معاونت بهداشت

آزمایشگاه مرجع بهداشت

جزوه آموزشی

کنترل کیفی در بخش باکتری شناسی

مقدمه:

این جزوه در راستای آموزش پرسنل شاغل در آزمایشگاههای معاونت بهداشت گردآوری شده و همه کارکنان در حین ورود به واحد و بخش باکتری شناسی ملزم به مطالعه و ارائه امتحان خواهند بود. کارشناس مسئولان شهرستان نیز ملزم به اخذ امتحان و نیز صلاحیت سنجی این بخش خواهند بود. مطالب این دوره از سایت آزمایشگاه مرجع و نیز فعالیت همکاران در سایر استانها جمع آوری شده است.

امید است همکاران عزیز با مطالعه و ایجاد آگاهی و نیز کسب دوره های آموزشی عملی در آزمایشگاه مرجع استان، باعث ارتقا آگاهی و مهارت ایشان شده و در راستای تضمین کیفیت در آزمایشگاههای بهداشتی به کار بگیرند.

علی حقی

کارشناس ارشد باکتری شناسی

گروه‌های هدف:

تکنسین کاردان و کارشناس آزمایشگاه تشخیص طبی

اهداف آموزشی

هدف کلی: افزایش دانش و آگاهی پرسنل درخصوص کنترل کیفی در بخش باکتری شناسی

روش و نحوه اجرای آموزشی

مطالعه غیرحضوری

مدت دوره آموزشی: 12 ساعت

ارزشیابی : در پایان دوره به منظور ارزیابی میزان حصول موفقیت و دستیابی به اهداف آموزشی و بررسی آگاهی، نگرش و عملکرد آموزش گیرندگان و بهبود مستمر فرایند یک ارزشیابی از شرکت کنندگان به صورت تست‌های چهارگزینه‌ای به عمل خواهد آمد.

فهرست:

مقدمه: ۵

هدف از کنترل کیفی ۶

اصول کنترل کیفی ۶

روش‌های تضمین کیفیت ۷

کنترل متغیرهای مؤثر بر کیفیت ۷

آزمایش کاتالاز ۲۷

کنترل کیفی محیط های کشت میکروبی: ۳۸

منبع سویه های کنترل کیفی: ۳۸

کنترل محیط های ساخته شده تجاری (آماده مصرف): ۴۱

روش تهیه کدورت استاندارد نیم مک فارلند ۴۷

اتوکلاو ۷۲

فور(اون) ۷۹

منابع :.....۸۵

مقدمه:

تاریخ شروع کنترل کیفی محصولات و فرآورده‌های تولیدشده، هم‌زمان با تولید محصولات شروع شده است. در ابتدا کنترل کیفی محصولات با نگاه کردن به‌ظاهر محصولات و تأیید ظاهری آن‌ها و بحث و گفتگو در مورد معایب و محاسن آن‌ها صورت می‌گرفت، اما پس از پیدایش محاسبات آماری و استفاده آن در علوم مختلف، قرن هفدهم به قرن کنترل کیفیت دستاوردهای صنعتی توسط آمار معروف شد. با این حال استفاده اصولی از آمار برای کنترل کیفیت محصولات از اوایل قرن بیستم شروع شد. در سال ۱۹۲۴ Walter.A Shewart از کارکنان شرکت تلفن بل با کمک چارت ابداعی خود محصولات کمپانی را از نظر کیفی کنترل می‌کرد؛ این چارت که به چارت شوارتز معروف گردید در کارخانه‌ها و آزمایشگاه‌های تشخیص پزشکی مورد استفاده قرار گرفت. استفاده از کنترل کیفی در صنعت در مقایسه با آزمایشگاه‌ها زودتر صورت گرفت و در آزمایشگاه‌ها کمی دیرتر، یعنی در سال ۱۹۵۳ معمول شد. از اواسط قرن بیستم برنامه کنترل کیفی خارجی نیز مرسوم شد و آزمایشگاه‌ها برای بررسی عملکرد خود نتایج آزمایش‌های خود را با آزمایشگاه‌های دیگر مقایسه می‌کردند.

کنترل کیفی در یک جمله به معنی مطالعه خطاهای آزمایشگاهی و روشهای تشخیصی و اتخاذ تدابیر لازم جهت به حداقل رساندن آنها میباشد. وقتی صحبت از کنترل کیفی میشود, بیشتر فعالیتها حول محور انجام آزمایش متمرکز میگردد, اما محدوده کنترل کیفی بسیار وسیعتر است. هرجا امکان خطا وجود دارد باید برنامه کنترل کیفی نیز وجود داشته باشد. لذا در چرخه مراجعه بیمار به آزمایشگاه تا گرفتن نتیجه کلیه مراحل نمونه گیری, انتقال, انجام آزمایش و ارائه جواب باید تحت نظارت سیستم کنترل کیفی باشد. دقیقترین سیستم انجام آزمایش وقتی که نمونه گیری و انتقال نمونه صحیح نباشد یا منشی آزمایشگاه نتیجه را اشتباه تایپ نماید, فاقد کارایی است

هدف از کنترل کیفی

به‌طورکلی هدف هر آزمایشگاهی اخذ نتیجه صحیح و درست و اندازه‌گیری دقیق نمونه‌های آزمایشگاهی است و برای رسیدن به این هدف باید میزان و نوع تغییرات غیراستانداردی که در آزمایشگاه‌ها صورت می‌گیرد شناسایی شده و خطاهای آزمایشگاه به حداقل ممکن برسد. برای یافتن متدهای اندازه‌گیری صحیح، قابل دسترس، بی‌خطر و قابل تکرار در آزمایشگاه، روش‌های گوناگونی وجود دارد. گردآوری این روش‌ها به‌صورت اصولی و مستند برای ارتقاء کیفیت خدمات آزمایشگاهی لازم است. کنترل کیفی شامل طیف وسیعی از فعالیت‌ها است که اجرای آن‌ها در یک قالب منسجم و مستند باعث رسیدن آزمایشگاه به کیفیت مطلوب و مقبول می‌گردد.

اصول کنترل کیفی

برای دستیابی به سیستم سلامت کارآمد بایستی تمامی بخش‌های درگیر در این سیستم مورد توجه و کنترل قرار بگیرند. پزشکان برای انتخاب صحیح شیوه‌های درمانی نیازمند تشخیص درست می‌باشند؛ تشخیص نادرست ممکن است باعث تأخیر در درمان بیماران شده و یا در موارد نادر منجر به فوت آنان گردد. جامعه آزمایشگاهی به‌عنوان یکی از بخش‌های مهم سیستم سلامت در این زمینه وظیفه مهمی دارد و می‌تواند در تشخیص و درمان بیماران نقش مهمی را ایفاء نماید. در راستای ایفای این نقش و بالا بردن کیفیت خدمات آزمایشگاهی باید مبحث کنترل کیفی به کارکنان آزمایشگاه آموزش داده شده و بر اجرای آن نظارت کامل صورت گیرد. اجرای این موارد برای آزمایشگاه پرهزینه و زمان‌بر بوده و نیاز به افراد کارآزموده دارد. متأسفانه برخی از آزمایشگاه‌ها خواهان انجام چنین کاری نیستند و آن را کاری بیهوده و اضافی تلقی می‌کنند، اما اجرای این موارد برای سلامتی و بالا بردن کیفیت کار آزمایشگاه ضروری بوده و شامل تمامی مراحل آزمایش از مرحله درخواست آزمایش توسط پزشک تا مرحله جوابدهی است. فرایند کنترل کیفی، تمامی فاکتورهای مؤثر بر نتایج آزمایش مانند تجهیزات و دستگاه‌ها، مواد و محلول‌ها، عوامل انسانی و محیطی را مورد نقد و بررسی قرار داده، صحت و دقت نتایج حاصله را تضمین نموده و توجیهات منطقی اقتصادی و هزینه‌ای را به دنبال دارد.

روش‌های تضمین کیفیت

سه متغیر عمده بر کیفیت پاسخ‌ها در آزمایشگاه اثر دارد که کنترل آن‌ها ضامن کیفیت است:

متغیرهای پیش از انجام آزمایش (preanalytical variable): شامل تقاضای آزمایش، شناسایی بیمار، آماده کردن بیمار، نمونه‌گیری، انتقال نمونه، نگهداری نمونه، پردازش و آماده‌سازی نمونه، تقسیم نمونه‌ها، تهیه لیست کاری، کارهای دفتری و نگهداری و بایگانی

متغیرهای حین آزمایش (analytical variable): شامل روش آزمایش، استاندارد و کالیبره کردن، ثبت روش‌ها و دستور کارها، کنترل معرف‌ها، تجهیزات و وسایل، کنترل کیفیت آزمایش انجام شده با روش‌های آماری و چارت‌های کنترلی، بایگانی و نگهداری آن‌ها

متغیرهای پس از انجام آزمایش (post analytical variable): شامل وارد کردن پاسخ‌ها، تایپ و آماده نمودن جواب‌ها، امضاء، درج مقادیر نرمال و بایگانی پاسخ‌ها

کنترل متغیرهای مؤثر بر کیفیت

کنترل متغیرهای پیش از انجام آزمایش: تحقیقات نشان می‌دهد حدود ۴۵٪ خطاهای آزمایشگاه در این قسمت روی می‌دهد. از آنجائیکه مسئولیت دقت و صحت آزمایش‌ها بر عهده آزمایشگاه است و مسائل بسیاری ممکن است قبل از انجام آزمایش‌ها روی دهد که بر نتایج آن تأثیرگذار باشد و تعدادی از آن‌ها خارج از محیط آزمایشگاه صورت می‌گیرد، لذا شناسایی علل خطا و کاهش میزان آن نیاز به همکاری بخش‌های مختلف آزمایشگاه و در مراکز درمانی نیاز به همکاری افرادی خارج از محیط آزمایشگاه مانند پزشک و پرستار با آزمایشگاه دارد.

کنترل متغیرهای حین انجام آزمایش: حدود ۱۰٪ خطاهای آزمایشگاهی در این بخش صورت می‌گیرد. برای رسیدن به نتیجه درست و صحیح و کاهش خطا در این مرحله نیاز به پرسنل کارآزموده و آگاه است که بتوانند

تمام فاکتورهای مؤثر در روند انجام آزمایش را شناسایی کرده و آن‌ها را مدیریت کنند. علاوه بر پرسنل فنی تمامی عوامل مؤثر بر فرایند اجرای آزمایش اعم از دستگاه‌ها، وسایل، معرف‌ها و عوامل محیطی نیز بر نتایج آزمایش تأثیر می‌گذارند.

کنترل متغیرهای پس از انجام آزمایش: ۴۵٪ باقیمانده خطاهای آزمایشگاهی مربوط به این بخش است. مهم‌ترین خطایی که بعد از آزمایش روی می‌دهد تهیه گزارش از نتایج آزمایش است که بیشتر آن‌ها در بررسی نهایی توسط مسئول آزمایشگاه کشف می‌شود، اما برخی از آن‌ها نیز کشف‌نشده گزارش می‌گردد. مشکل دیگری که ممکن است در این قسمت به وجود بیاید دادن جواب آزمایش یک بیمار به بیمار دیگر است که برای رفع چنین خطاهایی استفاده از سیستم جوابدهی پیشرفته، آموزش پرسنل جوابدهی و دقت در چک نتایج بیماران تا حدودی می‌تواند پیشگیرانه باشد.

کنترل کیفی داخلی Internal Quality Control (IQC): WHO : هدف از کنترل کیفی داخلی را اطمینان از ثبات روزانه سیستم آزمایش تعریف می‌کند. کنترل کیفی داخلی در آزمایشگاه‌ها برای پایش روزانه دقت و صحت روش اندازه‌گیری به کار می‌رود.

انواع خطاها :

۱- **خطای اتفاقی(راندمی) یا نامنظم:** این خطا قابل پیشبینی نیست و در یک جهت خاص هم اتفاق نمیافتد. یعنی گاهی نتیجه بیش از مقدار واقعی و گاهی کمتر است. اعمال روشهای کنترل کیفی در جلوگیری از ایجاد این نوع خطاها چندان موثر نیست .

۲- **خطای سیستماتیک یا منظم:** این نوع خطا جهت دار است و همیشه در یک جهت (یعنی بالاتر یا پایینتر از مقدار واقعی) اتفاق میافتد. اینگونه خطاها خود به چند دسته تقسیم میشوند.

الف- **خطای پرسنل:** (bias Personal) مانند تفاوتی که دو فرد در خواندن سطح مایع در پیپت دارند.

ب- **خطای آزمایشگاه:** (bias Laboratory) اگر یک نمونه را برای انجام آزمایش به چند آزمایشگاه مختلف بدهیم ,اختلاف جوابها گاه قابل توجه و چشمگیر است. این اختلافات ناشی از تفاوت در استانداردها, معرفها,روشها, وسایل و ... میباشند.

ج- **خطای تجربی: (bias Experimental)** این خطا وابسته به روش, وسایل و ... است. مثلا یک روش نسبت به روش آزمایش دیگر بطور ثابت کمتر یا بیشتر میخواند.

د- **کهنه شدن (Aging)**: در اثر کهنه شدن معرفها, استانداردها یا سرم بیمار تغییراتی مانند تبخیر, کریستالیزاسیون, رشد میکروبها, حلشدن ظرف شیشهای در قلیا و اسیدی شدن بر اثر ترکیب با دی اکسیدکربن هوا ایجاد میشود که معمولا" موجب خطا خواهد شد.

رنگ آمیزی گرم

رنگ آمیزی گرم برای طبقه بندی باکتری ها بر اساس شکل، اندازه، مرفولوژی سلول و واکنش گرم آنها در آزمایشگاه میکروب شناسی پزشکی استفاده می شود. همچنین به عنوان آزمایش کلیدی و بسیار مهم برای تشخیص احتمالی عوامل عفونت و بررسی کیفیت نمونه های بالینی به کار می رود.

اصول:

این آزمایش در ابتدا در سال ۱۸۸۴ توسط Gram Christian پایه گذاری شد. در سال ۱۹۲۱ توسط Hucker برای باکتری شناسی عمومی اصلاح شد، که معرف ها پایداری بیشتری داشته و افتراق ارگانیسم ها بهتر انجام می شود. اصلاحات دیگری به صورت اختصاصی برای رنگ آمیزی بی هوازی ها (Kopeloff,s modification) و برای باسیل های گرم منفی که به صورت ضعیف رنگ آمیزی می شوند (Brucella.spp, Campylobacter.spp, Legionella. spp)با استفاده از کربول فوشین یا فوشین بازی انجام شده است. در واقع بسیاری از آزمایشگاه ها از این رنگ ها به طور معمول استفاده می کنند، به خصوص برای اسمیر مستقیم

نمونه های بالینی.

باکتری ها بر اساس تفاوت در ساختمان و ترکیب دیواره سلولی، گرم مثبت یا گرم منفی رنگ می گیرند. گونه های گرم مثبت دارای لایه ضخیم پپتیدوگلیکان و مقدار زیادی اسید تیکوئیک هستند و اگر دیواره سلولی آنها در اثر سن، عوامل ضد میکروبی یا دیگر فاکتورها آسیب ندیده باشد، به وسیله الکل، بی رنگ نشده و به رنگ بنفش تیره اولیه باقی می مانند. گونه های گرم منفی دارای تک لایه پپتیدوگلیکان هستند. پپتیدوگلیکان به یک غشاء خارجی دو لایه لیپوساکارید-فسفولیپید که به صورت پراکنده در آن پروتئین وجود دارد، متصل است. غشاء خارجی به وسیله الکل، تخریب شده، ترکیب کریستال ویوله و ید خارج شده و به وسیله رنگ دیگر جایگزین می شود.

این آزمایش علاوه بر واکنش رنگ آمیزی گرم، اندازه، شکل و آرایش سلول باکتریایی را بررسی می کند. این خصوصیات ممکن است تحت تأثیر عوامل متعددی شامل سن کشت، محیط کشت، شرایط محیط انکوباسیون، روش های رنگ آمیزی و وجود مواد مهارکننده قرار گیرد. برای تفسیر اسمیر تهیه شده از نمونه های بالینی نیز شرایط مشابه به کار می رود، اما عوامل دیگری مثل وجود انواع سلول های میزبان و فاگوسیتوز نیز مؤثر می باشند.

تهیه اسمیر از نمونه های بالینی:

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

۱- نمونه های بالینی عموماً شامل سواب حلق، سواب بینی، خلط بیماران مبتلا به فیبروز سیستیک، مایعات استریل بدن، مدفوع و پروتزهای مصنوعی می باشد. لام مستقیم برای نمونه های زخم، جراحات چشم، بافت های بدن و ترشحات خاص بسیار مفید است.

۲- کشت های مایع و کشت های خون برای تعیین رشد یا مرفولوژی باکتری ها

۳- کلنی های رشد کرده روی محیط کشت جامد

توجه: تهیه اسمیر از کشت های تازه (کمتر از ۲۴ ساعت) روی محیط های غیر مهار کننده و نمونه های بالینی تازه، صحیح ترین نتیجه را می دهند. زمانی که مرفولوژی مهم است (مانند استرپتوکک ها و باسیل های گرم مثبت) کشت های مایع ارجحیت دارد.

برای جمع آوری نمونه به دستورالعمل های مربوطه برای هر نوع نمونه مراجعه شود.

معمولاً اسمیر در آزمایشگاه تهیه می شود، اما زمانی که انتقال آن با تأخیر صورت گیرد، یا ماده نگهدارنده به نمونه اضافه شود، اسمیر را آماده نموده و لام را به آزمایشگاه ارسال نمایید.

معیارهای رد نمونه جهت رنگ آمیزی گرم:

رنگ آمیزی گرم برای اسمیر مستقیم مدفوع، خون یا حلق، ارزش کمی داشته و همچنین برای خلط بیماران مبتلا به فیبروز سیستیک کاربردی ندارد.

معرف ها، لوازم و تجهیزات:

معرف ها:

الف - کریستال ویوله ب - ید گرم ج- رنگ برها

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

- رنگ بر آهسته: اتانول ٪۹۵

- رنگ بر متوسط: استون ـ الکل: مخلوطی از اتانول ۹۵ ٪و استون (grade Reagent) از هر کدام ۵۰ ml در بطری شیشه ای قهوه ای رنگ ریخته، با یک سال تاریخ انقضاء برچسب زده و در دمای اتاق نگهداری کنید.

- رنگ بر سریع: استون

- توجه: اتانول و استون قابل اشتعال هستند.

د- **رنگ کننده ها:**

- سافرانین (جایگزین فوشین بازی) :

معرف ها ممکن است به صورت آماده مصرف تجاری، خریداری و یا در آزمایشگاه تهیه شوند. حجم زیادی از معرف ها را تهیه کرده و به اندازه نیاز، محلول کاری آماده نمایید. برای مصرف روزانه، معرف ها را در بطری های کوچک تر بریزید، اما برای دوری از ایجاد رسوب روی لام، بطری های کوچک تر کریستال ویوله و رنگ برها باید هر ماه جایگزین شوند.

توجه: نام معرف، تاریخ آماده سازی، تاریخ استفاده، شماره ساخت، تاریخ انقضاء و شرایط نگهداری روی بطری و در برگه کاری مشخص شود. اگر تاریخ استفاده به طور واضح روی بطری های ذخیره و در برگه های کاری کنترل ثبت شده باشد، به غیر از نام معرف نیازی به برچسب گذاری بطری های کاری با این مشخصات نیست.

لوازم:

قلم الماس - لام شیشه ای - نرمال سالین استریل - لوپ یا نیدل - لوازم برای دور ریختن پسماند های بیولوژیک مثل وسایل نوک تیز و برنده - پنس - چراغ گازی - روغن ایمرسیون

روشهای تهیه لام برای رنگ آمیزی گرم:

الف- تهیه اسمیر

از یک لایه ارگانیسم با غلظت کافی اما با تراکم کم به گونه ای که خصوصیت آرایش میکروارگانیسم مشخص باشد، برای تهیه اسمیر مستقیم استفاده کنید. ازلامهای شیشه ای نو و تمیز استفاده نمایید.

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

نمونه مایعات بدن، BAL و CSF

۱) ۵ یا ۶ قطره از نمونه به اضافه ۱ قطره فرمالین ۳۷ ٪ را در Centrifuge Slide Cytospin سانتریفوژ کنید.

- توجه: برای مایعات غلیظ بدن از Centrifuge Slide Cytospin استفاده کنید، که باعث افزایش حساسیت رنگ آمیزی گرم، کاهش زمان سانتریفوژ و آزمایش و در نهایت نتیجه سریع تر می گردد.

۲) به عنوان یک روش جایگزین، زمانی که نمونه غلیظ یا کدر باشد یا مقدار نمونه کافی نباشد، ۱ یا ۲ قطره نمونه را به وسیله پی پت پاستور مستقیماً روی لام قرار دهید. سپس جای قطره را با قلم الماس مشخص کنید. مایع را روی لام پخش نکنید. در صورت نیاز برای افزایش غلظت مایع مورد آزمایش، یک قطره دیگر از نمونه را روی همان اسمیر اضافه کنید.

ب- نمونه های ادرار

۱) ۱۰ میکرولیتر از ادرار که به خوبی مخلوط شده، بدون سانتریفوژ نمودن روی لام شیشه ای قرار دهید. سپس جای قطره را با قلم الماس مشخص کنید.

۲) قطره را پخش نکنید و اجازه دهید قطره در مجاورت هوا خشک شود.

ج - نمونه های فرستاده شده روی سواب ، ترجیحاً باید یک سواب جدا برای رنگ آمیزی گرم فرستاده شود.

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

۲) در مواردی که فقط یک سواب فرستاده شده، سواب را در مقدار کمی سالین یا محیط مایع قرار داده و درِ لولهرا بسته و آن را ورتکس کنید. سواب را به دیواره داخلی لوله فشرده، و آن را برای تهیه اسمیر استفاده کنید . باقیمانده سوسپانسیون را برای تلقیح محیط کشت استفاده کنید.

د- نمونه هایی که روی سواب فرستاده نمی شوند، شامل آسپیره ها، ترشحات، خلط و غیره

۱- نمونه را روی یک لام تمیز قرار دهید

- اگر نمونه داخل یک سرنگ ارسال شده است، ابتدا همه محیط های کشت را تلقیح کنید و سپس مقدار کمی از آن را روی لام قرار دهید.

توجه: به کارکنان مربوطه آموزش دهید که در مورد نمونه هایی که با سرنگ ارسال می شود، قبل از ارسال، سوزن را از روی سرنگ بردارند.

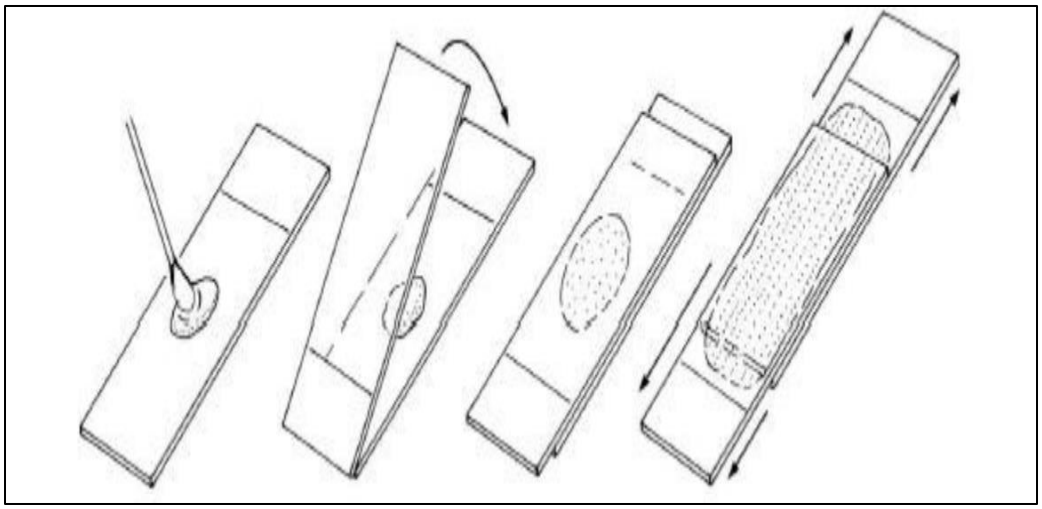
- با استفاده از یک اپلیکاتور چوبی یا پی پت یا لوپ سیمی استریل، قسمت های چرکی یا خونی رنگ نمونه را انتخاب کنید.

- نمونه را روی ناحیه بزرگی ازلام پهن کنید تا لایه نازکی ایجاد شود.

۲- برای نمونه های خیلی غلیظ یا چرکی

❖ برای تهیه آسان تر اسمیر، نمونه را در یک قطره سالین روی لام رقیق کنید.

❖ به عنوان یک روش جایگزین، نمونه را رویلامقرار داده، یکلامدیگر را روی آن قرار دهید.لامها را روی یکدیگر فشار داده و مطابق شکل زیرلام را با کشیدن در دو جهت مخالف، از یکدیگر جدا کنید. مواد اضافی روی لام را با دستمال آغشته به محلول ضد عفونی کننده، بردارید.



شکل ۱- روش تهیه گسترش روی لام

ج- مواد خشک یا نمونه های بالینی به مقدار خیلی کم

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

۲ - با استفاده از پی پت پاستور استریل، یک قطره از نمونه را رویلامقرار دهید.

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

کشت های مایع

روی هر اسلاید فقط یک اسمیر آماده کنید.

- با استفاده از پی پت پاستور استریل (یا سوزن خلأ، برای ظروفی مثل بطری های کشت خون، جهت جلوگیری از آلودگی با سوزن و سرنگ) ۱ تا ۲ قطره روی لام قرار دهید.
- قطره را پخش کنید تا لایه نازکی ایجاد شود.

کلنی از محیط های کشت جامد

یک قطره نرمال سالین روی لام قرار دهید.(آب مقطر ممکن است مرفولوژی طبیعی ارگانیسم های حساس را از بین ببرد). مقدار کمی از کلنی را با یک اپلیکاتور چوبی، نیدل سیمی یا لوپ استریل بردارید. به آرامی آن را در قطره نرمال سالین مخلوط کنید. اسمیر باید کمی کدر و یکنواخت باشد.

روشهای ثابت کردن گسترش

لام ها را در مجاورت هوا در هود ایمنی بیولوژیک یا روی گرم کننده اسلاید در دمای C° ۶۰ خشک کنید.

۱- خشک کردن با حرارت

اسلاید های خشک شده را دو یا سه بار از روی شعله بگذرانید یا برای ۵ تا ۱۰ ثانیه در مقابل کوره مخصوص نگه دارید. برای جلوگیری از تغییر شکل سلول ها، از حرارت زیاد اجتناب نمایید. سپس بگذاریدلام قبل از رنگ آمیزی خنک شود.

۲- **به عنوان روش جایگزین لام را با متانول فیکس کنید**. متانول مانع از لیز RBC ها می شود. از تخریب سلول های میزبان جلوگیری می کند، زمینه واضح تر می شود و مانع از شسته شدن نمونه های مایع می شود.

روی یک اسمیر خشک شده، چند قطره متانول به مدت یک دقیقه بریزید. متانول باقیمانده را بدون آبکشی از لام دور بریزید و اجازه دهید تا لام در مجاورت هوا خشک شود.

روش انجام رنگ آمیزی گرم

روشHucker

۱- اسمیر فیکس شده را با محلول کریستال ویوله بپوشانید. اجازه دهید رنگ به مدت ۳۰ ثانیه باقی بماند.

۲- کریستال ویوله را دور بریزید ولام را به آرامی با آب شیر آبکشی کنید.

توجه: آبکشی زیاد در این مرحله می تواند باعث شسته شدن کریستال ویوله از سلول های گرم مثبت شود.

۳- آب اضافه را با محلول ید، شسته و سپس لام را با محلول ید بپوشانید. اجازه دهید ید به مدت ۳۰ ثانیه باقی بماند.

۴- ید را دور بریزید و لام را به آرامی با آب شیر آبکشی کنید.

۵- در حالی که را به صورت زاویه دار (کج) نگه داشته اید، استون- الکل را روی اسمیر بریزید. زمانی که رنگ خارج شده از روی لام کمرنگ شد، این مرحله را متوقف کنید. زمان رنگ بری را بر اساس ضخامت اسمیر و نوع رنگ مورد استفاده تنظیم کنید.

۶- لام را با آب شیر آبکشی کنید.

۷- لام را با سافرانین بپوشانید و اجازه دهید حداقل۳۰ ثانیه و اگر از رنگ های فوشین استفاده می شود، یک دقیقه یا بیشتر روی لام بماند.

۸- آب اضافی را خارج کرده ولام را به صورت عمودی قرار دهید تا در مجاورت هوا خشک شود یا از خشک کننده تجاری استفاده نمایید.

توجه: رنگ ها، آب یا رنگ برها را مستقیماً روی اسمیر نریزید. قطره های معرف را نزدیک انتهای لام ریخته و اجازه دهید معرف روی سطح اسمیر را بپوشاند سپس می توان لام رنگ شده با میکروسکوپی بررسی کرد. و لام را ازنظر رنگ گرم و مرفولوژی و شکل آنها زیر عدسی شئی ۱۰۰ بررسی کنید.

باکتریها ی گرم مثبت به رنگ بنفش تیره و باکتریهای گرم منفی: صورتی یا قرمز دیده می شوند.

روشKopeloff

این روش برای مشاهده و افتراق بهتر باکتری های بی هوازی پیشنهاد می شود که ممکن است با روش Hucker به آسانی و خیلی زیاد تحت تأثیر رنگ بر، رنگ خود را از دست داده و کمرنگ رنگ بگیرند. این روش همچنین برای اسمیرهای واژن در تشخیص واژینوزیس باکتریایی پیشنهاد می شود. در این روش از کربول فوشین یا فوشین بازی استفاده می شود.

کنترل کیفی در رنگ آمیزی گرم:

الف- معرف ها را از نظر ظاهری، به طور روزانه بررسی کنید.

۱. اگر کریستال ویوله رسوب کند یا ته نشین شود، قبل از استفاده آن را صاف کنیدحتی زمانی که معرف ها به صورت تجاری خریداری می شوند.

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

۲ -تبخیر شدن مواد ممکن است کارایی و تأثیر معرف ها را دگرگون کند. اگر معرف های کاری را حداقل به صورت ماهانه دور بریزید تا استفاده مکرر آنها محدود شود.

توجه: رنگ ها می توانند آلوده شوند. وقتی مشکوک می شوید، باید از سری ساخت جدید معرف استفاده کنید.

ب- قبل از استفاده از هر سری ساخت جدید هر رنگ و معرف رنگ بر و بعد از آن حداقل به صورت هفتگی با یک میکروارگانیسم گرم مثبت و یک گرم منفی آزمایش کنید. کارکنان آزمایشگاه که رنگ آمیزی گرم را به دفعات کم انجام می دهند، باید به صورت روزانه یا با هر بار آزمایش نمونه بیمار، با یک کنترل مثبت و یک کنترل منفی آزمایش کنند.

۱- سوسپانسیونی با کدورت کم از(ATCC 25922) Escherichia coli و Staphylococcus aureus(ATCC 25923) در محیط مایع تهیه کنید.

۲. دو قطره از سوسپانسیون راروی دو لام جداگانه ریخته و دو اسمیر تهیه نمایید.

۳. آنها را در متانول فیکس کرده و در C° ۲۰- نگهداری کنید.

۴. مطابق روش رنگ آمیزی گرم، رنگ آمیزی نمایید.

نتایج مورد انتظار:

Escherichia coli (ATCC 25922) باسیل گرم منفی: صورتی

Staphylococcus aureus (ATCC 25923) کوکسی گرم مثبت: بنفش پررنگ

به طور جایگزین، از بین دندان ها با یک اپلیکاتور چوبی نمونه گیری کرده و در انتهایلامی که برای نمونه استفاده شده است، قرار دهید. این یک روش کنترل in-Built می باشد که شامل سویه های گرم مثبت و گرم منفی است.

وقتی که اسمیرهای رنگ شده کیفیت خوبی نداشته باشند، تفسیر رنگ ها مشکل باشد، یا تفسیر آنها صحیح نباشـد ، بایداقدام اصلاحی انجام گیرد.

برخی عوامل رایجی که موجب تهیه اسلاید رنگ آمیزی گرم نامناسب می گردند:

۱ - استفاده ازلامهای شیشه ای که تمیز نباشند.

۲- اگر گسترش ضخیم باشد هنگام مرحله بی رنگ شدن ، ممکن است مانند یک گسترش معمولی رنگ نشود و این مسئله باعث خطا در تشخیص شما در گرم منفی یا مثبت بودن باکتری خواهد شد.

۳ - حرارت دادن زیاد اسمیر، زمانی که برای فیکس کردن از روش حرارت استفاده می شود حرارت بیش از اندازه ممکن است موجب پاره شدن دیواره سلولی باکتری شده و باکتری گرم مثبت رنگ اولیه (کریستال ویوله) راهنگام رنگ بری از دست بدهد و رنگ ثانویه را جذب نماید و در نتیجه باکتری گرم مثبت ، بصورت گرم منفی دیده می شود.

۴ -آبکشی زیاد در طی انجام رنگ آمیزی، به خصوص اگر اسمیر به طور صحیح فیکس نشده باشد.

۵ -وجود رسوب در معرف ها

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

د- برای اطمینان از صحت تفسیر، برنامه ای برای مرور گزارش های رنگ آمیزی گرم تهیه کنید.

۱- رنگ آمیزی های گرم انتخابی به وسیله سوپروایزر، برای تعیین نیازهـای آمو زشـی و همچنـین کمـک بـه یکپارچگی اطلاعات بالینی مربوطه مرور ارزیابی شود.

۲- نتایج کشت نهایی را با گزارش های رنگ آمیزی گرم مقایسه کنید. مرفولوژی های گزارش شده در رنگ آمیزی گرم را که در کشت جدا نشده اند، بررسی کنید. همچنین زمانی که به تعداد ۴-۳ میکروارگانیسم از کشت

جدا شده، اما در رنگ آمیزی گرم میکروارگانیسمی مشاهده نشده است، هم رنگ آمیزی و هم کشت را بررسی نمایید.

توجه: تعداد قابل توجهی از ارگانیسم های تشخیص داده شده روی اسمیر، از کشت جدا می شوند. بنابراین تفاوت ها باید برای از بین بردن خطاهای ناشی از بررسی اسمیر یا به عنوان نشانه هایی برای به کارگیری سایر روش های کشت (مانند کشت بی هوازی، کشت برای قارا یا کشت باسیل های اسـ ید فست بررسی شوند.

۳- مجموعه ای ازلامهای مرجع برای آموزش تهیه نمایید.

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

محدودیت ها در رنگ آمیزی گرم :

- نتایج رنگ آمیزی گرم را در ارتباط با سایر یافته های بالینی و آزمایشگاهی استفاده کنید. از روش های اضافی دیگر(مثل رنگ آمیزی های خاص، استفاده از محیط های انتخابی و غیره) برای تأیید اطلاعات بدست آمده از اسمیرهای رنگ شده گرم استفاده نمایید.

- به کارگیری دقیق روش انجام آزمایش و معیارهای تفسیر برای کسب نتایج صحیح نیاز می باشد. صحت، ارتباط زیادی با آموزش و مهارت شخص مشاهده کنندهلامدارد .

- روش های رنگ آمیزی دیگر برای نمونه های بالینی چرکی که هیچ ارگانیسمی در روش رنگ آمیزی گرم مشاهده نشده، پیشنهاد می شود.

- مشاهده میکروارگانیسم درلام گرم برای کشت های منفی ممکن است ناشی از آلودگی معرف ها و لوازم،وجود عوامل ضد میکروبی یا عدم رشد ارگانیسم ها تحت شرایط کشت معمول(محیط کشت، اتمسفر و غیره) باشد.

- نتایج گرم کاذب ممکن است مربوط به مقدار ناکافی نمونه یا تأخیر در ارسال آن باشد.

- تهیه اسمیر از کشت های تازه کمتر از ۲۴ ساعت (روی محیط های غیر مهار کننده و نمونه های بالینی تازه، صحیح ترین نتیجه را می دهند. زمانی که مرفولوژی مهم است (مانند استرپتوکک ها و باسیل های گرم مثبت)کشت های مایع ارجحیت دارد.

ملاحظات ایمنی در رنگ آمیزی گرم:

- ید ماده خطرناکی است. از استنشاق، خوردن و تماس آن با پوست پرهیز شود.
- اتانول و استون قابل اشتعال می باشند.
- برای آماده سازی اسمیر از دستکش لاتکس و سایر وسایل محافظ مناسب با احتیاطات عمومی استفاده نمایید
- به کارکنان مربوطه آموزش دهید که در مورد نمونه هایی که با سرنگ ارسال می شود، قبل از ارسال، سوزن را از روی سرنگ بردارند.
- هنگام تهیه اسمیر، هیچگاه قطره را به شدت مخلوط نکنید، تا از ایجاد ذرات معلق در هوا (آئروسل) جلوگیری شود.
- اسلایدها ممکن است کیسه های خطر زیستی را سوراخ کنند، آنها را به عنوان مواد زائد بیولوژیک " تیز و برنده" در نظر گرفته و جهت دفع از ظروف خطر زیستی (safety box) مطابق با دستورالعمل دفع پسماند آزمایشگاه مرجع سلامت استفاده کنید.

با این حال همهٔ باکتری‌ها را نمی‌توان با رنگ‌آمیزی گرم مشاهده نمود. فهرستی از باکتری‌های مهم از نظر پزشکی که با رنگ‌آمیزی گرم قابل مشاهده نیستند در جدول زیر آمده‌است.

جدول ۱- باکتری‌های مهم از نظر پزشکی که با رنگ‌آمیزی گرم قابل مشاهده نیستند.

نام باکتری	علّت عدم مشاهده باکتری با روش گرم	روش رنگ‌آمیزی جایگزین
مایکوباکتریوم‌ها شامل مایکوباکتریوم توبرکلوزیس	وجود مقدار زیادی چربی در دیواره سلولی که از نفوذ رنگ جلوگیری می‌کند	رنگ‌آمیزی اسید فاست
ترپونما پالیدوم	نازکتر از آن است که دیده شود	میکروسکوپ زمینه تاریک یا آنتی‌بادی فلوئورسنت
مایکوپلاسما پنومونیه	نبود دیواره سلولی	روشی وجود ندارد
لژیونلا پنومونیه	عدم دریافت رنگ قرمز	طولانی نمودن مرحله افزودن سافرانین در رنگ‌آمیزی گرم
کلامیدیا از جمله کلامیدیا تراکوماتیس	وجود ارگانیسم‌های درون سلولی، کوچکی سلول	
ریکتزیا	وجود ارگانیسم‌های درون سلولی، کوچکی سلول	رنگ‌آمیزی گیمسا یا سایر رنگ‌آمیزی‌های بافتی

کنترل کیفی سایر رنگ آمیزی ها

جدول ۲- کنترل کیفی سایر رنگ ها

روش رنگ آمیزی	ارگانیسم کنترل	شماره ATCC	نتیجه مورد انتظار	زمان کنترل کیفی
Acid -Fast Fast (Ziehl – Neelsen)	M.Tuberculosis or BCG E.Coli	25177 25922	باسیل صورتی-قرمز باسیل آبی	هر سری ساخت و سپس هر روز کاری
Methylen Blue	C. diphtheriae or Diphtheroid E.coli	----- 25922	دانه های متاکروماتیک آبی رنگ	هر سری ساخت و سپس هر روز کاری

آزمایش اکسیداز

هدف: افتراق انتروباکتریاسه ها (اکسیداز منفی) از گونه های آئروموناس (اکسیداز مثبت)، پلزیوموناس شیگلوئیدس (اکسیداز مثبت) و اکثر گونه های ویبریو (اکسیداز مثبت)

- افتراق موراکسلا(اکسیداز مثبت) و نیسریا(اکسیداز مثبت) از اسینتوباکتر(منفی)
- گونه های کمپیلوباکتر اکسیداز مثبت هستند.
- به عنوان تست تشخیصی مهم برای تشخیص باکتری های میله ای گرم منفی که عضو خانواده انتروباکتریاسه نیستند، به کار می رود.

اصول:

آنزیم باکتریایی داخل سلولی سیتوکروم اکسیداز، در حضور اکسیژن محیط، معرف فنیلن دی آمین(پذیرنده الکترون) را به فنل اندول بنفش تیره اکسید می کند .این آزمایش برای تشخیص اولیه باکتری های گرم منفی مفید واقع می شود.

روش انجام آزمایش

۱- مربع کوچکی از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ را در ظرف پتری قرار دهید و با یک یا دو قطره از معرف اکسیداز کواکس آماده شده مرطوب نمایید، یا نوار یا دیسک اکسیداز آماده مصرف را در ظرف پتری قرار دهید.

توجه : مطابق دستورالعمل سازنده عمل کنید .ممکن است شاید مطابق دستورالعمل بعضی سازندگان نیاز به مرطوب نمودن دیسک باشد.

۲- از یک کلنی تک و خالص با استفاده از اپلیکاتور برداشته و بر روی کاغذ صافی آغشته به معرف کواکس پخش کنید . در صورت بودن مثبت آزمایش تغییر رنگ کاغذ به بنفش را مشاهده خواهید نمود.

۳- برای باکتری های سخت رشد، کلنی را با سوآب پنبه ای سفید برداشته، سوآب را بر روی کاغذ صافی آغشته به معرف بکشید .تغییر رنگ به بنفش را بر روی س تفسیر آزمایش

- واکنش مثبت : ایجاد رنگ آبی تیره تا بنفش در مدت ۱۰ ثانیه
- واکنش تاخیری: ایجاد رنگ آبی تیره تا بنفش در مدت ۱۰-۶۰ ثانیه (باید تست های بیشتری انجام شود، زیرا احتمالا" متعلق به خانواده انتروباکتریاسه نمی باشد).

واکنش منفی : عدم تغییر رنگ معرف یا ایجاد صورتی کمرنگ در مدت ۱۰ ثانیه

کنترل کیفی

- درهر سری ساخت جدید پودر معرف یا دیسک آماده مصرف تجاری
- در هر روزی کاری
- هنگامیکه محلول معرف برنگ بنفش کم رنگ تغییر کند یا دیسک کاغذی در حال تیره شدن است، از آن استفاده نکنید.

✓ سویه کنترل مثبت: Pseudomonasa aeruginosa ATCC 27853

✓ سویه کنترل منفی : Escherichia coli ATCC 25922

محدودیت ها

برای جلوگیری از ایجاد نتایج مثبت کاذب:

- از لوپ استیل یا نیکروم برای برداشتن کلنی استفاده نکنید .زیرا در اثر استریل کردن لوپ با شعله، اکسیداسیون سطحی ایجاد شده و نتیجه مثبت کاذب بدست می آید.
- از ارگانیسم هایی که بر روی محیط های حاوی گلوکز یا رنگ(مانند MAC یا EMB) رشد کرده اند، استفاده نکنید.
- کشت های مخلوط نیسریا و سودوموناس ممکن است نتایج منفی کاذب دهند .زیرا سودوموناس یک سوبسترای مهاری تولید می کند که با تولید اکسیداز توسط نیسریا تداخل ایجاد می نماید.
- رعایت زمان قرائت واکنش برای انجام دقیق تست بسیار مهم است.

آزمایش کاتالاز

هدف:

۱- افتراق استافیلوکوک ها و میکروکوک ها(کاتالاز مثبت) از استرپتوکوک ها و انتروکوک ها (کاتالاز منفی)

۲- افتراق کلستریدیوم ها (کاتالازمنفی) از باسیلوس ها (کاتالاز مثبت)

۳- افتراق لیستریا مونوسیتوژنز و کورینه باکتریوم ها(کاتالاز مثبت) از استرپتوکوک گروهB (کاتالاز منفی)

۴- افتراق باسیل های گرم منفی سخت رشد از یکدیگر

اصول:

باکتری هایی که آنزیم کاتالاز تولید می کنند، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) را به آب و گاز اکسیژن هیدرولیز می کنند و منجر به آزاد شدن حباب های گاز می شود . پراکسید هیدروژن یکی از محصولات نهایی اکسیداسیون در متابولیسم کربوهیدرات است . این آزمایش در تشخیص اولیه اغلب باکتری ها مفید واقع می شود.

نمونه های بالینی :

کلنی های خالص و تازه(کشت ۱۸-۲۴ ساعته) از باکتری رشد کرده روی محیط آگار مناسب ، برای باکتری های بیهوازی، کلنی ها را به مدت ۳۰ دقیقه قبل از آزمایش در معرض هوا قرار دهید.

ابزار و معرف ها:

معرف پراکسید هیدروژن ، اپلیکاتور چوبی یا شیشه ای یا لوپ پلاتینی، لام شیشه ای ، سویه های کنترل مثبت و منفی

- معرف پراکسید هیدروژن ۳ % برای آزمایش باکتری های معمول

- معرف پراکسید هیدروژن% ۳۰ برای نیسریاها(هشدار :آب اکسیژنه% ۳۰ به شدت برای پوست سوزاننده است .در صورت تماس با پوست، فورا" با اتیل الکل %۷۰ ، و نه آب، شستشو دهید).
- معرف پراکسید هیدروژن% ۱۵ برای میکروارگانیسم های بی هوازی

توجه ۱ - معرف% ۳۰ را می توان برای تمام آزمون ها استفاده کرد، اما خطرناک تر است.

توجه ۲ - معرف ها باید در شیشه های تیره رنگ، دور از نور و در یخچال نگهداری شوند.

روش انجام آزمایش:

۱- با یک اپلیکاتور از مرکز یک کلنی ۱۸-۲۴ ساعته به سطح یک لام شیشه ای تمیز منتقل کنید .اطمینان حاصل نمایید که کلنی روی لام با چشم قابل رویت است .اگر کلنی روی پلیت بلاد آگار باشد، دقت شود از خون برداشته نشود.

۲- بلافاصله یک قطره معرف را به کلنی روی لام اضافه کنید و فورا ا یجاد حباب روی لام را بررسی نمایید . نتیجه را به صورت مثبت یا منفی گزارش کنید .برای مشاهده بهتر حباب ها لام را روی زمینه سیاه نگه دارید.

۳- لام را پس از انجام آزمایش داخل Safty Box بیندازید.

تفسیر:

واکنش مثبت : ظاهر شدن فوری حباب های ماندگار یا حالت جوش زدن نشان دهنده نتیجه مثبت آزمایش است.

واکنش ضعیف : ایجاد یک یا دو حباب

واکنش منفی : عدم ایجاد حباب یا ظاهر شدن چند حباب بعد از ۲۰ ثانیه(بعضی از باکتری ها دارای آنزیمی غیر از کاتالاز هستند که پراکسید هیدروژن را تجزیه کرده که تعداد کمی حباب ریز ایجاد می شود).

کنترل کیفی:

معرف پراکسید هیدورژن باید هر روز یا قبل از آزمایش نمودن باکتری مجهول با سویه های کنترل مثبت و منفی آزمایش شود.

- ✓ سویه کنترل مثبت : Staphylococcus aureus s ATCC 25923
- ✓ سویه کنترل منفی: Streptococcus pyogenes ATCC 19615

محدودیت ها:

- گلبول های قرمز حاوی کاتالاز هستند .برای اجتناب از جواب های مثبت کاذب نباید کلنی ها را از محیط آگار خون دار برداشت .اگر کلنی به آسانی برداشت نمی شود یا خوب رشد نمی کند، آزمایش را از روی محیط شکلات آگار تکرار نمایید ، که در آزمایش مداخله ایجاد نمی کند .اما از آنجائی که اکثر نمونه های کلینیکی روی محیط های خون دار کشت داده می شوند، برای انجام تست می توان از قله کلنی ها بدون تماس با محیط برداشت تا واکنش مثبت کاذب ایجاد نشود.
- از محیط مولر هینتون آگار استفاده نکنید.
- از آنجائی که بعضی از باکتری ها دارای آنزیم هایی غیر از کاتالاز هستند که پراکسید هیدروژن را تجزیه می نمایند، ایجاد حباب های ریز به تعداد کم بعد از ۲۰ثانیه مثبت در نظر گرفته نمی شود.
- بهتر است از یک اپلیکاتور چوبی، لوپ پلاتینی یا پلاستیکی برای برداشتن کلنی استفاده شود .استفاده از لوپ آهنی واکنش مثبت کاذب ایجاد می کند.
- چون این آنزیم فقط در کشت های زنده وجود دارد ، کشت های بیشتز از ۲۴ ساعت برای آزمایش مناسب نیستند .کشت های کهنه ممکن است سبب نتیجه منفی کاذب شوند.

- ترتیب اضافه نمودن معرف به کلنی را برعکس نکنید، زیرا می تواند نتایج منفی کاذب رخ دهد.
- معرف وکلنی ها را مخلوط نکنید

تهیه و کنترل کیفیت محیط های کشت

محیط های کشت نقش اساسی را در آزمایشگاه میکروب شناسی ایفا می کنند و به طور گسترده ای جهت جدا سازی، تعیین هویت و آنتی بیوگرام میکروارگانیسم های بیماری زا به کار می روند. بسیاری از آزمایشگاه ها به طور روتین محیط های کشت مورد نیاز برای مصارف تشخیصی و تحقیقاتی را خودشان تهیه می نمایند. با این همه برای اطمینان از این که محیط های کشت، کیفیت خوب و نتایج مطلوبی دارند، باید روش های کنترل کیفی مناسبی به کار گرفته شود . برای رسیدن به این هدف باید در تهیه و مصرف محیط های کشت معیارهای ذیل در نظر گرفته شود

آب:

کیفیت محیط های کشت به طور مستقیم به کیفیت مواد خام مورد استفاده در تهیه آنها بستگی دارد. آب یکی از مهمترین موادی است که در تهیه محیط های کشت به کار می رود. سه معیار مهم برای آب مورد استفاده در تهیه محیط های کشت (آب نوع III) شامل عدم وجود یون های مس، قدرت هدایت الکتریکی و pH می باشد. در شرایط ایده ال یون های مس به دلیل خا صیت مهارکنندگی برای اغلب میکروارگانیسم ها، نباید در آب مورد استفاده برای تهیه محیط های کشت وجود داشته باشد. قدرت هدایت الکتریکی آب باید حدود ۱۰ میکروزیمنس بر سانتی متر با شد و همچنین pH آب مورد استفاده بهتر ا ست کمی اسیدی باشد، ولی نباید کمتر از ۵ و بیشتر از ۸ باشد.

توزین محیط کشت و افزودن آب:

طبق دستورالعمل تهیه محیط کشت که بر روی ظرف آن نصب گردیده است، مقدار مناسبی از پودر محیط کشت را با دقت وزن نمایید. ظرف محیط کشت را دور از جریان هوا و رطوبت باز کنید. از استنشاق پودرها به خصوص آنهایی که دارای مواد سمی هستند و تماس طولانی مدت آنها با پوست اجتناب کنید. پودر را به سرعت، به دقت و بدون ایجاد غبار وزن کنید. هرچه زودتر درِ ظرف را ببندید . نصف حجم آب مورد نیاز را داخل ظرف بریزید. سپس مقدار وزن شده محیط کشت را به آن اضافه نمایید. برای چند دقیقه به تندی تکان دهید. باقیمانده آب را به دیواره داخلی ظرف بریزید تا ذرات محیط کشت چسبیده به دیواره نیز وارد محلول شوند. این مرحله بسیار مهم است، چون پودر خشک محیط کشت در بالای سطح آب، ممکن است در اتوکلاو استریل نشود و منبع آلودگی گردد .

حل کردن محیط کشت:

محیط های کشت بدون آگار، معمولا با تکان دادن آهسته و ملایم حل خواهند شد. اما محیط های کشت حاوی آگار باید قبل از حرارت دادن به مدت چند دقیقه با آب مخلوط شوند. سپس حرارت داده شوند تا آگار قبل از اتوکلاو کردن، حل شود. محیط های کشت را بجوشانید بدون آنکه بسوزند. محیط های کشتی که نباید اتوکلاو شوند، بعد از این مقدار حرارت دادن، برای تقسیم داخل پلیت ها یا ظروف دیگر آماده خواهند بود. اکثر محیط های کشت به استریلیزاسیون نهایی (در دمای $121^{\circ}C$ به مدت ۱۵ دقیقه) نیاز خواهند داشت.

توزیع :

محیط کشت را در ظرفی مناسب با حجم ۲ تا ۳ برابر حجم محیط کشت بریزید تا بتوانید آن را به خوبی تکان دهید و مخلوط کنید .

استریلیزاسیون محیط کشت:

بعضی از محیط های کشت به استریلیزاسیون با اتوکلاو احتیاجی نداشته و با جوشاندن قابل استفاده می شوند که دستور ساخت آنها بر روی برچسب ظرف محیط کشت قید گردیده است .استریلیزاسیون سایر محیط های کشت توسط حرارت مرطوب(اتوکلاو) یا صافی غشایی(فیلتراسیون) انجام می گردد که این موارد نیز بر روی برچسب ظرف محیط کشت قید گردیده است.

الف) استریلیزاسیون با حرارت مرطوب:

استریلیزاسیون محیط کشت تا حجم یک لیتر، در اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای $121^{\circ}C$ (فشار ۱/۲ کیلوگرم بر سانتیمتر مربع) انجام می گیرد. برای حجم های بیشتر از یک لیتر باید چرخه استریلیزاسیون را بطور مناسب تغییر داد. اما چون اکثر مشکلات در استریلیزاسیون محیط های کشت وقتی رخ میدهد که مقادیر بیشتر از دو لیتر محیط کشت باید استریل شود، لذا توصیه می شود که مقادیر زیاد محیط کشت را در حجم های کوچکتر تقسیم نمایید.

کنترل کیفی اتوکلاو، کنترل دما و فشار آن باید به طور مداوم انجام گردد .برای کنترل اتوکلاو از اندیکاتورهای شیمیایی کلاس۶ (TST) در هرچرخه کاری استفاده می شود. از اندیکاتورهای بیولوژیکی جهت پایش عملکرد اتوکلاو حداقل به طور هفتگی یا فواصل بیشتر، متناسب با حجم کاری اتوکلاو استفاده می شود که ویال حاوی اسپور*Geobacillus Stearothermophilus* ATCC 7953 است و به صورت تجاری در دسترس می باشد که در قسمت مربوطه بحث خواهد شد.

ب) استریلیزاسیون با صافی غشایی:

از صافی غشایی برای استریل کردن محیط های کشت و ترکیبات حساس به حرارت استفاده می شود. استریلیزاسیون بوسیله صافی غشایی تحت شرایط خلاء یا افزایش فشار انجام می پذیرد. از غشاء ها و صافیهای با

قطر منفذ ۰/۲۲ یا ۰/۴۵ میکرومتر استفاده نمایید. این فیلترها باید قبل از استفاده، در اتوکلاو استریل شوند. در مورد غشاء ها و صافیهایی که در بسته بندیهای استریل به فروش می رسند، به دستورالعمل سازنده مراجعه نمایید. قسمت های مختلف دستگاه صافی را با صافی یا بدون صافی در اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه در دمای $121^{\circ}C$ استریل نمایید.

آماده سازی جهت مصرف:

بعد از استریلیزاسیون، اجازه دهید دمای محیط کشت به حدود $50^{\circ}C$ برسد، سپس با رعایت شرایط آسپتیک در ظروف نهایی تقسیم نمایید. هیچ وقت محیط کشت را در دمای بالاتر از $50^{\circ}C$ تقسیم نکنید. مکمل های حساس به گرما و حرارت باید بعد از این که دمای محیط کشت به حدود $50^{\circ}C$ رسید، به آن اضافه شوند. اجازه دهید دمای مکمل (ساپلمنت) استریل قبل از این که به محیط کشت اضافه شود، به دمای اتاق برسد. سپس مکمل را با رعایت شرایط آسپتیک به محیط کشت اضافه نموده، خوب مخلوط کنید و در ظروف نهایی که از قبل استریل شده اند، تقسیم نمایید.

اندازه گیری و تنظیم pH محیط های کشت:

محیط های کشت دهیدراته اگر به طور مناسب تهیه شوند، نیازی به تنظیم pH ندارند pH نهایی محصول استریل شده را می توان روی پلیت یا بطری اندازه گیری کرد، اما باید آنها را بعد از سنجش pH دور ریخت . بنابراین بعد از استریل شدن و خنک شدن محیط کشت تا دمای $25^{\circ}C$ ، مقدار pH را در حد مورد نظر (۰/۲ ±)تنظیم نمایید.

PHرا به یکی از روش های ذیل کنترل نمایید:

روش اول- روش خیساندن(Macerate) :آگار یک پلیت را در ظرفی کوچک حاوی مقدار کمی آب مقطر(۷ml –۵) له کرده و به مدت ۱۰ دقیقه بخیسانید، سپس نوک الکترود pH متر را در این مخلوط غوطه ور کنید.

روش دوم- نوک الکترود pH متر را در داخل ارلن کوچکی قرار دهید. مقدار اندکی از آگار مذاب را به داخل ارلن ریخته، پس از سفت شدن آگار، pH را اندازه گیری نمایید.

روش سوم- از الکترودهای سطحی استفاده نمایید.

پارامترهای فیزیکی:

محیط کشت های تهیه شده باید قبل از استفاده، از لحاظ فیزیکی و ظاهری نیز بررسی شوند. معیارهای ظاهری قابل بررسی شامل وجود حباب، حفره، ناصافی سطح محیط، ترک خوردگی، یخ زدگی می باشد. ضخامت محیط نیز اهمیت دارد. ضخامت محیط های کشت پلیتی نباید کمتر از ۳ میلی متر باشد.

نگهداری محیط های کشت تهیه شده:

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

موارد استثناء: تایوگلیکولات براث، اندول نیترات براث و SIM فقط به مدت یک ماه قابل نگهداری می باشند. محیط های CTA Medium و OF Medium حاوی کربوهیدرات و مولرهینتون براث فقط به مدت ۶ هفته قابل نگهداری می باشند.

جدول ۳- علل اشکالات رایج در محیط های کشت

اشکال	علل ممکن
نرم بودن آگار	حرارت بیش از حد، pH پایین که موجب هیدرولیز اسید در محیط کشت می گردد، توزین یا مخلوط نکردن درست، حل نشدن کامل آگار، حجم نادرست آب، رقیق سازی زیاد با تلقیح مایع یا مکمل ها و ذخیره سازی طولانی در دمای ۵۰ ºC
pH نامناسب	استفاده از شیشه های قلیایی، آب ناخالص، حرارت بیش از حد، آلودگی شیمیائی، اندازه گیری pH در دمای نامناسب، استفاده از pH متر غیرکالیبره، استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده، ذخیره سازی نادرست محیط کشت دهیدراته و کیفیت پایین آب یا ظروف
رنگ یا تیرگی غیرطبیعی	ناخالص بودن آب، استفاده از شیشه آلات کثیف، استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده، حرارت دادن بیش از حد، pH نامناسب، حل نشدن کامل محیط کشت و ذخیره سازی طولانی در دمای ۵۰ ºC

سمیت (Toxicity)	حرارت دادن بیش از حد (سوزاندن محیط)، استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده، قرارگیری در معرض مستقیم نور خورشید و حجم نادرست مکمل اضافه شده
رشد ضعیف ارگانیسم یا داشتن خاصیت ضعیف انتخابی و یا افتراقی	استفاده از آب و یا شیشه آلات آلوده، استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده، توزین یا مخلوط نکردن درست، حرارت بیش از حد، ذخیره سازی طولانی محیط کشت، خشک شدن، تیرگی و تغییر pH محیط کشت
لخته یا کواگوله شدن محیط کشت	حرارت بیش از حد محیط در هنگام افزودن مکمل به آن
رگه رگه شدن محیط کشت	رگه رگه سیاه: نیم سوز شدن آگار رگه رگه روشن: سرد شدن آگار موقع افزودن مکمل
ایجاد رسوب یا کدورت	pH نامناسب، ناخالص بودن آب، استفاده از شیشه آلات کثیف، حل نشدن محیط کشت، کیفیت پایین آب یا ظروف، حرارت بیش از حد و ذخیره سازی طولانی در دمای ۵۰ ºC

ارزیابی کیفیت محیط های کشت:

هر آزمایشگاه باید از کیفیت هر شماره ساخت از محیط های آماده مصرف تجاری و یا محیط های دهیدراته، قبل از استفاده اطمینان حاصل نماید .الزامات عمومی کنترل کیفیت محیط های کشت عبارتند از:

الف) ثبت اطلاعات محیط های کشت

۱- محیط های آماده مصرف تجاری:

منبع تهیه آن، شماره ساخت، تاریخ انقضاء، تاریخ دریافت و تاریخ شروع به استفاده از آن را برای هر یک از انواع محیط ثبت کنید.

هر محیط را مطابق دستورالعمل سازنده نگهداری کنید(معمولا در$^{\circ}C$ ۸-۲)

۲- محیط های ساخته شده از پودر دهیدراته در آزمایشگاه:

مقدار محیط ساخته شده، منبع تهیه آن، شماره ساخت، روش استریل نمودن آن، تاریخ ساخت، pH ، تاریخ شروع به استفاده از آن، تاریخ انقضاء و نام فرد سازنده آن ثبت شود.

ب) بررسی مشخصات ظاهری:

محیط های کشت تهیه شده باید قبل از استفاده، از لحاظ فیزیکی و ظاهری نیز بررسی شوند:

- شکستگی یا آسیب دیدگی پلیت ها و لوله ها، جدا شدن آگار از جداره پلیت ها و لوله ها، یخ زدگی یا ذوب شدن آگار ، نا صاف پر شدن پلیت ها
- مقدار ناکافی آگار در پلیت ها(عمق کمتر از ۳ mm) و لوله ها(عمق و سطح ناکافی)؛
- وجود همولیز در محیط های حاوی خون

- تغییر در رنگ مورد انتظار برای هر محیط(احتمال اشکال در pH محیط)
- وجود حباب یا ناهمواری بیش از حد در سطح محیط؛رطوبت اضافی یا خشک شدن بیش از حد محیط؛
- آلودگی قابل مشاهده؛ وجود رسوب

کنترل کیفی محیط های کشت میکروبی:

اصطلاحات مربوط به سویه های میکروبی کنترل

- سویه کنترل (Control Strain): میکروارگانیسمی که برای ارزیابی عملکرد میکروبی محیط کشت استفاده می شود.

- سویه مرجع (Reference Strain): میکروارگانیسمی که حداقل تا سطح جنس و گونه شناسایی شده و بر اساس ویژگی ها و ترجیحاً منشا آن، فهرست بندی و تعریف شده است.

- ذخیره های مرجع (Reference Stocks): کشت های بدست آمده از پاساژ سویه مرجعی که از مراکز بین المللی تهیه شده است.

- ذخیره های کاری (Working Stocks): کشت مجددی که از کشت های ذخیره جهت کنترل کیفیت محیط های کشت استفاده می شود.

منبع سویه های کنترل کیفی:

همه سویه های کنترل که در جدول ۳ از آنها نام برده شده است، ATCC می باشند (American type culture collection). این سوشها، حداقل سوشهایی هستند که باید برای ارزیابی هر محیط کشت استفاده شوند. ارگانیسم های مورد استفاده برای اهداف کنترل کیفی می تواند از سویه های National collection باشد. سویه های دیگری نیز ممکن است توسط سازنده محیط کشت به کار رود که

شامل مجموعه ای از سویه های وحشی (Wild strain) یا بدست آمده از نمونه های بیمار می باشد که مختص هر آزمایشگاه بوده و برای انجام آزمایش های بیشتر به کار می روند.

روش انجام آزمون کنترل کیفیت محیط های کشت

تهیه سوسپانسیون میکروبی:

یک کشت از ارگانیسم کنترل کیفی روی پلیت بلادآگار تهیه کنید. بعد از انکوباسیون پلیت ۵-۳ کلنی ایزوله را در مقدار کمی تریپتیکیس سوی براث (TSB) استریل حل نمایید تا سوسپانسیون میکروبی حاصل شود و آن را برای چهار یا پنج ساعت انکوبه نمایید. سپس کدورت آن را با استاندارد نیم مک فارلند تنظیم کنید.

به جای این روش می توان مستقیماً از کلنی های ایزوله روی پلیت، سوسپانسیون میکروبی مطابق با کدورت نیم مک فارلند تهیه کرد. بدین ترتیب که ۵-۳ کلنی ایزوله روی پلیت ۲۴ ساعته را در ۵-۳ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل حل کرده و کدورت آن را با نیم مک فارلند تنظیم نمایید. با هر روشی که این سوسپانسیون میکروبی تهیه شود، باید کدورتی حاوی 10^{7}-10^{8}CFU/ml کلنی داشته باشد. (مطابق با استاندارد نیم مک فارلند).

بررسی آزمایش های عملکردی محیط کشت (Performance testing)

۱- آزمایش ظرفیت مغذی بودن (Nutritional activity) محیط های کشت پلیتی مانند بلاد آگار، نوترینت آگار، تریپتیک سوی آگار و...

سوسپانسیون اولیه را به نسبت ۱ به ۱۰۰ در نرمال سالین استریل رقیق نموده و مقدار µl ۱۰ یا ml ۰/۰۱ سوسپانسیون رقیق شده را به محیط کشت مورد آزمایش تلقیح کنید. تعداد کلنی های مورد انتظار در هر پلیت (CFU/plate) 10^{3}-10^{4} می باشد. برای اجتناب از رشد زیاد باکتری در بعضی از محیطهای کشت انتخابی ممکن است نیاز باشد که سوسپانسیون را ده بار رقیق تر تهیه نمایید.

۲- آزمایش ظرفیت مهارکنندگی محیط های کشت انتخابی پلیتی مانند مکانکی آگار، EMB آگار، XLD آگار و...

سوسپانسیون اولیه را به نسبت ۱ به ۱۰ در نرمال سالین استریل رقیق نموده و مقدار µl ۱۰ یا ml ۰/۰۱ سوسپانسیون رقیق شده را به محیط کشت مورد آزمایش تلقیح کنید. و به گونه ای کشت دهید که کلنی های ایزوله بدست آید. تعداد کلنی های مورد انتظار در هر پلیت (CFU/plate) $۱۰^{۴}$-$۱۰^{۵}$ می باشد. برای اجتناب از رشد زیاد باکتری در بعضی از محیطهای کشت انتخابی ممکن است نیاز باشد که سوسپانسیون ده بار رقیق تر تهیه شود.

۳- آزمایش محیط های کشت لوله ای

هر لوله باید با µl ۱۰ یا ml۰/۰۱ از سوسپانسیون اولیه تهیه شده مطابق با نیم مک فارلند (بدون رقیق سازی) تلقیح شود. گاهی ممکن است به تلقیح کمتر یا بیشتر نیاز باشد.

محیط مورد آزمون را بعد از تلقیح تحت شرایطی که در جدول ۲ آمده است، انکوبه نمایید. به طور نرمال زمان انکوباسیون، ۲۴-۱۸ ساعت یا ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ºC ۲±۳۵ می باشد. محیط شکلات آگار و سایر محیط های کشت برای جداسازی انتخابی گونه های نایسریای بیماریزا باید در ۱۰- ۵٪ Co_2 انکوبه شوند و در فواصل زمانی۲۴-۱۸ ساعت و سپس ۴۸-۲۴ ساعت بررسی گردند.

برای باکتری های بی هوازی، کشت ها عموماً به حداقل ۴۸ ساعت انکوباسیون در شرایط بی هوازی و غنی از Co_2 نیاز دارند.

در مورد کمپیلوباکتر آگار، پلیتها باید در ºC ۴۲ در شرایط میکروآئروفیلیک غنی از Co_2 به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شوند.

۴- کنترل محیط های کشت برای آزمایشهای بیوشیمیایی

از سوسپانسیون میکروبی رقیق نشده برای کنترل این محیطها استفاده می کنیم.

پس از تلقیح، تمام کشت ها را در شرایط لازم (از نظر Co_2، رطوبت و یا شرایط بیهوازی و درجه حرارت مناسب) قرار داده و پس از طی مدت زمان لازم (۲۴ تا ۴۸ ساعت) آنها را مورد بررسی قرار می دهیم. محیط های مناسب دارای رشد کافی از کلنی های باکتریهای مورد نظر می باشند و در مورد محیطهای انتخابی مهار میکروارگانیسمهای مورد نظر باید مشخص باشد.

کنترل محیط های ساخته شده تجاری (آماده مصرف):

۱- رطوبت: محیطهای کشت باید بدون هر گونه رطوبت اضافی بوده، همچنین هیچ نشانه ای از خشک شدن اطراف محیط کشت نباید مشاهده گردد.

۲- سترون بودن: محیطهای کشت باید عاری از آلودگی باشند.

رنگ: محیطهای کشت آگار خوندار نباید هیچ نشانه ای از همولیز داشته باشند و محیطهای کشت دیگر نباید هیچگونه تغییر رنگ غیر طبیعی داشته باشند.

بررسی آلودگی محیط های کشت (استریل بودن محیط های کشت):

در صورتیکه تعداد پلیت یا لوله تهیه شده در هر سری ساخت یا Lot، ۱۰۰ عدد یا کمتر باشد، باید به تعداد ۵-۳٪ محیط های تهیه شده را در دمای ۳۵-۳۷ ºC به مدت ۵-۲ روز انکوبه نمود. برای Lot های با تعداد بیش از ۱۰۰، باید به تعداد ۱۰ پلیت یا لوله را به طور تصادفی برداشته و در شرایط فوق انکوبه نمود. بعد از انکوباسیون هیچ گونه رشد میکروبی نباید مشاهده شود.

تفسیر نتایج :

یک محیط کشت زمانی قابل قبول می باشد که با همه سویه های پیشنهادی برای آزمون محیط کشت که در جدول ۳ مشخص شده است، رشد کافی داشته و خصوصیات مورفولوژیکی کلنی ها بارز باشد. در مورد محیط های انتخابی، رشد بعضی از ارگانیسم های خاص مهار می شود، ضمن اینکه اجازه رشد کافی به سایر ارگانیسم می دهد. در بعضی موارد، واکنشهای رنگی خاص یا همولیز همچنانکه در جدول ۲ آمده است، باید ایجاد شود. مثلاً در مورد کشت بلادآگار ایجاد همولیز مناسب ضروری است و یا برای محیط مکانکی آگار ایجاد واکنش های رنگی برای سویه های میکروبی مشخص ضروری می باشد.

جدول ۴ - سویه های کنترکیفی محیط های کشت

محیط کشت	زمان انکوباسیون	ارگانیسم های کنترلی	نتیجه قابل انتظار
بایل اسکولین آگار	۲۴ ساعت	استرپتوکوک فکالیس S. faecalis استرپتوکوک پایوژنز S. pyogenes	رشد مثبت، محیط سیاهرنگ می شود رشد منفی
بلاد آگار جار شمع دار CO_2	۲۴ ساعت	استرپتوکوک پایوژنز Streptococcus pyogenes استرپتوکوک پنومونیه S. pnemoniae	رشد مثبت دارای همولیز بتا رشد مثبت دارای همولیز آلفا
شکلات آگار	۲۴ ساعت	هموفیلوس آنفلوانزا Haemophilus influenzae	رشد مثبت

لیزین دکربوکسیلاز(محیط بوسیله روغن استریل پوشانده میشود)	۴۸ ساعت	سالمونلا تایفی موریوم S. typhimurium شیگلا فلکسنری Shigella flexneri	مثبت (بنفش رنگ می شود) منفی (بدون تغییر رنگ)
اورنیتین (دکربوکسیلاز)	۴۸ ساعت	سالمونلا تایفی موریوم S. typhimurium کلبسیلا پنومونیه K. pneumoniae	مثبت منفی
آرژینین (دی هیدرولاز)	۴۸ ساعت	سالمونلا تایفی موریوم S. typhimurium پروتئوس میرابیلیس Proteus mirabilis	مثبت منفی
ژلاتین از	۲۴ ساعت	اشرشیا کلی E. coli باسیلوس سوبتیلیس Bacillus subtilis	منفی مثبت
کلیگلرآیرون آگار	۲۴ ساعت	سیتروباکتر فروندی Citrobacter frundii سالمونلا تایفی موریوم S. typhimurium شیگلا فلکسنری Sh. flexneri اسینتوباکتر کالکوستیکوس Acinetobacter calcoaceticus	گاز + $A/A, SH_2$ گاز یا بدون گاز + $K/A, SH_2$ K/A تغییر نمی کند
مکانکی آگار	۲۴ ساعت	اشرشیا کلی E. coli	کلنی های قرمز رنگ

(همراه با کریستال ویوله)		پروتئوس میرابیلیس Proteus mirabilis استرپتوکوک فکالیس S. faecalis	کلنی های بیرنگ، بدون سوارمینگ (خزش) رشد منفی
مالونات	۲۴ ساعت	اشرشیا کلی E. coli کلبسیلا پنومونیه K. pneumonia	منفی (سبز رنگ) مثبت (آبی رنگ)
مانیتول سالت آگار	۲۴ ساعت	استافیلوکوک اورئوس S. aureus S. epidermidis استافیلوکوک اپیدرمیدیس اشرشیا کلی E. coli	کلنی های زرد رنگ کلنی های قرمز رنگ رشد منفی
MRVP	۴۸ ساعت	اشرشیا کلی E. coli کلبسیلا پنومونیه K. pneumonia	MR مثبت- VP منفی MR منفی- VP مثبت
مولرهینتون آگار	۲۴ ساعت	استافیلوکوک اورئوس S. aureus ATCC 25923 سودوموناس آئروژینوزا P. aeruginosa ATCC 27853	به جدول میزان هاله عدم رشد قابل قبول در بخش آنتی بیوگرام مراجعه شود

		اشرشیا کلی E. coli ATCC 25922	
نیترات براث	۲۴ ساعت	اشرشیا کلی E. coli اسینتوباکتر کالکوستیکوس Acinetobacter calcoaceticus	مثبت منفی
آب پپتونه (اندول)	۲۴ ساعت	اشرشیا کلی E. coli کلبسیلا پنومونیه K. pneumoniae	مثبت منفی
فنیل آلانین دآمیناز	۲۴ ساعت	اشرشیا کلی E. coli پروتئوس میرابیلیس P. mirabilis	منفی مثبت
سالمونلا شیگلا آگار (S.S) یا دزوکسی کلات سیترات آگار	۲۴ ساعت	اشرشیا کلی E. coli سالمونلا تایفی موریوم Salmonella typhimurium یرسینیا انتروکولیتیکا Yersinia enterocolitica شیگلا فلکسنری Shigella flexneri	منفی کلنی های بیرنگ کلنی های بیرنگ کلنی های بیرنگ
سلنیت برات (SF)	۲۴ ساعت	سالمونلا تایفی موریوم S. typhimurium اشرشیا کلی E. coli	بعد از کشت مجدد رشد می کند بعد از کشت مجدد رشد نمی کند

سیمون سیترات (در لوله های با درپیچ شل در انکوباتور گذاشته شود)	۴۸ ساعت	اشرشیا کلی E. coli کلبسیلا پنومونیه K. pneumonia	رشد - منفی رشد - مثبت- رنگ آبی
TCBS آگار	۲۴ ساعت	Vibrio SPP	کلنی های زرد رنگ
تایر مارتین	۲۴ ساعت	نایسریا منتژیتیدیس Neisseria meningitidis (CO_2) نایسریا گونوره N. Gonorrhoeae اشرشیا کلی E. coli	رشد - مثبت رشد - مثبت رشد - منفی
تایوگلیکولات براث Thioglycollate broth	۲۴ ساعت	باکتروئیدس فراجیلیس Bacteriodes fragilis	رشد- مثبت
TSI عمق محیط باید ۳ سانتی متر باشد (با درپیچ شل اتوو گذاری شود)	۲۴ ساعت	سیتروباکتر فروندیCitrobacter frundii سالمونلا تایفی موریوم S. typhimurium اسینتوباکتر کالکوستیکوس Acinetobacter calcoaceticus	گاز + A/A, SH_2 گاز یا بدون گاز + K/A, SH_2 K/A تغییر نمی کند

محیط اوره	۲۴ ساعت	اشرشیا کلی E. coli پروتئوس میرابیلیس P. mirabilis	منفی مثبت، صورتی
Eosin Methylen Blue Agar (EMB)	۲۴ ساعت	سالمونلا تایفی موریوم S. typhimurium شیگلا فلکسنری Sh. Flexneri اشرشیا کلی E. coli E.faecali (29212)	رشد،کلنی های بی رنگ تا کهربایی رشد،کلنی های بی رنگ تا کهربایی رشد،کلنی های آبی سیاه با درخشش سبز متالیک مهار رشد (جزئی)
Xylose Decarboxylate Agar (XLD)	۲۴ ساعت	*سالمونلا تایفی موریوم S. typhimurium* *شیگلا فلکسنری Sh. Flexneri* انتروکوک فکالیس *E.faecalis* *اشرشیا کلی E. coli*	رشد،کلنی های قرمز با مرکز سیاه رشد،کلنی های قرمز مهار رشد (جزئی) کلنی های زرد تا زرد_قرمز

روش تهیه کدورت استاندارد نیم مک فارلند

۱- هدف:

جهت استاندارد کردن غلظت تلقیح برای آزمایش تعیین حساسیت میکروبی، باید از استاندارد سولفات باریم ($BaSo_4$)، برابر با استاندارد نیم مک فارلند استفاده شود.

۲- مواد و ابزار لازم:

کلرور باریم دهیدراته، اسید سولفوریک، آب مقطر، مزور، بالن ژوژه، لوله آزمایش شیشه ای درپیچ دار، اسپکتروفتومتر

۳- روش انجام کار:

کدورت استاندارد نیم مک فارلند به روش زیر تهیه می شود:

۱- ۰/۵Ml از کلرور باریم ($BaCl_2$) ۰/۰۴۸ mol/l (۱/۱۷۵٪ $W/VBaCl_2.2H_2O$) را به ۹۹ /۵ml اسید سولفوریک ۰/۱۸mol/l (۱ V/V٪) اضافه کنید و با هم زدن مداوم سوسپانسیون بدست آورید.

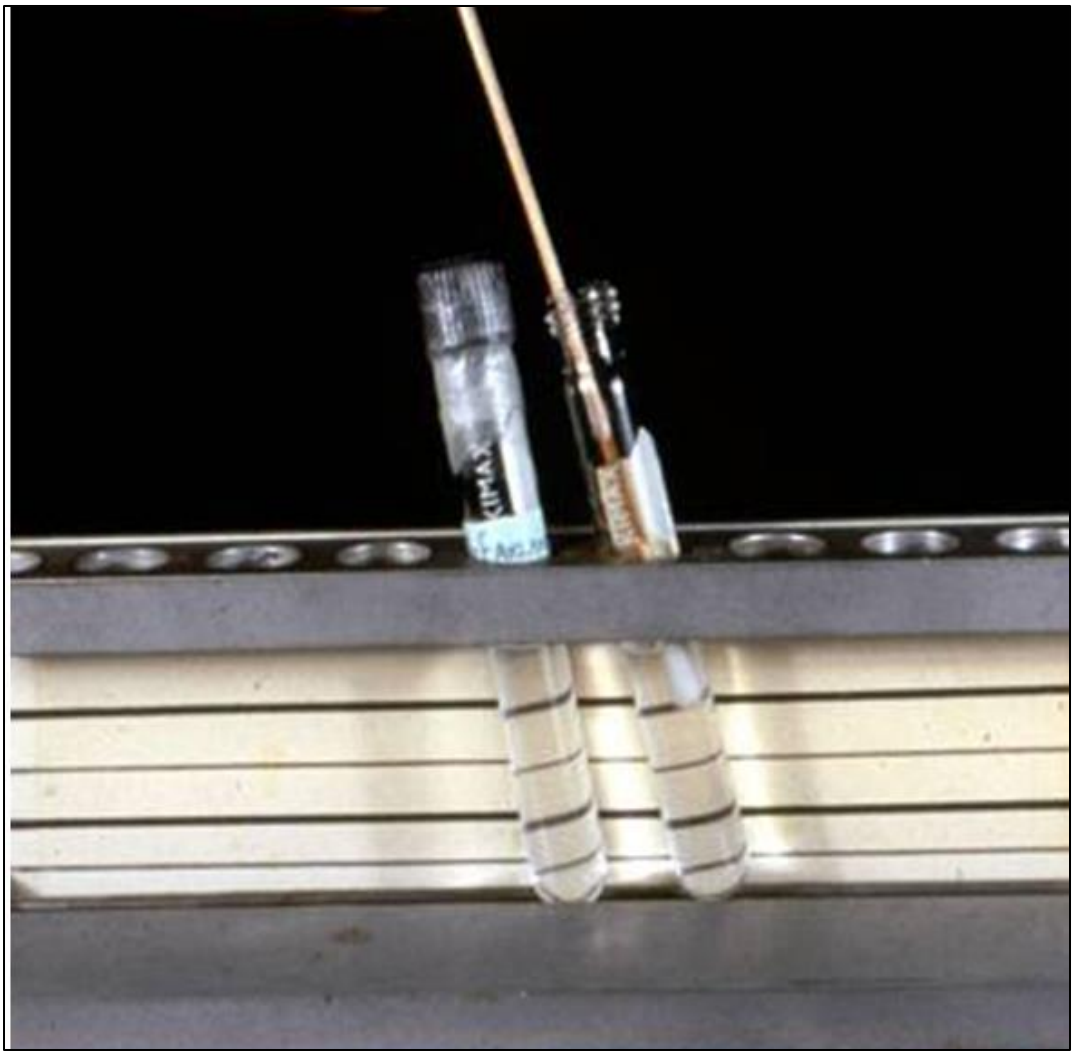
۲-چگالی صحیح کدورت استاندارد با استفاده از اندازه گیری جذب در اسپکتروفتومتر با طول مسیر نوری ۱ cm، مشخص شود. جذب در ۶۲۵ nm باید بین ۰/۰۸ تا ۰/۱۳ باشد.

۳-سوسپانسیون سولفات باریم باید به مقدار ۶-۴ ml در لوله های درپیچ دار هم اندازه با لوله های سوسپانسیون باکتریایی ریخته شود.

۴-درب این لوله ها باید محکم بسته شوند و در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری گردند.

۵-استاندارد سولفات باریم قبل از هر بار استفاده باید به شدت (ترجیحا با ورتکس مکانیکی) هم زده شود، تا کدورت یکنواختی ایجاد گردد. در صورت مشاهده ذرات بزرگ، باید استاندارد تازه ای تهیه گردد.

۶-جذب نوری استاندارد نیم مک فارلند باید هر ماه اندازه گیری، و در صورت نیاز (تغییرOD خیار از محدوده ۰/۰۸ تا ۰/۱۳) تعویض گردد استاندارد نیم مک فارلند باید حداکثر پس از شش ماه تعویض شود.



شکل ۲- مقایسه کدورت نیم مک فارلند

کنترل کیفیت دیسک های آنتی بیوتیک جهت انجام آزمایش تعیین حساسیت میکروبی

تعیین حساسیت میکروبی به روش disk diffusion agar

هدف

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

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

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

سویه های پیشنهادی توسط CLSI برای کنترل کیفی دیسک های آنتی بیوتیک عبارتند از:

Enterococcus faecalis ATCC 29212

Escherichia coli ATCC 25922

Escherichia coli ATCC 35218

Haemophilus influenzae ATCC 49247

Haemophilus influenzae ATCC 49766

Klebsiella pneumoniae ATCC 700603

Neisseria gonorrhoeae ATCC 49226

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Streptococcus pneumoniae ATCC 49619

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

Enterococcus faecalis ATCC 29212 یا *E.*faecalis ATCC 33186 برای ارزیابی محیط مولر هینتون آگار با دیسک تری متوپریم/ سولفامتوکسازول استفاده می شود. درمحیط کشت قابل قبول، هاله عدم رشد واضحی به قطر *mm* ۲۰ یا بزرگتر ایجاد می شود در حالیکه در محیطهای کشت غیر قابل قبول، هاله عدم رشد ایجاد نمی شود یا در داخل هاله، رشد کم مشاهده می شود و یا هاله ای با قطر کمتر از *mm* ۲۰ ایجاد میگردد. این کار به منظور بررسی مقادیر غیرقابل قبول تیمیدین در محیط کشت مزبور است.

Enterococcus faecalis ATCC 29212 همچنین برای کنترل دیسک های آمینوگلیکوزید با دوز بالا به کار می رود.

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

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

سویه های کنترل کیفی را باید به روش استاندارد آزمایش disk diffusi*on* و با استفاده از همان مواد و روشی که برای سویه های جدا شده از نمونه های کلینیکی استفاده می شود آزمایشات و نتایج را با جداول CLSI

مقایسه و بررسی نمود. محدوده قطر هاله عدم رشد قابل قبول برای هر سویه کنترلی نسبت به یک دیسک آنتی بیوتیکی در جداول CLSI فهرست شده است.

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

آزمایش کنترل کیفی دیسک آنتی بیوتیکی باید درچه فواصل زمانی انجام گیرد؟

الف _ انجام آزمایش روزانه

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

ب _ انجام آزمایش هفتگی

- در صورتیکه تنها یک مورد از ۲۰ نتیجه قطر هاله عدم رشد برای هر سویه کنترلی/ دیسک آنتی بیوتیکی خارج از محدوده قابل قبول مندرج در جداول CLSI قرار گیرد ، کنترل کیفی روزانه را به هفتگی تغییر دهید.

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

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

اقدامات اصلاحی (Corrective actions)

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

- استفاده از دیسک اشتباه، استفاده از سویه کنترلی اشتباه، آلودگی واضح سویه و استفاده غیرعمدی از دما و شرایط اشتباه انکوباسیون بوجود آمده است . دراین حال باید دلیل ایجاد خطا مکتوب و پس از اصلاح آزمایش دوباره تکرار شود. اگر نتایج گزارش شده در محدوده مورد نظر قرار گرفت ، عملیات اصلاحی بیشتری مورد نیاز نمی باشد .

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

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

عملیات اصلاحی اضافی:

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

- اندازه گیری و ثبت صحیح قطر هاله های عدم رشد

- رعایت تاریخ انقضا و شرایط نگهداری دیسکها و مواد مورد استفاده (دور از رطوبت و در دمای مناسب)

- مناسب بودن دما و اتمسفر انکوباتور

- تغییرنیافتن یا آلوده نبودن سویه های کنترل

- مطابقت صحیح سوسپانسیون تلقیح با استاندارد نیم مک فارلند

- استفاده از پلیت کشت تازه برای تلقیح (پلیت کشت باید تازه بوده و مدت زمان انکوباسیون آن بیشتر از ۲۴ ساعت نباشد)

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

نگهداری دیسکهای آنتی بیوتیکی

- دیسکها باید در یخچال$^{\circ}C$ ۸ و پایین تر ، یا در فریزر$^{\circ}C$ ۱۴- و پایین تر تا زمان مصرف نگهداری شوند.

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

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

- دیسکها باید در ظروف دارای درپوش محکم و حاوی مواد جاذب رطوبت نگهداری شوند.

- دیسکهای آنتی بیوتیکی باید یک تا دو ساعت قبل از استفاده از یخچال یا فریزر خارج شوند تا به درجه حرارت اتاق برسند.

تعیین حجم لوپ میکروب شناسی

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

برای بررسی حجم لوپ از روشهایی مانند رنگ‌سنجی و توزین استفاده می‌شود. ساده ترین روش برای بررسی حجم لوپ استفاده از روش رنگ‌سنجی از طریق اسپکتروفتومتر یا فتومتر به کمک مواد رنگی مانند متیلن بلو ، کریستال ویوله و اوانس بلو می‌باشد. در این دستورالعمل روش رنگ‌سنجی با استفاده از اوانس بلو توضیح داده شده است.در صورت استفاده از سایر مواد رنگی ، میبایستی طول موج و جذب نوری ویژه همان ماده بکار برده شود.

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

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

۲- آب مقطر

۳- لوله آزمایش

۴- پیپت یا سمپلر

۵- اسپکتروفتومتر یا فتومتر کالیبره

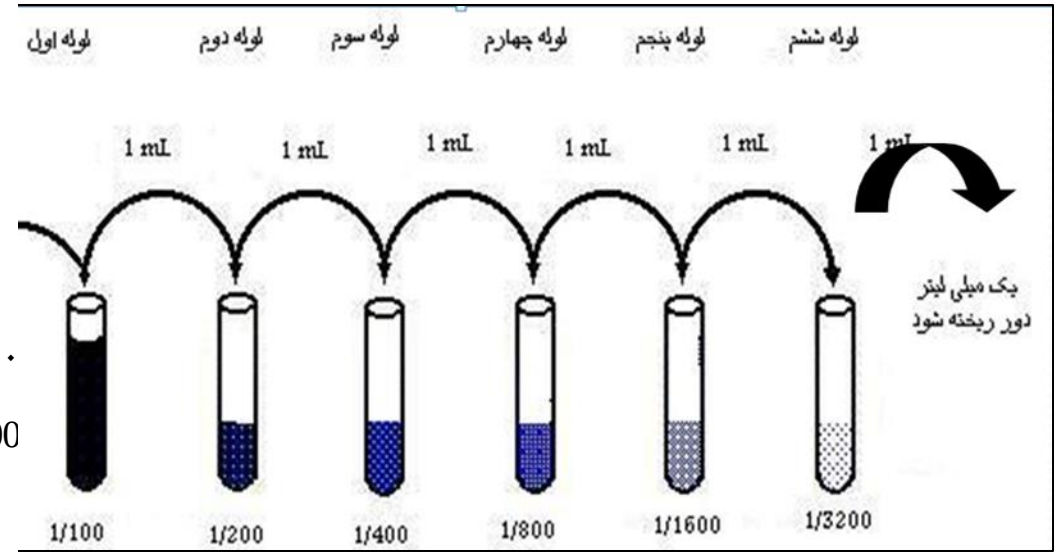
۶- کاغذ میلیمتری

روش انجام تعیین حجم لوپ به روش رنگ سنجی:

۱- ۲۰mg از پودر رنگی اوانس بلو را در ۱۰ میلی لیتر آب حل نمایید. غلظت این محلول g ۰/۲ در۱۰۰ می‌باشد.

۲- ۶ لوله آزمایش انتخاب کرده ، در لوله اول ۲ میلی لیتر و در هر یک از لوله‌های باقیمانده 1ml آب مقطر بریزید. ۲۰ لاندا (۰/۰۲ میلی لیتر) از محلول ذخیره اولیه (g ۰/۲ در۱۰۰) برداشته در لوله اول ریخته و کاملا مخلوط نمایید. سپس ۱ میلی لیتر از لوله اول برداشته و در لوله دوم بریزید ، از لوله دوم ، در لوله سوم و این عمل را تا آخر ادامه دهید. در نهایت یک میلی لیتر از لوله ششم را برداشته و دور بریزید . به این ترتیب ۶ محلول خواهید داشت که رقت نهایی بدست آمده در هر یک و میزان ماده رنگی موجود در آن بشرح زیر خواهد بود.

۲۰ λ از محلول ذخیره 0.2g/100



رقت مقدار ماده رنگی 10λ 5 λ 2.5λ 1.25λ 0.625λ 0.3125λ

شکل ۳- روش رقیق سازی ماده رنگی

۳- میزان جذب نوری (OD) هر یک از ۶ محلول حاصله را به کمک اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۰ nm بدست آورید.

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

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

۶- بعد از مخلوط کردن ، جذب هریک از لوله‌ها را در طول موج ۶۲۰ nm قرائت نمائید.

۷- بر روی کاغذ میلی‌متری نموداری ترسیم نمایید که در آن ، محور افقی نشانگر رقت های تهیه شده و محور عمودی نمایانگر جذب نوری هر رقت باشد.

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

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

روشهای دیگری نیز برای بررسی میزان حجم برداشتی توسط لوپ باکتریولوژی وجود دارد که از بین آنها می‌توان به روش توزینی مندرج در کتاب iagnostic microbiology ,Elmer W.Koneman, 5th edition اشاره کرد که در آن با استفاده از ترازوی بسیار حساس تغییرات وزن دیسک کاغذی بعد از افزودن یک لوپ آب مقطر روی آن، محاسبه می‌گردد.

موارد بحرانی در آزمایشگاه میکرب شناسی

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

وظایف آزمایشگاه:

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

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

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

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

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

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

جدول ۵- موارد بحرانی در آزمایشگاه میکرب شناسی- آزمایش های باکتری شناسی

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

	پتشی از نظر مننگوکک	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	نمونه قانقاریای گازی	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	باسیل های گرم مثبت درشت مشابه کلستریدیوم
	اسمیر گرم و پارشیال اسید فست نوکاردیا	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	اسمیر اسید فست در نمونه های تنفسی	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	

کشت	کشت خون	تمام گروه های سنی	هر نتیجه مثبت	
	مایع مغزی نخاعی (CSF)	تمام گروه های سنی	هر نتیجه مثبت	
	مایعات استریل بدن شامل: جنب، آسیت، آمنیوتیک، مفصل، زجاجیه، پریکارد و ...	تمام گروه های سنی	هر نتیجه مثبت	اولین تشخیص باکتری در کشت بحرانی تلقی می شود. در صورت مثبت شدن مجدد طی یک هفته، این نتیجه دیگر بحرانی تلقی نمی گردد.

	تراشه قرنیه	تمام گروه های سنی	هر نتیجه مثبت	
	بیوپسی بافت مانند مغز، کبد، کلیه، استخوان و مغز استخوان	تمام گروه های سنی	هر نتیجه مثبت	
	مدفوع	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت برای *ویبریو کلرا*	
		کمتر از ۱۸ سال	نتیجه مثبت برای *E. coli* Enterohemorrhagic مانند *E. coli* O157	
		کمتر از ۱۲ سال	نتیجه مثبت برای *شیگلا*	در بیماران بستری
		تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت برای *شیگلا دیسانتریه*	در بیماران بستری و سرپایی
		اطفال	نتیجه مثبت برای *کمپیلوباکتر*	در صورت وجود خون یا گلبول سفید در نمونه بیمار
		تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت برای *سالمونلا تایفی*	در بیماران بستری و سرپایی

		تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت برای *سالمونلا*های غیر تایفی	بیماران با علائم بالینی شدید یا دارای نقص سیستم ایمنی
	مایع دیالیز	تمام گروه های سنی	هر نتیجه مثبت	
	بورخلدریا مالئی و *سودومالئی*	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	نیسریا مننژیتیدیس در نمونه های مایع مغزی نخاعی، خون، مایع مفصل و پتشی	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	

کشت	*سودوموناس* در نمونه چشم	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	گونه های *بروسلا*	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	هر نمونه ای
	باسیلوس آنتراسیس	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	هر نمونه ای

فرانسیسلا تولارنسیس	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	هر نمونه ای	
یرسینیا پستیس	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	هر نمونه ای	
استرپتوکک گروه A جدا شده از فاسیت و یا زخم های جراحی	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت		
لژیونلا	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت		
لپتوسپیرا	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت		
لیستریا	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	زنان باردار و افراد مبتلا به هر گونه نقص سیستم ایمنی	
کشت مثبت *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس*	تمام گروه های سنی	اولین بار جداسازی و جداسازی سویه های مقاوم (MDR و XDR)	در صورتی که از نمونه مجدد بیمار طی دو هفته دوباره باکتری جدا شود، دیگر به گزارش شفاهی یا فوری نیازی نیست.	

	سایر گونه های *مایکوباکتریوم*	تمام گروه های سنی	اولین جواب مثبت	هر نمونه ای
	کورینه باکتریوم دیفتریه	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	استرپتوکوکوس آگالاکتیه در نمونه های ادرار، تناسلی و رکتوم در زنان باردار	زنان باردار هفته ۳۷-۳۵ بارداری	نتیجه مثبت	
	سودوموناس آئروژینوزا یا گونه های *باسیلوس* در نمونه ترشحات چشم	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	بردتلا پرتوسیس	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	ارگانیسم هایی با مقاومت میکربی چندگانه، مانند MRSA، MRS، ESBLs، مقاومت به کاربانم ها، مقاومت VRSA، VISA، VRE، پنوموکک مقاوم به پنی سیلین و هر گونه مقاومت غیر منتظره	تمام گروه های سنی	نتایج مثبت	این مقاومت ها با نظر کمیته کنترل عفونت می تواند در بخش های مختلف بیمارستان به عنوان موارد بحرانی در نظر گرفته شود.

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

روش های مولکولی	TB در نمونه های مایع مغزی نخاعی و تنفسی	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	بردتلا پرتوسیس	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	کلامیدیا در نمونه چشم	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	MRSA	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	لژیونلا	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	

جدول ۵- موارد بحرانی در آزمایشگاه میکرب شناسی- آزمایش های قارچ شناسی

آزمایش		سن	نتایج بحرانی	ملاحظات
اسمیر	رنگ آمیزی India Ink در مایع مغزی نخاعی از نظر کریپتوکوکوس	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	پنوموسیستیس با روش DFA	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	تراشه قرنیه	تمام گروه های سنی	هر نتیجه مثبت	
	نمونه های کشت خون، مایع مغزی نخاعی، مایعات بدن یا نمونه های بیوپسی بافت	تمام گروه های سنی	هر نتیجه مثبت	اولین تشخیص مستقیم قارچ در این نمونه ها، بحرانی تلقی می شود و در صورت مثبت شدن مجدد طی یک هفته، دیگر بحرانی تلقی نمی گردد.
	نمونه بیوپسی سینوس در بیماران دیابتی و دارای نقص سیستم ایمنی	تمام گروه های سنی	هر نتیجه مثبت	
کشت	نمونه های کشت خون، مایع مغزی نخاعی، مایعات بدن یا نمونه های بیوپسی بافت	تمام گروه های سنی	هر نتیجه مثبت	

	نمونه بیوپسی سینوس در بیماران دیابتی و دارای نقص سیستم ایمنی	تمام گروه های سنی	هر نتیجه مثبت	
	تراشه قرنیه	تمام گروه های سنی	هر نتیجه مثبت	
آزمایش های آنتی ژنی	آنتی ژن کریپتوکوکوس در نمونه مایع مغزی نخاعی و سرم	تمام گروه های سنی	اولین جواب مثبت	نتیجه اولیه بحرانی تلقی می شود و نیازی به گزارش مجدد نمی باشد؛ مگر آن که در آزمایش کمی، افزایش معنی داری معادل ۴ تیتر در آزمایش های بعدی مشاهده گردد.

جدول ۵- موارد بحرانی در آزمایشگاه میکرب شناسی- آزمایش های انگل شناسی

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

جدول ۵- موارد بحرانی در آزمایشگاه میکرب شناسی- آزمایش های ویروس شناسی

آزمایش		سن	نتایج بحرانی	ملاحظات
کشت	ویروس هرپس سیمپلکس در نمونه های مایع مغزی نخاعی، مغز، مایع آمنیوتیک و چشم	تمام گروه های سنی	نتایج مثبت	
	ویروس هرپس سیمپلکس در نمونه های زخم تناسلی	در پایان دوره بارداری	نتیجه مثبت	
	آنسفالیت های ویروسی	تمام گروه های سنی	نتایج مثبت	
	نمونه مایع مغزی نخاعی شیرخواران	کمتر از ۱۲ ماه	هر نتیجه مثبت	
	انفلوانزای A و B	تمام گروه های سنی	نتایج مثبت	در شروع اپیدمی
	نورو ویروس در نمونه مدفوع	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	

	نمونه های مایع مغزی نخاعی، خون، مایعات استریل بدن، مایع آمنیوتیک یا نمونه های بیوپسی بافت	تمام گروه های سنی	نتایج مثبت	مانند CMV، انترو ویروس، EBV، VZV
	Respiratory Syncytial Virus (RSV)	اطفال	نتیجه مثبت	
روش های مولکولی	ویروس هرپس سیمپلکس در نمونه های مایع مغزی نخاعی، مغز، مایع آمنیوتیک و چشم	تمام گروه های سنی	نتایج مثبت	
	ویروس هرپس سیمپلکس در نمونه های زخم تناسلی	در پایان دوره بارداری	نتیجه مثبت	
	آنسفالیت های ویروسی	تمام گروه های سنی	نتایج مثبت	
	نمونه مایع مغزی نخاعی شیرخواران	کمتر از ۱۲ ماه	هر نتیجه مثبت	
	انفلوانزای A و B	تمام گروه های سنی	نتایج مثبت	در شروع اپیدمی
	نورو ویروس در نمونه مدفوع	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	

	سیتومگالوویروس (CMV) به روش کمی (viral load) در بیماران پیوندی یا دارای نقص سیستم ایمنی و شیرخواران کمتر از ۳ ماه	تمام گروه های سنی	نتیجه مثبت	
	RSV	اطفال	نتیجه مثبت	

اتوکلاو

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

چرخهٔ استریلیزاسیون

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

انواع استریلیزاسیون

- استریلیزاسیون محیط های کشت و محلول ها

- استریلیزاسیون مواد مصرفی آلوده
- استریلیزاسیون مواد خشک بسته بندی شده

استریلیزاسیون محیط های کشت و محلولها

- بهتر است از لوله و ارلن درپیچ دار استفاده شود. بیشتر از دوسوم حجم آنها را پر نکنید. درپیچ آنها را شل کنید.
- از قرار دادن اشیاء بر روی یکدیگر بپرهیزید. باید فاصلهٔ اشیاء از یکدیگر و از دیواره های اتوکلاو حداقل ۵ سانتی متر باشد تا بخار جریان یابد.
- درب اتوکلاو را ببندید. زمان و دما را طبق دستور شرکت سازنده (معمولاً ۱۵ دقیقه در $121^{\circ}C$) تنظیم کنید.
- در بعضی از محیط های کشت که به دمای بالا حساس هستند (محتوی مقدار قند بالا یا عوامل مهار کننده مثل دزوکسی کولات سدیم یا نمکهای صفراوی هستند) تحت تأثیر دمای بالا، pH محصول نهایی کاهش می یابد.
- دمای استریلیزاسیون به دمای چمبر اتوکلاو برمیگردد نه به دمای محیط کشت. زمان لازم برای رسیدن به این دما باید در حد ممکن کوتاه باشد.

چرخهٔ استریلیزاسیون باید متناسب با زمان نفوذ گرما در نظر گرفته شود. برای مثال محتویات یک ظرف یک لیتری محیط کشت باید مدت زمان ۱۵ دقیقه از لحظه رسیدن محفظه به دمای $121^{\circ}C$، محاسبه شود.

استریلیزاسیون مواد مصرفی آلوده

- مواد مصرفی آلوده را جدا نموده و در کیسه های قابل اتوکلاو شدن قرار دهید و بر روی آنها برچسب Biohazard نصب کنید.

- برای اطمینان از نفوذ بخار به همهٔ قسمتهای کیسه، یا گرهٔ آنرا شل کنید یا قبل از محکم کردن گره، یک پیمانه (۰/۳ لیتر) آب به آن اضافه کنید. بیش از سه چهارم کیسه را پر نکنید.

- برای جلوگیری از مسدود شدن آبگذر اتاقک اتوکلاو توسط آگار مذاب، کیسه ها را داخل سطل قرار دهید.

- زمان لازم برای استریلیزاسیون زباله، ۶۰-۳۰ دقیقه در $121^{\circ}C$یا ۳۰-۱۵ دقیقه در $134^{\circ}C$می باشد.

- وقتی آگار ذوب شده، سفت شد آنرا مثل زبالهٔ طبیعی دور بریزید. اما محیط کشت محتوی سلنیت را باید بصورت زبالهٔ مخصوص منهدم کنید.

استریلیزاسیون مواد خشک بسته بندی شده

- بسته ها را طوری در اتوکلاو قرار دهید که حداکثر چرخش بخار در بین آنها ایجاد شود و با دیواره های اتوکلاو نیز تماسی نداشته باشند.

- زمان لازم برای استریلیزاسیون مواد خشک بسته بندی شده ، ۲۵ دقیقه با خروج سریع بخار یا ۳۰ دقیقه بدون خروج بخار در دمای $121^{\circ}C$می باشد.

نحوهٔ نگهداری

- روزانه: صفحهٔ کف اتوکلاو را از سوراخ آبگذر اتاقک جدا کرده، تمیز کنید. لوازم فرعی مثل طبقات و سینی ها را با آب و صابون بشویید. سطح آب ژنراتور را کنترل کنید.

- هفتگی: آبگذر و درزها را تمیز کنید. سوپاپ اطمینان را بررسی کنید.

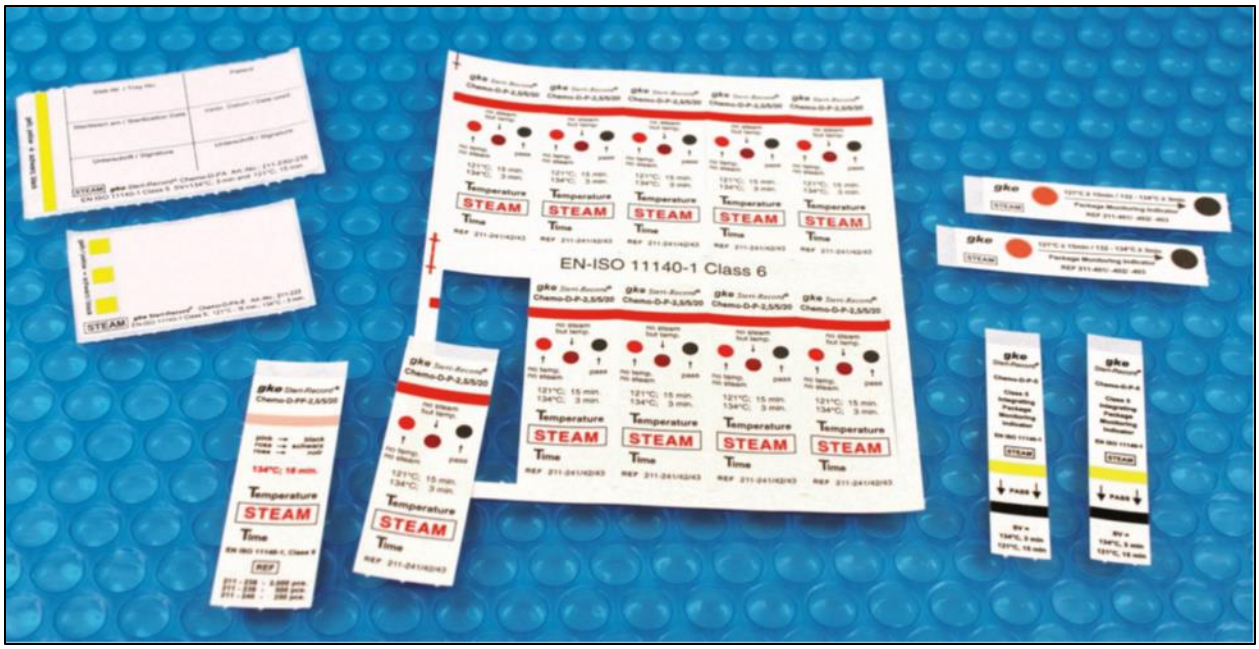
- ماهانه: آب دستگاه را تعویض نمایید.
- هر ۳ ماه: داخل و خارج دستگاه و قسمت بیرونی آبگذر را تمیز کنید.
- هر ۶ ماه: دستگاه توسط نمایندۀ سرویس تعمیر، بازرسی شود.

کنترل کیفی اتوکلاو:

اندیکاتور شیمیایی:

اندیکاتور شیمیایی (TST) کلاس ۶ : برای پایش مستمر اتوکلاو در هر بار استفاده، از این اندیکاتور استفاده کنید.

این اندیکاتور سه عامل زمان، بخار و دما را کنترل می کند و تغییر رنگ می دهد. مشاهدۀ تغییر رنگ مناسب اندیکاتور پس از پایان مرحله سترون سازی، نشان دهنده عملکرد مطلوب دستگاه است.



شکل ۴- نمونه اندیکاتور های شیمیایی

اندیکاتور بیولوژیک:

استفاده از ویال اندیکاتور حاوی اسپور *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 به طور هفتگی یا فواصل بیشتر، متناسب با بار کاری اتوکلاو برای پایش عملکرد آن توصیه می شود .

روش استفاده از ویال اندیکاتور حاوی اسپور:

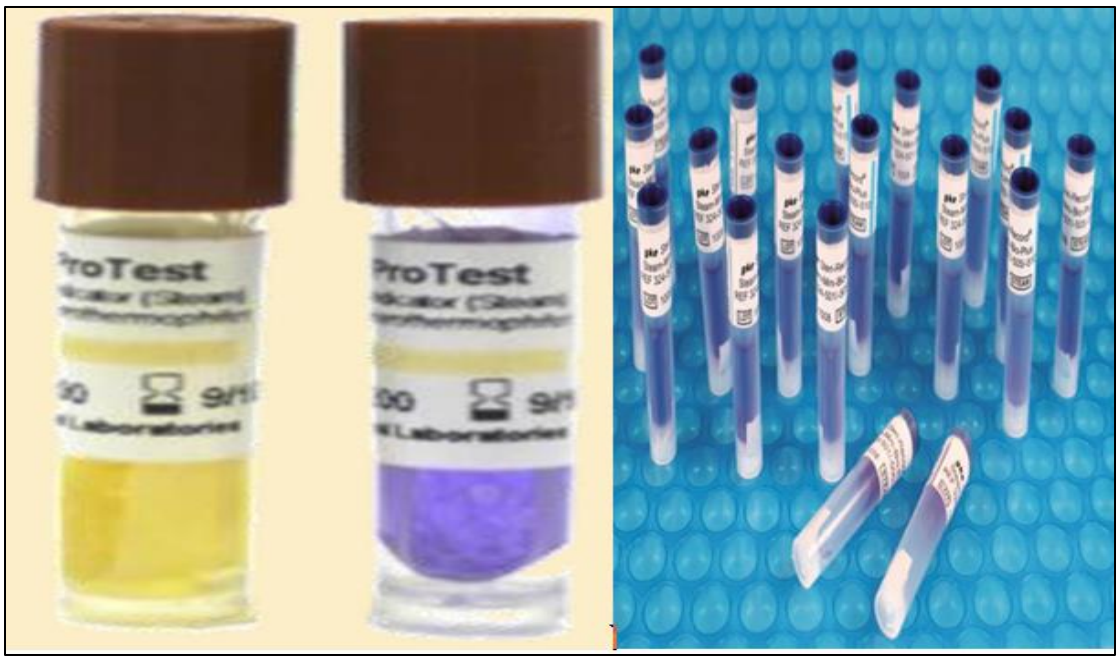
در ته یک ظرف کوچک مقاوم به حرارت و نفوذپذیر نسبت به بخار مثل SafetyBox تعدادی تنزیب قرار داده، تست شیمیایی و بیولوژیک را داخل آن قرار داده، درِ SafetyBox را ببندید و آن را به همراه سایر مواد و وسایل داخل دستگاه قرار دهید .برنامه سترون سازی را اجرا کنید. پس از پایان سیکل، ویال اندیکاتور بیولوژیک را بیرون بیاورید و طی مدت ۲ ساعت آمپول شیشه ای داخل آن را بشکنید تا محیط کشت و اندیکاتورpH داخل آمپول شیشه ای با کاغذ آغشته به اسپور باسیلوس در تماس قرار گیرد،

سپس ویال را به مدت ۲۴- ۷۲ ساعت در دمای $^{\circ}C$ ۱ ± ۵۶ انکوبه نمایید و تغییر رنگ در آن را بررسی کنید.

تغییر رنگ محیط کشت به رنگ اعلام شده توسط سازنده، نشانگر رشد باکتریایی و تغییر pH محیط کشت و عدم صحت عملکرد دستگاه است و عدم تغییر رنگ، نشان دهنده از بین رفتن باسیلوس و صحت عملکرد دستگاه است .نتیجه را ثبت کنید.

کنترل مثبت: چند وقت یکبار برای بررسی زنده بودن میکروارگانیسم داخل ویال از کنترل مثبت استفاده کنید .

برای این کار، یک ویال اندیکاتور بیولوژیک را بدون آن که اتوکلاو شود، به همراه سایر ویال های بیولوژیک که از اتوکلاو خارج کرده اید، بشکنید و به مدت ۲۴-۷۲ ساعت در دمای $^{\circ}C$ ۱ ±۵۶ انکوبه نمایید .باسیلوس موجود در این ویال حتما باید رشد کند و رنگ محیط کشت را تغییر دهد .اگر تغییر رنگ مورد نظر در این ویال ایجاد شود، نتایج سایر ویال ها قابل اعتماد است .اگر این ویال تغییر رنگ ندهد، نشان دهنده از بین رفتن خودبخودی باسیلوس است، بنابراین نتایج سایر ویال ها نیز قابل اعتماد نیست.



شکل ۵- نمونه اندیکاتور های بیولوژیکی اتوکلاو

شکل ۶ - انکئباتور ۵۶ درجه برای ویال اتوکلاو

ایمنی

- از دستکش مقاوم به حرارت و محافظ چشم استفاده کنید.
- بعد از آن که فشار اتاقک اتوکلاو به صفر و دمای آن به حدود $۶۰C^{\circ}$ رسید، کنار درِ اتوکلاو بایستید و آن را به آرامی باز کنید. منتظر بمانید تا ظروف کمی خنک شوند، سپس آنها را حمل کنید.
- هرگز در هنگام روشن بودن دستگاه اقدام به بارگذاری یا خارج نمودن وسایل و مواد ننمایید، همیشه ابتدا دستگاه را خاموش نموده و سپس اقدام به گذاردن و برداشتن وسایل نمایید.
- هرگز در هنگام روشن بودن دستگاه و اتصال آن به پریز برق اقدام به تمیز نمودن آن نکنید. در صورت سهل انگاری و ریختن آب یا مایعات بر روی تابلوی برق، فوراً دستگاه را از پریز جدا نموده و سپس اقدام به خشک کردن تابلوی برق نمایید، از دستگاه استفاده نکنید تا مواد ریخته شده، کاملاً خشک شود.

- هرگز پیچ های محکم کنندهٔ در را در هنگام کار دستگاه شل و سفت نکنید.

فور(اون)

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

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

استریلیزاسیون در اون

۱- برای بسته بندی وسایل فوق‌الذکر جهت استریل نمودن آنها در اون میتوان از فویل آلومینیومی یا کاغذ کرافت و سربطریهای پنبه ای استفاده نمود. باید دقت شود که کاغذ و پنبه نسوزند چون پنبهٔ نیم سوز مواد ضد باکتری فرّاری را متصاعد می کند.

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

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

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

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

۶- قبل از قرار دادن ظروف شیشه ای در اون، از خشک بودن آنها مطمئن شوید. برای خشک کردن وسایل معمولاً از دمای کمتر از $100\ ^{\circ}C$ استفاده می گردد.

۷- مواد را به گونه ای در اون قرار دهید که هوای داغ در اطراف و مابین آنها در جریان باشد.

۸- درِ اون را ببندید و منبع گرما را روشن کنید.

۹- زمان نگهداری استریلیزاسیون از زمانی آغاز می شود که اتاقک به دمای استریل انتخابی برسد و نیز مدتی هم بیشتر درنظر گرفته می شود تا همهٔ قسمتهای اتاقک و مواد داخل آن به دمای مورد نظر برسند($160-180\ ^{\circ}C$ به مدت ۲ ساعت).

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

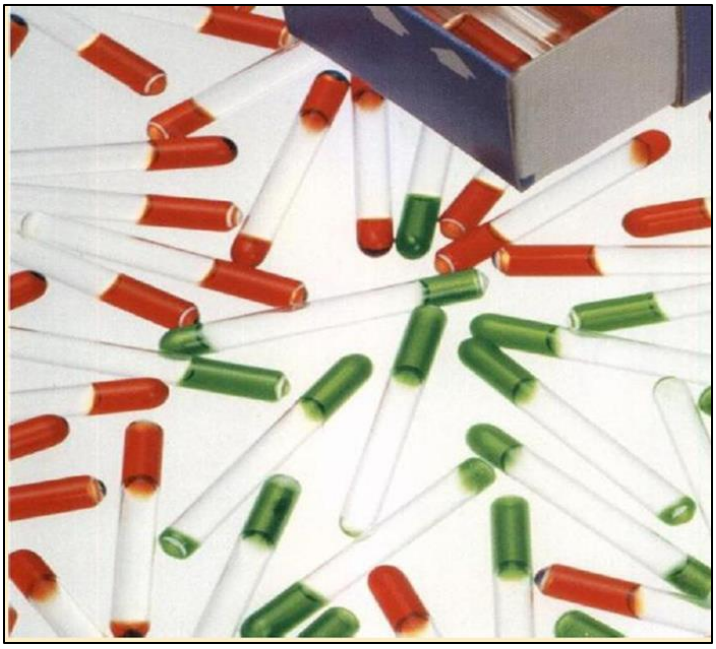
نحوهٔ نگهداری :

به طور ماهانه داخل آن تمیز شود و سالانه توسط نمایندهٔ سرویس بازرسی و تعمیر شود.

توجه : قبل از انجام هر گونه اقدام برای نگهداری معمول، اطمینان حاصل کنید که اون به دمای اتاق رسیده و به پریز برق متصل نیست.

کنترل کیفی فور:

اندیکاتور شیمیایی : ویال شیشه ای Browne و مشاهدهٔ تغییر رنگ مناسب از قرمز به سبز. برای پایش مستمر اون در هر بار استفاده، از این اندیکاتور استفاده کنید .مشاهدهٔ تغییر رنگ مناسب اندیکاتور پس از پایان مرحله سترون سازی، نشان دهنده عملکرد مطلوب دستگاه است.



شکل ۶- نمونه از ویال های شیمیایی فور

اندیکاتور بیولوژیک: استفاده از نوار کاغذی حاوی اسپور باسیلوس سوبتیلیس واریتهٔ نایجر9372 ATCC به طور هفتگی یا فواصل بیشتر، متناسب با بار کاری اون برای پایش عملکرد آن توصیه می شود .

پس از پایان سیکل، پاکت نوار کاغذی اندیکاتور بیولوژیک را از داخل اون بیرون بیاورید و طی مدت ۲ ساعت نوار اندیکاتور را در کنار شعله با پنس استریل (شرایط آسپتیک) خارج نمایید و در داخل لوله حاوی محیط کشت

تریپتیک سوی براث (TSB) یا سوی بین کازئین دایجست براث تلقیح کنیدو لوله را حداقل به مدت ۴۸ ساعت در دمای$^{\circ}C$۱± ۳۶ انکوبه نمایید. لوله محیط کشت را هر روز از نظر ایجاد کدورت که علامت رشد باکتریایی است،بررسی نمایید .مشاهده هرگونه رشد باید از نظر وجود این باسیلوس بررسی گردد، بنابراین باید آن را بر روی محیط های کشت مناسب، کشت مجدد داد .نتیجه را ثبت کنید.

کنترل منفی : همیشه از یک لوله کنترل منفی در کنار سایر لوله های حاوی نوار کاغذی اندیکاتور بیولوژیک استفاده کنید .این لوله فقط حاوی محیط کشت است و برای بررسی آلوده نبودن محیط کشت، در کنار سایر لوله های حاوی نوار کاغذی اندیکاتور بیولوژیک، داخل انکوباتور قرار می گیرد .این لوله را به همراه سایر لوله ها حداقل به مدت ۴۸ ساعت در دمای $^{\circ}C$۱± ۳۶ انکوبه نمایید، لوله محیط کشت را هر روز از نظر ایجاد کدورت که علامت رشد باکتریایی است، بررسی نمایید. اگر در لوله کنترل منفی کدورت ایجاد شود، نتایج سایر لوله ها قابل اعتماد نمی باشد.

کنترل مثبت : چند وقت یکبار برای بررسی زنده بودن میکروارگانیسم نوار کاغذی اندیکاتور بیولوژیک از کنترل مثبت استفاده کنید برای این کار یک نوار کاغذی اندیکاتور بیولوژیک را بدون آن که در داخل اتوکلاو قرار گرفته باشد، در کنار شعله با پنس استریل (شرایط آسپتیک) از پاکت آن خارج نمایید و در داخل لوله حاوی محیط کشت تریپتیک سوی براث (TSB) یا سوی بین کازئین دایجست براث تلقیح کنید. به همراه سایر لوله ها، حداقل به مدت ۴۸ ساعت در دمای $^{\circ}C$۱± ۳۶ انکوبه نمایید، لوله محیط کشت را هر روز از نظر ایجاد کدورت که علامت رشد باکتریایی است، بررسی نمایید.

اگر در لوله کنترل مثبت رشد و کدورت ایجاد نشود، نتایج سایر لوله ها قابل اعتماد نمی باشد. نباید از مواد قابل اشتعال یا انفجار در داخل اون استفاده شود.

ایمنی :

- باید از پاشیده شدن محلول های اسیدی یا بخارات خورنده در داخل اون جلوگیری نمود، تا از خوردگی سطوح و قفسه های داخلی پیشگیری شود.
- باید برای برداشتن وسایل از داخل اون، از وسایل حفاظت فردی مثل دستکش های عایق و مقاوم به حرارت، عینک ایمنی یا محافظ چشم استفاده گردد.

انکوباتور

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

الف _ **انکوباتورهای بدون CO_2**:

- تنظیم کننده دما را روی دمای مورد نظر قرار دهید. دمای انکوباتور را با دماسنج کالیبره اندازه گیری و کالیبره نموده و به طور روزانه و در دو نوبت بر روی منحنی دما، ثبت کنید.
- نمونه ها را به طور ایمن روی سینی ها یا قفسه ها قرار دهید.
- می توانید با قراردادن یک تشتک پر از آب متناسب با اندازه اتاقک در کف انکوباتور ، محیط مرطوب ایجاد نمایید .
- تمام عملیات نگهداری، تمیز کردن و دمای روزانه را در جداول مربوطه ثبت نمایید.

ب _ **انکوباتورهای CO_2 دار:**

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

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

نگهداری:

- همه انکوباتورها باید به طور ماهانه و نیز بعد از ریختن مواد عفونی، با استفاده از محلول گندزدای مناسب تمیز شوند.
- قبل از تمیز کردن، انکوباتور را از پریز برق جدا کنید.
- ا ز مواد تمیز کننده ای استفاده کنید که خراش ایجاد نمی کنند .سطوح داخلی و خارجی انکوباتور را با پارچه آغشته به محلول تمیز کننده ملایم تمیز کنید.
- از تماس بین مواد پاک کننده و ساختارهای الکتریکی خودداری نمایید.
- قبل از اتصال مجدد انکوباتور به برق، منتظر بمانید تا داخل انکوباتور خشک شود.

توجه : قبل از انجام هر گونه تعمیر، مطمئن شوید که انکوباتور، آلودگی زدایی، تمیز و از پریز برق جدا شده است.

- به منظور رعایت موارد ایمنی، کپسول های CO2 باید به صورت ایستاده با زنجیر سنگین به دیوار محکم شود .زمانی که از سیلندرها استفاده نمی شود، سوپاپ ها و درپوش ها باید به طور محکم بسته شوند .سیلندرهای خالی را روی حمل کننده سیلندر گاز به طور محکم با زنجیر نگهداری کنید .هرگزسیلندرهای گاز را در دمای بالاتر از$^{\circ}C$ ۵۲ نگهداری نکنید .سیلندرها را در وضعیت افقی قرار ندهید.

منابع :

١- Quality Assurance for commercially prepared Microbiological Culture Third edition document M22-–Media-Second Edition ; Approved standard. A3. Vol. 24 No.19; 2006.

٢- Oxoid company- General Guide to the use of Oxoid culture Media.

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

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

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

٦- Critical Values; Indiana University Health- 2011

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

٨- ٨Communication of Pathology Results, Document ID; GE- QA- 19.9- 2009

٩- Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests- Edition; M02–A11, Vol. 32 No. 1, January 2012 Approved Standard,

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

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

١٢- Microbiology Critical Values; Legacy Laboratory Services- 2011

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

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

١٥- Textbook of Diagnostic Microbiology; Mahon- 2011

١٦- Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology- 2007

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

۱۷- محیط های کشت آزمایشگاهی (موارد مصرف وکنترل کیفی) به انضمام اطلس رنگی محیط های کشت؛ گردآوری و ترجمه مهناز صارمی – محمدعلی صارمی؛ آزمایشگاه مرجع سلامت، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی؛ ۱۳۸۷