هر میلی‌لیتر باشد. با این‌همه، در استانداردهای جدید پیشنهاد شده‌است معیار ۵۰CFU در نظر گرفته‌شود.

ج) آب‌های مورد استفاده در همودیالیز

باید این آب‌ها از لحاظ وجود اندوتوکسین آزمایش شوند. بررسی وجود اندوتوکسین در حمام دیالیز نیز لازم است.

گزارش کشت

تعداد کلنی را در هر میلی‌لیتر گزارش کنید. وقتی تعداد کلنی‌ها در آب مورد استفاده برای همودیالیز بیش از ۲۰۰CFU و در مایع همودیالیز بیش از ۲۰۰۰CFU باشد، سریعاً به مسئول بخش همودیالیز یا پزشک مسئول کنترل عفونت گزارش‌نمایید. برای شمارش کلنی بیش از ۵۰CFU در آب به کارکنان فنی درخصوص تصفیه آب تذکردهید. نتایج نهایی آزمایش‌ها را به کمیته کنترل عفونت بیمارستان و مدیر پرستاری واحد همودیالیز که مسئول تضمین کیفیت است گزارش‌دهید.

آزمایش اندوتوکسین باکتریال

اندوتوکسین‌ها، لیپوپلی‌ساکارید (LPS) غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی هستند که قسمت توکسیک آن لیپید A است. زیر واحد پلی‌ساکاریدی آن به‌علت حلالیت در آب در سمیت اندوتوکسین دخالت دارد. اندوتوکسین ممکن‌است موجب تب، لکوپنی و در موارد شدید شوک و مرگ شود. آستانه واکنش تب‌زایی اندوتوکسین ۵ واحد توکسین به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن است (تزریق داخل وریدی). اندوتوکسین مایعات همودیالیز در پدیده‌ای که امروزه به‌نام سندروم واکنش التهابی نامیده‌می‌شود دخالت دارد. آزمایش لیمولوس

آمبوسیت لیزات^۱ برای تشخیص اندوتوکسین از مشاهده اثر عفونت‌های باکتری‌های گرم منفی در خرچنگ نعل‌اسبی که به انعقاد داخل عروقی منجر می‌شود، منشاء گرفته‌است. امروزه مشخص شده‌است که این واکنش به‌واسطه آنزیمی است که توسط اندوتوکسین کاتالیز می‌شود. این پدیده به پیدایش آزمایش‌هایی منجر شد که برای تعیین اندوتوکسین در داروها و مواد بیولوژیک با کاربرد درمانی استفاده می‌شود.

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

ملاحظات پیش از آزمایش اندوتوکسین

نمونه

۱. می‌توان هر مایعی را از لحاظ وجود اندوتوکسین آزمایش کرد. بعضی ترکیبات یا محلول‌ها به‌واسطه داشتن املاح فلزات یا قدرت یونی بالا یا اسمولاریته بالا ممکن‌است نتایج مثبت یا منفی کاذب بدهند یا باعث افزایش سرعت یا مانع واکنش شوند. روش‌های آزمایش و تفسیر نتایج بالینی باید به‌دقت بررسی شوند. بعضی آزمایشگاه‌های بالینی ممکن‌است برای این آزمایش با آزمایشگاه‌های شرکت‌های تجاری قرارداد ببندند.

۲. pH نمونه باید بین ۷/۵-۶ باشد.

۳. نمونه را مانند نمونه‌ای جمع‌کنید که برای کشت استفاده می‌شود. در صورت استفاده از ظرف‌های شیشه‌ای، باید عاری از اندوتوکسین باشند؛ بنابراین، می‌توان آنها را به مدت ۴ ساعت در دمای ۱۸۰°C در داخل فور قرارداد یا از ظرف‌های پلاستیکی استریل یک‌بار مصرف استفاده کرد.

۴. نمونه‌ها را می‌توان در دمای $2-8^{\circ}\text{C}$ به مدت ۲۴ ساعت نگهداری نمود. برای نگهداری طولانی مدت یا ارجاع به آزمایشگاه مرجع می‌توان نمونه‌ها را در $20^{\circ}\text{C}-$ فریز کرد.

وسایل و مواد لازم

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

ملاحظات حین آزمایش

روش

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

کنترل کیفی

۱. آزمایش باید هم‌زمان با استانداردهای رقیق‌شده انجام شود که نشان‌دهنده حساسیت نقطه نهایی (endpoint) کیت است.
۲. استاندارد کنترل اندوتوکسین می‌تواند دارای نقطه نهایی $5-0.001 \text{ EU/ml}$ باشد که به روش بستگی دارد. روش کیتیک کمی (کدورت‌سنجی یا رنگ‌سنجی) یا روش‌های نیمه کمی (لخته ژل و رنگ‌سنجی).

ملاحظات پس از آزمایش

گزارش نتایج

۱. اگر نتیجه آزمایش منفی باشد، هر نمونه منفی را باتوجه به مقدار ماده قابل اندازه‌گیری توسط کیت گزارش نمایید که به حساسیت کیت به‌کار رفته بستگی دارد؛ مانند $0.03 \text{ EU/ml} < \text{یا} < 0.06 \text{ EU/ml}$.
۲. گزارش نتایج مثبت به روش آزمایش بستگی دارد و اینکه آیا از روش‌های کیتیکی کمی یا نیمه‌کمی (تشکیل لخته ژل) یا تک‌لوله‌ای (Single Tube) استفاده می‌شود. برای روش‌های کیتیکی EU در هر میلی‌لیتر گزارش می‌شود و برای آزمایش لخته ژل EU عیار آخرین لوله‌ای است که لخته شده و به‌صورت breakpoint گزارش می‌شود. اولین لوله‌ای که لخته تشکیل نشده است در محدوده این دو نقطه قرار می‌گیرد. برای روش‌های تک‌لوله‌ای نتایج به‌صورت مساوی یا بیشتر از حساسیت لوله منفرد گزارش می‌شود؛ مانند $0.06 \geq \text{EU/ml یا} \geq 0.125 \text{ EU/ml}$.

محدودیت

۱. LAL یک واکنش وابسته به آنزیم است و به تنظیم pH، املاح و یون‌های دوزفیتی نیاز دارد. نتایج منفی به‌علت عوامل مهاری به‌معنای فقدان اندوتوکسین نیست.
۲. در بعضی موارد ممکن است واکنش تسریع‌شود. مانند آلودگی با استات سلولز یا سلولز-دی یا تری‌استات که با LAL واکنش نشان می‌دهند.

این موارد مانند واکنش‌دهنده با LAL محسوب می‌شوند و ضرورتاً نشان‌دهنده وجود یا فقدان اندوتوکسین نیستند.

۳. در هر قسمتی که برای سنجش اندوتوکسین به کار می‌رود، باید استاندارد تعریف شود. در دستورالعمل استاندارد ملی آمریکا برای آب همودیالیز تعداد کلنی برای آب همودیالیز کمتر از ۲۰۰ CFU و میزان مجاز اندوتوکسین ۲ EU/ml با محدودیت ۱ EU/ml به روش LAL تعریف شده است. این معیارها اخیراً برای دستگاه‌های همودیالیز بیان شده است که همودیالیز را فراوری مجدد می‌کنند.

کشت مایع دیالیز صفاقی

۱. گروه بیماران: یک درصد بیماران که در مرحله نهایی (End-Stage) بیماری‌های کلیوی هستند، از طریق همودیالیز یا دیالیز صفاقی یا پیوند کلیه تحت درمان قرار می‌گیرند. در سال ۱۹۹۸، از تعداد ۳۴۶,۴۵۳ بیمار مبتلا به نارسایی کلیه، ۲۹ درصد پیوند کلیه شدند، ۶۱ درصد تحت درمان همودیالیز و ۷/۳ درصد از طریق نوعی از انواع همودیالیز صفاقی تحت درمان قرار گرفتند. متداول‌ترین نوع دیالیز صفاقی دیالیز صفاقی آمبولاتوری و دیالیز مداوم گردشی است.
۲. روش: مایع دیالیز از طریق یک سوند دائمی وارد صفاق می‌شود. این شیوه درمان در خانه نیز قابل اجرا است. در دیالیز صفاقی آمبولاتوری ۲ لیتر مایع دیالیز همواره در حفره صفاق وجود دارد به نحوی که خون مداوم

صاف‌شده و مایع روزانه عوض می‌شود (APD)^۱. دو روش APD به شرح زیر رایج است:

■ CAPD^۲: مایع دیالیز در هر روز ۴ نوبت از طریق تخلیه مایع دیالیز کهنه و جایگزینی آن با مایع جدید عوض می‌شود. این عمل حدود ۴۵ دقیقه طول می‌کشد. تعویض‌ها با فاصله در طی روز انجام می‌گیرد.

■ CCPD^۳: در دیالیز مداوم گردشی در طول شب یک سیکلر اتوماتیک وصل و تعویض در طول خواب انجام می‌شود. وقتی بیمار از ماشین جدا می‌شود، ۲ لیتر از مایع دیالیز در حفره صفاق باقی می‌ماند که این مقدار پس از اتصال مجدد به دستگاه در هنگام شب خارج خواهد شد.

 توجه: تمام مراحل کار باید به صورت آسپتیک انجام گیرد تا شانس آلودگی کیسه‌ها کاهش یابد. با وجود استفاده از روش‌های آسپتیک بروز عفونت محتمل است.

نمونه

جمع‌آوری و انتقال

۱. احتیاط‌های ایمنی: کیسه دیالیز را داخل کیسه پلاستیکی بزرگ‌تری قرار دهید. این کیسه را داخل یک ظرف پلاستیکی غیرقابل نشت قرار دهید و به آزمایشگاه منتقل کنید.
۲. قسمت اول و کدر نمونه را برای کشت انتخاب کنید. در بیمارانی که CCPD انجام می‌شود، ممکن است نمونه شفاف باشد. در این موارد یک نمونه مجدد پس از یک ساعت جمع‌آوری و شکل ظاهری آن را ارزیابی

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

کنید. در ۶ درصد از بیماران با کشت مثبت که دچار پریتونیت هستند، مایع دیالیز شفاف است.

شرایط انتقال

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

آماده‌سازی

۱. محتوی کیسه را ۲۰-۱۰ بار پشت و رو کنید تا کاملاً مخلوط شود.
۲. قسمت ورودی را با بتادین ضدعفونی کنید و اجازه دهید تا خشک شود. ۱۰۰ میلی‌لیتر از مایع دیالیز را بکشید و در یک ظرف درپچ‌دار ۵۰ میلی‌لیتری بریزید.
۳. شمارش تام و افتراقی سلولی را انجام دهید. اگر تعداد گلبول‌های سفید $50/mm^3$ $\geq$ باشد، ممکن است کشت ضرورت داشته باشد. وجود بیش از ۱۰۰ گلبول سفید در میلی‌متر مکعب که حداقل ۵۰ درصد آن PMN باشد، قویاً به نفع پریتونیت است.
۴. نمونه را به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۰۰۰g سانتریفوژ کنید و مایع رویی را با احتیاط دور بریزید.
۵. از رسوب آن اسمیر گرم تهیه کنید.
۶. رسوب حل شده را در محیط‌های مناسب مانند بلاد آگار، شکلات آگار، EMB یا مکانکی، BHI، محیط‌های اختصاصی قارچ‌ها و شیشه کشت خون کشت دهید.

آزمایش میکروسکوپی

الف) رنگ‌آمیزی گرم

۱. نمونه را طبق روش فوق سانتریفوژ کنید.
۲. اسمیر گرم را تهیه و در صورت مشاهده ارگانیسم سریعاً گزارش کنید.
۳. رنگ‌آمیزی گرم در ۴۰-۹ درصد موارد پریتونیت مثبت است و در صورت مثبت‌شدن در ۸۵ درصد موارد کشت نیز مثبت خواهد بود. با وجود آنکه رنگ‌آمیزی گرم در نهایت در ۵۰ درصد موارد مثبت می‌شود، نتایج آن برای شروع درمان بسیار حائز اهمیت است.

ب) رنگ‌آمیزی اسید فاست

استفاده بالینی از این روش بسیار محدود است. شمارش افتراقی گلبول‌های سفید و بررسی اسمیر اسید فاست عموماً کمک چندانی به تشخیص پریتونیت مایکوباکتریال نمی‌نماید. مایکوباکتریوم‌های غیرسلی (فورتیتوم، کانزاسی، گوردونه و ...) نیز ممکن است موجب پریتونیت شوند. در صورت وجود علائم بالینی و شک به پریتونیت، چنانچه نتایج کشت معمولی منفی باشد، ممکن است این میکروارگانیسم‌ها عامل بیماری باشند.

کشت

۱. باکتری‌ها: نمونه را در پلیت هوازی کشت دهید و هم‌زمان از بطری‌های کشت خون استفاده کنید. ۵ میلی‌لیتر از نمونه را داخل بطری‌های کشت خون تلقیح کنید. پلیت را در شرایط CO_2 ۵ درصد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه کنید.
۲. عفونت بی‌هوازی در پریتونیت ناشی از CCPD و CAPD نادر است و انجام‌دادن کشت بی‌هوازی اختیاری است. در صورت نیاز نمونه را در

محیط‌های کشت غیرانتخابی بی‌هوازی کشت دهید و به مدت ۷ روز در 35°C و در شرایط بی‌هوازی انکوبه نمایید. به‌منظور جداسازی بی‌هوازی‌های کند رشد، محیط مایع کشت نمونه‌ها باید یک هفته دیگر نگهداری شوند.

کشت موازی

مایع دیالیز سانتریفوژشده هم‌زمان با کشت روتین در محیط مایکوباکتریوم‌ها و قارچ‌ها کشت داده می‌شود. این عمل زمانی اندیکاسیون دارد که اسمیر مستقیم اسید فاست یا دید مستقیم قارچ‌ها با KOH یا کالکوفلور مثبت باشد.

- مایع دیالیز تغلیظ‌شده به مدت ۵ روز در یخچال نگهداری می‌شود.
- اگر کشت باکتری‌ها منفی باشد و بیمار به درمان جواب ندهد، کشت از لحاظ مایکوباکتریوم و قارچ ضروری است.

روش‌های تکمیلی

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

تفسیر

فلور پوست بیمار (استافیلوکوک / اورئوس یا سایر گونه‌های مختلف استافیلوکوک) از عوامل شایع پریتونیت توأم با دیالیز آمبولاتوری و خودکار هستند. تفسیر نتایج کشت در پریتونیت ناشی از دیالیز به علت تعداد کم ارگانسیم‌های مولد

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

۱. موارد زیر مثبت تلقی می‌شوند:

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

۲. موارد زیر را آلودگی در نظر بگیرید:

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

ارزیابی کمی

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

یافته‌های مکمل بالینی

الف) شمارش سلولی

۱. مایع پریتون نرمال (CAPD):

- حاوی ۵۰-۱۰۰ گلبول سفید در هر میلی‌متر مکعب است که اغلب تک‌هسته‌ای هستند.

■ از لحاظ ظاهری شفاف است.

۲. مایع دیالیز پريتوان:

■ حاوی بیش از ۱۰۰ گلبول سفید در هر میلی‌متر مکعب است.

■ از لحاظ ظاهری کدر است.

ب) تشخیص افتراقی

۱. پريتونیت باکتریایی: پلی‌مرفونوکلئرها غالب هستند و بیش از ۵۰ درصد سلول‌ها را تشکیل می‌دهند.

۲. پريتونیت مایکوباکتریایی:

■ نوتروفیل‌ها گاهی در این نوع پريتونیت دیده می‌شوند.

■ غالب موارد ارجحیت با سلول‌های تک‌هسته‌ای است.

۳. پريتونیت آلرژیک: هنگامی که بیش از ۱۰ درصد گلبول‌های سفید از نوع انوزینوفیل باشد.

علائم و نشانه‌ها

۱. بیمارانی که مایع پريتوان آنها کدر یا دچار درد شکم یا تب هستند (CAPD).

۲. بیمارانی که دارای مایع پريتوان کدر یا دچار درد شکم یا تب در هر مرحله از دیالیز آمبولاتوری گردشی (CCPD) هستند.

۳. در موارد مشکوک مانند درد شکم یا تب چنانچه مایع دیالیز شفاف باشد، از یک مایع تعویضی دیگر بعد از ۲ ساعت، کشت انجام می‌شود.

پاسخ بالینی

برای بیمارانی که بعد از ۹۶-۴۸ ساعت بهبودی بالینی پیدا نمی‌کنند، یک ارزیابی مجدد ضروری است. در این گونه موارد شمارش سلولی مجدد، رنگ‌آمیزی گرم

و کشت باید تکرار شود. در بیمارانی که علائم آنها مداوم است باید به فکر یافته‌های پاتولوژیک داخل شکم یا ژنیکولوژی بود و ممکن است به مداخله جراحی نیاز باشد، همچنین احتمال دارد که بیمار مبتلا به عفونت‌های قارچی، مایکوباکتریایی یا ارگانیسم‌های سخت‌رشد باشد.

تضمین کیفیت

۱. محیط‌های کشت و معرف‌ها باید کنترل کیفی شوند.
۲. کشت هم‌زمان نرمال سالین و آب مقطر استریل ضروری است.
۳. تمام نتایج مثبت را به کمیته کنترل عفونت و واحد دیالیز گزارش نمایید. در صورتی که میزان عفونت افزایش ناگهانی داشته‌باشد یا تعداد عفونت‌های کاذب افزایش یافته‌باشد، باید تحقیقات بیشتری درخصوص آلودگی دستگاه دیالیز انجام‌شود.

Reference

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

Laboratory Guide to Diagnosis of Nosocomial Infections

Ministry of Health & Medical Education
Health Department

Center for Diseases Control - Reference Laboratories of Iran, Research Center



sedapublishing@yahoo.com