عنوان کتاب

(درسنامه عملی میکروب‌شناسی)

تألیف: نام نویسنده

ترجمه: نام مترجم

نوبت و سال چاپ : چهارم . ۱۳۹۸

سرشناسنامه	:	شاهسوان، شادی، ۱۳۶۱ -
عنوان و نام پدیدآورندگان	:	تکنسین آزمایشگاه (پذیرش و نمونه‌گیری)/ تألیف شادی شاهسوان.
مشخصات نشر	:	تهران، انتشارات ابن سینا، ۱۳۹۸.
مشخصات ظاهری	:	۸۸ ص.: مصور، جدول، نمودار.
شابک	:	۹۷۸-۶۰۰-۲۴۰-۲۸۸-۲
وضعیت فهرست نویسی	:	فیپا مختصر
موضوع	:	Cytology
شماره کتاب‌شناسی ملی	:	۴۲۳۱۷۵۸

انتشارات ابن سینا

عنوان کتاب : تکنیسین آزمایشگاه (درسنامه عملی میکروب‌شناسی)

تألیف : دکتر اصغر فتایی- مریم شاملی- مریم اکباتانی‌نژاد

ناشر : زعیم

ناظر چاپ : صالح خوارزمی

تیتراژ : ۱۰۰۰ نسخه

نوبت چاپ : اول ۱۳۹۸

شابک : ۹۷۸-۶۰۰-۲۴۰-۲۸۸-۲

قیمت : ۳۰۰۰۰ تومان

تلفن : ۶۶۴۸۲۸۳۰ ۰۲۱-۶۶۴۸۶۱۱۵ https://www.pressebnesina.com

به انتشارات ابن سینا بپیوندید : @ebnesinapub @ebnesinapub

حق چاپ محفوظ است.

مقدمه

«حمد و سپاس خداوندی را که خلقت او مایه شگفتی و هدایت او مایه سعادت خلق است. از بی‌کرانه‌های علم و حکمت و سرچشمه‌های نور و هدایت کتاب و عترت و خاندان عصمت و طهارت ما را بهره‌مند ساخت»

تا روزی که کتابی جامع در پاتولوژی بالینی متناسب با اپیدمیولوژی بیماری‌ها در ایران، امکانات علمی، فنی و اقتصادی کشورمان و نیز اهداف تربیتی کاردان‌ها، کارشناس‌ها و پزشکان توسط اساتید عالم و باتجربه خودمان تألیف نشده باشد، ناچار به بهره‌گیری از متون معتبر خارجی هستیم که بی‌شک یکی از معتبرترین آن‌ها کتاب Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods می‌باشد. این کتاب منبع درسی بی‌رقیب طب آزمایشگاهی از حدود یکصد و هشت سال پیش می‌باشد و پاسخگوی مشکلاتی است که پزشک در انتخاب یک تست مناسب، روش انجام آن، تفسیر داده‌ها و پیگیری وضع بیماران با آن روبرو می‌باشد. در چاپ جدید اطلاعات ذی قیمتی در مورد تکنولوژی‌های تازه و سیستم‌های اتوماسیون ارائه شده است. اینجانب این کتاب را به کلیه دستیاران پاتولوژی و رشته‌های مرتبط با آزمایشگاه توصیه می‌کنم و امیدوارم که از دانش دریافتی در امور خیر و بهبود وضع سلامت بیماران در هر شرایطی استفاده شود.

ما باید بدانیم هرچه نادانسته‌های ما بیشتر باشد، یعنی داناتر هستیم. یعنی به قول بزرگان تاریخ علم، دانش حقیقی این است که بدانیم که نادانیم (سقراط). رسیدن واقعی به این مرحله بسیار سخت است و نیاز به زحمات بسیار دارد. ما در زندگی زحمات زیادی را متحمل می‌شویم ولی مطمئن باشید وقتی می‌توانید این زحمت و رنج کشیدن را تحمل بلکه از آن لذت نیز ببرید که عاشق باشید. عشق به چه؟ عشق

به شناسایی مجهولات بیشتر. عشق به فهمیدن و ایجاد مجهولات بیشتر. عشق به تلاش در این راه. عشق به یادگیری. عشق رسیدن به هدف نهایی. این عشق تمام سختی‌های شما را تبدیل به لذت می‌کند. اگر تا دیر وقت از خواب خود می‌گذرید و کتاب و مقالات را می‌خوانید، اگر با تحمل و تنگدستی و با قبول عدم توجه عدم توجه به لذایذ مادی در مطالب علمی غوطه ور هستید، همه این سختی‌ها زمانی لذت‌بخش می‌گردد و دیگر سختی به لذت تبدیل می‌شود که عاشق باشید. من شما عزیزان را قسم به آنچه قبول دارید می‌دهم که اگر عاشق نیستید هرگز در این مسیر قدم نگذارید. انسان‌ها بی‌نهایت طلب هستند، اگه به بی‌نهایتی علم ندارید شاید بی‌نهایتی ثروت شما را ارضاع کند ولی مطمئن باشید اگرچه ثروت نهایت ندارد ولی عمر و جسم شما نهایت دارد و خواهید رفت. به هر حال تنها عشق است که توانایی خلق می‌کند و توانایی است که حرکت می‌آفریند و حرکت است که رسیدن به معشوق را میسر و لذت بخش می‌کند. دانشمندی دانشمند واقعی می‌شود که عاشق علم و هدفی که دارد باشد.

هدف از انتشار این کتاب که یکی از دروس اساسی در رشته میکروب‌شناسی پزشکی است، آشنایی خوانندگان، دانشجویان و محققین با پایه‌های علم میکروب می‌باشد. این کتاب به طور خلاصه مطالب اساسی مرتبط با میکروب را مبتنی بر ارتباطات آن در رشته پزشکی تبیین می‌نماید. مطالعه این کتاب می‌تواند افق‌های جدیدی از رشته میکروب را برای دانشجویان پزشکی و کارشناسی ارشد شاخه‌های علوم زیستی روشن خواهد نمود. اساساً مطالعه کتب علمی از متن اصلی، بهترین روش در آموزش می‌باشد ولی چنین اقدامی نیاز به یک‌سری پیش نیازهایی دارد که یکی از آن‌ها تسلط به زبان اصلی کتاب و اصطلاحات رشته مذکور می‌باشد. لذا تألیف کتب و مطالب علمی می‌تواند در تسهیل و کاهش زمان مطالعه و تحفیظ مطالب کمک کننده باشند البته به شرط رسایی و شیوایی آن‌ها. در تألیف اینجانب و دانشجویان و هکاران عزیز اولاً مطالب اضافه علمی را که به‌نظر می‌رسید در تفهیم و تعلیم مطالب بخش‌های مختلف

برای خواننده مؤثر باشند را به‌طور مشخص شده رعایت نموده‌ایم و همچنین حفظ قداست زبان فارسی در تداخل با اصطلاحات تخصصی مطالب ارزشمند کتاب حاضر را برای خوانندگان شیوا و رسا نماییم، هر چند یقیناً به دلیل قلم قاصر ما در مطالب ارائه شده شاید اشکالاتی یافت گردد که تذکر آن‌ها به ما باعث مزید امتنان و تشکر خواهد گردید و در چاپ‌های آتی سعی بر رفع آن‌ها خواهد شد.

موفقیت شما آرزوی ماست

دکتر شادی شاهسوان

استاد گروه پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

استاد گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی

۱۳۹۸

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: تشخیص و تأثیر آن بر درمان ۹
مراحل تشخیص عامل بیماری عفونی ۹
مرحله پیش تحلیلی ۱۲
نکات مهم در جمع آوری نمونه: ۱۲
انتقال نمونه ۱۷
دریافت نمونه و مشاهده مقدماتی ۱۹
شاخص‌های بازگرداندن نمونه‌های بالینی ۲۰
آنالیز نمونه‌ها ۲۱
استریلیزاسیون و ضد عفونی کردن: ۲۲
روش‌های استریلیزاسیون: ۲۲
روش‌های فیزیکی ۲۲
روش‌های ضد عفونی کردن: ۲۷
ب: روش‌های شیمیایی ضد عفونی کردن ۲۸
فصل دوم: روش‌های مطالعه میکروب‌شناسی نمونه‌های بالینی ۳۱
میکروبیولوژی ملکولی..... ۳۳
روشMass Spectrometry ۳۵
روش کشت ۳۵
روش‌های میکروسکوپی ۳۶
مشاهده مستقیم میکروسکوپ‌ها ۳۶
رنگ آمیزی گرم: ۳۷
تهیه گسترش ۳۷

تهیه نمونه از محیط کشت جامد و مایع ۳۸
تهیه گسترش از محیط جامد ۳۹
مراحل رنگ آمیزی گرم ۴۰
مشاهده با میکروسکوپ نوری ۴۱
اشکال و آرایش باکتری‌ها ۴۱
رنگ آمیزی ساده ۴۳
رنگ آمیزی اختصاصی ۴۳
رنگ آمیزی مقاوم به اسید (Acid fast stains)..... ۴۳
رنگ آمیزی مقاوم به اسید به روش زیل نلسن..... ۴۴
رنگ آمیزی فونتانا ۴۴
رنگ آمیزی آلبرت Albert stains ۴۵
رنگ آمیزی ورمالاشیت: ۴۵
فصل سوم: کشت باکتری‌ها ۴۷
انتخاب محیط‌های کشت مناسب ۴۸
انواع محیط‌های کشت ۴۸
روش‌های کشت نمونه بالینی..... ۴۹
کشت به روش ایزولاسیون بر روی محیط کشت آگار ۴۹
کشت Streaking بر روی محیط آگار جهت شمارش کلنی‌ها ۵۰
کشت در لوله‌های حاوی محیط کشت: ۵۱
کشت در لوله حاوی محیط مایع ۵۲
کشت در لوله حاوی محیط جامد شیب دار ۵۴
کشت در لوله حاوی محیط نیمه جامد ۵۴
دما، اتمسفر و رطوبت مناسب جهت رشد باکتری‌ها ۵۴
تفسیر نتایج کشت: ۵۵

فصل چهارم: پیشگیری از انتقال عفونت ۷۳
غربالگری افراد در معرض خطر بالا ۷۴
غربالگری جمعیت ۷۷
شاخص‌های یک برنامه غربالگری ۸۱
غربالگری پیش و پس از تولد ۸۴
ملاحظات اخلاقی در تشخیص ۸۷

واژه‌نامه ۹۵
پرسش‌های چند گزینه‌ای ۱۰۹
ضمیمه ۱۲۱
نمایه ۱۳۳

فصل اول

تشخیص و تأثیر آن بر درمان

روند تشخیص بیماری‌های عفونی پیچیده است. پزشک متخصص ممکن است بر اساس سابقه بیماری، علائم، بررسی‌های فیزیکی و اطلاعات اپیدمیولوژی قادر به تشخیص کلینیکی بیماری باشد.

اما تشخیص عامل بیماری عفونی ممکن است خیلی مشکل‌تر بوده و وابسته به تهیه نمونه‌ای با کیفیت قابل قبول، انتقال در شرایط صحیح و نتایج آزمایش‌ها یک آزمایشگاه میکروبیولوژی بالینی می‌باشد. علائم ناشی از بیماری‌ها با عوامل مختلف می‌توانند هم‌پوشانی داشته باشند و هم‌چنین یک‌روند عفونی می‌تواند اندام‌های گوناگونی را درگیر کند، بنابراین جهت درمان، نیاز به تشخیص عامل اصلی بیماری عفونی و استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر می‌باشد. درواقع عدم‌تشخیص دقیق و به‌موقع عامل بیماری، منتهی به درمان تجربی می‌شود و یا در مواردی مانند بیماری با چند عامل میکروبی و غیره باعث طولانی شدن درمان شود.

درمان تجربی احتمال واکنش‌های دارویی نامطلوب، تغییر میکروبیوم بیماران و انتخاب میکروب‌های جهش‌یافته‌ی مقاوم را افزایش داده که به روش غیرمستقیم می‌تواند سلامت بیماران را به خطر بیندازد. چنین آسیب‌های جانبی، تأکیدی بر لزوم اجرای آزمایش‌ها دقیق و سریعی جهت تشخیص عامل بیماری باشد.

خوشبختانه امروزه ابزار زیادی برای مبارزه با بیماری‌ها در اختیار بشر می‌باشد که همچنان در حال پیشرفت است و سبب شده است که عوامل میکروبی با سرعت بیش‌تر

تشخیص داده شوند. البته هنوز هم روش‌های قدیمی کشت و شناسایی برای برخی از باکتری‌ها بااهمیت می‌باشد.

مراحل تشخیص عامل بیماری عفونی

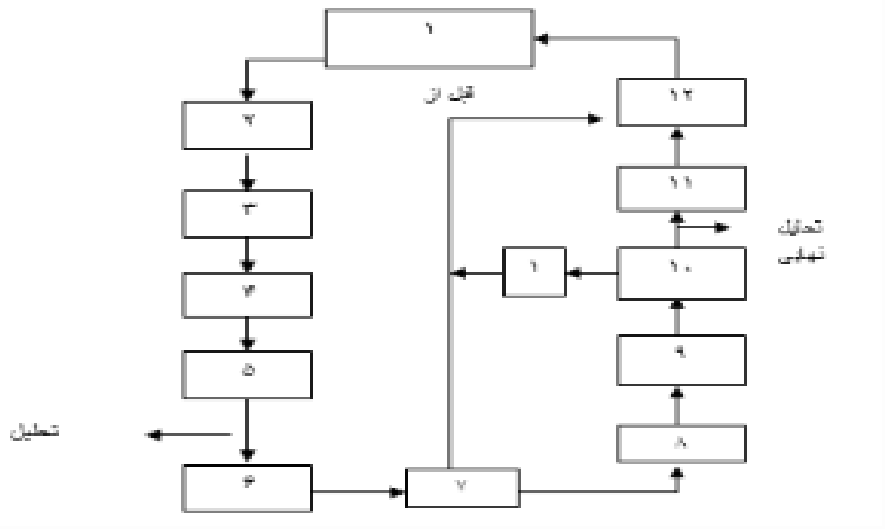
ارزیابی آزمایشگاهی نمونه بالینی شامل ۳ مرحله می‌باشد (شکل۱-۱، شکل۲-۱):

۱- مرحله پیش‌تحلیل (Pre Analytical)

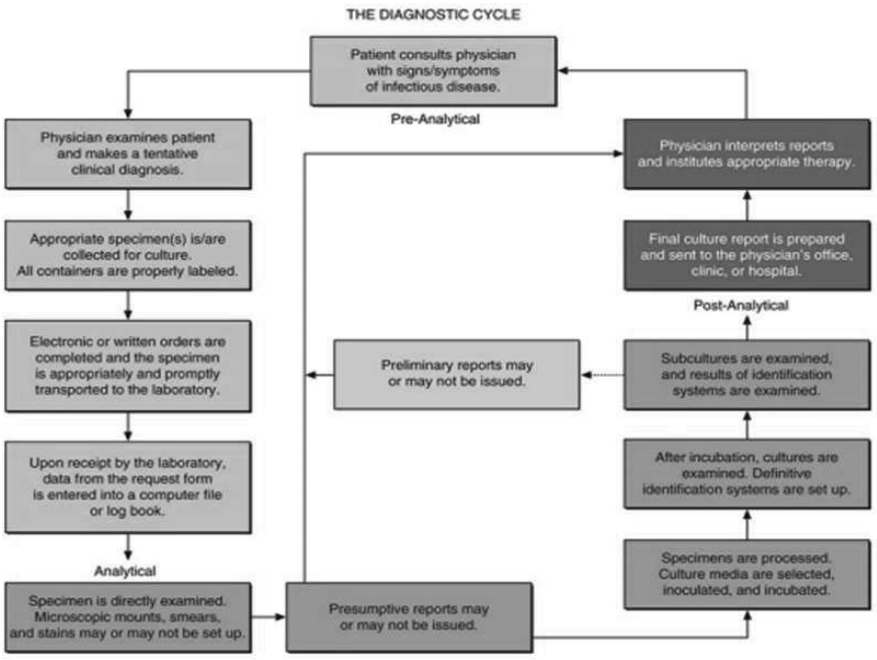
۲- مراحل تحلیل (Analytical)

۳- مرحله پساتحلیل (Post Analytical)

جهت رسیدن به نتیجه مطلوب دقت در هر یک از این مراحل ضروری و حائز اهمیت می‌باشد.



شکل ۱-۱ مراحل تشخیص بالینی و آزمایشگاهی بیماری‌های عفونی



شکل ۲-۱ مراحل تشخیص بالینی و آزمایشگاهی بیماری‌های عفونی

۱- مشاوره بیمار با پزشک و ارائه علائم و نشانه‌های بیماری عفونی

۲- معاینه بیمار توسط پزشک و تشخیص بالینی تجربی

۳- تهیه نمونه یا نمونه‌های مناسب جهت کشت، به طوری که تمام نمونه‌ها دارای برچسب مشخصات باشند.

۴- درخواست آزمایش‌ها به‌صورت دست‌نویس یا الکترونیکی و انتقال نمونه‌ها به روش صحیح

۵- پذیرش نمونه توسط آزمایشگاه و ثبت داده‌ها بر اساس برگه درخواست ارسالی در یک فایل کامپیوتری یا یک دفتر

۶- آزمایش مستقیم نمونه

۷- گزارش‌ها احتمالی به پزشک در صورت امکان

۸- بررسی نمونه‌ها (انتخاب محیط‌های کشت، تلقیح نمونه‌ها و گرما گذاری)

۹- بررسی محیط‌های کشت و شناسایی بر اساس دستور عمل آزمایشگاه

۱۰- بررسی محیط‌های کشت و آزمایش‌هایی که جهت شناسایی انجام‌شده است

۱۱- تهیه گزارش نهایی کشت و ارسال به پزشک (کلینیک یا بیمارستان)

۱۲- تفسیر گزارش‌ها توسط پزشک و درمان مناسب

۱۳- گزارش اولیه (در صورت امکان)

مرحله پیش تحلیلی (Pre-Analytical)

۱- مشاوره بیمار با پزشک و ارائه علائم و نشانه‌های بیماری عفونی

۲- معاینه بیمار توسط پزشک و تشخیص بالینی تجربی

۳- نمونه‌برداری: در بررسی عامل بیماری عفونی، باید نمونه‌های مختلفی جهت کشت میکروبی، مطالعات سرولوژیک و یا بررسی مولکولی تهیه شود.

جمع‌آوری نمونه صحیح و مناسب و انتقال آن در شرایط صحیح از مراحل بسیار مهم و مؤثر در تشخیص عامل بیماری می‌باشد. یک نمونه نامناسب، سبب عدم شناسایی عامل اصلی عفونت و درنهایت منجر به درمان نادرست و حتی مضر برای بیمار می‌شود.

نکات مهم در جمع‌آوری نمونه:

۱- نمونه باید از محل واقعی عفونت با حداقل آلودگی تهیه شود؛ برای مثال در بررسی عفونت استرپتوکوکی حلق، باید سوآپ فقط در تماس با لوزه‌ها و بخش پشتی حلق باشد و با سایر قسمت‌های دهان و بزاق تماسی نداشته باشد. چون در این نواحی

به‌طور طبیعی باکتری‌های زیادی ساکن هستند و سبب عدم شناسایی صحیح عامل عفونت و شکست درمان می‌شود (شکل ۳-۱). از مثال‌های دیگر می‌توان به وجود باکتری‌های ساکن بافت‌های اطراف پیشاب‌راه[۱] و پرینه[۲] قبل از جمع‌آوری ادرار در خانم‌ها، آلودگی نمونه اندومتریال[۳] با ترشحات واژن باشد.

۲- زمان مناسب جمع‌آوری، در هر نمونه‌برداری در نظر گرفته شود. برای تعیین این زمان سیر بیماری[۴] و بیماری عفونی[۵] اهمیت زیادی دارند. برای مثال در بیماری تیفوئید (حصبه) در طی هفته اول می‌توان باکتری را از کشت خون جداسازی نمود، درحالی‌که در هفته دوم و سوم باکتری از نمونه مدفوع و ادرار بهتر جداسازی می‌شود. مثال دیگر نامناسب بودن جمع‌آوری نمونه‌های ۲۴ ساعته جهت کشت باکتری می‌باشد که به علت افزایش احتمال آلودگی و رشد باکتری‌های همزیست نتایج صحیحی نخواهند داشت، مانند نمونه ۲۴ ساعته ادرار و خلط.

شکل ۳-۱: نمونه‌برداری از حلق توسط سوآپ استریل

۱- Perurethral
۲- Perineum
۳- Endometrial
٤- naturalhistory
٥- pathophysiology

۳- مقدار نمونه‌های آزمایش‌های درخواستی کافی باشد. نمونه‌های کم ممکن است منجر به عدم‌تشخیص عامل عفونت شود، به همین جهت بر روی محیط‌های کشت خون مقدار لازم برای تزریق خون به محیط ثبت‌شده است.

۴- استفاده از ابزار مناسب نمونه‌برداری، ظروف نمونه، محیط‌های کشت و انتقال بسیار مهم می‌باشد. ظروف نمونه باید استریل بوده، استفاده از آن آسان باشد، درب آن‌ها کاملاً بسته‌شده و هیچ‌گونه نشتی وجود نداشته باشد.

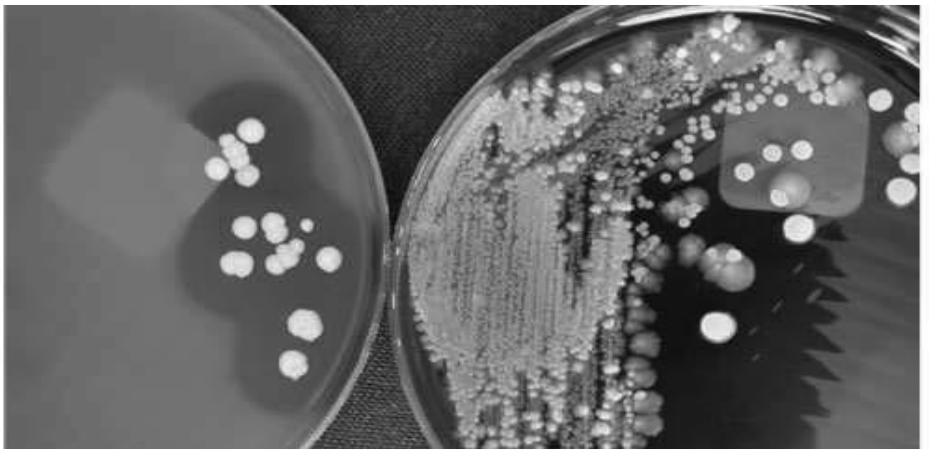
سوآپ‌ها ابزار متداولی برای جمع‌آوری نمونه‌ها جهت کشت باکتری‌ها می‌باشند البته در مواردی که امکان آسپیراسیون ترشحات توسط سرنگ یا برداشت بافت ممکن باشد، بهتر است از این ابزار استفاده شود (شکل ۴-۱).

نکاتی که در استفاده از سوآپ‌ها باید در نظر گرفته شود:

- سوآپ‌هایی از جنس کتان ممکن است حاوی اسیدهای چرب، کلسیم و آلژینات بوده و رشد باکتری‌های پرنیاز را مهار کنند. سوآپ‌هایی از جنس داکرون یا پلی‌استر ریون غالباً مناسب‌تر هستند.

- نمونه‌ها نباید مدت طولانی بر روی سوآپ باقی بمانند. علاوه بر سمیت مواد تشکیل‌دهنده سوآپ‌ها، توانایی جذب و سپس آزادسازی نمونه‌ها در آن‌ها متفاوت می‌باشد.

- سوآپ‌ها جهت جلوگیری از خشک شدن و مرگ باکتری‌ها باید در محیط انتقال یا ظروف مرطوب حمل شوند. البته در برخی نمونه‌ها مانند تراشه‌های پوست و یا ناخن جهت بررسی قارچ‌ها باید سوآپ‌ها در ظروف خشک انتقال داده شوند. هم‌چنین نمونه‌ها باید توسط دو سوآپ جمع‌آوری شوند تا نمونه کافی برای آزمایش‌ها مستقیم و کشت وجود داشته باشد.



شکل ٤-١: پلیت سمت چپ تصویر مربوط به نمونه‌برداری توسط سرنگ می‌باشد و پلیت سمت راست مربوط به همان نمونه، ولی برداشت توسط سوآپ

برای جمع‌آوری نمونه‌های بی‌هوازی، سوآپ ابزار مناسبی نیست و بهتر است نمونه توسط یک سرنگ استریل آسپیره شود، همچنین نمونه باید از خشک شدن و تماس با اکسیژن محافظت شود. البته امروزه محیط‌های انتقالی تولید شده است که می‌تواند هم باکتری‌های هوازی و هم بی‌هوازی را محافظت نماید.

۵- در صورت امکان نمونه‌ها قبل از تجویز آنتی‌بیوتیک جمع‌آوری شوند.

۶- علاوه برکشت باید از نمونه‌ها گسترش تهیه‌شده و مستقیماً بررسی شود. یکی از مواردی که تهیه گسترش در تشخیص آن بسیار کمک‌کننده است، بررسی نمونه خلط می‌باشد. مشاهده میکروسکوپی خلط به ما این امکان را می‌دهد که بتوانیم ماهیت التهابی نمونه و وجود باکتری را بررسی نموده و نتایج کشت را با این داده‌ها ارزیابی کنیم. برای مثال اگر در گسترش خلط، فراوانی سلول‌های اپی‌تلیال و میکروبیوتا را مشاهده کنیم، نباید نمونه کشت داده شود.

۷- ظروف حاوی نمونه باید دارای برچسب با ذکر مشخصات باشند. حداقل مشخصات شامل نام کامل بیمار، شماره معرف بیمار، منبع نمونه، نام پزشک و شماره تماس، تاریخ و ساعت جمع‌آوری نمونه می‌باشد. ذکر منبع نمونه و مصرف آنتی‌بیوتیک به انتخاب بهتر محیط کشت کمک نموده و همچنین نام و شماره تماس پزشک، جهت مشاوره و اطلاع‌رسانی یافته‌های اولیه مهم می‌باشد.

انتقال نمونه:

نکته اولیه در انتقال نمونه‌ها، فاصله محل نمونه‌برداری از آزمایشگاه می‌باشد. راهنمای کنترل کیفیت دستورالعمل‌های نمونه‌برداری و انتقال آن‌ها توسط CLSI[۶] ارائه‌شده است.

خطرات بالقوه حمل دستی نمونه‌ها با استفاده از ظروف مخصوص به حداقل می‌رسد. نمونه‌ها در حین انتقال باید در برابر شرایط محیطی نامناسب مانند سرما یا گرما، تغییرات شدید فشار و یا خشک شدن محافظت شوند. با استفاده از فریزر ۷۰- درجه سلسیوس می‌توان زمان نگهداری و انتقال نمونه را افزایش داد (این زمان بستگی به نوع میکروارگانیسم دارد که در کتابچه‌های راهنما[۷] مشخص‌شده است. معمولاً نمونه‌های مایع باید هرچه سریع‌تر به آزمایشگاه منتقل شوند (شکل ۵-۱).

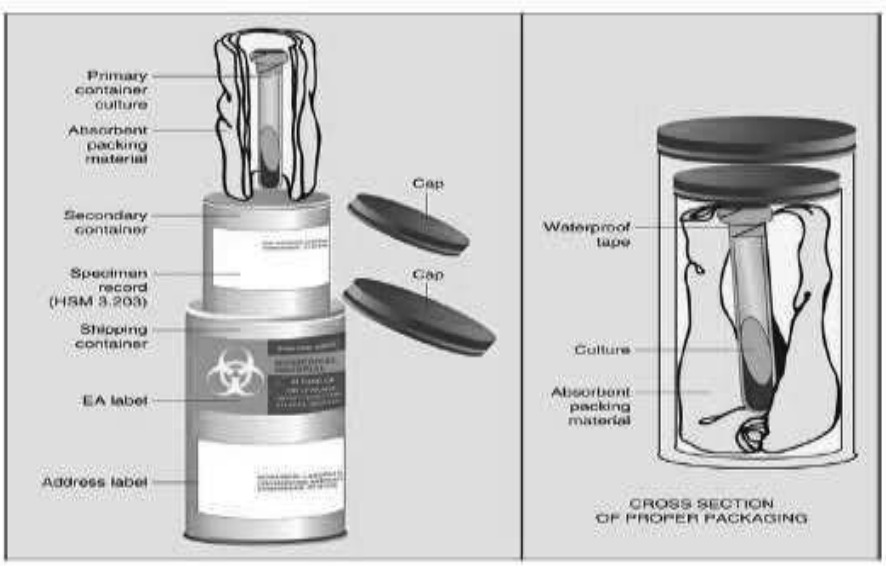
در بیمارستان‌ها معمولاً حداکثر زمان بین جمع‌آوری نمونه و ارسال آن ۲ ساعت هست. که این محدودیت زمانی مشکلی برای انتقال نمونه‌ها از مطب پزشکان به آزمایشگاه می‌باشد. البته جهت رفع این مشکل بنا به نوع نمونه دستور کارهای خاصی ارائه‌شده است. مثلاً برای نمونه کشت ادرار می‌توان از مقادیر کمی بوریک‌اسید استفاده کرد یا تا ۲۴ ساعت نمونه را در یخچال نگهداری نمود. هم‌چنین بر طبق دستورالعمل‌ها

۶- Clinical Laboratory Standards Institute
۷- Guide lines

می‌توان از محیط‌های انتقال استفاده نمود. نمونه‌های خلط جهت بررسی مایکوباکتریوم‌ها و قارچ‌ها می‌توانند در ظروف پروپیلن و پلی‌اتیلن حمل شوند، از ظروف شیشه‌ای به علت احتمال شکستگی نباید استفاده شود (شکل ۶-۱).

Refrigerate	Room Temperature
Catheter tips (IV)	Abscess, lesion, wound
CSF for viruses	Body fluids
Ear: outer	CSF for bacteria
Feces (unpreserved)	Ear: inner
Feces for *Clostridium difficile* toxin (up to 3 d; >3 d store at −70°C)	Feces (preserved)
Sputum	Genital
Urine (unpreserved)	Nasal, N/P, throat
	Tissue
	Urine (preserved)

شکل ۵-۱: راهنمای نگهداری نمونه‌ها



شکل ٦-۱: نمایش بسته‌بندی نمونه پرخطر در ظروف جمع‌آوری و انتقال

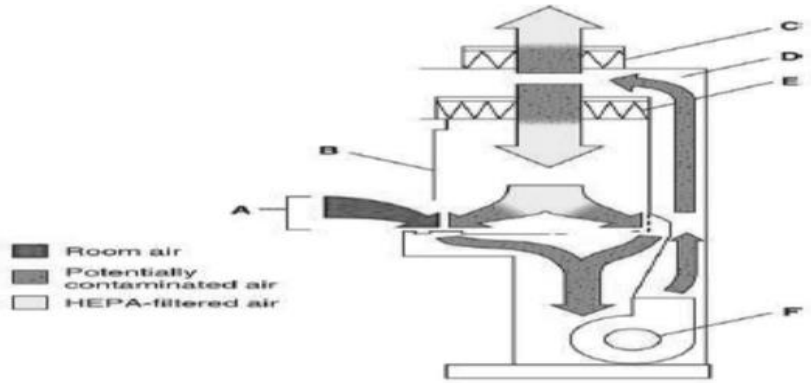
دریافت نمونه و مشاهده مقدماتی

محل خاصی برای تحویل نمونه‌ها در نظر گرفته شود. مشاهدات مقدماتی و حمل نمونه‌ها به دلیل پیشگیری از آلودگی کارکنان با عوامل بیماری‌زا، باید در یک اتاقک ایمن[۸] انجام گیرد (شکل ۷-۱). کارکنان باید با پوشیدن لباس آزمایشگاه دستکش، ماسک خود را در عوامل بیماری‌زای احتمالی محافظت نمایند. امروزه به علت احتمال آلودگی خون و سایر مایعات بدن با ویروس‌های HCV و HIV تمامی نمونه‌ها، نمونه پرخطر در نظر گرفته می‌شود. این مرحله شامل:

۱- ثبت داده‌های مربوط به نمونه‌ها (کامپیوتر یا کتابچه و...).

۲- بررسی و مشاهده شاخص‌های نمونه به‌عنوان نمونه قابل قبول شرایط بازگشت نمونه را نداشته باشند.

۳- مشاهده میکروسکوپی برای نمونه‌های خاص و گزارش تشخیص احتمالی.



شکل ۷-۱: نمایش اتاقک ایمن (Safety cabinet)

۸- Biology safety cabinet

شاخص‌های بازگرداندن نمونه‌های بالینی

۱- کامل نبودن اطلاعات برچسب نمونه و برگه درخواست آزمایش‌ها. یک فرد مسئول عموماً در چنین موردی اطلاعات را از محل ارسال نمونه تکمیل می‌نماید، چون ممکن است احتمال نمونه‌گیری مجدد نباشد. در این حالت در برگه گزارش نتیجه، می‌توان ذکر نمود که داده‌های نمونه ناقص بوده است و توسط فرد (نام و نام‌خانوادگی) تکمیل‌شده است.

۲- نمونه‌هایی که در فرمالین ارسال‌شده است. (اگر قطعات بزرگ بوده و تماس با فرمالین کمتر از یک ساعت باشد، می‌توان با برداشت از مرکز نمونه به کشت آن اقدام نمود).

۳- نمونه‌های خلط ۲۴ ساعته

۴- گسترش ترشحات Uterine cervix، Vaginal canal، Anus برای تشخیص نایسریا گونوره‌آ (Neisseria gonorrhoeae) به روش رنگ‌آمیزی گرم[۹]

۵- یک سوآپ برای چند آزمایش ،مثلاً برای تشخیص قارچ، باکتری و غیره

۶- نمونه‌هایی که در ظروف غیر استریل، آلوده و نامناسب ارسال‌شده باشد و مایع از آن ظرف نشت کرده باشد.

۷- پلیت‌های کشت که رشد خیلی زیادی دارند و یا خشک شده‌اند.

۹- Gram stain

۸- نمونه‌هایی که آلودگی در آن‌ها آشکار است مانند حضور رنگ‌ها، مواد شیمیایی روغنی و یا باریوم[۱۰]

۹- درخواست کشت بی‌هوازی برای نمونه شست‌وشو معده، ادرار، حلق، بینی و یا سایر نمونه‌های Oropharyngeal (به‌جز نمونه‌های بافت عمقی در جراحی دهانی)، مدفوع (به‌جز برای کلستریدیوم دیفسیل، کشت‌های محیطی، سوآپ‌های Ileostomy یا Colostomy و Super facial.

آنالیز نمونه‌ها (Analytic phase)

این مرحله شامل آزمایش میکروسکوپی،کشت نمونه‌ها، تشخیص و آنتی‌بیوگرام می‌باشد.

الف) آزمایش میکروسکوپی: انجام این مرحله به دلایل زیر بسیار مهم می‌باشد.

۱- تعداد و درصد نوتروفیل‌ها (Segmented neutrophils) شاخص نوع پاسخ التهابی است و می‌تواند کیفیت نمونه را ارزیابی کند (مانند نمونه خلط)

۲- مشاهده باکتری‌ها، قارچ‌ها (اشکال رشته‌ای و مخمری)، ساختمان‌های انگلی و Viral inclusions (ساختارهای درون‌سلولی که توسط ویروس در سلول ایجاد می‌شود می‌توانند به تشخیص احتمالی عامل عفونت کمک کنند.

۳- تشخیص احتمالی در نمونه‌های بی‌هوازی

۱۰- Gastric washings

استریلیزاسیون و ضدعفونی کردن (Sterilization and Disinfection):

استریلیزاسیون: روندی که منجر به کشته شدن تمامی اشکال میکروبی(حتی اسپورها) می‌شود.

ضدعفونی کردن: روندی است که ارگانیسم‌های بیماری‌زا را تخریب می‌کند، اما الزاماً تمامی میکروارگانیسم‌ها و یا اسپورها را از بین نمی‌برد. استریلیزاسیون و ضدعفونی کردن به دو روش مکانیکی و شیمیایی انجام می‌شود.

روش‌های استریلیزاسیون:

-روش‌های فیزیکی:

۱- سوزاندن

۲- حرارت مرطوب

۳- حرارت خشک

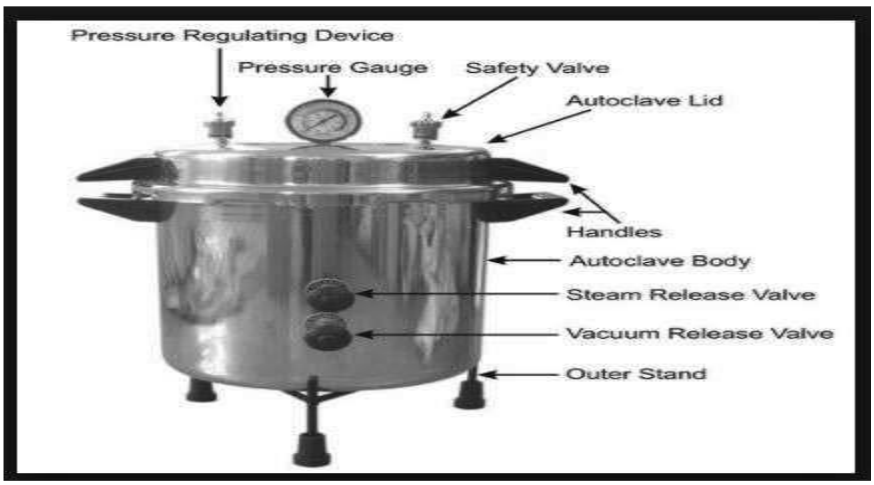
۴- استفاده از صافی

۵- اشعه یونیزان

۱- سوزاندن: معمول‌ترین و مطمئن‌ترین روش برای از بین بردن زباله‌های عفونی می‌باشد. مواد خطرناک در دمای ۸۷۰ تا ۹۸۰ درجه سلسیوس سوزانده شده و تبدیل به خاکستر می‌شوند. پریون‌ها (پروتئین‌های عفونی) توسط روش‌های معمول دیگر از بین نمی‌روند و به همین علت سوزاندن بهترین روش برای این نمونه‌ها می‌باشد.

۲- حرارت مرطوب (استفاده از بخار تحت‌فشار): استفاده از حرارت مرطوب سریع‌ترین و ساده‌ترین روش استریلیزاسیون است. در این روش از وسیله‌ای به نام اتوکلاو جهت استریل نمودن مواد مقاوم به حرارت و زباله‌های عفونی استفاده می‌شود. منبع گرمایشی اتوکلاو ،آب داخل محفظه اولیه را تبدیل به بخار نموده، بخار حاصل وارد محفظه‌ای که مواد و وسایل مورد نظر قرار گرفته‌شده و چون سبک‌تر از هوا می‌باشد در بالای محفظه قرارگرفته و به‌تدریج هوا را از محفظه خارج می‌کند. به‌تدریج فشار و دما، داخل محفظه بالا می‌رود و توسط کنترل‌کننده فشار و دما در نقطه‌ای که از قبل انتخاب‌شده است، ثابت می‌شود. معمولاً فشار PSI، ۱۵ و در دمای $121^{\circ}C$ یا $132^{\circ}C$ و زمان ۳۰ الی ۶۰ دقیقه انتخاب می‌شود. در این فشار پروتئین‌های ساختمانی و آنزیمی به‌صورت غیر برگشت‌پذیر تخریب می‌شوند.

دمای $121^{\circ}C$ به مدت ۱۵ دقیقه جهت استریل نمودن محیط‌های کشت، مایعات و ابزار استفاده می‌شود و دمای $132^{\circ}C$ به مدت ۶۰-۳۰ دقیقه برای استریل نمودن زباله‌های عفونی به کار می‌رود (شکل ۸-۱، ۹-۱).



شکل ۸-۱: تصویر دستگاه اتوکلاو

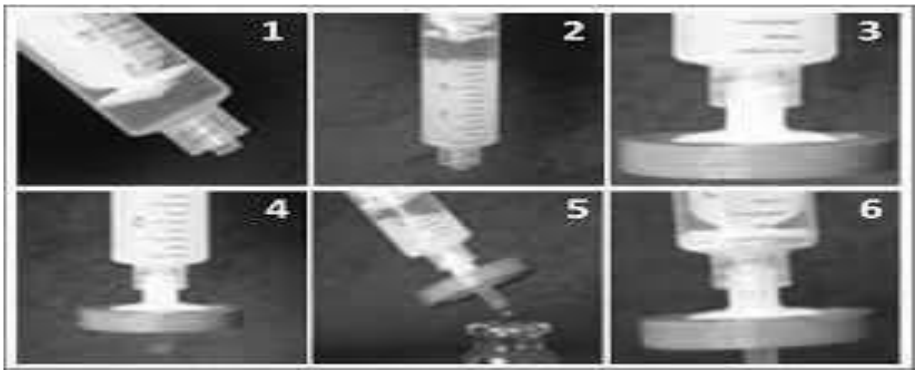
شکل ۹-۱: تصویر دستگاه اتوکلاو

۳- حرارت خشک: استفاده از این روش نیاز به دما و زمان بیشتری نسبت به حرارت مرطوب دارد. از دستگاهی به نام آون (Oven)، فور یا اجاق پاستور استفاده می‌شود. به این روش می‌توان شیشه‌ها، روغن‌ها و پودرها را استریل نمود. دمای مورداستفاده معمولاً ۱۸۰°C به مدت ۱,۵ ساعت و یا ۱۶۰°C به مدت ۳ ساعت می‌باشد (شکل ۱۳-۱).

۴- استفاده از صافی‌ها: فیلتراسیون روش انتخابی برای استریل کردن محلول‌های حساس ب ه حرارت مانند محلول‌های آنتی‌بیوتیکی، مواد شیمیایی سمی، رادیو ایزوتوپ‌ها، واکسن‌ها و قندها می‌باشند. معمولاً برای محلول‌ها از صافی‌های استات سلولز و نیترات سلولز استفاده می‌شود (شکل ۱۴-۱).

فیلترها جهت پاک‌سازی هوا از ذرات بزرگ‌تر از ۰/۳ µm (میکرومتر) به کار می‌روند. که با استفاده از فیلترهای HEPA (High Frequency Particulate Air) در اتاق‌های عمل، اتاق‌های ایزوله و اتاقک‌های ایمن (Safety Cabinet).

شکل ۱۰-۱: تصویر دستگاه فور



شکل ۱۱-۱: استفاده از سرنگ جهت استریل کردن

۵- پرتوهای یونیزان: از این پرتوها (اشعه گاما با طول‌موج کوتاه و انرژی بالا) در میکروویوها و دستگاه‌های رادیوگراف استفاده‌شده است. پرتوهای یونیزان برای استریل کردن وسایل یک‌بارمصرف مانند سرنگ‌های پلاستیکی، کاتترها و یا دستکش‌ها استفاده می‌شود.

۶-مواد شیمیایی استریل کننده: معمول‌ترین ماده شیمیایی استریل کننده گاز اکسید اتیلن است که در استریل کردن مواد حساس به حرارت استفاده می‌شود. بخار فرمالوئید و بخار پراکسید هیدروژن (به‌عنوان یک عامل اکسیدکننده) برای استریل کردن فیلترهای HEPA اتاقک‌های ایمن (Safety cabinet) استفاده می‌شود.

گلوتار آلوئید، ماده شیمیایی دیگری است در مدت ۳-۱ ساعت می‌تواند اسپورهای باکتری‌ها را از بین ببرد و در استریل کردن برونکوسکوپ‌ها (Bronchoscope) به علت عدم خوردگی لنزها، فلزها و یا لاستیک‌ها قابل‌استفاده می‌باشد. پراستیک اسید نیز در استریل کردن سطوح وسایل جراحی استفاده می‌شود. استفاده از گلوتارآلدئید یا پراستیک اسید استریلیزاسیون سرد نامیده می‌شود.

روش‌های ضد عفونی کردن:

الف) روش‌های فیزیکی

ب) روش‌های شیمیایی

الف) روش‌های فیزیکی ضدعفونی کردن : شامل جوشاندن، پاستوریزاسیون و استفاده از پرتوهای غیریونیزان می‌باشد.

۱- جوشاندن: این روش با استفاده از دمای $^{\circ}C$ ۳۶ به مدت ۱۵ دقیقه باعث مرگ اشکال رویشی باکتری‌ها می‌شود. در این روش از دمای $^{\circ}C$ ۶۳ به مدت ۳۰ دقیقه یا $^{\circ}C$ ۷۲ به مدت ۱۵ دقیقه استفاده می‌شود که علاوه بر کشتن باکتری‌های بیماری‌زای موجود در مواد غذایی، آسیبی در ارزش و طعم مواد غذایی ایجاد نمی‌کند.

۲- پرتوهای غیر یونیزان: مانند اشعه ماوراءبنفش (UV) این پرتو طول‌موج بلند و انرژی کم دارد، به همین دلیل قدرت نفوذ به منافذ را ندارد و فقط قادر به از بین بردن باکتری‌هایی است که در سطح هستند.

ب: روش‌های شیمیایی ضدعفونی کردن: ضدعفونی‌کننده‌های شیمیایی انواع متفاوتی دارند و شامل الکل‌ها، آلدئیدها، هالوژن‌ها، فلزات سنگین، ترکیبات آمونیوم چهار ظرفیتی و فنل‌ها می‌باشند.

مواد ضدعفونی‌کننده‌ای که برای پوست استفاده می‌شوند مواد آنتی‌سپتیک (Antiseptic) نامیده می‌شوند.

فاکتورهایی که در عملکرد ضدعفونی‌کننده‌های شیمیایی مؤثر هستند، عبارت‌اند از:

۱- نوع ارگانیسم‌ها

۲- دما و PH

۳- تعداد ارگانیسم‌ها

۴- غلظت ماده ضدعفونی‌کننده

۵- مقدار مواد طبیعی حاضر در محیط (خون موکوس، چرک)

۶- ماهیت سطحی که باید ضدعفونی شود (متخلخل یا صیقلی)

۷- مدت‌زمان تماس مواد شیمیایی

۸- نوع آبی که استفاده می‌شود (سختی بالا یا سختی کم) آب سخت ممکن است باعث کاهش اثر ضدعفونی‌کننده شود.

اسپورها (مانند اسپورهای باسیلوس) بیشترین مقاومت را دارند و بعد از آن ها به ترتیب مایکوباکتریوم‌ها (باسیل‌های مقاوم به اسید)، ویروس‌های بدون پوشش ، قارچ‌ها، شکل رویشی باکتری‌ها و ویروس‌های پوشش‌دار (حساس‌ترین به مواد ضدعفونی کننده) قرار می‌گیرند. بنابراین بر اساس این که چه ارگانیسمی را در چه محلی باید از بین ببریم، ماده ضد عفونی کننده متفاوتی استفاده می شود. ابزاری که به مواد طبیعی مانند خون، چرک یا موکوس آغشته هستند ابتدا باید به صورت مکانیکی (شست‌وشو) این مواد حذف شوند و سپس در تماس با ماده ضدعفونی کننده قرارگیرند.

در استفاده از الکل ها باید توجه شود که الکل اتیلیک ۷۰ ٪ قدرت کشندگی بالاتری از الکل ۹۰٪ دارد که به علت وجود آب بیشتر سبب هیدرولیز پیوندها در پروتئین‌ها و در نتیجه مرگ میکروارگانیسم‌ها می‌شود. الکل اتیلیک یا ایزوپروپیلیک قدرت کشندگی اسپورهای باکتری ها را ندارند. بنابراین استفاده از آن محدود به ضد عفونی پوست به عنوان یک آنتی‌سپتیک، ضد عفونی دماسنج و سطح ویال‌های تزریقی پلاستیکی می‌شود. فرمالدئید و گلوتار آلدئید به علت بخارات آسیب‌زا به عنوان ضد عفونی کننده سطوح استفاده نمی‌شوند. هالوژن‌ها خصوصاً ید و کلر عمدتاً به عنوان ضد عفونی کننده استفاده می‌شوند. کلر در ترکیب هیپوکلریت سدیم (Naocl) جهت مصارف خانگی به کار می‌رود.

مرکز کنترل و پیشگیری بیماری‌ها (CDC) محلول ۱:۱۰ هیپوکلریت سدیم را برای تمیز کردن سطوحی که به خون آغشته شده‌اند (میز-تخت) توصیه می‌کند. ید معمولاً به صورت ترکیبی با الکل یا به صورت یک پدوفور همراه یک پلیمر خنثی مانند پویدون آیودین (Povidone - Iodine) به کار می رود. هر دو ترکیب به عنوان آنتی سپتیک استفاده می شوند. در واقع استفاده از الکل اتیلک ۷۰ ٪ متعاقب آن استفاده از یک پدوفور معمول‌ترین روش ضدعفونی پوست قبل از خونگیری می‌باشد.

به علت سمیت جیوه برای طبیعت، فلزات سنگین حاوی جیوه دیگر توصیه نمی‌شوند، اما یک قطره چشمی حاوی ۱٪ نیترات نقره هنوز برای محافظت چشم نوزادان از عفونت نایسر یا گونوره‌آ توصیه می‌شود.

ترکیبات آمونیوم چهار ظرفیتی برای سطوح آزمایشگاه استفاده می‌شوند. آلودگی سطوح با خون و سایر مواد آلی، استفاده از ترکیبات آمونیوم چهار ظرفیتی و فلزات سنگین را محدود می‌کند.