

فرم: دستورالعمل انجام آزمایشهای تشخیصی برای شناسایی باکتری های جدا شده از ادرار و نحوه تفسیر کشت آنها صفحه: ۱ از ۱۰	تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۷/۱۸ شماره سند:
بخش استقرار: میکروپ شناسی	آزمایشگاه مرجع معاونت بهداشت محدوده توزیع: تضمین کیفیت

دستورالعمل انجام آزمایشهای تشخیصی برای شناسایی باکتری های جدا شده از ادرار و نحوه تفسیر کشت ادرار

هدف:

- شناسایی صحیح باکتری های گرم مثبت و گرم منفی از یکدیگر و نحوه تفسیر درست آنها
- شناسایی صحیح مخمرها و نرمال فلور ها از باکتری های گرم مثبت و نحوه تفسیر درست آنها
- تفسیر و شناسایی استرپتوکوک آگلاکتیه از سایر استرپتوکوکها
- نحوه تفسیر کلنی کانت های کمتر از 10^5 که با توجه به علائم بالینی باید مورد توجه قرار گیرد.

اقدامات وابسته:

تمامی محیطهای کشت، مواد و معرفهایی که برای شناسایی باکتری مورد نظر به کار میروند قبل از استفاده باید با سوشهای استاندارد کنترل کیفی شوند. همچنین دیسکهای تشخیصی، استاندارد نیم مک فارلند و سایر لوازم مصرفی که برای شناسایی باکتریها به کار میروند قبل از استفاده باید کنترل کیفی شوند.

صلاحیت و شایستگی کاربر:

جهت حصول اطمینان از نحوه صحیح این آزمایش توسط پرسنل بخش، مطالعه کامل این دستورالعمل همراه با گذراندن دوره آزمایشی به مدت ۷ روز کاری تحت نظر مسئول بخش باتجربه مربوطه الزامی است.

مواد و لوازم مصرفی مورد نیاز:

- محیط کشت های افتراقی
- لام و لامل
- محلول رنگ آمیزی گرم
- معرف های کوآکس و MR-VP
- محلول پراکسید هیدروژن
- پلاسمای سیترا ته خرگوش
- پودر یا دیسک اکسیداز
- دیسکهای تشخیصی باسیترا سین و نئوبیوسین
- آنس
- سواپ استریل
- پنس
- پلپیت حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار

فرم: دستورالعمل انجام آزمایشهای تشخیصی برای شناسایی باکتری های جدا شده از ادرار و نحوه تفسیر کشت آنها صفحه: ۲ از ۱۰	 آزمایشگاه مرجع معاونت بهداشت	تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۷/۱۸ شماره سند:
بخش استقرار: میکروپ شناسی		محدوده توزیع: تضمین کیفیت

- پلیت حاوی محیط کشت مولر همراه با ۰.۵٪ خون گوسفندی

- جار بی هوازی

-لوله همولیز شیشه ای

تجهیزات مورد نیاز :

-میکروسکوپ

-شعله

-انکوباتور ۳۷ درجه

-هود میکروبیولوژی

-چراغ مطالعه

فرم: دستورالعمل انجام آزمایشهای تشخیصی برای شناسایی باکتری های جدا شده از ادرار و نحوه تفسیر کشت آنها صفحه: ۳ از ۱۰	 آزمایشگاه مرجع معاونت بهداشت	تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۷/۱۸ شماره سند:
بخش استقرار: میکروپ شناسی		محدوده توزیع: تضمین کیفیت

نحوه تفسیر و شناسایی باکتری های جدا شده از ادرار:

تفسیر:

تست کشت ادرار U/C جهت تشخیص عفونتهای باکتریایی مجاری ادراری (Urinary Tract Infection: UTI) شامل پیشابراه، مثانه، کلیه ها و پروستات که از قسمت های مختلف دستگاه ادراری می باشند و همگی محل های مستعد ابتلا به عفونت هستند. اغلب عفونتهای ادراری در اثر صعود باکتری ها و حرکت بالا رونده آنها از طریق مدخل ورودی پیشابراه ایجاد می شود که به ترتیب باعث ایجاد اورتیت، سیستیت و پیلونفریت میشود. عفونت های باکتریایی مثانه (سیستیت) و کلیه (پیلونفریت) در زنان شایع تر است. اورتریت بیشتر در مردان و افراد فعال از نظر جنسی رخ می دهد.

نتایج آنالیز ادرار اگر به صورت زیر باشند نشانگر عفونت احتمالی هستند و باید آزمون U/C مورد استفاده قرار گیرد.

(WBC یا باکتری در ادرار، PH قلیایی و مثبت شدن استراز لکوسیتی و نیتريت در نوار استریپ ادراری)

در صورتی که WBC بیمار در آنالیز ادرار بالای ۵ در هر میدان میکروسکوپی با X40، باشد و وجود باکتری در ادرار تشخیص داده شود؛ آنرا پیوری تلقی کرده و اگر یک نوع باکتری در محیط کشت رشد کرده باشد طبق دستورالعمل روی آن کار میکنیم.

در صورت رشد دو نوع باکتری بر روی محیط کشت روی هر دو نوع باکتری کار میکنیم.

رشد بیش از ۳ نوع باکتری در محیط کشت آلودگی محسوب میشود و مربوط به آلودگی ثانویه با پوست و ناحیه تناسلی می باشد و Mix growth گزارش می شود.

رشد یک باکتری پاتوژن باکتری کانت زیر ۱۰ هزار و با گلبول سفید زیر ۵ عدد با عدسی ۴۰ بی اهمیت است.

فرم: دستورالعمل انجام آزمایشهای تشخیصی برای شناسایی باکتری های جدا شده از ادرار و نحوه تفسیر کشت آنها صفحه: ۴ از ۱۰	 آزمایشگاه مرجع معاونت بهداشت	تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۷/۱۸ شماره سند:
بخش استقرار: میکروپ شناسی		محدوده توزیع: تضمین کیفیت

جدول ۱- نحوه تفسیر، گزارش کشت ادرار و محل جداسازی باکتری

محل جداسازی رشد	ادرار میانی لوپ ۱۰ الاندا	ادرار کاتانتر	سوپراپوئیک لوپ ۱۰ الاندا	مردان علامتدار	سندرم پورتال حاد نرمال
یک نوع	کمتر از ۱۰ ^۵ کلنی رشد: بدون اهمیت رشد بالای ۱۰ ^۵ کلنی: بررسی و آنتی بیوگرام	بررسی هر تعداد کلنی و آنتی بیوگرام	بررسی هر تعداد کلنی و آنتی بیوگرام	بالای هزار کلنی بررسی شود	۱۰۰ کلنی در صورت پیوری
دو نوع	هر دو بالای ۱۰ ^۵ بررسی و آنتی بیوگرام	هر دو بالای ۱۰ ^۵ بررسی و آنتی بیوگرام	بررسی هر تعداد کلنی و آنتی بیوگرام	-	-
دونوع و یک نوع غالب	تنها ارگانیسم غالب بررسی شود.	تنها ارگانیسم غالب بررسی گردد.	بررسی هر تعداد کلنی و آنتی بیوگرام	-	-
بیش از دو نوع	آلودگی و تکرار (Mixed growth)	آلودگی و تکرار (Mixed growth)	بررسی هر تعداد کلنی و آنتی بیوگرام	-	-
خالص استافیلوکوک	هر تعداد بررسی	هر تعداد بررسی	هر تعداد بررسی	هر تعداد بررسی	هر تعداد بررسی

روش شناسایی باکتری های رشد یافته روی محیط کشت:

ابتدا محیط کشتهای رشد یافته در انکوباتور ۳۷ درجه را در دمای اتاق قرار دهید و بررسی محیطهای کشت از نظر باکتری های گرم مثبت و گرم منفی طبق مراحل زیر انجام میگیرد.

اگر روی محیط کشت بلاد آگار باکتری قابل تشخیص رشد کرده باشد و روی EMB و یا مک کانکی رشد نکرده باشد، نشان میدهد که به احتمال قوی باکتری گرم مثبت است برای اطمینان بیشتر یک لام مرطوب تهیه میکنید و زیر میکروسکوپ باکتری را از نظر مخمرها، لاکتوباسیها و سایر باسیلهای گرم مثبت (اکتینومایستها) افتراق دهید. بهتر است یک رنگ آمیزی گرم هم انجام بگیرد.

فرم: دستورالعمل انجام آزمایشهای تشخیصی برای شناسایی باکتری های جدا شده از ادرار و نحوه تفسیر کشت آنها صفحه: ۵ از ۱۰	 آزمایشگاه مرجع معاونت بهداشت	تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۷/۱۸ شماره سند:
بخش استقرار: میکروپ شناسی		محدوده توزیع: تضمین کیفیت

برای تشخیص باکتری های گرم مثبت از یکدیگر ابتدا آزمایش کاتالاز انجام دهید. با توجه به جواب آزمایش کاتالاز (استافیلوکوکها و میکروکوکها: کاتالاز مثبت و استرپتوکوکها: کاتالاز منفی) طبق چارتهای زیر، باکتریهای گرم مثبت از یکدیگر تشخیص داده میشوند.

نکته: برای شناسایی گونه های استافیلوکوک از یکدیگر می توانید از محیط مانیتول سالت آگار استفاده کنید اگر باکتری مورد نظر روی محیط مانیتول سالت آگار رشد کرد و رنگ محیط را از قرمز به زرد تغییر دهد به طوری که کل محیط زرد بشود (محیط داخل لوله شیشه ای به صورت شیبدار درست شده باشد) باکتری استاف اورئوس است. اگر فقط سطح شیبدار زرد شده باشد باکتری استاف ساپروفیتکوس است. اما اگر رنگ محیط تغییری نکرده باشد و به رنگ قرمز باقی مانده باشد باکتری استاف اپیدرمیدیس است

نکته :

انتروکوک ها اغلب پس از ۲۴-۴۸ ساعت بر روی محیط EMB رشد ضعیفی دارند و کلنی های ریز ایجاد میکنند. انتروکوک ها بایل اسکولین مثبت هستند. جهت حصول نتیجه باید آنرا تا ۴۸ ساعت در انکوباتور نگهداری کنید. بررسی نوع همولیز در انتروکوک ها باید در محیط بلاد آگار حاوی خون گوسفندی انجام گیرد.

رشد انتروکوک ها در محیط مایع حاوی NaCl 6.5% مثبت است. برای تهیه آن در ۱۰۰ سی سی از محیط هارت اینفیوژن براث و یا (TSB) مقدار ۶ گرم کلرورسدیم اضافه کنید. (توجه نمایید که محیط های فوق حاوی نیم گرم NaCl می باشند)، سپس آنرا در لوله های متوسط به میزان ۵ سی سی ریخته و اتو کلاو نمایید.

برای انجام این تست یک لوپ کوچک از کلنی رشد کرده در محیط بلاد آگار را به داخل محیط مایع فوق تلقیح کرده و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور قرار دهید بعد از مدت فوق در صورت رشد رنگ محیط کدر می شود. ولی به آن اکتفاء نکنید و حتما رنگ آمیزی گرم انجام و کوکسی های گرم مثبت و یا زنجیره ای کوتاه زیر میکروسکوپ مشاهده نموده تا به نتیجه کار اطمینان حاصل کنید.

نکته :

برای شناسایی استرپتوکوکهای بتا همولیتیک در کنار دیسک تشخیصی باسیتراسین حتما باید تست حساسیت برای دیسک SXT هم انجام گیرد.

فرم: دستورالعمل انجام آزمایشهای تشخیصی برای شناسایی باکتری های جدا شده از ادرار و نحوه تفسیر کشت آنها صفحه: ۱۰ از ۱۰	 آزمایشگاه مرجع معاونت بهداشت	تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۷/۱۸ شماره سند:
بخش استقرار: میکروپ شناسی		محدوده توزیع: تضمین کیفیت

جدول ۲- نحوه افتراق و شناسائی استرپتوکوک های بتاهمولیتیک

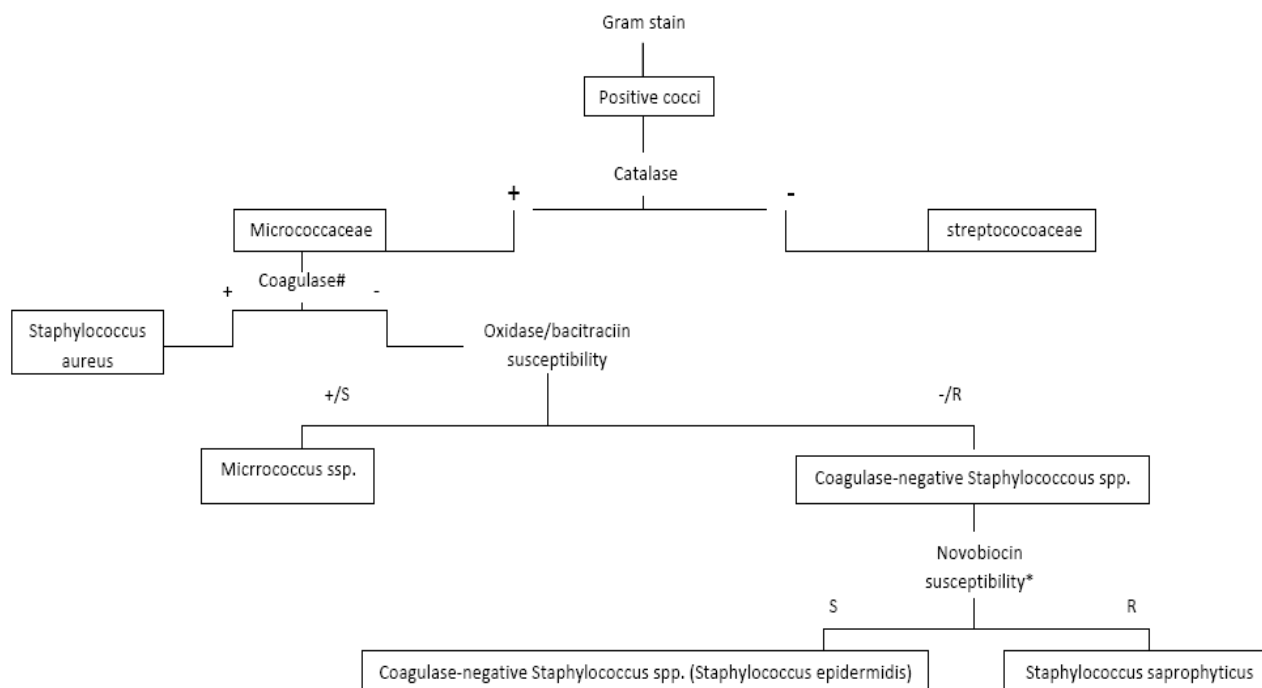
Bacitracin	SXT	
S ^۱	R	Group A
R ^۲	R	Group B
S/R	S	Non group A or B

حساس^۱

مقاوم^۲

فرم: دستورالعمل انجام آزمایشهای تشخیصی برای شناسایی باکتری های جدا شده از ادرار و نحوه تفسیر کشت آنها صفحه: ۷ از ۱۰ بخش استقرار: میکروپ شناسی	تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۷/۱۸ شماره سند: آزمایشگاه مرجع معاونت بهداشت سلامت پرست	تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۷/۱۸ شماره سند: محدوده توزیع: تضمین کیفیت
---	---	--

چارت شناسایی گونه های استافیلوکوک

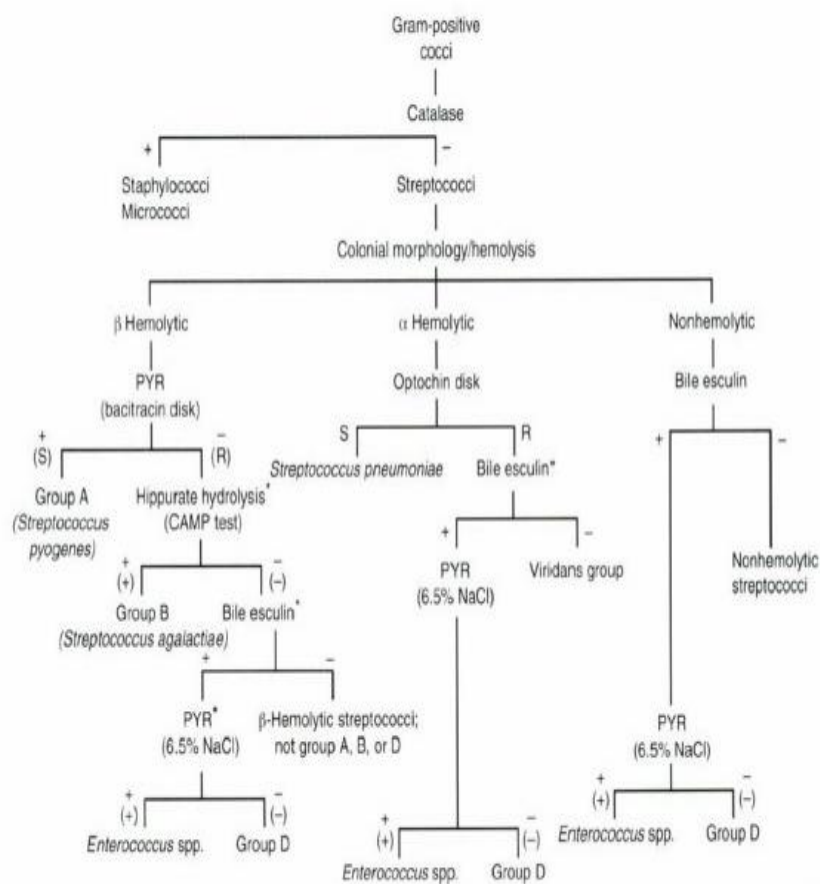


Novobiocin susceptibility → S:16mm ≤ *

علاوه بر S.aureus ، S.lugdunensis ، S.intermedius ، S.schleferi و S.tryicus نیز کوآگولاز مثبت می باشند.

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۷/۱۸ شماره سند:	 سازمان بهداشت و آموزش پزشکی	فرم: دستورالعمل انجام آزمایشهای تشخیصی برای شناسایی باکتری های جدا شده از ادرار و نحوه تفسیر کشت آنها صفحه: ۸ از ۱۰
محدوده توزیع: تضمین کیفیت	آزمایشگاه مرجع معاونت بهداشت	بخش استقرار: میکروپ شناسی

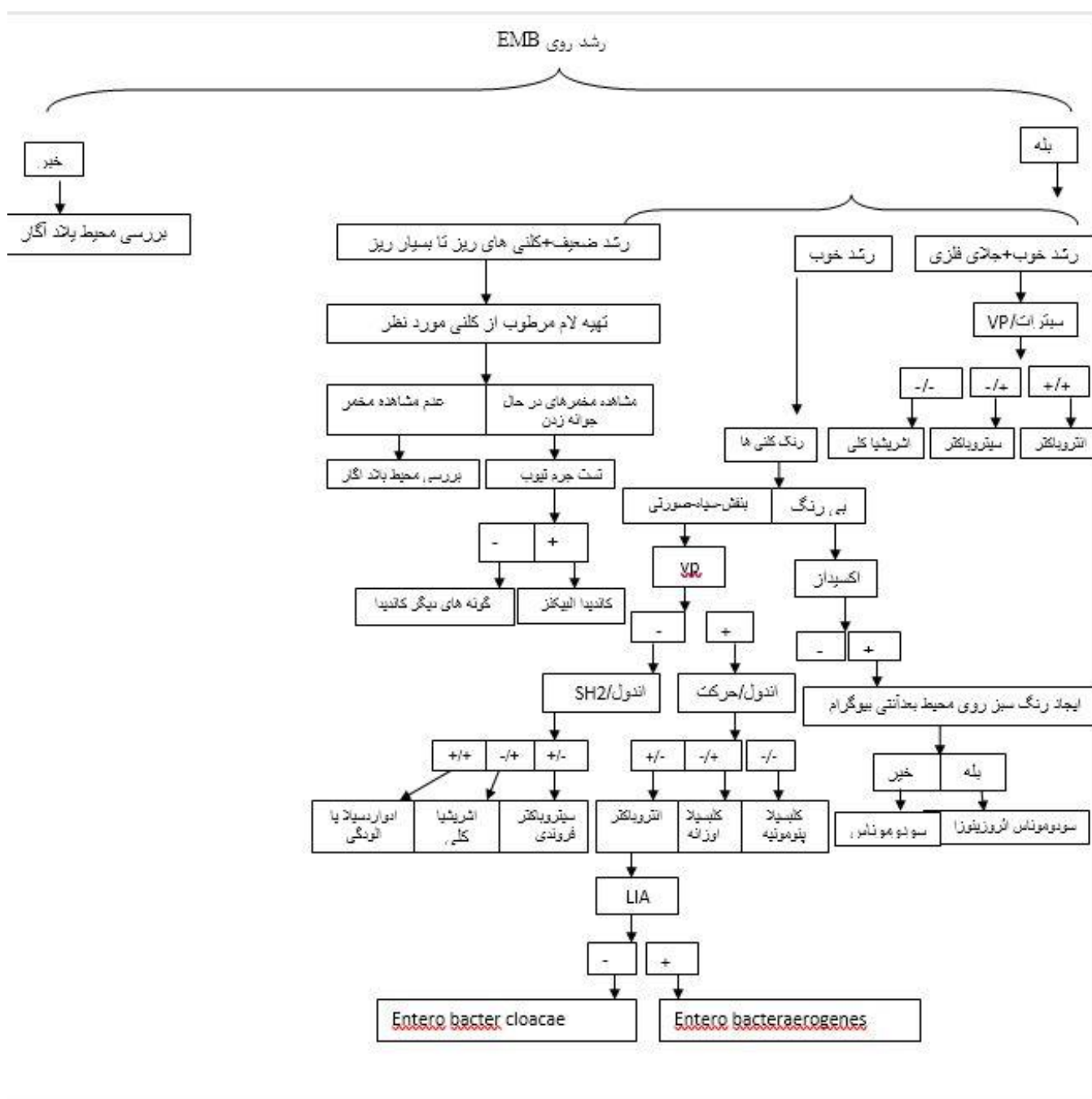
چارت شناسائی کوکسی های گرم مثبت کاتالاز منفی



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

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۷/۱۸ شماره سند:	 سازمان بهداشت و آموزش پزشکی	فرم: دستورالعمل انجام آزمایشهای تشخیصی برای شناسایی باکتری های جدا شده از ادرار و نحوه تفسیر کشت آنها صفحه: ۹ از ۱۰
محدوده توزیع: تضمین کیفیت	آزمایشگاه مرجع معاونت بهداشت	بخش استقرار: میکروب شناسی

اگر روی محیط بلاد آگار، EMB و مک کانکی کلنی های قابل تشخیص رشد کرده باشد به احتمال قوی میکروب گرم منفی می باشد (ولی این موضوع صد در صد نمیباشد و بعضی از کوکسیهای گرم مثبت مثل انتروکوک ها روی محیط EMB رشد میکنند). حتما رنگ آمیزی گرم انجام دهید. برای شناسایی باکتری مورد نظر باید تمام آزمون های بیوشیمیایی (گالری میکروبی) برای باکتری مورد نظر انجام گردد. توجه داشته باشید که تمامی محیطهای افتراقی نیم ساعت قبل از استفاده از یخچال بیرون گذاشته شوند. از چارت زیر برای شناسایی باکتری های گرم منفی عامل عفونتهای ادراری می توانید استفاده کنید



فرم: دستورالعمل انجام آزمایشهای تشخیصی برای شناسایی باکتری های جدا شده از ادرار و نحوه تفسیر کشت آنها صفحه: ۱۰ از ۱۰	 آزمایشگاه مرجع معاونت بهداشت	تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۷/۱۸ شماره سند:
بخش استقرار: میکروپ شناسی		محدوده توزیع: تضمین کیفیت

بعد از شناسایی باکتری رشد یافته روی محیطهای کشت تعداد کلونی ها را در ضریب لوپ ضرب کرده و بصورت CFU/ml گزارش کنید.

ایمنی:

کاربر باید قبل از انجام آزمایش مجهز به وسایل حفاظت ایمنی شخصی PPE (دستکش، روپوش سفید و...) باشد تمامی محیط های کشت و سایر مواد عفونی را بعد از آلودگی زدایی به صورت ایمن دفع کنید. وسایل مصرفی تیز و برنده را به صورت ایمن در Safety box دفع کند.

مراجع:

دستورالعملهای آزمایشگاه مرجع سلامت وزارت بهداشت

نام و امضاء تهیه کننده:	نام و امضاء تصویب کننده:	نام و امضاء تایید کننده:
حوریه قربانی - کارشناس آزمایشگاه الهام اکبری - کارشناس ارشد باکتری شناسی پزشکی	علی حقی - کارشناس ارشد باکتری شناسی پزشکی	