با نام و یاد خدا

استانداردهای میکروب شناسی در جداسازی و تشخیص عوامل بیماریزا در بیماری های منتقله از آب و غذا (ویبریو کلرا، سالمونلا و شیگلا)

رقیه صبوریان

آزمایشگاه مرجع سلامت

اردیبهشت ۱۴۰۱

عناوین مورد بحث

- بر اساس: چک لیست ارزیابی بخش باکتری شناسی آزمایشگاه های بهداشتی- نسخه اول- سال ۱۳۹۸
  - نمونه گیری و انتقال نمونه
  - آزمایش کشت مدفوع
  - شناسایی باکتری ها
  - کنترل کیفیت
  - تجهیزات و ابزار پایه
  - کارکنان و آموزش
  - گزارش دهی

نمونه گیری و انتقال نمونه

- برای اطمینان از نمونه گیری صحیح به دستورالعمل های ساده و کاربردی نیاز است:
  - شامل روش جمع آوری صحیح نمونه، شرایط نگهداری و انتقال آن و ...
  - بصورت کاغذی یا الکترونیک در دسترس کارکنان میکروب شناسی و همچنین کارکنان مربوطه در واحد بیماری ها باشد.
  - کارکنان نسبت به محتویات آن آگاهی داشته و به درستی اجرا کنند یا بتوانند با مراجعه به آن سریعا اطلاعات لازم را پیدا کنند.
  - به طور منظم به روز شده باشد.

نمونه گیری و انتقال نمونه

- دستورالعمل کشوری مدیریت نمونه ها در بیماری های منتقله از آب و غذا، ویرایش اسفند ۱۳۹۹:
  - روش صحیح نمونه گیری: مدفوع، آب، غذا و...
  - روش نگهداري مناسب نمونه مدفوع که امکان کشت و بررسي سريع آنها وجود ندارد.
  - معیارهای رد نمونه
  - انتقال امن و ایمن نمونه ها

دستورالعمل کشوری مدیریت نمونه ها در بیماری های منتقله از آب و غذا

وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی
معاونت بهداشت
آزمایشگاه مرجع سلامت – مرکز مدیریت بیماریهای واگیر
و
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی شهید بهشتی
آزمایشگاه مرجع کشوری بیماری های منتقله از آب و غذا
پژوهشکده بیماری های گوارش و کبد

اسفند ۱۳۹۹

نمونه گیری مدفوع چه زمانی باید انجام شود؟

- بهترین زمان نمونه گیری:
  - طی مرحله حاد بیماری
  - هر چه سریع تر بعد از شروع بیماری (ترجیحا در طی ۴ روز اول بعد از بروز اولین علائم بیماری)
    - یعنی زمانی که عوامل بیماری زا معمولا به بیشترین تعداد در مدفوع وجود دارند، زیرا این عوامل با گذشت زمان کاهش پیدا می کنند.
  - قبل از شروع درمان با آنتی بیوتیک

روش های نمونه گیری مدفوع

- نمونه مدفوع تازه
- نمونه سواب مدفوع
- نمونه رکتال سوآب

- اصولاً نمونه مدفوع تازه نسبت به سوآب (سواب مدفوع یا سواب مقعدی) برتري دارد.
  - چرا که امکان بررسی همزمان عوامل بیماری زای باکتریایی، انگلی و ویروسی را برای آزمایشگاه امکان پذیر می نماید.
- البته در برخي شرايط سوآب كاربرد بيشتري دارد. بطور مثال
  - زمانی که سریعاً به نمونه مدفوع نیاز باشد.
  - و یا در مواقعی که تعداد نمونه گیری زیاد است، به دلیل تسهیل در نگهداری و انتقال، نمونه سواب ارجحیت دارد.
  - رکتال سوآب براي باکتريهاي مهاجم به مخاط روده مانند شیگلا انتخاب مي شود. زيرا نمونه با ساييدن سوآب به مخاط روده جمع آوري مي گردد.
  - همچنین برای نمونه گیری از نوزادان و کودکان رکتال سواب نمونه مناسبی است. در این روش، انجام صحیح نمونه گیری بسیار مهم است.

نمونه مدفوع تازه برای تشخیص ویروس های روده ای

- زمانی که گاستروانتریت ویروسی مطرح است:
  - نمونه ارجح برای آزمایش ویروس: نمونه مدفوع تازه شل یا آبکی، جمع آوری شده در اسرع وقت حتما طی ۴۸ ساعت اول شروع علائم بالینی
  - مدفوع آبکی (liquid) یا شل (soft): حداقل ۱۰ میلی لیتر
  - از ۱۰ فرد بیمار
  - در ظرف پلاستیکی یکبار مصرف تمیز (نیاز به استریل بودن نیست)، خشک، دهان گشاد با اندازه مناسب، با در پوش محکم و فاقد نشتی
  - بدون آلودگی با ادرار، فاقد مواد نگهدارنده، شوینده، یونهای فلزی و باریوم یا کاغذ توالت
  - ظروف نمونه گیری باید دارای برچسب حداقل شامل: شماره نمونه، نام کامل بیمار و تاریخ نمونه گیری
  - در موارد طغیان در صورت امکان برای تایید اپیدمیولوژی حداقل از ده نفر بیمار نمونه مدفوع تازه اسهالی از هر فرد حداقل ۱۰ mL
  - نمونه ها باید به سرعت به ۴ درجه سانتیگراد منتقل شود و در صورت کوتاه بودن فاصله با همین شرایط دمایی (در cold box با ایمنی مناسب با یخ فراوان یا آیس پک) به آزمایشگاه منتقل شود. در صورت طولانی بودن زمان انتقال نمونه ها (حداکثر ۲۴ تا ۴۸ ساعت بعد از نمونه گیری) در دمای منفی ۲۰ درجه فریز و با یخ خشک به آزمایشگاه انتقال یابند.

نمونه مدفوع تازه برای تشخیص باکتری های بیماریزای روده ای

- زمانی که گاستروانتریت باکتریایی مطرح است:
  - نمونه ارجح برای کشت: نمونه مدفوع تازه (البته برای کشت تا ۲ ساعت بعد از نمونه گیری)، جمع آوری شده در فاز حاد بیماری
  - آبکی (liquid) یا شل (soft): حدود ۵ میلی لیتر
  - سفت (formed): ۰/۵ تا ۲ گرم نمونه
  - از ۱۰ فرد بیمار
  - در ظرف پلاستیکی یکبار مصرف تمیز (نیاز به استریل بودن نیست)، خشک، دهان گشاد با اندازه مناسب، با در پوش محکم و فاقد نشتی
  - بدون آلودگی با ادرار، فاقد مواد نگهدارنده، شوینده، یونهای فلزی و باریوم یا کاغذ توالت
    - کاغذ توالت ممکن است به املاح باریوم آغشته باشد که باعث مهار رشد میکروارگانیسم های انتروپاتوژن می شود.
  - ظروف نمونه گیری باید دارای برچسب حداقل شامل: شماره نمونه، نام کامل بیمار و تاریخ نمونه گیری
  - نمونه های مدفوع تازه باید هر چه سریع تر تا ۳۰ دقیقه بعد از نمونه گیری و حداکثر در مدت ۲ ساعت بعد از نمونه گیری به آزمایشگاه تحویل داده شود و مورد آزمایش قرار گیرد.
    - این موضوع برای جداسازی شیگلا و کمپیلوباکتر بسیار حائز اهمیت است.

نمونه سوآب مدفوع

- زمانی که گاستروانتریت باکتریایی مطرح است و نمونه در مدت ۲ ساعت بعد از نمونه گیری نمی تواند مورد آزمایش قرار گیرد:
  - باید از نمونه مدفوع تازه، سواب مدفوع تهیه و سواب در محیط انتقال کری بلر وارد نموده و بلافاصله در یخچال گذاشته شود.
    - قرار دادن نمونه موجود در کری بلر در یخچال ۴ درجه سانتیگراد قبل از انجام آزمایش باعث نگهداری بهتر باکتری های بیماری زای روده ای می شود، به استثناء شیگلا.
  - تهیه سوآب مدفوع:
    - یک سوآب استریل را درون نمونه مدفوع قرار داده و پس از حرکت چرخشی، مقدار کمی از آن را بردارید.
    - در صورت مشاهده موکوس یا خون در مدفوع باید با سوآب از آنها نیز نمونه گرفت.
    - سوآب را تا عمق لوله محیط انتقال مناسب (Cary-Blair) که قبلا به مدت ۱ تا ۲ ساعت در یخچال خنک شده است، وارد کنید.
    - قسمت بالایی چوب را که با انگشتانتان لمس می کنید، بشکنید و دور بیندازید.
    - درب لوله را کاملاً ببندید. لوله را بلافاصله در یخچال قرار دهید. در صورت عدم دسترسی به یخچال آن را در مکانی خنک و دور از نور قرار دهید.

نمونه رکتال سوآب

- معایب:
  - حساسیت کمتر نسبت به نمونه مدفوع تازه جهت کشت
- مزایا:
  - نمونه مناسبی است برای نمونه گیری از نوزادان و کودکان یا وقتی که جداسازی شیگلا مطرح باشد.
  - روش نمونه گیری با سواب (رکتال سواب یا سواب مدفوع تازه) در مواقعی که تعداد نمونه گیری زیاد است، به دلیل تسهیل در نگهداری و انتقال ارجحیت دارد.

نمونه رکتال سوآب

- روش نمونه گیری رکتال سوآب:
  - ابتدا سوآب استریل را با قرار دادن در محیط انتقال (کری بلر) مرطوب نمایید.
  - از سوآب پنبه ای سالم استفاده کنید و دقت نمایید که پنبه سر آن کنده نشده باشد. از ژل جهت چرب کردن مقعد استفاده نشود.
  - سر سوآب را حدود ۲ تا ۳ سانتیمتر در رکتوم فرو برده، با احتیاط بچرخانید تا با مخاط انتهایی رکتوم تماس یابد و سپس خارج کنید.
  - با مشاهده سوآب از وجود مدفوع روی پنبه سوآب مطمئن شوید.
  - سوآب را در عمق محیط انتقال مناسب (Cary-Blair) که قبلا به مدت ۱ تا ۲ ساعت در یخچال خنک شده است، فرو برید، به گونه ای که سر پنبه ای سوآب داخل محیط قرار گیرد. قسمتی از چوب سوآب را که با انگشت تماس داشت را شکسته و دور بیندازید. لوله را بلافاصله در یخچال قرار دهید.

توجه

- در تمامی موارد فوق حداقل ۲ سوآب مدفوع یا مقعدی باید برای هر بیمار جمع آوری و هر دو سوآب را در یک لوله حاوی محیط انتقال قرار داد. ولی تعداد سوآب مورد نیاز بسته به تعداد عوامل پاتوژن مورد مطالعه می تواند تغییر کند.

نگهداری نمونه مدفوع بعد از نمونه گیری

- نمونه های مدفوع تازه باید هر چه سریع تر تا ۳۰ دقیقه بعد از نمونه گیری و حداکثر در مدت ۲ ساعت بعد به آزمایشگاه تحویل داده شود و مورد آزمایش قرار گیرد.
- اگر نمونه در مدت ۲ ساعت نمی تواند مورد آزمایش قرار گیرد، باید از نمونه مدفوع تازه، سواب مدفوع تهیه نموده و سواب در محیط انتقال کری بلر در یخچال یا Cold Box قرار داد.
- نمونه سواب مدفوع یا رکتال سواب در محیط انتقال در یخچال یا ارسال آنها با رعایت شرایط زنجیره سرد باید در مدت ۲۴ ساعت و حداکثر ۷۲ ساعت به آزمایشگاه تحویل داده شود.
- اما اگر نمونه بیش از ۷۲ ساعت باید نگهداری شود، باید هر چه سریع تر پس از نمونه گیری در فریزر منفی ۷۰ درجه سانتیگراد منجمد شود. نگهداری در فریزر منفی ۲۰ درجه سانتیگراد برای مدت کوتاه قابل قبول است. ولي مي بايستي هر چه سريعتر در خصوص انتقال نمونه به آزمایشگاه اقدام نمود.
  - غیر از مواردی که جداسازی کمپیلوباکتر ژژونی و عوامل انگلی از مدفوع مطرح می باشد، که نمونه نباید منجمد شود.

نگهداری نمونه مدفوع بعد از نمونه گیری

TABLE 31: Collection and transport of fecal specimens for laboratory diagnosis

Fecal Specimens for the Laboratory	When to collect	When the patient is having diarrhea, as soon after onset of illness as possible (preferably within 4 days of onset) and before antimicrobial treatment is started.
	How much to collect	Rectal swab or swab of fresh stool in transport medium.
	Transport medium	Cary-Blair or other suitable transport medium (NOT buffered glycerol saline for *V. cholerae*).
	Storage after collection	Refrigerate at 4°C if the specimens will be received by the laboratory within 48 hours or freeze at -70°C. Fecal specimens from patients with suspected cholera can be transported at ambient temperature and held for longer times if necessary; however, refrigeration is preferred.
	Transportation	Seal tubes/containers to prevent leakage; place in waterproof container to protect from wet or dry ice. Ship in insulated box with ice packs, wet ice, or dry ice by overnight delivery.

محیط انتقال (Transport Medium)

- محیط های انتقال بسته به مورد استفاده، طراحی شده است برای اینکه:
  - ارگانیسم را برای یک دوره زمانی معین زنده نگه دارد.
  - رشد زیاد آن را با استفاده از آنتی بیوتیک های مختلف یا با کاهش اکسیژن محیط مهار کند.
- محیط انتقال مورد استفاده برای نمونه های مدفوعی شامل
  - Stuart's
  - Amies
  - Cary-Blair
- محیط Cary-Blair نسبت به دو محیط انتقال Amies و Stuarts برای نگهداری و انتقال ویبریو کلرا برتری دارد.
  - به دلیل pH بالای محیط (۸/۴)
- همچنین برای انتقال بسیاری از عوامل بیماریزای روده از جمله شیگلا و اشریشیا کلی O157:H7 کاربرد دارد.
- قوام نیمه جامد کری بلر موجب آسانی حمل و نقل می شود.

محیط انتقال (Cary-Blair)

- نحوه تهیه:
  - مطابق دستور سازنده
  - توصیه می شود از محیط کشت کری بلر اصلاح شده که در آن مقدار آگار ۱.۶ گرم در لیتر (به جای ۵ گرم) می باشد، استفاده شود.
  - توزیع در ظروف یا لوله های پلاستیکی شفاف (در صورت عدم دسترسی، در ظروف یا لوله های شیشه ای) درپوش دار محکم
  - حجم محیط کری بلر داخل ظرف یا لوله به اندازه ای که دارای حداقل ۴ سانتیمتر عمق باشد.
  - با درپوش شل ۱۵ دقیقه در بن ماری جوش یا مطابق دستور سازنده استریل شود.
- نحوه نگهداری:
  - درب لوله ها را پس از استریل کردن و خنک شدن محکم ببندید.
  - کری بلر باید در لو له های شفاف با درب محکم و در مکانی خنک و دور از نور نگهداری گردد.
  - در صورت کاهش نیافتن حجم محیط و عدم تغییر رنگ و آلودگی تا ۶ ماه قابل استفاده است.

برچسب گذاری نمونه ها

- شماره نمونه، نام بیمار و تاریخ نمونه گیری باید به شکلی خوانا بر روی برچسب ضد آب روی لوله نمونه نوشته شود.
- اطلاعات بیمار باید بر روی داده برگ ثبت شود، یک نسخه با نمونه ها ارسال و دیگری توسط فرستنده نگهداری شود.
- اطلاعات لازم شامل:
  - نام کامل بیمار
  - تاریخ نمونه گیری
  - تاریخ بروز اولین علائم
  - ذکر وجود خون در نمونه
  - اطلاعات تماس با بیمار
  - مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها قبل از جمع‌آوری نمونه
  - اطلاعات کلینیکی مفید و تاریخچه بیمار (مانند سابقه مسافرت یا مصرف مواد غذایی) برای تفسیر نتایج میکروبیولوژی ضروریست.

معیار های رد نمونه

- نمونه مدفوع که بیشتر از دو ساعت بعد از نمونه گیری بدون محیط انتقال به آزمایشگاه تحویل داده شده است. زیرا برای جداسازی اکثر شیگلاها نامناسب است.
  - اگر نمونه گیری مجدد امکان پذیر نمی باشد و پزشک درخواست داده است، کشت را انجام داده و کامنت بگذارید: تاخیر دریافت نمونه توسط آزمایشگاه ممکن است جداسازی پاتوژن ها را با مشکل مواجه سازد.
- اگر نمونه در محیط انتقال بیشتر از ۷۲ ساعت بعد از نمونه گیری در ۴ درجه سانتیگراد یا بیشتر از ۲۴ ساعت در ۲۵ درجه سانتیگراد به آزمایشگاه تحویل داده شده است.
  - اگر نمونه گیری مجدد امکان پذیر نمی باشد، کشت را انجام داده و کامنت بگذارید: به دلیل تاخیر در انتقال نمونه ممکن است نتیجه کشت به طور کاذب منفی باشد.
- کشت مدفوع دریافت شده از بیماران بزرگسال در بیمارستان بیشتر از ۳ تا ۴ روز، به استثناء بیماران HIV مثبت یا وقوع اپیدمی. نمونه مدفوع نوزادان و کودکان تا بعد از ۴ روز بستری در بیمارستان را رد نکنید، زیرا ممکن است جمع آوری نمونه مدفوع از آنها بیشتر طول بکشد.
- ارسال یک سوآب با چند درخواست برای ارگانیسم های متفاوت (باکتری، ویروس و ...)
- چند نمونه مدفوع از همان بیمار در یک روز به آزمایشگاه ارسال شده باشد.
- نمونه های مدفوع تازه با حجم کمتر از ۱۰ میلی لیتر برای بررسی ویروسی و کمتر از ۵ میلی لیتر برای کشت باکتریایی

معیارهای رد نمونه (ادامه)

- سواب های خشک (عدم وجود نمونه روی پنبه سوآب) نباید آزمایش شوند.
- نمونه های مدفوع آغشته به ادرار و یا باریوم نباید آزمایش شوند.
- نمونه های نگهداری شده در محیط های انتقال حاوی فرمالین یا مواد نگهدارنده (PVA)
- نمونه های سواب که در عمق محیط کری بلر وارد نشده باشند.
- نمونه هایی که محیط انتقال آنها خشک، آبکی یا دارای قارچ باشد.
- نمونه های با لوله شکسته یا درب لوله آنها بسته نباشد.
- مشخصات بیمار روی برگه درخواست و برچسب ظرف نمونه متفاوت باشد.
- نمونه هايي که فاقد برچسب باشند، یا مشخصات روی برچسب ناخوانا باشند.
- نمونه های بیمارانی که تحت درمان آنتی بیوتیکی هستند، مگر با دستور پزشک مبنی بر پیگیری روند درمان.
- محیط انتقال فاقد سوآب نمونه باشد.

ثبت اطلاعات در آزمایشگاه

- فرم (کاغذی یا الکترونیک) پذیرش نمونه حاوی اطلاعات ضروري (مشخصات بیمار، تشخیص احتمالی بیماری، سابقه مصرف آنتی بیوتیک و ...) در آزمایشگاه وجود داشته باشد و تکمیل گردد.
- در مواردی که کشت مدفوع به آزمایشگاه ارجاع شده، آزمایشگاه بعد از دریافت نمونه، باید این موارد را به طریق مناسب ثبت و نگهداری نماید:
  - تاریخ نمونه گیری
  - تاریخ دریافت نمونه
  - تاریخ انجام آزمایش
  - تاریخ گزارش نتیجه

نمونه گیری و انتقال نمونه

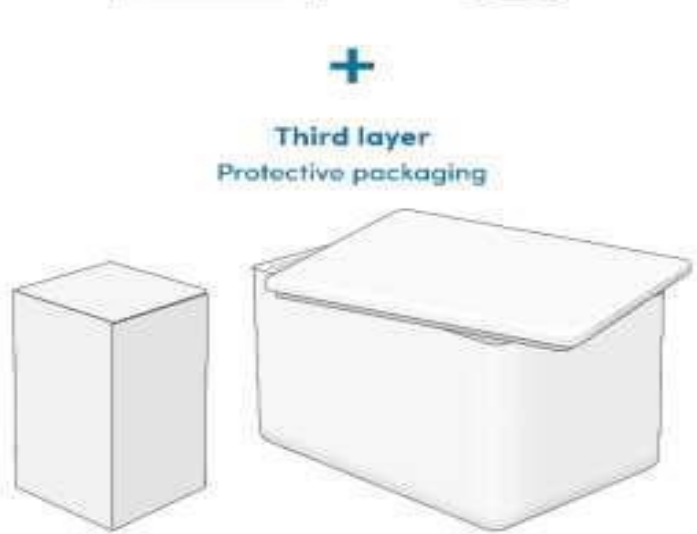
- آموزش های لازم به کارکنان نمونه گیر واحد بیماری ها برای نمونه گیری صحیح و بسته بندی سه لایه استاندارد و انتقال امن و ایمن نمونه های رکتال سواب بیماران
- فراهم نمودن تمهیدات لازم از جانب واحد بیماری ها برای ارسال هر چه سریع تر نمونه ها از خانه ها و پایگاه های بهداشت، مراکز جامع سلامت و بیمارستانها به آزمایشگاه حداکثر طی مدت ۳ روز
- استفاده از بسته بندی سه لایه استاندارد توسط آزمایشگاه برای انتقال امن و ایمن نمونه/ایزوله ها به خارج از مرکز بهداشت

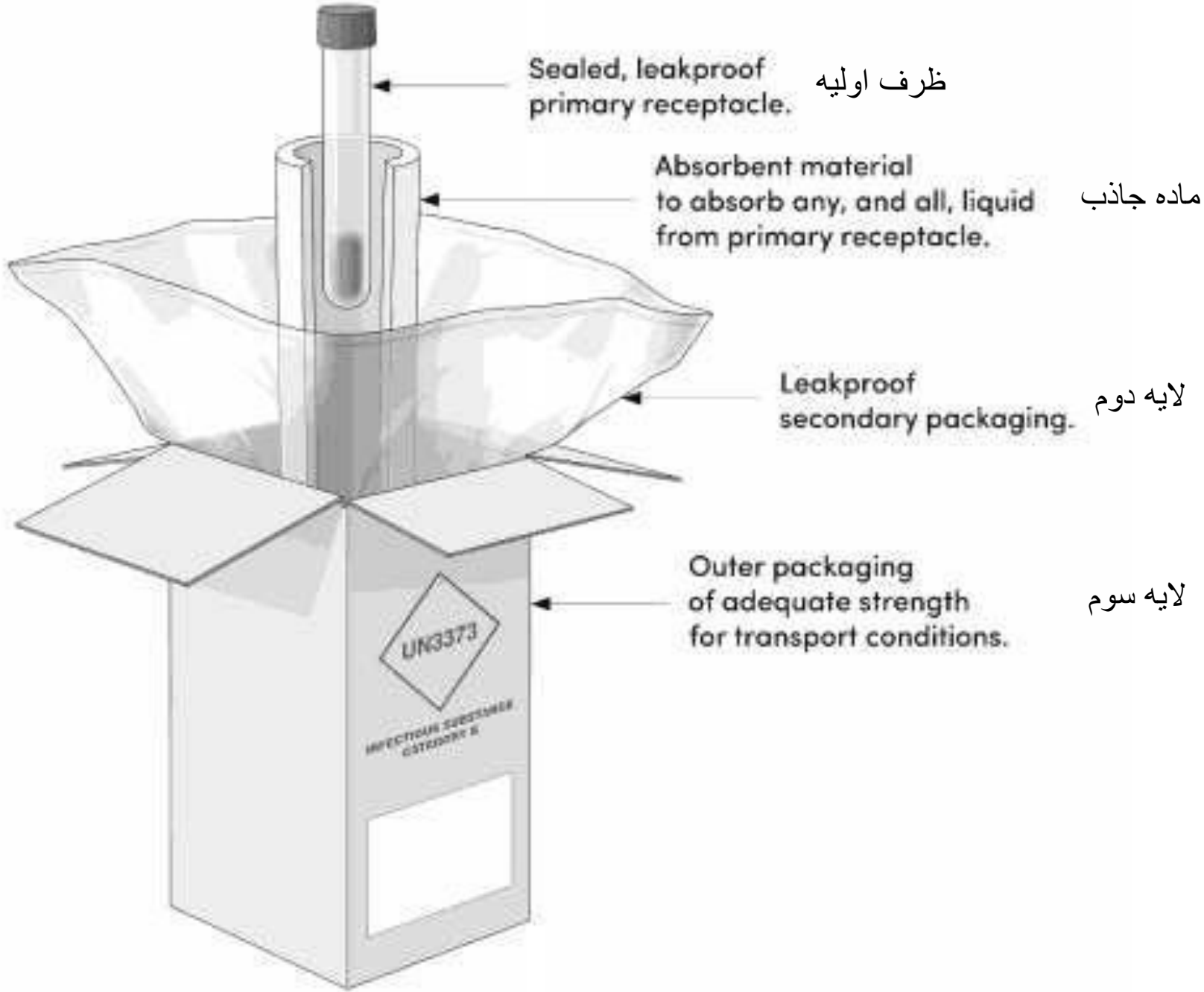
مثال هایی از
مواد مورد استفاده در بسته بندی
سه لایه استاندارد

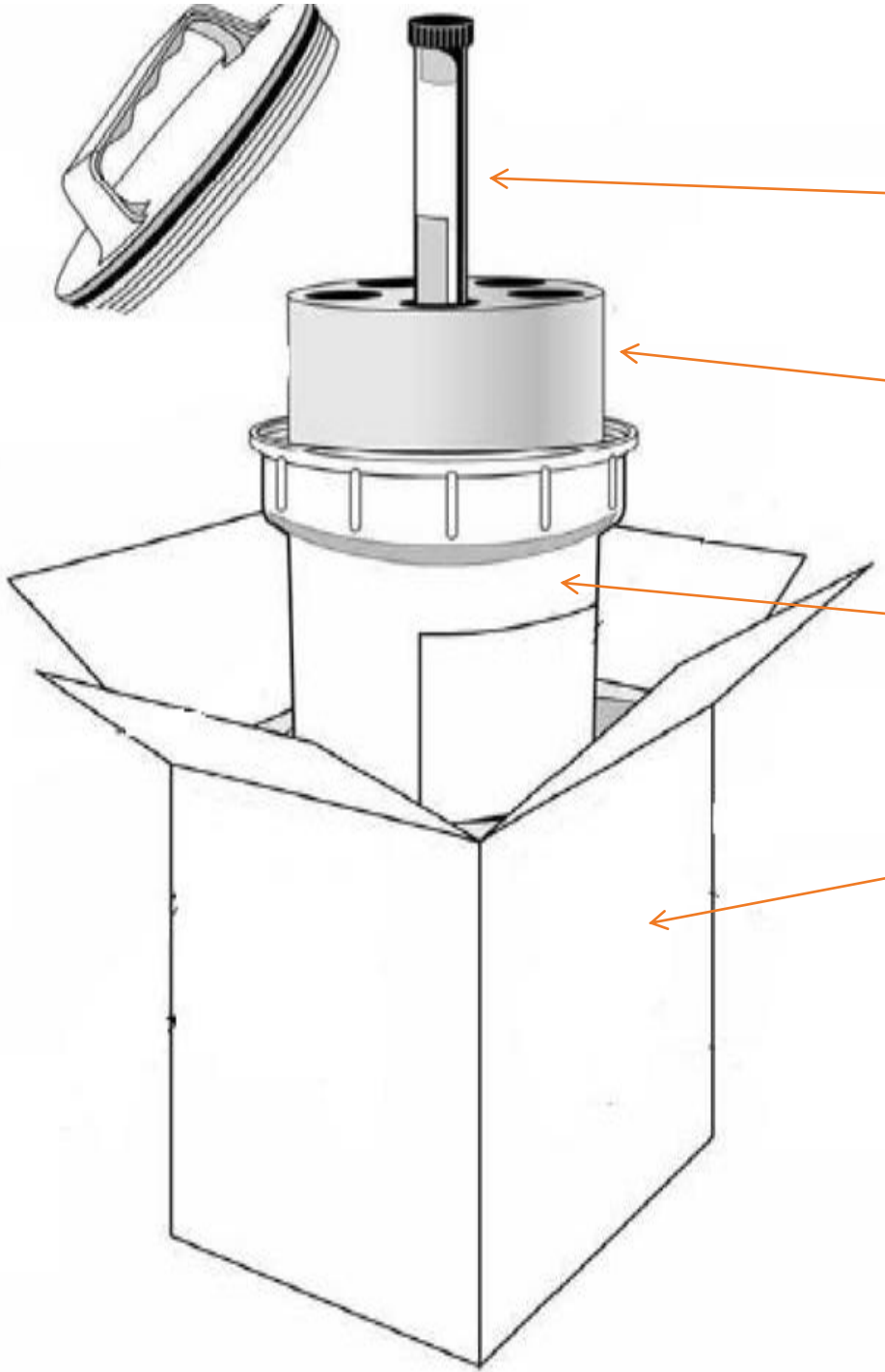
ظرف اولیه:
ضدآب و غیرقابل نشت، مانند لوله آزمایش یا ظرف نمونه مدفوع
به همراه ماده جاذب

لایه دوم:
ضدآب و غیرقابل نشت، برای محافظت از ظرف اولیه و ماده جاذب
مانند زیپ کیپ یا قوطی درپیچ دار پلاستیکی محکم

لایه سوم:
برای محافظت از لایه دوم
مانند جعبه های کاغذی محکم متناسب با وزن و اندازه بسته های داخلی




Sealed, leakproof
primary receptacle.
ظرف اولیه
Absorbent material
to absorb any, and all, liquid
from primary receptacle.
ماده جاذب
Leakproof
secondary packaging.
لایه دوم
Outer packaging
of adequate strength
for transport conditions.
لایه سوم
UN3373



ظرف
اولـیـه

مـاده جاذب و
ضربـه گـیـر

لایـه دوم

لایـه سوم
(بـیـرونـي)

BIOHAZARD

نمونه گیری و انتقال نمونه

وجود دستورالعمل معیارهای رد نمونه در بخش میکروب شناسی و آگاهی کارکنان بخش به آن

گزارش کتبی موارد عدم انطباق نمونه گیری و انتقال نمونه، به واحد بیماری ها و وجود سوابق آن در آزمایشگاه

اقدامات اصلاحی لازم توسط واحد بیماری ها در جهت رفع مشکلات (آموزش به کارکنان نمونه گیر)

نمونه گیری و انتقال نمونه

در صورت نیاز به نمونه گیری مجدد
(مدفوع تازه یا رکتال سواب)

وجود دستورالعمل (فرآیند) اطلاع رسانی به پزشک مسئول، واحد بیماری ها و یا بیمار به صورت مناسب، در آزمایشگاه

وجود سوابق اطلاع رسانی، در آزمایشگاه

کشت مدفوع و شناسایی باکتری های پاتوژن شایع مدفوع

وجود دستورالعمل کشت مدفوع بر اساس دستورالعمل آزمایشگاه مرجع سلامت یا مراجع معتبر

وجود جداول/ الگوریتم های مناسب برای شناسایی و افتراق
ویبریو کلرا، سالمونلا و شیگلا

وجود دستورالعمل تست های تشخیصی

ثبت نتایج آزمایش های شیمیایي و سرولوژیک انجام شده روی کلنی ها

محیط های کشت مورد نیاز برای کشت نمونه مدفوع در جداسازی ویبریو کلرا

۱. محیط انتخابی Thiosulfate Citrate Bile Salts (TCBS)
۲. محیط براث غنی کننده Alkaline Peptone Water (APW)
۳. محیط Sheep Blood Agar (استفاده اختیاری)

- **کشت سریع نمونه**
  - ویبریوها عموما نسبت به خشکی، قرار گرفتن در معرض نور خورشید و تغییر pH به شرایط اسیدی بسیار حساس هستند.
  - همچنین رشدشان بوسیله فلور نرمال روده یا ارگانیسم های آلوده کننده به راحتی مهار می شود.

تلقیح محیط پلیتی TCBS

۱. نمونه مدفوع تازه، سوآب مدفوع یا رکتال سوآب را روی سطح پلیت TCBS اول تلقیح کنید و به گونه ای کشت دهید که کلنی های ایزوله بدست آید.

۲. پلیت ها را به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در ۳۵-۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه کرده و در صورت عدم رشد یا رشد ضعیف، انکوباسیون را تا ۴۸ ساعت ادامه دهید.

- **توجه:**
  - برای هر بیمار استفاده از یک پلیت با قطر ۸-۱۰ سانتیمتری برای هر محیط الزامیست و نباید از پلیت ۶ سانتیمتری استفاده کنید، زیرا احتمال جداسازی ویبریو کاهش می یابد.
  - از نصف کردن محیط TCBS خودداری نمایید.
  - محیط TCBS نباید اتوکلاو شود، فقط حرارت دهید تا محیط بجوشد و کاملا حل شود. اجازه دهید تا دمای ۴۵-۵۰ درجه سانتیگراد خنک شود، سپس در پلیت های استریل توزیع کنید.
  - هنگام استفاده از محیط TCBS از زمان تهیه نباید بیش از یک هفته گذشته باشد.
  - پلیت های TCBS باید به گونه ای در یخچال نگهداری شود، که از خشک شدن آنها جلوگیری گردد.

تلقیح محیط غنی کننده APW

۱. در روز اول بعد از تلقیح پلیت TCBS، نمونه مدفوع تازه، سوآب مدفوع یا رکتال سوآب را در محیط APW تلقیح کرده، سپس سواب را دور بیندازید.

۲. محیط APW را به مدت ۸-۶ ساعت با درپوش شل در ۳۷-۳۵ درجه سانتیگراد انکوبه نمایید.

۳. بعد از ۸-۶ ساعت از سطح محیط براث بدون مخلوط کردن (به دلیل حرکت بیشتر *ویبریو کلرا* در مقایسه با *اشریشیاکلای* و تراکم *ویبریو* در سطح براث) یک یا دو لوپ برداشته، روی پلیت TCBS دوم کشت دهید، به طوری که کلنی های جدا از هم بدست آید.

- **توجه:** اگر نتوانستید محیط آب پپتونه قلیایی را بعد از ۸-۶ انکوباسیون بر روی محیط TCBS کشت دهید، یک یا دو لوپ از محیط آب پپتونه را پس از ۱۸ ساعت در یک لوله آب پپتونه قلیایی جدید ساب کالچر نموده و این لوله را پس از ۸-۶ ساعت انکوباسیون در محیط TCBS دوم ساب کالچر نمایید.

۴. پلیت TCBS دوم را به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در ۳۷-۳۵ درجه سانتی گراد انکوبه کنید. در صورت عدم رشد یا رشد ضعیف، انکوباسیون را تا ۴۸ ساعت ادامه دهید.

نکاتی در مورد APW

- براث غنی کننده ساده ایست که برای مواقعی که تعداد کم میکروارگانیسم در نمونه پیش بینی می شود، مورد استفاده قرار می گیرد (برای مثال در مواقع نقاهت بیماری).
- pH بالای محیط رشد باکتری های کومنسال را مهار می کند، در ضمن اینکه موجب تکثیر *ویبریو کلرا* می شود.
- حاوی ۱ درصد پپتون و ۱ درصد NaCl، با pH ۸/۴-۸/۶
- pH محیط APW باید بعد از اتوکلاو نمودن و خنک شدن آن تا دماي ۲۵ درجه سانتیگراد با استفاده ازدستگاه pH متر استاندارد و کالیبره اندازه گیري شود.
- در صورتی که pH خارج از این محدوده باشد، معمولاً با استفاده از هیدروکسید سدیم ۴۰ گرم در لیتر (تقریباً یک مولار) یا با استفاده از اسید کلریدریک ۳۶/۵ گرم در لیتر (تقریباً یک مولار) تنظیم نمایید.
- محیط APW باید در لوله های درپوش دار محکم تهیه و نگهداری شود. در صورتی که از لوله های درپنبه استفاده می کنید، روی پنبه را با پارافیلم کاملا" بپوشانید، تا از تبخیر و تغییر pH محیط جلوگیری شود.
- در محیط آب پپتونه می توان مدفوع تازه، سواب مدفوع یا سواب رکتال را تلقیح نمود. مدفوع تلقیح شده نباید از ده درصد حجم آب پپتونه بیشتر باشد.

بررسی محیط TCBS

- پلیت های TCBS را از نظر وجود کلنی های شبیه *ویبریو کلرا* بررسی نمایید.
- *V. cholerae* سوکروز را تخمیر کرده و کلنی های زرد رنگ، نرم، به قطر ۲ تا ۴ میلیمتر با مرکز مات و حاشیه براق ایجاد می کند.
- همچنین گونه های زیر سوکروز را تخمیر کرده و کلنی های زرد رنگ مشابه *ویبریو کلرا* ایجاد می کنند:

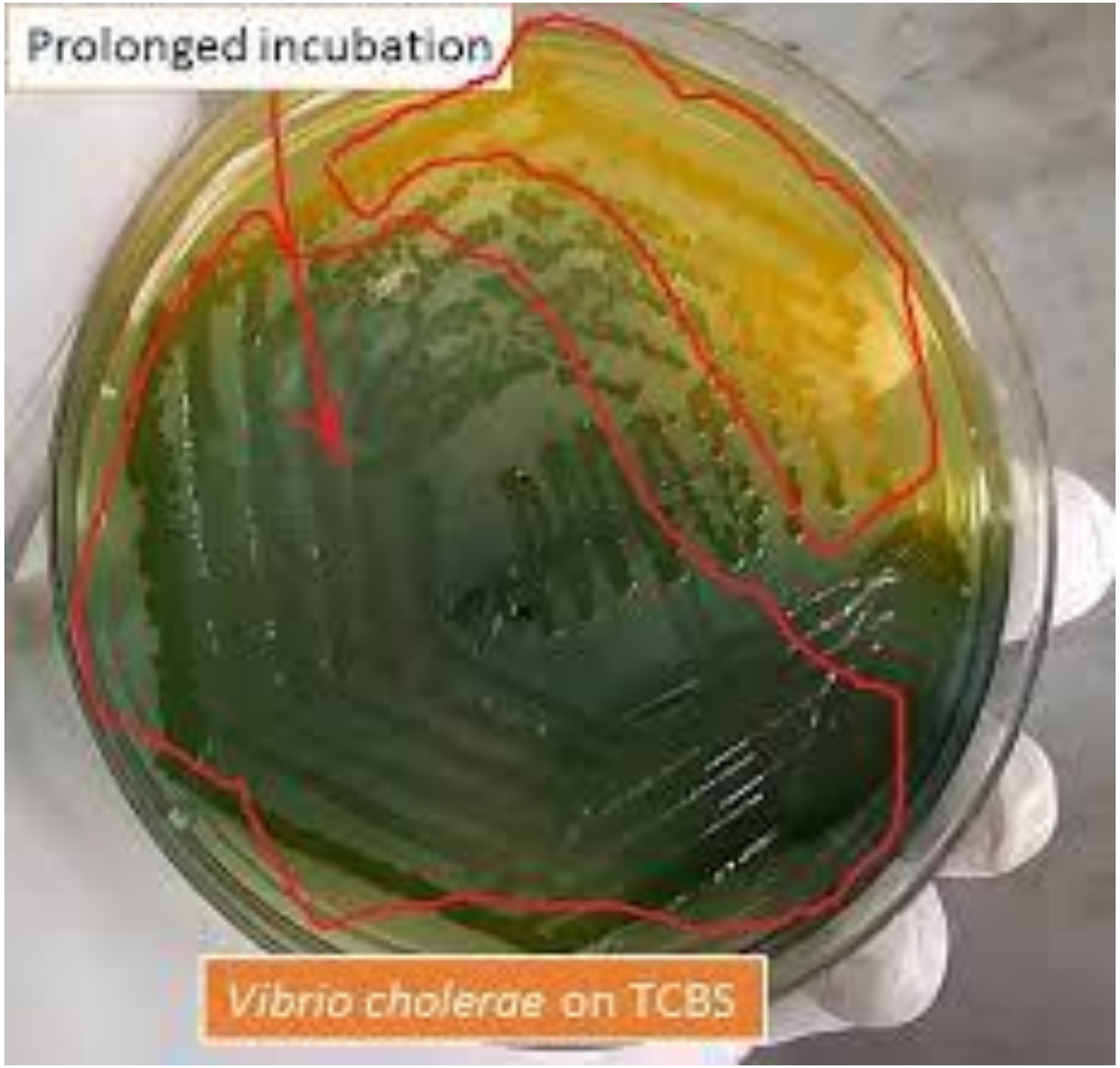
V. alginolyticus, *V. cincinnatiensis, V. fluvialis, V. furnissii, V. harveyi, V. metschnikovii,* ***some V. vulnificus***

- سایر ویبریوهایی که از نظر بالینی مهم هستند، کلنی های سبز تا آبی رنگ ایجاد می کنند:

V. parahaemolyticus, *V. mimicus, V. damsel,* ***most V. vulnificus***

TCBS

کلنی های *ویبریو کلرا* زرد رنگ، نرم، به قطر ۲ تا ۴ میلیمتر با مرکز مات و حاشیه براق



TCBS

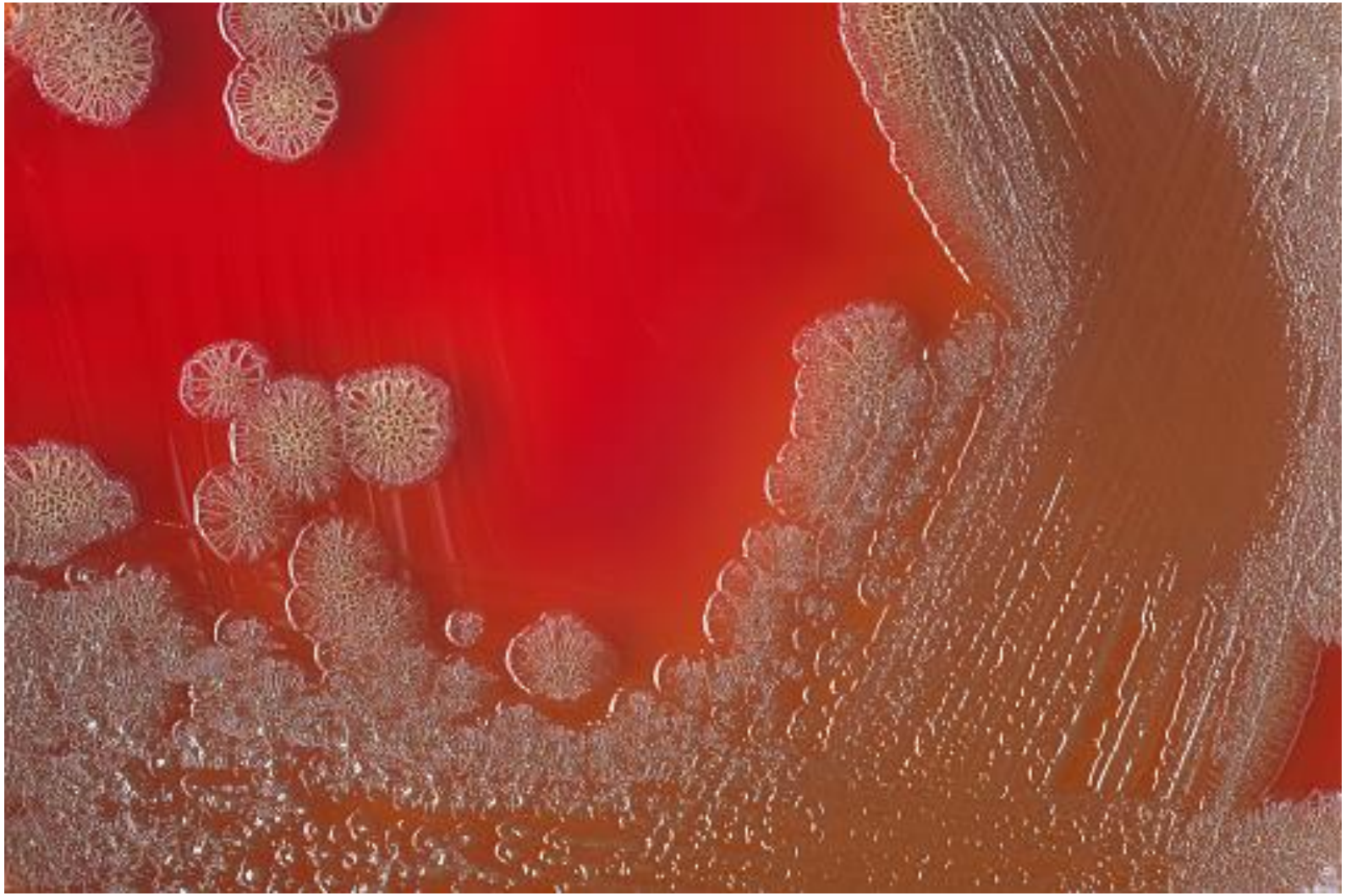
تغییر رنگ کلنی های *ویبریو کلرا* به رنگ سبز
در صورت انکوباسیون طولانی مدت

بررسی محیط Sheep Blood Agar (اختیاری)

- استفاده از این محیط در کشت نمونه های اسهالی مشکوک به *ویبریو*، *آئرومونـاس* و *پلزیومونـاس* توصیه می شود، برای:
  - مشاهده همولیز
  - انجام تست اکسیداز
  - ساب کالچر به محیط KIA
  - ساب کالچر به محیط SIM
- *V. cholerae*: کلنی ها نرم، محدب، دارای قوام خامه ای، خاکستری-سفید، همولیتیک یا نان همولیتیک
- گاهی کلنی های خشن (Rough) مشاهده می شوند، که چروکیده بوده و به آگار می چسبند.

محیط Sheep Blood Agar:

کلنی ها نرم، محدب، دارای قوام خامه ای، خاکستری-سفید



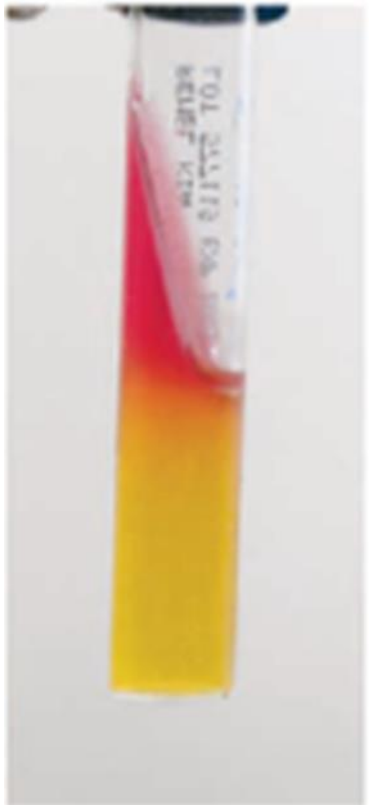
محیط Sheep Blood Agar

گاهی کلنی های خشن (Rough) مشاهده می شوند، که به آگار می چسبند.

آزمایش های تشخیصی ویبریو کلرا

- **حداقل آزمایش های تشخیصی *ویبریو کلرا* O1:**
  - **آزمایش های غربالگری:**
    - KIA (Kligler Iron Agar) (محیط TSI نمی تواند جایگزین محیط KIA شود)
    - SIM (Sulfide-Indole-Motility)
    - Oxidase
  - **آزمایش های سرولوژی:**
    - Antiserum Test
      - *V. cholerae* Polyvalent O1 Antiserum
      - *V. cholerae* Serotype Ogawa Antiserum
      - *V. cholerae* Serotype Inaba Antiserum

KIA (Kligler Iron Agar)



- محیط کشت KIA بصورت شیبدار در لوله تهیه می شود:
  - به هنگام تهیه محیط کشت باید دقت نمود که طول سطح شیبدار و عمق محیط کشت در لوله مساوی و حدود ۳ سانتی متر باشد.
- از یک کلنی زرد رنگ روی محیط TCBS با آنس برداشته، محیط KIA با کشت مارپیچي روي تمام سطح شیب دار و سپس سوراخ کردن عمق آگار (یا بالعکس) تا فاصله ۳-۵mm عمق لوله، تلقیح نمایید.
- لوله ها در دمای ۳۶±۱C° به مدت ۱۸-۲۴ ساعت انکوبه کنید.
- درپوش تمام لوله های تست های بیوشیمیایی پیش از انکوباسیون شل شوند، این موضوع به ویژه در مورد محیط KIA اهمیت دارد. اگر درپوش ها سفت باشند، در لوله شرایط بی هوازی ایجاد شده، واکنش نادرست رخ می دهد و واکنش مشخصه ویبریو کلرا ممکن است مشاهده نشود.
- واکنش ویبریو کلرا بر روی این محیط: Alk/Acid {سطح قلیایی (قرمز) و عمق اسیدی (زرد)} بدون تولید گاز و بدون H2S

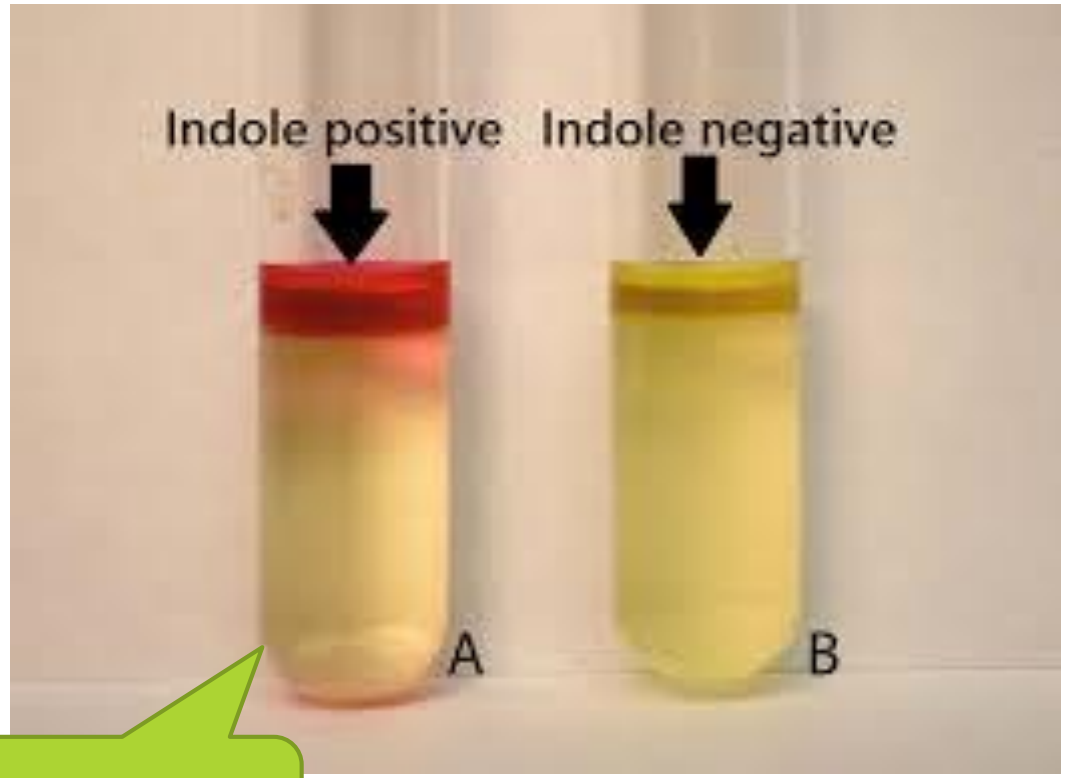
SIM (Sulfide-Indole-Motility)

- محیط کشت نیمه جامد SIM بصورت عمقی در لوله تهیه می شود:
  - عمق محیط SIM در هر لوله باید حداقل ۳ cm باشد.
- **روش انجام آزمایش:**

۱. محیط را از یخچال خارج کرده و اجازه دهید به دمای اتاق برسد.
۲. با استفاده از نیدل استریل، از مرکز يك كلني كاملا ایزوله و تازه (کشت ۲۴- ۱۸ ساعته) روی محیط TCBS بردارید.
۳. نیدل را در مرکز محیط تا عمق حدود ۱/۵ cm در محیط فرو ببرید (حدود دو سوم محیط)، و سپس از همان خط تلقیح اولیه از محیط خارج کنید.
۴. درپوش لوله را شل ببندید، تا هوا در محیط جریان داشته باشد.
۵. لوله را در دمای ۳۵ تا ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در مجاورت هوا انکوبه کنید.
۶. محیط را از نظر تولید H2S، اندول و حرکت بررسی نمایید.

SIM (Sulfide-Indole-Motility)

- **تفسیر نتایج:**
  - H2S
    - مثبت: وجود هر گونه رنگ سیاه در محیط، در طول خط تلقیح یا در کل عمق محیط
    - منفی: عدم تشکیل رنگ سیاه (واکنش ویبریو کلرا بر روی این محیط)
  - اندول
    - ۳ قطره معرف کواکس را از کناره لوله به محیط اضافه کرده و تغییر رنگ را در سطح محیط بررسی نمایید.
      - مثبت: ایجاد رنگ قرمز-قهوه ای تا قرمز-ارغوانی در مدت ۲۰ ثانیه (واکنش ویبریو کلرا بر روی این محیط)
      - منفی: بی رنگ یا زرد کمرنگ
  - حرکت
    - مثبت: انتشار رشد به بیرون از خط کشت و کدورت محیط (واکنش ویبریو کلرا بر روی این محیط)
    - منفی: رشد باکتری فقط در طول خط کشت و شفاف بودن محیط (شبیه محیط تلقیح نشده)
  - توجه:
    - اگر تفسیر آزمایش حرکت مشکل باشد، آن را با یک محیط تلقیح نشده (کنترل) مقایسه نمایید.



V. cholerae

Motility negative Motility positive

V. cholerae

Oxidase Test

- محلول اکسیداز (تترامتیل پارافنیلن دي آمین دي هیدروکلراید)
- توجه: فرمول های دیگری نیز وجود دارد، اما کواکس حساس ترین معرف است، پایدارتر بوده و نسبت به مشتق دی متیل آن کمتر سمی است.
  - برای تهیه محلول ۱٪ اکسیداز، ۰/۱ گرم از پودر تترامتیل پارافنیلن دي آمین دي هیدروکلراید را در ۱۰ml آب مقطر استریل حل کنید. بخوبی مخلوط کرده و به مدت ۱۵ دقیقه آن را درجای ثابتی قرار دهید (از حرارت دادن خودداری نمایید).
  - معرف را بصورت روزانه تهیه کنید.
  - همچنین می توانید معرف را داخل لوله های درپیچ دار پوشیده شده با فویل به اندازه های مساوی تقسیم کرده و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره نمایید. قبل از استفاده معرف را از فریزر خارج نموده، بگذارید ذوب شود. باقیمانده هر روز را دور بریزید.
  - دیسک ها یا نوارهای کاغذی آغشته به معرف (آماده مصرف تجاری) نگهداری شده در یخچال

Oxidase Test

- **روش انجام آزمایش:**

۱. مربع کوچکی از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ را در ظرف پتری قرار دهید و با ۱ یا ۲ قطره از معرف اکسیداز 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 مطابق دستورالعمل بعضی سازندگان نیاز به مرطوب نمودن دیسک باشد.

۲. از کلنی خالص روی محیط KIA یا Blood Agar با استفاده از اپلیکاتور برداشته و بر روی کاغذ صافی آغشته به معرف اکسیداز پخش کنید.

۳. تغییر رنگ کاغذ به بنفش را در محل تلقیح در مدت ۱۰ ثانیه مشاهده نمایید.

Oxidase Test

- **تفسیر:**
  - نتیجه مثبت: ایجاد رنگ آبی تیره تا بنفش در مدت ۱۰ ثانیه
  - نتیجه تاخیری: ایجاد رنگ آبی تیره تا بنفش در مدت ۶۰-۱۰ ثانیه (بايد تست هاي بيشتري انجام شود، زيرا احتمالاً متعلق به خانواده انتروباکتریاسه نمي باشد.)
  - نتیجه منفی: عدم تغییر رنگ معرف یا ایجاد صورتی کمرنگ در مدت ۱۰ ثانیه
  - توجه: به دستورالعمل سازنده توجه شود.

Oxidase Test

- **کنترل کیفیت:**
- هر سری ساخت جدید پودر معرف یا دیسک آماده مصرف تجاری
- و سپس هر روزي 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: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- سویه کنترل منفي: *Escherichia coli* ATCC 25922

Oxidase Test

- **محدودیت ها:**
- برای جلوگیری از ایجاد نتایج 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 کلنی هایی که بر روی محیط های حاوی رنگ (مانند TCBS) رشد کرده اند، برای انجام این تست استفاده نکنید. نتیجه منفی کاذب ایجاد می شود.
  - از کلنی هایی که روی محیط های قند قابل تخمیر رشد کرده اند، برای انجام این تست استفاده نکنید. اسیدی شدن محیط (pH کمتر از ۵/۱) باعث ایجاد نتیجه مثبت کاذب می شود.
- رعایت زمان قرائت واکنش برای انجام دقیق تست بسیار مهم است.

تشخیص سرولوژی *ویبریو کلرا* O1

- استفاده از آنتی سرم ها یکی از سریع ترین و اختصاصی ترین روش های تشخیصی *V. cholerae* O1 می باشد.
- بعد از تشخیص بیوشیمیایی ایزوله به عنوان *ویبریو کلرا*، آزمایشگاه باید با آنتی سرم های اختصاصی *ویبریو کلرا* آزمایش انجام دهد، برای:
  - تعیین سروگروه (این که ایزوله سروگروه O1 می باشد یا خیر)
  - تایید تشخیص *ویبریو کلرا* O1
  - تعیین سروتایپ

آزمایش آنتی سرم
۱- تعیین سروگروه

- **روش انجام آزمایش:**

۱. یک لام تمیز برداشته و روی یک سمت آن یک قطره سرم فیزیولوژی برای بررسی اتوآگلوتیناسیون یا خشن بودن کلنی ها (به عنوان کنترل منفی) قرار دهید.

۲. سمت دیگر لام یک قطره آنتی سرم *V. cholerae* Poly O1 قرار دهید.

۳. بوسیله لوپ، آنس یا اپلیکاتور چوبی استریل از کلنی های خالص و ۲۴-۱۸ساعته ایزوله مورد آزمون از روی محیط غیر انتخابی مانند Blood agar یا KIA برداشته، ابتدا در قطره سرم فیزیو لوژی و سپس در قطره آنتی سرم سوسپانسیون یکنواختی تهیه کنید.

- **توجه ۱:** به هیچ وجه از محیطهاي انتخابي مانند MAC یا TCBS براي انجام آزمايش آنتي سرم استفاده نكنيد، زيرا نتايج گمراه كننده اي بدست مي آيد. **استفاده از کلنی روی محیط TCBS منجر به نتایج منفی کاذب می شود.**

- **توجه ۲:** قبل از انجام آزمایش با آنتی سرم، روش انجام آزمایش در دستورالعمل همراه (بروشور) تولید کننده آنتی سرم باید به دقت مطالعه شود. مطابق دستورالعمل بعضی از تولیدکنندگان، باید یک قطره سرم فیزیولوژی در یک سمت لام و قطره دیگری سرم فیزیولوژی در سمت دیگر لام بریزید. از کلنی مورد آزمون سوسپانسیون یکنواختی در هر دو قطره تهیه نموده، یک قطره آنتی سرم به یکی از قطره های سرم فیزیولوژی اضافه کنید.

۴. لام را به مدت ۳۰ ثانیه یا ۱ دقیقه (با توجه به دستورالعمل همراه آنتی سرم، این زمان متفاوت است) به صورت دورانی حرکت دهید.

۵. تشکیل ذرات آگلوتیناسیون را در زیر نور کافی (چراغ مطالعه) با پس زمینه تیره به دقت بررسی نمایید. مطمئن شوید که قطره سوسپانسیون سرم فیزیولوژی فاقد ذرات آگلو تیناسیون باشد.

آزمایش آنتی سرم

- **تفسیر:**
- واکنش مثبت: وجود ذرات آگلوتیناسیون در قطره آنتی سرم و وجود نداشتن ذرات آگلوتیناسیون در قطره سرم فیزیولوژی (کنترل منفی) در مدت ۳۰ ثانیه یا ۱ دقیقه، بر اساس دستورالعمل سازنده
  - **توجه:** مطابق دستورالعمل سازنده آنتی سرم ایجاد ذرات آگلوتیناسیون ضعیف بعد از ۳۰ ثانیه یا ۱ دقیقه فاقد ارزش می باشد.
- واکنش منفی: وجود نداشتن ذرات آگلوتیناسیون در قطره آنتی سرم و وجود نداشتن ذرات آگلوتیناسیون در قطره سرم فیزیولوژی (کنترل منفی) در مدت ۳۰ ثانیه یا ۱ دقیقه، بر اساس دستورالعمل سازنده
  - **توجه:** قطره سرم فیزیولوژی (قطره کنترل منفی) در هر دو واکنش مثبت و منفی باید فاقد ذرات آگلوتیناسیون باشد، تا نتیجه قطره آنتی سرم قابل اطمینان محسوب شود.
- آگلوتیناسیون خود به خودی (اتوآگلوتیناسیون): وجود ذرات آگلوتیناسیون در قطره سرم فیزیولوژی، که به علت خشن بودن کلنی (Rough) ایجاد می شود. در این صورت تشکیل ذرات آگلوتیناسیون در قطره آنتی سرم فاقد ارزش است.
  - **توجه:** گاهی استفاده از محیط های حاوی قند زیاد مانند TSI یا KIA می تواند باعث ایجاد آگلوتیناسیون خود به خودی شود. در این موارد کلنی را بر روی محیط بدون قند مانند بلاد آگار کشت داده و آزمایش آنتی سرم را از روی محیط بلاد آگار تکرار نمایید.

آزمایش آنتی سرم

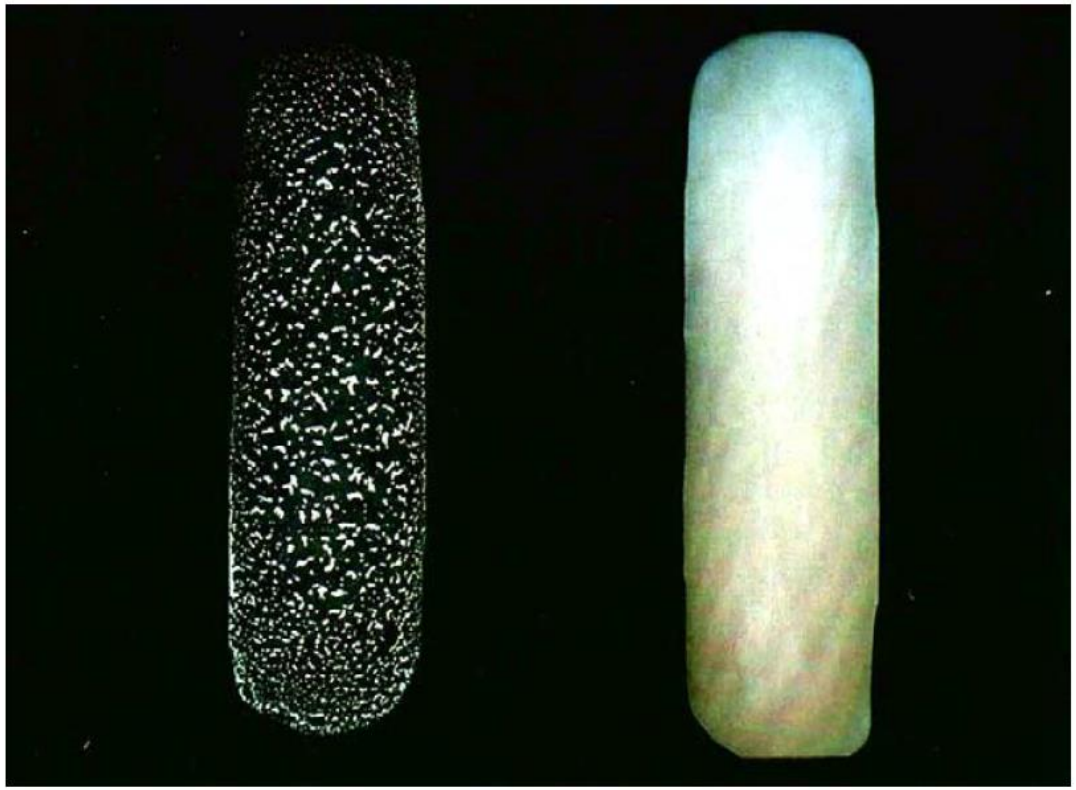
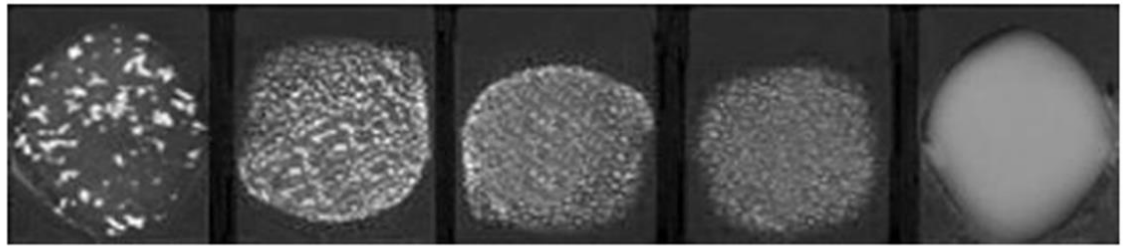


Figure V1-1. Antisera to the O1 serogroup of *V. cholerae* will agglutinate homologous organisms (left). A normal serum or saline control (right) does not show agglutination

آزمایش آنتی سرم

Score and record the results as follows:

4+	All organisms are clumped and the supernatant, or suspending fluid is clear
3+	About 75% agglutination, the supernatant fluid is slightly cloudy
2+	About 50% agglutination, the supernatant fluid is moderately cloudy
1+	About 25% agglutination, the supernatant fluid is cloudy
Tr	Trace amount of agglutination present
Negative	No agglutination apparent and suspension remains homogenous.



4+ **3+** **2+** **1+** **Negative**

آزمایش آنتی سرم
۲- تعیین سروتایپ

- ایزوله های سروگروه O1 *ویبریو کلرا* به ۳ سروتایپ اینابا، اگاوا و هیکوجیما (بسیار نادر) تقسیم می شوند.
- تشخیص سروتایپ بر اساس آگلوتیناسیون با آنتی ژن های O اختصاصی با آنتی سرم های مونوالان اینابا و اگاوا صورت می گیرد.

Identifying characteristics of serotypes of *V. cholerae* serogroup O1

Serotype	Major O factors Present	Agglutination in absorbed serum	
		Ogawa	Inaba
Ogawa	A, B	+	-
Inaba	A, C	-	+
Hikojima	A, B, C	+	+

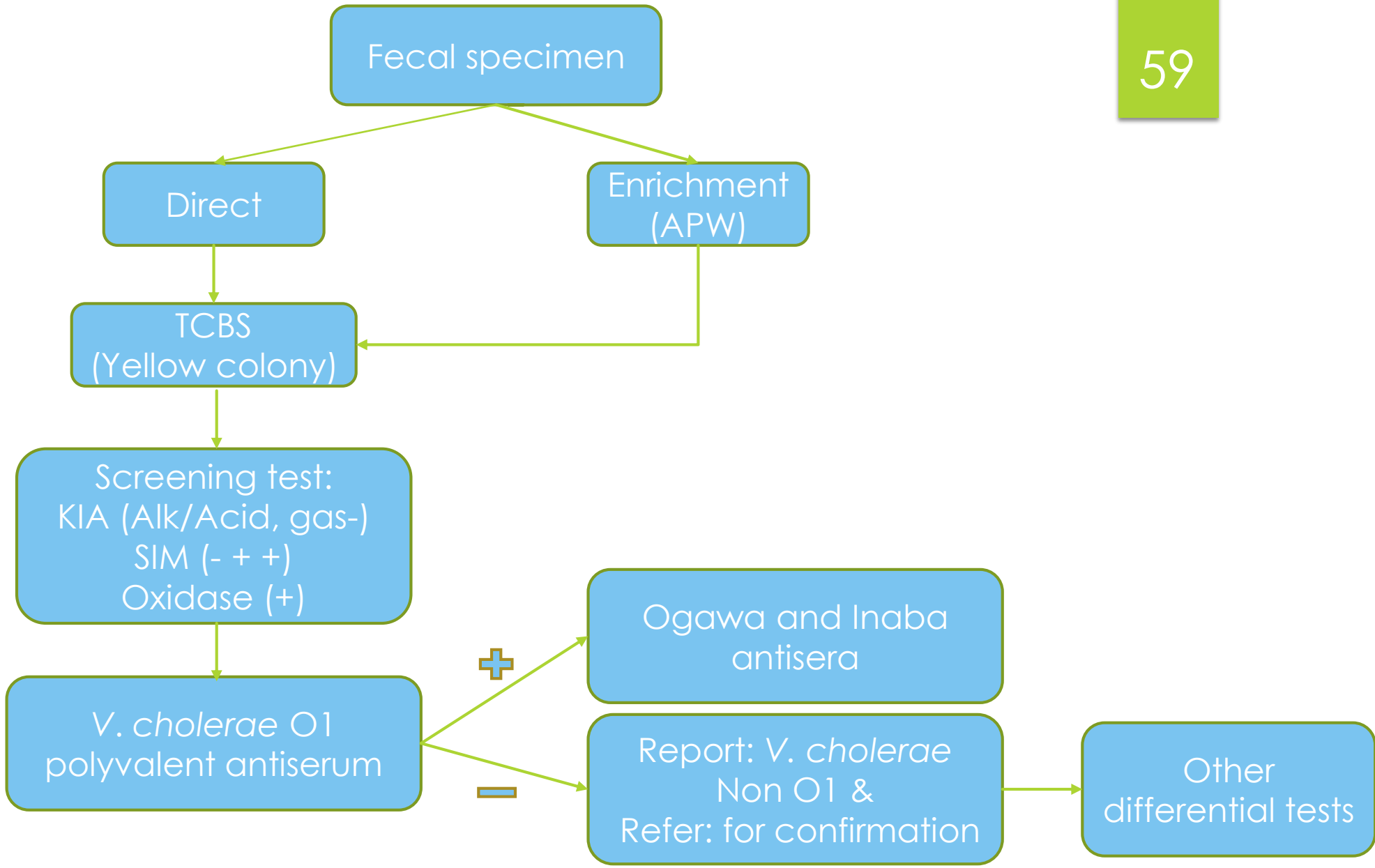
آزمایش آنتی سرم
۲- تعیین سروتایپ

- در صورت ایجاد واکنش مثبت با آنتی سرم پلی والان O1، آزمایش با آنتی سرم های مونووالان اینابا و اگاوا به طور **همزمان** انجام شود.

Vibrio cholerae O Antisera			
Poly O1	**Inaba**	**Ogawa**	**Report**
+	+	-	***V.cholerae*** **serotype Inaba**
+	-	+	***V.cholerae*** **serotype Ogawa**
+	+	+	***V.cholerae*** **Serotype Hikojima**
-	کاربرد ندارد	کاربرد ندارد	***V.cholerae*** **Non O1**

آزمایش آنتی سرم
۲- تعیین سروتایپ

- آنتی سرم های اینابا و اگاوا هرگز نباید با سویه هایی که با آنتی سرم O1 منفی هستند، استفاده شوند.
- ایزوله هایی که با آنتی سرم Poly O1 واکنش آگلوتیناسیون ضعیفی دارد، اما با آنتی سرم های اینابا یا اگاوا آگلوتیناسیون ندارند، سروگروه O1 نمی باشند.
- سویه هایی که با هر دو آنتی سرم اینابا و اگاوا خیلی شدید و همزمان با یکدیگر آگلوتینه دارند، بسیار نادر هستند. اگر چنین واکنشی مشاهده شود:
  ۱. آنتی سرم ها را از نظر ظاهری بررسی نمایید، که فاقد هر گونه ذره، رسوب و کدورت باشد.
  ۲. در صورت وجود نداشتن مشکل ظاهری آنتی سرم، سویه را برای آزمایش های بیشتر به آزمایشگاه مرجع ارسال نمایید.



Procedure for recovery of *Vibrio cholerae* O1 from fecal specimens

Table IV-2. Differential characteristics of selected members of *Vibrionaceae* and *Enterobacteriaceae*.

TEST	ORGANISM						
	Vibrio cholerae	*Vibrio mimicus*	*Halophilic vibrios*	*Aeromonas hydrophila*	*Aeromonas veronii*	*Plesiomonas shigelloides*	*Enterobacteriaceae*
KIA	K/A	K/A	V	V	K/AG	K/A	V
TSI	A/A	K/A	V	V	A/AG	K/A	V
String	+	+	+[a]	-	-	-	-
Oxidase	+	+	+	+	+	+	-
Gas from glucose	-	-	-[b]	+	+	-	V
Sucrose	+	-	V	V	+	-	V
Lysine	+	+	V	V	+	+	V
Arginine	-	-	V	+	-	+	V
Ornithine	+	+	V	-	+	+	V
VP	V	-	V	V	+	-	V
Growth in 0% NaCl[c]	+	+	-	+	+	+	+
Growth in 1% NaCl[c]	+	+	+	+	+	+	+

Note: V=variable reaction
[a] *V. parahaemolyticus*, *V. cincinnatiensis*, and *V. damsel* give variable reactions.
[b] *V. furnissii* and *V. damsel* are variable for gas from glucose.
[c] Nutrient broth base (Difco Laboratories, Detroit, MI)

Halophilic *Vibrios*: *V. parahaemolyticus, V. alginolyticus, V. vulnificus*

TABLE 20-2 Salient Features for the Identification of *Vibrio*, *Aeromonas*, and *Plesiomonas*

	Vibrio	*Aeromonas*	*Plesiomonas*
Gram-stain reaction	–	–	–
Oxidase activity	+	+	+
Resistance to 0/129*			
10 µg	+/–	+	+/–
150 µg	–	+	–
Growth in nutrient broth with:			
0% NaCl	–/+	+	+
6.5% NaCl	+	–	–
Acid from:			
Glucose	+	+	+
Inositol	–	–	+
Mannitol	+	+/–	–
Sucrose	+/–	+/–	–
Gelatin liquefaction	+	+	–

Carnahan AM: Update on *Aeromonas* identification, *Clin Microbiol Newsl* 13:169, 1991.

+, Most strains positive; –, most strains negative; +/– or –/+, predominant reaction first.

*Vibriostatic agent (2, 4-diamino-6, 7-diisopropylpteridine).

Oxidase-Positive, Fermentative, Gram-Negative Bacilli: Differential Characteristics of *Aeromonas hydrophila, Plesiomonas shigelloides, Chromobacterium violaceum*, and *Vibrio cholerae*

Characteristics	*A. hydrophila*	*P. shigelloides*	*C. violaceum*	*V. cholerae*
Kligler's iron agar (slant/deep/ hydrogen sulfide)	K/A/–	K – A/A/–	K/A/–	K/A/–
Catalase	+	+	+	+
Esculin	+	–	–	–
Motility	+	+	+	+
ONPG	+	+	–	+
Indole	+	+	–	+
Voges–Proskauer	(+)	–	–	(–)
Lysine decarboxylase	+	+	–	+
Ornithine decarboxylase	–	+	–	+
Carbohydrates:				
Lactose	(–)	(+)	–	–
Sucrose	+	–	(–)	+
Mannitol	+	–	–	+
Inositol	–	+	–	–
Growth in 1% peptone with:				
0% NaCl	+	+	+	+
7% NaCl	–	–	–	–
11% NaCl	–	–	–	–

+, 90% or more of strains are positive; (+), 51%–89% of strains are positive; (–), 51%–89% of strains are negative; –, 90% or more of strains are negative; V, variable; K/A, alkaline slant/acid deep; K – A/A, alkaline to acid slant/acid deep; ONPG, *o*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside.

ویبریو کلرا

Test	Vibrio cholerae	Aeromonas hydrophila	Plesiomonas shigelloides
KIA	Alk/Acid	Alk/Acid or Acid/Acid	Alk/Acid or Acid/Acid
TSI	Acid/Acid	Alk/Acid or Acid/Acid	Alk/Acid or Acid/Acid
H_2S	-	-	-
Gas from glucose	–	+	–
Catalase	+	+	+
Oxidase	+	+	+
String	+	–	–
Motility	+	+	+
Indole	+	+	+
Esculin hydrolysis	–	+	–
DNase, 25°C	+	+	–
Lysine decarboxylase	+	V	+
Arginine dehydrolase	–	+	+
Ornithine decarboxylase	+	–	+
Gelathin liquefaction, 22°C	+	+	–
ONPG	+	+	+
VP	V	V	–
Resistance to O/129 150 µg	-	+	-
Growth in 0% NaCl	+	+	+
Growth in 1% NaCl	+	+	+
Growth in 6.5% NaCl	+	–	–
Carbohydrate Lactose Sucrose Mannitol Inositol	 – + + –	 V + + -	 V - - +

محیط های کشت مورد نیاز برای کشت روتین مدفوع

۱) **MacConkey agar**

۲) **Hektoen Enteric (HE) agar or Xylose-Lysine-Desoxycholate (XLD) agar**

- انتخاب یکی از این دو محیط (HE or XLD) بر اساس کیفیت محیط و یا در دسترس بودن آن برای آزمایشگاه
- توجه: اگرچه محیط SS (Salmonella Shigella Agar) برای جداسازی سالمونلا به کار می رود، اما باعث مهار رشد برخی از سویه های شیگلا سونئی می شود. لذا نباید از این محیط به تنهایی و به جای MAC، XLD یا HEK استفاده نمود.
- برای هر کشت اولیه نمونه مدفوع هر بیمار استفاده از یک پلیت با قطر ۱۰-۸ سانتیمتری برای هر محیط الزامیست و نباید از پلیت ۶ سانتیمتری یا دو قسمتی استفاده نمود، زیرا احتمال جداسازی کاهش می یابد.

۳) **Selenite F (SF) Broth or GN Broth**

محیط های کشت مورد نیاز برای کشت روتین مدفوع

- استفاده از محیط های براث غنی کننده برای جداسازی تعداد کم سالمونلا و شیگلا از نمونه به خصوص در:
  - افراد دارای مشاغل حساس (مانند افراد شاغل در مهدهای کودک، آشپزخانه ها و ...)
  - ناقلین بدون علامت
  - آزمایشگاه هایی که موارد کم سالمونلا و شیگلا در پلیت (کشت مستقیم، بدون مرحله غنی سازی) جدا می کنند.
  - بکارگیری این محیط احتمال جداسازی سالمونلا و شیگلا را تا ۱۰ درصد افزایش می دهد.
  - توجه:
    - محیط SF عموما برای غنی سازی سالمونلاها کاربرد دارد، و ممکن است باعث مهار بعضی از شیگلاها شود. ۱۸ تا ۲۴ ساعت انکوباسیون
    - محیط GN برای غنی سازی سالمونلاها و شیگلاها به کار می رود، اما نیاز به ۶ تا ۸ ساعت انکوباسیون دارد.
    - هنگام ساخت محیط SF Broth، حرارت دادن بیش از اندازه باعث ایجاد ذراتی در محیط می شود، که در این صورت نمی توان از آن استفاده کرد.
    - همچنین عملکرد محیط SF Broth در شرایط بی هوازی بهتر می باشد، بنابراین مقدار محیط در لوله باید به اندازه ای باشد، که حداقل ۵ سانتی متر عمق ایجاد شود.

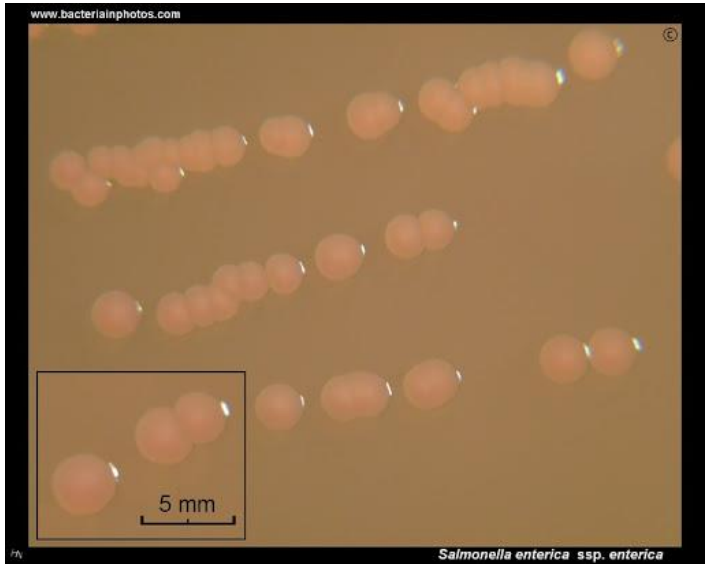
انکوباسیون محیط های کشت

- **انکوباسیون:**
- همه محیط های پلیتی را در دمای ۳۶°c (+/- 1°c) بدون CO2 به مدت ۲۴-۱۸ ساعت انکوبه نمایید، در صورت عدم رشد یا رشد ضعیف، انکوباسیون را تا ۴۸ ساعت ادامه دهید. به استثناء:
  - CIN برای جداسازی یرسینیا در دمای ۲۵°c به مدت ۴۸-۲۴ در شرایط هوای معمولی
- Selenite F Broth را در دمای ۳۶°c (+/- 1°c) بدون CO2 به مدت ۲۴-۱۸ ساعت انکوبه نمایید. سپس روی محیط های XLD و Mac ساب کالچر نمایید.
- GN Broth را در دمای ۳۶°c (+/- 1°c) بدون CO2 به مدت ۸-۶ ساعت انکوبه نمایید. سپس روی محیط های XLD و Mac ساب کالچر نمایید.

بررسی محیط های کشت پلیتی

	Salmonella (majority)	*Salmonella* Typhi	*Shigella spp.*
MacConkey Agar (MAC)	Smooth, colourless colonies. 2-4 mm	Smooth, colourless colonies. 1-3 mm	Smooth, colourless colonies. 2-3 mm
Hektoen Enteric Agar (HE)	Clear colonies with black centres. 2-4 mm	Clear colonies. Some may produce pinpoint black centres. 1-3 mm	Clear / green colonies 2-3 mm
Xylose Lysine Desoxycholate Agar (XLD)	Colonies may range in colour from clear to pink /red. Most colonies 2-4 mm with black centres.	May be inhibited. 1-3 mm clear colonies. Some with pinpoint black centres.	Red colonies 1-2 mm

بررسی محیط های کشت پلیتی
MacConkey agar

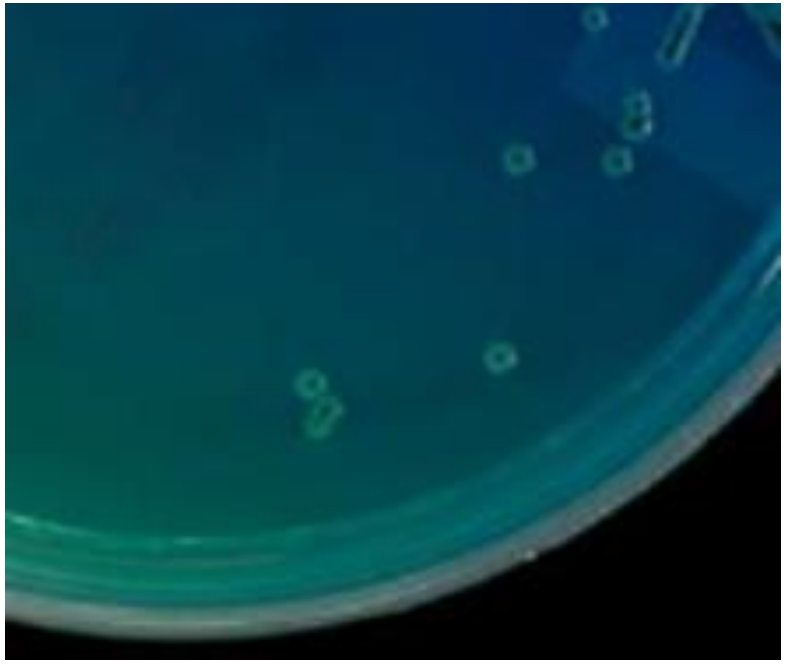


MacConkey agar with *Salmonella* spp.: Lactose negative colonies. Similar morphology will be observed with *Shigella* spp.

بررسی محیط های کشت پلیتی
MacConkey agar

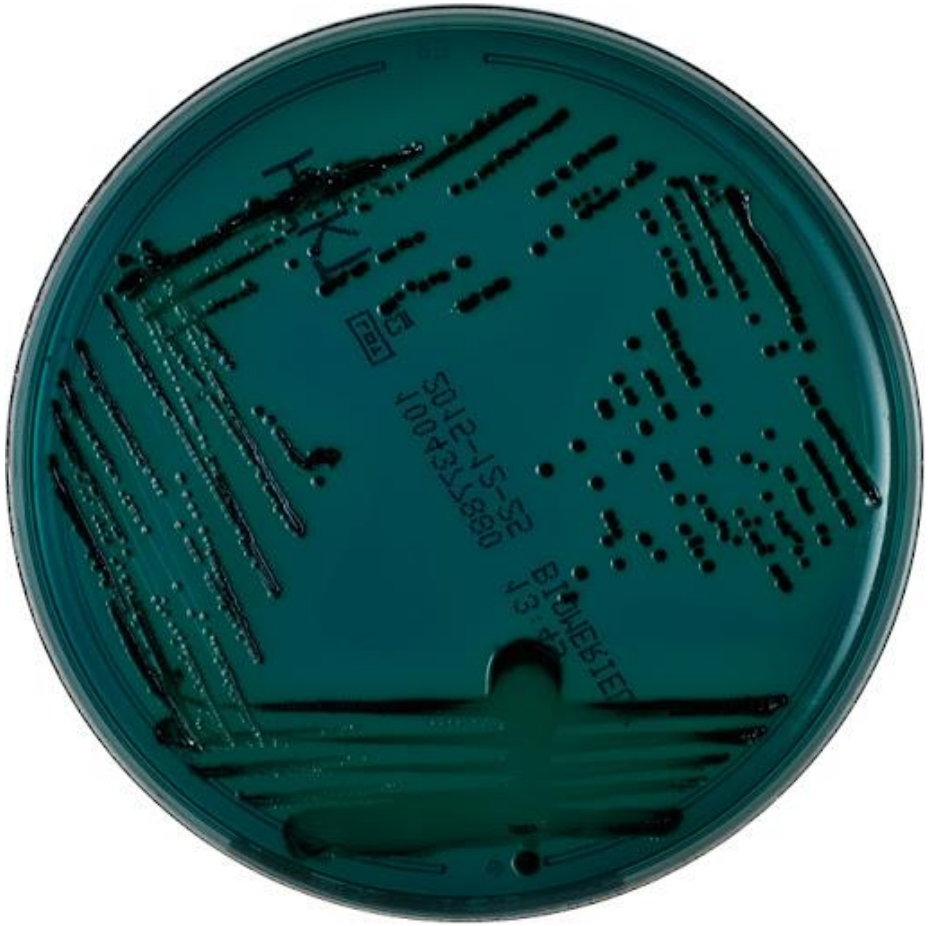
MacConkey agar with *E. coli*: Lactose positive colonies.

بررسی محیط های کشت پلیتی
Hektoen Enteric Agar



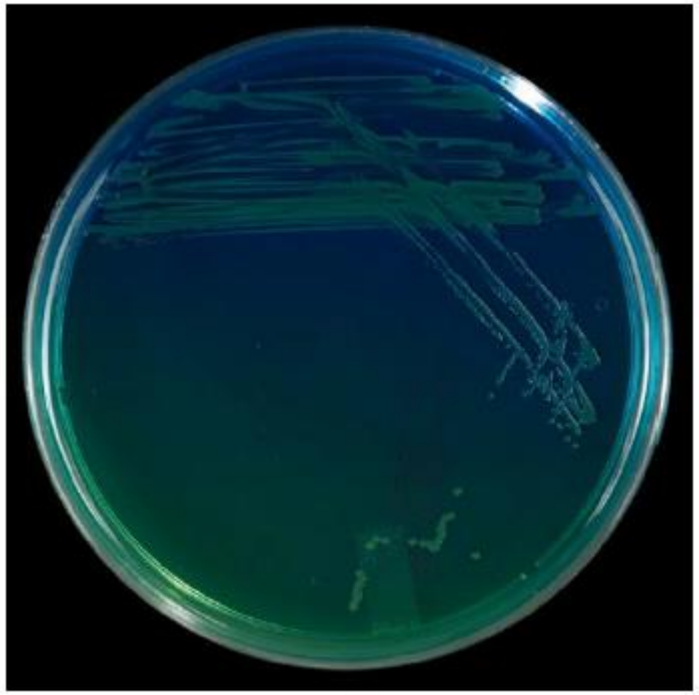
Hektoen Enteric Agar with *Salmonella* Typhi: clear colonies with small black centres: trace hydrogen sulphide production. Most other *Salmonella* serovars will produce colonies with larger black centres (similar to XLD plate below).

بررسی محیط های کشت پلیتی
Hektoen Enteric Agar



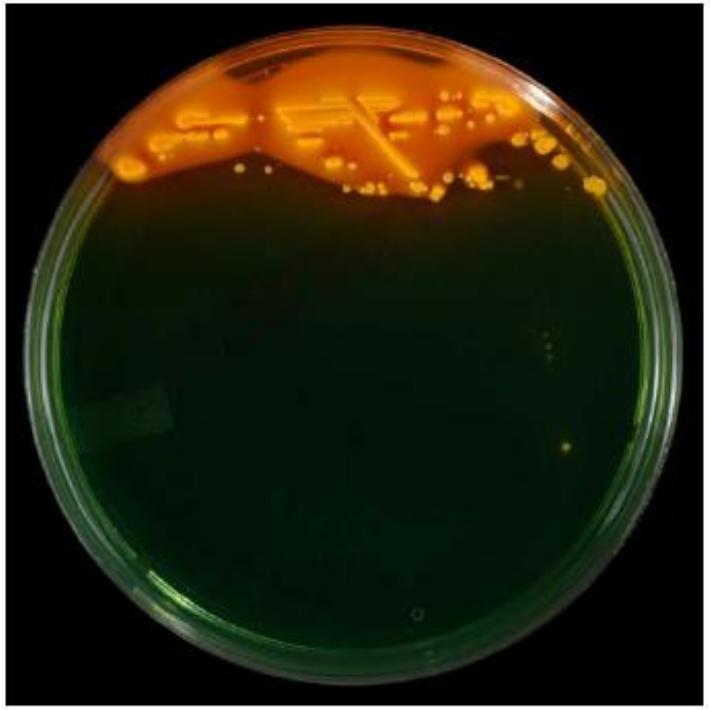
***Sal*. Typhimurium**

بررسی محیط های کشت پلیتی
Hektoen Enteric Agar

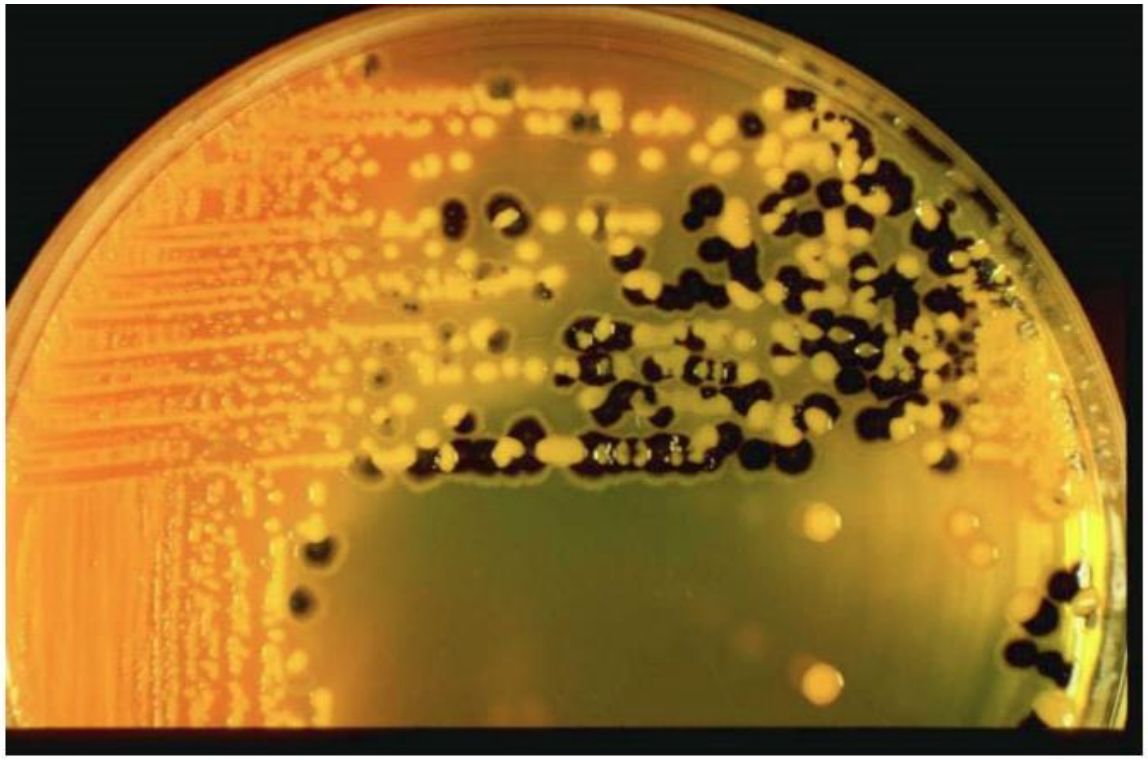


Hektoen Enteric Agar with *Shigella* spp.: small, clear (lactose, sucrose, salicin, H2S negative) colonies.

بررسی محیط های کشت پلیتی
Hektoen Enteric Agar

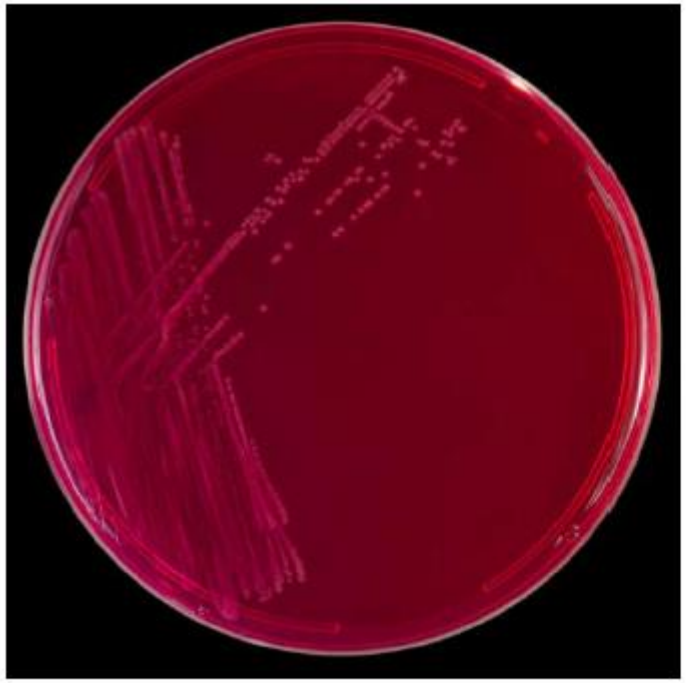


Hektoen Enteric Agar with *E. coli*: yellow colonies



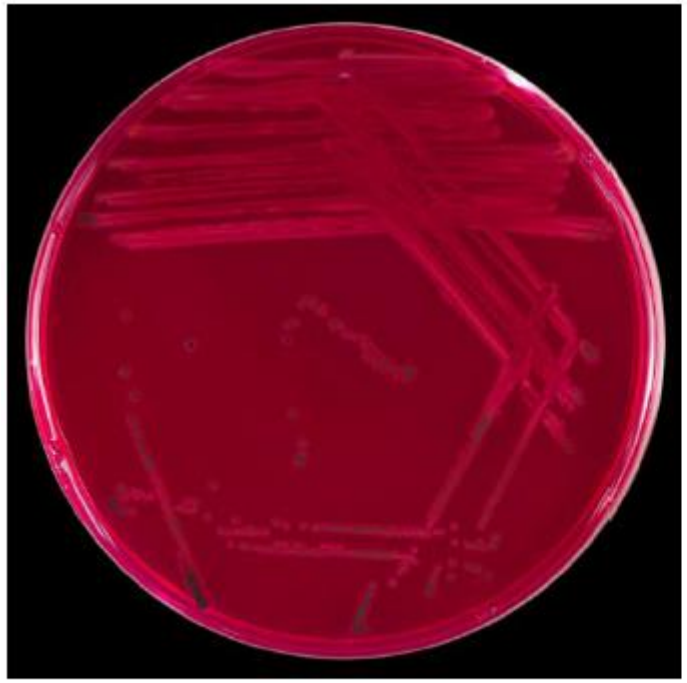
HEA: *Salmonella* (black colonies) and *E.coli* (salmon coloured colonies)

بررسی محیط های کشت پلیتی
XLD agar



XLD agar with *Shigella* spp.: clear colonies

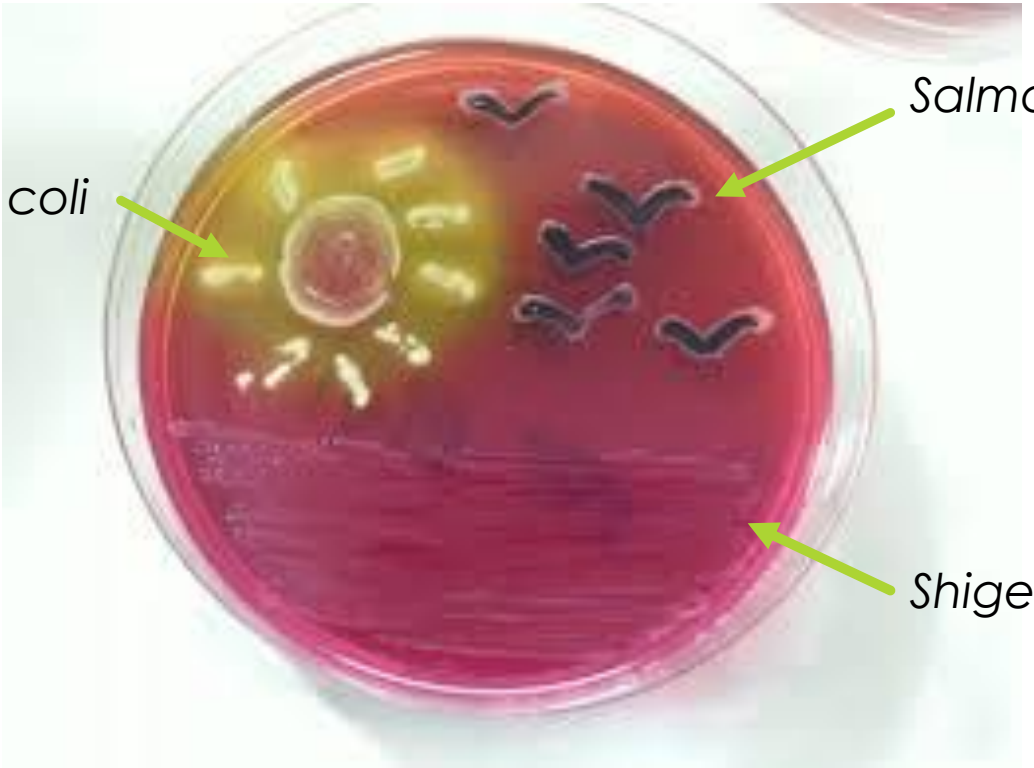
بررسی محیط های کشت پلیتی
XLD agar



XLD agar with *Salmonella* spp.: clear colonies with black centres.

بررسی محیط های کشت پلیتی
XLD agar

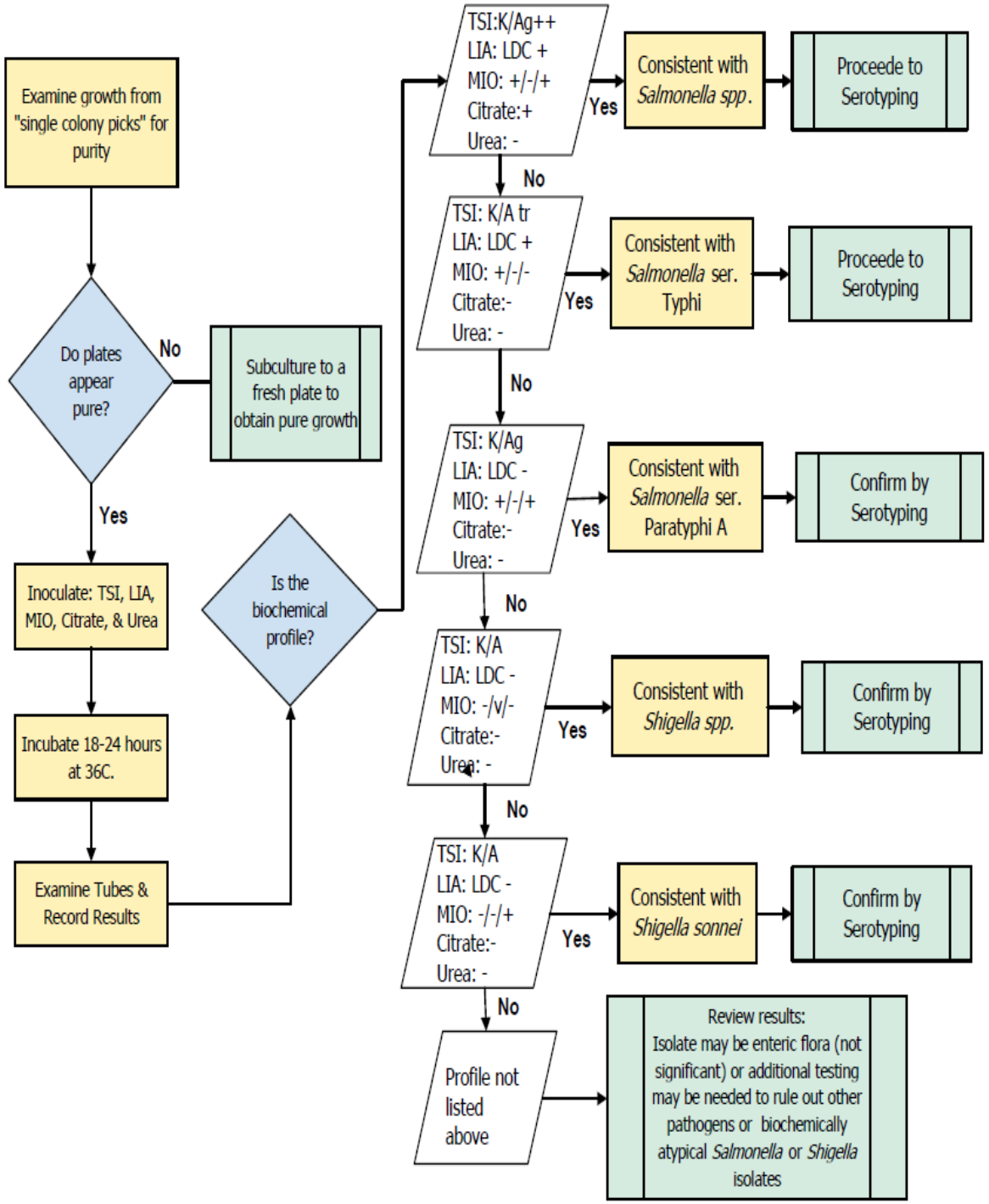
XLD agar with *E. coli:* yellow colonies



انتخاب تست های بیوشیمیایی برای تشخیص سالمونلا و شیگلا

- کلنی های مشکوک به سالمونلا یا شیگلا باید با تست های بیوشیمیایی مطابق الگوریتم غربالگری شوند. پانل تست های تشخیصی شامل:
  - TSI یا KIA
  - LIA (Lysine Iron Agar)
  - (SIM) SH2-Indol-Motility
  - Simmons citrate agar
  - Urea agar
  - Ornithine decarboxylase (اختیاری)
- این پانل برای rule-in / rule-out سالمونلا یا شیگلا و افتراق بیوشیمیایی *Salmonella* Typhi و *Salmonella* Paratyphi A از سایر سروتایپ های سالمونلا کفایت می کند.

الگوریتم تشخیصی سالمونلا و شیگلا



سالمونلا و شیگلا

Comparative Phenotypic Profiles of *Salmonella* species, *Salmonella* ser. Typhi, *Salmonella* ser. Paratyphi A, and *Shigella* sp.

	Salmonella (majority)	*Salmonella* serovar Typhi	*Salmonella* serovar Paratyphi A	*Shigella spp.*
TSI (slant)[1]	K	K	K	K
TSI (butt)[1]	A	A	A	A
TSI (H_2S)[2]	+	Trace amount	-	Negative
TSI (gas)[3]	+	-	+	- (most)
LIA[4]	+	+	-	-
MIO (Motility)[5]	+	+	+	-
MIO (Ornithine)[6]	+	+	+	*S. dysenteriae, S. flexneri, & S. boydii*: - *S. sonnei*: +
MIO (Indol)[7]	-	-	-	Varies by species / serotype
Urea[8]	-	-	-	-
Citrate (Simmons)	+	-	-	-

Phenotypes recorded after 18-24 hours at 36ºC.

سالمونلا و شیگلا

TSI: Triple Sugar Iron Agar
LIA: Lysine Iron Agar
MIO: Motility-Indol-Ornithine Agar
Urea: Urea Agar
Citrate (Simmons): Simmons Citrate Agar

1) A: Acid (yellow colour); K: Alkaline (red colour)
2) H_2S: Production of hydrogen sulphide evidenced by blackening of agar.
3) Gas: Gas production evidenced by splitting of agar or presence of bubbles.
4) LIA: Lysine decarboxylation (positive) evidenced by purple colour in butt of tube.
5) MIO (Motility): Motility (positive result) evidenced by diffuse growth through agar
6) MIO (Ornithine): Ornithine decarboxylation (positive) evidenced by purple colour in bottom 3/4 of tube
7) MIO (Indol): Indol production (positive reaction) evidenced by red colour development after addition of Kovacs' reagent.
8) Urea: Urease activity (positive reaction) detected by red colour development on slant.
9) Citrate: Citrate utilisation (positive reaction) evidenced by blue colour development on slant

محیط های کشت مورد نیاز برای کشت نمونه مدفوع در جداسازی *ایکلای* O157

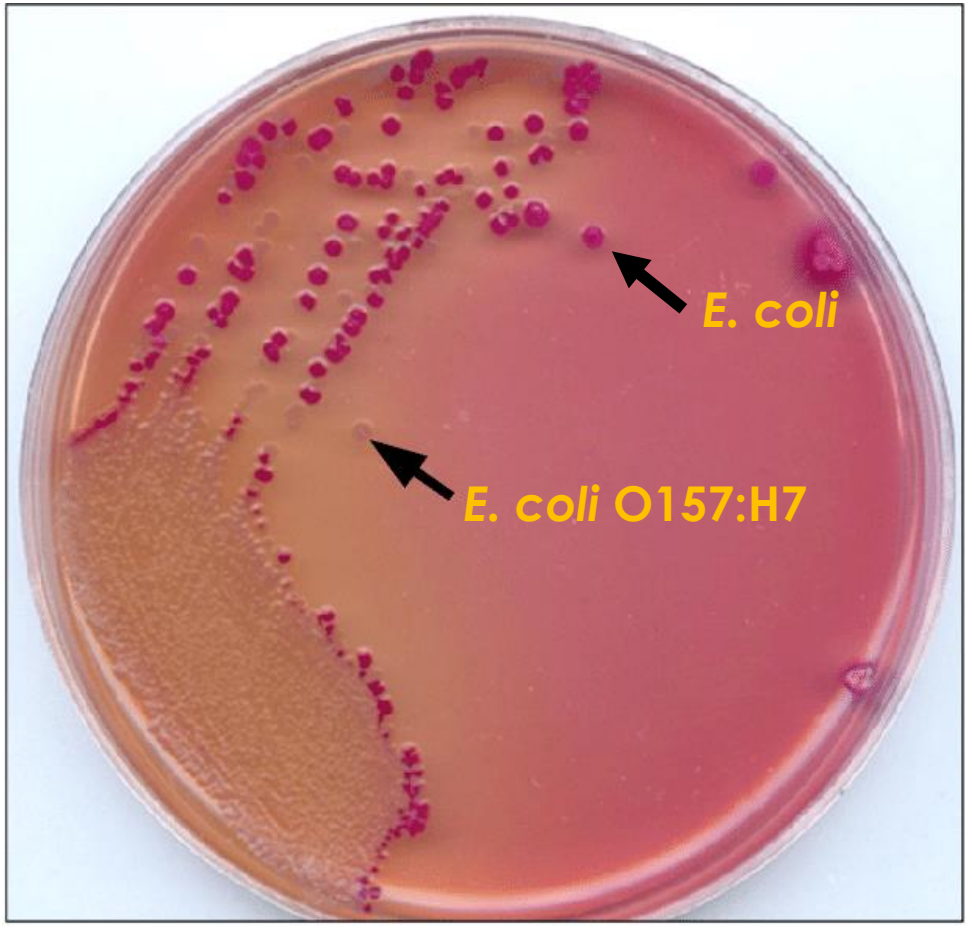
- **محیط های اختصاصی برای *E. coli* O157:**
  - Sorbitol MAC (SMAC) و یا
  - MAC-sorbitol with cefixime and tellurite (CT-SMAC) (خاصیت انتخابی بهتر)

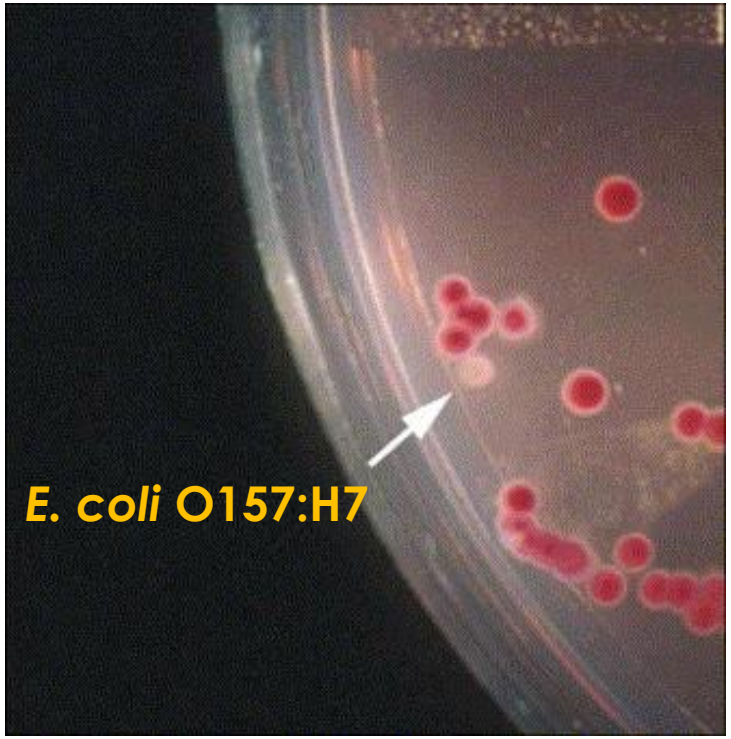
- اگر کلنی سوربیتول-منفی روی Smac مشکوک به *E. coli* O157 وجود داشت و با تست های بیوشیمیایی و سرولوژی تشخیص داده و تایید شد، باید در سطح جنس، گونه و سروتیپ گزارش شود:

  "*E. coli* serotype O157 isolated."

  - **توجه:**
  - بر اساس درخواست پزشک/واحد مبارزه با بیماری ها و یا علائم بالینی بیمار
  - به هیچ عنوان نباید از سایر آنتی سرم های *E. coli* برای تعیین سروگروه های *E. coli* جدا شده از نمونه های مدفوع استفاده شود.
  - شناسایی و گزارش طغیان های ناشی از *E. coli* صرفا به لحاظ اپیدمیولوژیک ارزش داشته و توسط آزمایشگاه مرجع کشوری *E. coli* انجام می شود.
  - از آنجایی که گزارش آزمایش تعیین حساسیت ضد میکروبی برای *E. coli* کاربرد ندارد، به هیچ عنوان نباید برای سویه های *E. coli* جدا شده از نمونه مدفوع آزمایش تعیین حساسیت ضد میکروبی انجام و گزارش گردد.

بررسی محیط های کشت پلیتی
Sorbitol MAC (SMAC)

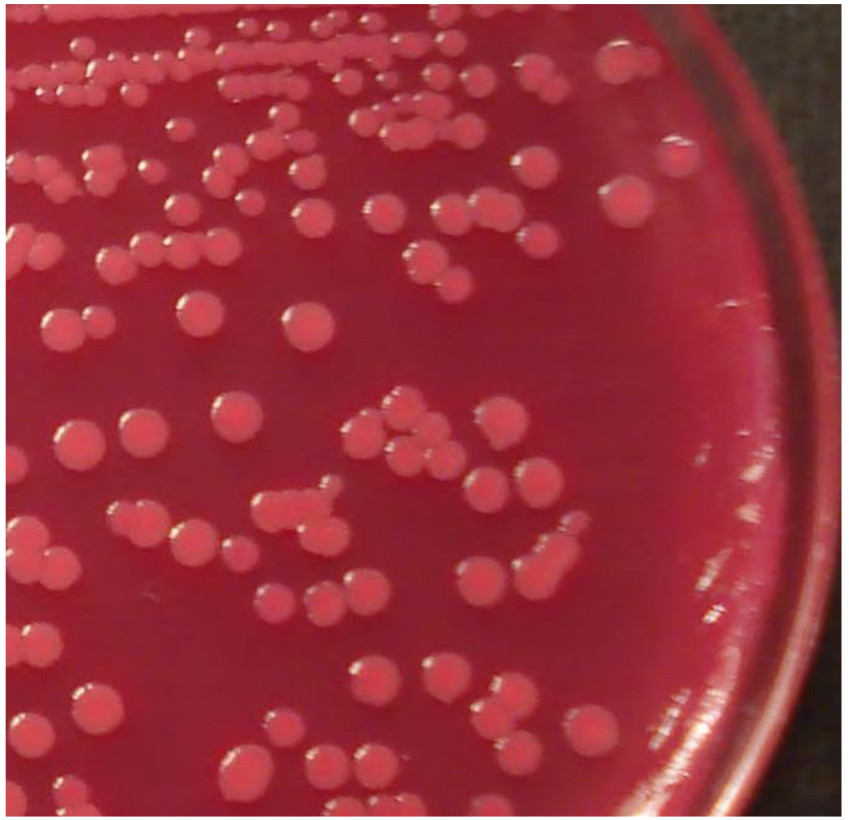




Mixtures of colorless and pink colonies grown on sorbitol-MacConkey agar after overnight incubation at 35°c.

بررسی محیط های کشت پلیتی
MacConkey agar

***E. coli* O157 on MacConkey agar**



برنامه کنترل کیفیت

- برنامه کنترل کیفیت (QC) به ما اطمینان می دهد که اطلاعات تولید شده در یک آزمایشگاه صحیح، قابل اعتماد و تکرارپذیر باشد. این موضوع با ارزیابی کیفیت نمونه ها، پایش عملکرد روش انجام آزمایش ها، معرف ها، محیط های کشت، تجهیزات و کارکنان، مرور نتایج آزمایش و مستند کردن اعتبار روش های آزمایش محقق می شود.
- پارامترهای اختصاصی کیفیت شامل:
  - کارایی وسایل و تجهیزات: برای اطمینان از عملکرد مناسب دستگاه یا مشخص شده توسط سازنده، عملکرد تجهیزات را بررسی و ثبت نمایید. نگهداری پیشگیرانه روتین را ثبت نمایید. گزارش های نگهداری آن را به مدت عمر تجهیز نگهداری کنید.
  - محیط های تهیه شده در آزمایشگاه و یا آماده مصرف تجاری
  - رنگ ها، معرف ها و آنتی سرم ها
  - کیت های تجاری: هر سری ساخت و هر محموله جدید که به آزمایشگاه می رسد را آزمایش کنید. مطابق توصیه های سازنده کیت برای آزمایش QC عمل نمایید.

برنامه کنترل کیفیت

- پارامترهای عمومی کیفیت شامل:
- جمع آوری و انتقال نمونه: وجود دستورالعمل، معیارهای قبول نمونه ها، معیارهای رد برای نمونه های غیر قابل قبول
- دستورالعمل (راهنما) انجام آزمایش: شامل مراحل قبل از آزمایش، انجام آزمایش و بعد از آزمایش. کارایی آزمایش، محدوده های تولرانس، قابل پذیرش بودن نمونه ها، آماده سازی معرف ها، کنترل کیفیت، محاسبات و گزارش را در آن تعیین کنید. دستورالعمل ها را بصورت سالانه مرور کنید. تغییرات را با ذکر تاریخ تصویب کنید. آنها را در دسترس و در محیط کاری قرار دهید. دستورالعمل های منسوخ را تا دو سال نگهدارید.
- کارکنان: استخدام تعداد کارکنان مجرب متناسب با حجم و پیچیدگی کار. آموزش کارکنان متناسب با استانداردهای اجرایی و ارزیابی آنها بصورت سالانه.
- کنترل کیفیت: همه نتایج QC را در فرم های QC یا کامپیوتر ثبت کنید. همه نتایج خارج از کنترل را به سوپروایزر گزارش کرده و اقدام (ات) اصلاحی را در فرم QC ثبت نمایید. گزارش های QC را بصورت ماهانه با سوپروایزر بررسی کنید. گزارش های QC را حداقل به مدت دو سال نگهداری نمایید.

برنامه کنترل کیفیت

- گزارش بیماران: نتایج را فقط به کارکنانی که برای این کار مجازند، گزارش کنید. نتایج بحرانی را بلافاصله به درخواست دهنده آزمایش اطلاع دهید. وقتی نتایج را بطور شفاهی گزارش می دهید، نام فردی که به آن اطلاع دادید، تاریخ و زمان گزارش را ثبت کنید. خطاها در گزارش بیمار به موقع اصلاح شود. گزارشات را حداقل تا دو سال نگهداری کنید. البته این زمان ممکن است در جاهای مختلف، متفاوت باشد.
- مهارت آزمایی: در یک برنامه ارزیابی خارجی کیفیت متناسب با سطح آزمایشگاه خود شرکت کنید. برنامه مهارت آزمایی داخلی هم برای آزمایشگاه خود در نظر بگیرید.

برنامه کنترل کیفیت
برنامه ارزیابی خارجی کیفیت (مهارت آزمایی)

- شرکت در برنامه ارزیابی خارجی کیفیت میکروب شناسی بطور مستمر و وجود سوابق
- استفاده از نتایج به دست آمده از برنامه ارزیابی خارجی کیفیت، برای شناسایی، ریشه یابی و رفع خطاها
- ثبت اقدامات انجام شده در سوابق
  - شناسایی خطا
    - مقایسه پاسخ آزمایشگاه شما با پاسخ مورد انتظار (پاسخ صحیح) و بدست آوردن خطا
  - ریشه یابی خطای بدست آمده
    - یافتن علت خطا، مانند: عدم انجام آزمایش کنترل کیفیت، بکارگیری روش نادرست انجام آزمایش، عدم آگاهی لازم انجام دهنده آزمایش و ...
  - اقدام اصلاحی برای رفع خطا
    - مانند: اصلاح دستورالعمل و روش انجام آزمایش، آموزش، انجام آزمایش های کنترل کیفیت مستمر و ...

کنترل کیفیت

- وجود دستورالعمل های کنترل کیفیت در بخش میکروب شناسی:
  - محیط های کشت
  - معرف ها و رنگ ها
  - آنتی سرم ها
- آگاهی کارکنان نسبت به محتویات آنها، از نظر روش و دفعات انجام آزمایش کنترل کیفیت
- وجود سوابق کنترل کیفیت موارد فوق در فرم های مربوطه به طور کامل و نگهداری آنها (حداقل به مدت دو سال)
- وجود فهرستی از محیط های کشت، معرف ها، آنتی سرم ها و دیسک های آنتی بیوتیکی موجود شامل نام شرکت سازنده، سری ساخت، تاریخ شروع استفاده و تاریخ انقضاء در بخش میکروب شناسی
- تمامی محیط های کشت، دیسک های آنتی بیوتیکی و تشخیصی، معرف ها و آنتی سرم های خریداری شده و مورد استفاده در آزمایشگاه باید دارای تأییدیه (کتبی/سایت imed) از وزارت بهداشت باشند.
- تمامی معرف ها، آنتی سرم ها، محیط های کشت و دیسک های تشخیصی و آنتی بیوتیکی باید بعد از تاریخ انقضاء دور انداخته شود و آزمایشگاه مرکز بهداشت مجاز به استفاده از آنها نمی باشد.

دستورالعمل آماده سازی، تهیه و کنترل کیفیت محیط های کشت

آزمایشگاه مرجع سلامت

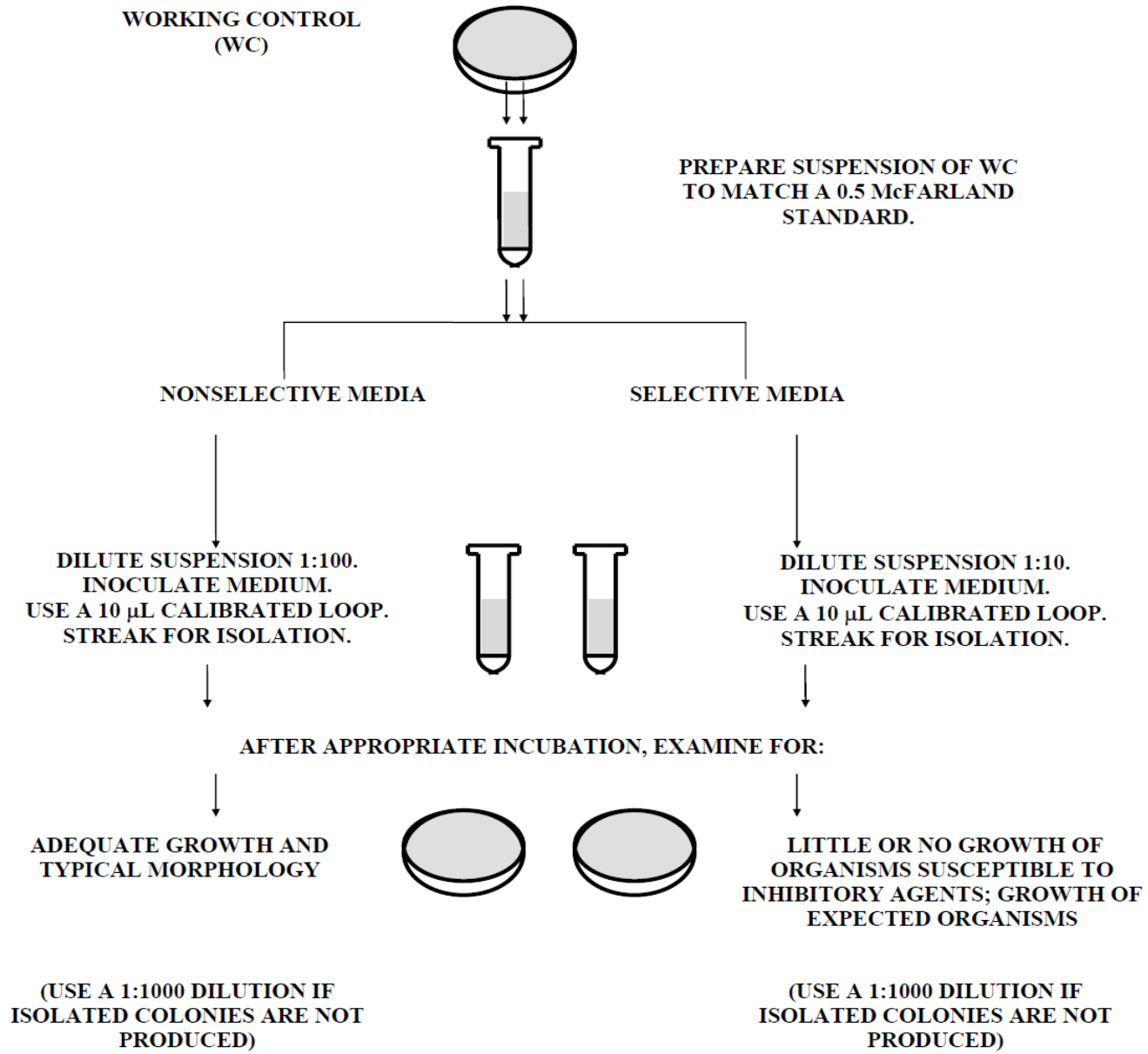
وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی

سال ۱۳۹۷

فرم ثبت تهیه (ساخت) محیط کشت

نام محیط کشت	نام تولید کننده محیط	سری ساخت پودر محیط	تاریخ ساخت در آزمایشگاه	نام فرد سازنده محیط	ماده افزودنی (در صورت بکارگیری)	سری ساخت ماده افزودنی	فرم محیط (لوله، پلیت)	تعداد ساخته شده	pH (در صورت نیاز)

شکل ۱ - آماده سازی سوسپانسیون برای کنترل کیفیت محیط های کشت



جدول شماره ۳- الزامات کنترل کیفیت محیط های کشت

محیط کشت	اتمسفر، مدت زمان و دمای انکوباسیون	ارگانیسم های کنترلی (شماره ATCC)	نتایج قابل انتظار
Alkaline peptone water (APW)	هوازی، ۱۲- ۶ ساعت، ۳۵°C	*V. cholerae* non O1 *E. coli* (25922)	رشد بر روی ساب کالچر (بلاد آگار) مهار جزئی تا کامل بر روی ساب کالچر (بلاد آگار)
Bile esculin agar	هوازی، ۴۸- ۲۴ ساعت، ۳۵°C	*E. faecalis* (29212) *S. pyogenes* (19615)	رشد می کند، اطراف کلنی ها سیاه می شود (نصف یا بیشتر محیط سیاه می شود) مهار (جزئی تا کامل)؛ اطراف کلنی ها سیاه نمی شود
Blood agar (BA)—nonselective sheep blood agar media	هوازی یا Co_2، ۲۴- ۱۸ ساعت، ۳۵°C	*S. pyogenes* (19615) *S. pneumoniae* (6305)	رشد می کند، همولیز بتا رشد می کند، همولیز آلفا
		S. aureus (25923) or *E. coli* (25922)	رشد می کند رشد می کند
Blood agar-CAMP test (trypticase soy agar [TSA] with sheep blood only)	هوازی، ۲۴- ۱۸ ساعت، ۳۵°C	*S. aureus* (33862) or (25923) *S. agalactiae* (12386) *S. pyogenes* (19615)	رشد می کند واکنش مثبت (تشکیل نوک پیکان شفاف) واکنش منفی (عدم تشکیل نوک پیکان)
Cary-Blair transport medium	هوازی، ۲۴- ۱۸ ساعت، ۲۵°C	*S. typhimurium* (14028) *V. cholerae* non O1 *S. flexneri* (12022)	روی ساب کالچر (بلاد آگار) رشد می کند روی ساب کالچر (بلاد آگار) رشد می کند روی ساب کالچر (بلاد آگار) رشد می کند
Enrichment broths for enterics (gram-negative [GN] broth, selenite broths)	هوازی، ۲۴- ۱۸ ساعت، ۳۵°C	*S. typhimurium* (14028) or *S. sonnei* (9290)	روی ساب کالچر (مکانکی آگار) رشد می کند روی ساب کالچر (مکانکی آگار) رشد می کند (ممکن است روی محیط های دارای سلنیت مهار شود)
		E. coli (25922)	مهار (جزئی تا کامل) بر روی ساب کالچر (مکانکی آگار)، اما از GN broth بر روی ساب کالچر رشد می کند

Hektoen enteric (HEK) agar	هوازی، ۲۴- ۱۸ ساعت، ۳۵°C	*S. typhimurium* (14028) *S. flexneri* (12022) *E. faecalis* (29212) *E. coli* (25922)	رشد می کند، کلنی های آبی تا سبز- آبی با مراکز سیاه رشد می کند، کلنی های سبز تا سبز- آبی مهار می شود (به طور جزئی)؛ کلنی های زرد مهار (جزئی تا کامل)؛ کلنی های زرد تا زرد-قرمز
Kligler iron agar (KIA)	هوازی، ۲۴- ۱۸ ساعت، ۳۵°C	*E. coli* (25922) *S. typhimurium* (14028) *S. flexneri* (12022) *P. aeruginosa* (27853)	A/A، ایجاد گاز، بدون SH_2 Alk/A، با یا بدون گاز، ایجاد SH_2 Alk/A، بدون گاز، بدون SH_2 Alk/Alk، بدون گاز، بدون SH_2
Lysine iron agar (LIA)	هوازی، ۲۴- ۱۸ ساعت، ۳۵°C	*S. typhimurium* (14028) *S. flexneri* (12022) *P. mirabilis* (43071)	Alk/Alk، ایجاد SH_2، بدون گاز Alk/A، بدون SH_2، بدون گاز Red/A، بدون گاز، بدون SH_2
MacConkey agar	هوازی، ۲۴- ۱۸ ساعت، ۳۵°C	*E. coli* (25922) *P. mirabilis* (12453) *S. typhimurium* (14028) *E. faecalis* (29212)	رشد می کند، کلنی های صورتی رشد می کند، کلنی های بی رنگ، مهار جزئی سوارمینگ رشد می کند، کلنی های بی رنگ مهار می شود (به طور جزئی)
MR-VP broth	هوازی، ۴۸- ۲۴ ساعت، ۳۵°C	*E. coli* (25922) *E. aerogenes* (13048)	MR مثبت (قرمز) و VP منفی (بدون تغییر) MR منفی (زرد) و VP مثبت (قرمز)
SIM medium	هوازی، ۴۸- ۲۴ ساعت، ۳۵°C	*E. coli* (25922) *S. typhimurium* (13311) *S. sonnei* (9290)	تولید SH_2 منفی، اندول مثبت و حرکت مثبت تولید SH_2 مثبت، اندول منفی و حرکت مثبت تولید SH_2 منفی، اندول منفی و حرکت منفی

Thiosulfate citrate bile salts sucrose (TCBS) agar	هوازی، ۲۴- ۱۸ ساعت، ۳۵°C	*V. cholerae* (9459) *V. parahaemolyticus* (17802) *E. coli* (25922) *P. aeruginosa* (10145) *E. faecalis* (29212)	رشد متوسط تا زیاد، کلنی های زرد رشد متوسط تا زیاد، کلنی های سبز آبی مهار جزئی یا کامل، کلنی های کوچک و شفاف مهار جزئی یا کامل، کلنی های سبز آبی مهار جزئی یا کامل، کلنی های کوچک و زرد
Triple sugar iron (TSI) agar	هوازی، ۲۴- ۱۸ ساعت، ۳۵°C	*E. coli* (25922) *S. typhimurium* (14028) *S. flexneri* (12022) *P. aeruginosa* (27853)	A/A، ایجاد گاز، بدون SH_2 Alk/A، با یا بدون گاز، ایجاد SH_2 Alk/A، بدون SH_2، بدون گاز Alk/Alk، بدون SH_2، بدون گاز
Urea agar/ broth	هوازی، ۴۸- ۸ ساعت، ۳۵°C	*P. mirabilis* (43071) *S. typhimurium* (13311)	اوره آز مثبت، رنگ قرمز صورتی اوره آز منفی، بدون تغییر رنگ
Xylose lysine desoxycholate (XLD) agar	هوازی، ۲۴ ساعت، ۳۵°C	*S. typhimurium* (14028) *S. flexneri* (12022) *E. faecalis* (29212) *E. coli* (25922)	رشد می کند، کلنی های قرمز با مراکز سیاه رشد می کند، کلنی های قرمز مهار جزئی مهار می شود (جزئی تا کامل؛ کلنی های زرد تا زرد-قرمز)
Moeller decaboxylase broth with amino acids (Arginine, Ornithine and Lysin)	بیهوازی، ۹۶- ۲۴ ساعت، ۳۵°C	*K. pneumoniae* (13883) *E. aerogenes* (13048) *S. typhimurium* (14028) *S. flexneri* (12022)	دهیدرولاز آرژینین و دکربوکسیلاز اورنیتین، منفی (A) و دکربوکسیلاز لایزین، مثبت (Alk) دهیدرولاز آرژینین، منفی و دکربوکسیلاز اورنیتین و دکربوکسیلاز لایزین، مثبت دهیدرولاز آرژینین، دکربوکسیلاز اورنیتین و دکربوکسیلاز لایزین، مثبت دکربوکسیلاز لایزین، منفی

فرم ثبت نتایج کنترل کیفیت محیط کشت

نام محیط کشت:

pH (در صورت نیاز):

شرکت سازنده	سری ساخت پودر محیط	مشخصات فیزیکی	استریل بودن	سویه کنترل کیفی	مورفولوژی کلنی	میزان رشد/واکنش	نتیجه نهایی	اقدام اصلاحی	نام فرد انجام دهنده آزمایش	تاریخ انجام آزمایش

کنترل کیفیت معرف ها

دیسک تشخیصی /معرف	ارگانیسم کنترل	شماره ATCC	نتیجه مورد انتظار	دفعات انجام آزمایش QC
Bacitracin, 0.04U	*Strep. pyogenes*	19615	هاله عدم رشد (بزرگتر از 10mm)	هر سری ساخت و خرید، سپس هر یک ماه
	Strep. agalactiae	12386	بدون هاله یا هاله کمتر از 10mm	
Catalase (3% H_2O_2)	*Staph. aureus*	25923	مثبت (ایجاد سریع حباب)	هر سری ساخت و خرید، سپس هر روز کاری
	Strep. pyogenes	19615	منفی (بدون حباب)	
Coagulase test	*Staph. aureus*	25923	مثبت (ایجاد لخته)	هر سری ساخت و خرید پلاسمای خرگوش، سپس هر روز کاری
	Staph. epidermidis	12228	منفی (عدم ایجاد لخته)	
Deoxycholate (10%) (Bile solubility test)	*Strep. pneumoniae*	6305	مثبت (حل شدن)	هر سری ساخت و خرید، سپس هر ۳ ماه
	Ent. faecalis	29212	منفی (حل نشدن)	
Ferric chloride (10%)	*Proteus mirabilis*	43071	مثبت (سبز رنگ)	هر سری ساخت و خرید، سپس هر ۳ ماه
	E. coli	25922	منفی (بدون تغییر رنگ)	
Indole (Kovacs)	*E. coli*	25922	مثبت (ارغوانی رنگ)	هر سری ساخت و خرید، سپس هر ۳ ماه
	Klebsiella pneumoniae	13883	منفی (بدون تغییر رنگ)	
Methyl Red	*E. coli*	25922	مثبت (قرمز رنگ)	هر سری ساخت و خرید، سپس هر ۳ ماه
	Klebsiella pneumoniae	13883	منفی (بدون تغییر رنگ)	
Ninhydrin (Hippurate hydrolysis test)	*Strep. agalactiae*	12386	مثبت (آبی پررنگ)	هر سری ساخت و خرید، سپس هر ۳ ماه
	Strep. pyogenes	19615	منفی (بنفش کمرنگ یا بدون تغییر رنگ)	
Novobiocin, 5µg, on BAP or MH agar	*Staph. aureus*	25923	≥22 mm	هر سری ساخت و خرید، سپس هر یک ماه
	Staph. saprophyticus	15305	≤15 mm	
ONPG	*E. coli*	25922	مثبت (زرد رنگ)	هر سری ساخت و خرید، سپس هر ۳ ماه
	Proteus mirabilis	29245	منفی (بدون تغییر رنگ)	

کنترل کیفیت معرف ها

دیسک تشخیصی /معرف	ارگانیسم کنترل	شماره ATCC	نتیجه مورد انتظار	دفعات انجام آزمایش QC
Optochin, 5µg (in 5 to 10% CO_2)	*Strep. pneumoniae*	6305	حساس (قطر هاله عدم رشد ≥ 16mm برای دیسک 10mm و قطر هاله عدم رشد ≥ 14mm برای دیسک 6mm)	هر سری ساخت و خرید، سپس هر یک ماه
	Strep. pyogenes	19615	مقاوم (بدون هاله عدم رشد)	
Oxidase	*P. aeruginosa*	27853	مثبت (بنفش)	هر سری ساخت و خرید، سپس هر روز کاری
	E. coli	25922	منفی (بدون تغییر رنگ)	
PYR test	*Ent. faecalis*	29212	مثبت (صورتی پررنگ تا قرمز)	هر سری ساخت و خرید، سپس هر ۳ ماه
	E. coli	25922	منفی (صورتی کمرنگ یا بدون تغییر رنگ)	
Voges-Proskauer	*Enterobacter cloacae*	13047	مثبت (قرمز)	هر سری ساخت و خرید، سپس هر ۳ ماه
	E. coli	25922	منفی (بدون تغییر رنگ)	
Antisera	مطابق دستورالعمل کنترل کیفیت هر آنتی سرم	-	-	هر سری ساخت و خرید، سپس هر ۶ ماه

فرم ثبت نتیجه کنترل کیفیت معرف اکسیداز

سری ساخت	تولید کننده	مشخصات فیزیکی	نتایج آزمایش با سویه های کنترل		نتیجه نهایی	اقدام اصلاحی	نام فرد انجام دهنده آزمایش	تاریخ انجام آزمایش
			E. coli ATCC 25922	*P. aeruginosa* ATCC 27853				

فرم ثبت نتیجه کنترل کیفیت معرف کواکس

سری ساخت	تولید کننده	مشخصات فیزیکی	نتایج آزمایش با سویه های کنترل		نتیجه نهایی	اقدام اصلاحی	نام فرد انجام دهنده آزمایش	تاریخ انجام آزمایش
			E. coli ATCC 25922	*K. pneumoniae* ATCC 13883				

جدول ۱- استانداردهای کنترل کیفیت رنگ ها و محیط های کشت

رنگ/محیط کشت	ارگانیسم کنترل	شماره ATCC	نتیجه مورد انتظار	دفعات انجام آزمایش QC
Acid-Fast (Ziehl-Neelsen)	*M. tuberculosis* (or BCG)	25177	باسیل صورتی-قرمز	هر سری ساخت و خرید، سپس هر روز کاری
	E. coli	25922	باسیل آبی	
Gram	*Staph.aureus*	25923	کوکسی بنفش	هر سری ساخت و خرید، سپس حداقل یک بار در هفته
	E. coli	25922	باسیل صورتی	
Methylene Blue	*Corynebacterium spp.*	-	باسیل های پلی مورف آبی رنگ با دانه های متاکروماتیک	هر سری ساخت و خرید، سپس هر یک ماه
	E. coli	25922	باسیل آبی	
	Saline		مشاهده نشدن باکتری	
Dehydrated Culture Media	مطابق دستورالعمل کنترل کیفیت هر محیط کشت	-	-	هر سری ساخت و خرید، سپس هر ۶ ماه
Commercially Prepared Culture Media	مطابق دستورالعمل کنترل کیفیت هر محیط کشت	-	-	هر سری ساخت و خرید

فرم ثبت نتیجه کنترل کیفیت رنگ گرم

سری ساخت	تولید کننده	مشخصات فیزیکی	نتایج آزمایش با سویه های کنترل		نتیجه نهایی	اقدام اصلاحی	نام فرد انجام دهنده آزمایش	تاریخ انجام آزمایش
			S. aureus ATCC 25923	*E. coli* ATCC 25922				

کنترل کیفیت آنتی سرم

- هر سری ساخت و خرید، و سپس هر شش ماه یک بار
- بررسی چشمی یک قطره از آنتی سرم روی لام، آنتی سرم باید شفاف بوده و فاقد هر گونه ذره باشد.
- آزمایش بروش آگلوتیناسیون بر روی لام
- آزمایش حداقل یک سویه کنترل مثبت و یک سویه کنترل منفی باید برای بررسی خصوصیت و شدت آگلوتیناسیون آنتی سرم
  - آزمون کنترل کیفیت آنتی سرم با سویه های کنترل باید مطابق روش انجام آزمایش و کاملا منطبق با دستورالعمل شرکت سازنده باشد.
- ثبت نتایج همه واکنش ها

کنترل کیفیت آنتی سرم

- یک قطره آنتی سرم (حدود 0.05 ml، اگرچه می توان 10µl هم استفاده نمود) روی یک طرف لام قرار دهید.
- یک قطره سرم فیزیولوژی روی طرف دیگر لام قرار دهید، برای بررسی اتوآگلوتیناسیون یا خشن بودن کلنی ها.(به عنوان کنترل منفی)
- از کلنی های خالص و ۱۸ تا ۲۴ ساعته سویه کنترل روی محیط غیر انتخابی مانند بلاد آگار یا TSA، سوسپانسیون یکنواخت حدود ۲ تا ۳ مک فارلند در هر قطره تهیه نمایید. با اپلیکاتور چوبی یا لوپ آنرا کاملا مخلوط کنید.
- لام را به مدت ۳۰ ثانیه یا ۱ دقیقه (مطابق دستورالعمل سازنده) به عقب و جلو بچرخانید.
- واکنش آگلوتیناسیون را در زیر نور کافی (چراغ مطالعه) با پس زمینه تیره بررسی نمایید.
- قطره سرم فیزیولوژی باید فاقد آگلوتیناسیون باشد، تا نتیجه قطره آنتی سرم قابل اطمینان محسوب شود.

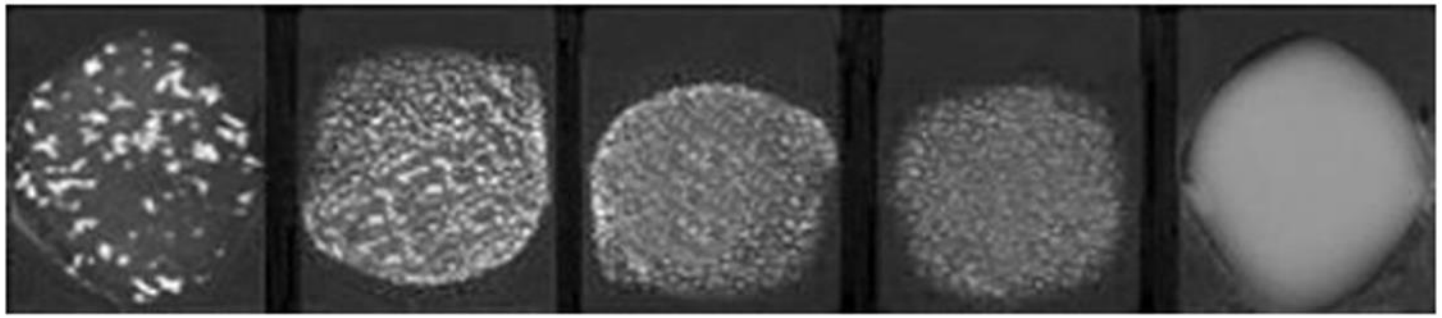
کنترل کیفیت آنتی سرم

- شدت آگلوتیناسیون قرائت و می توان آن را مطابق جدول زیر ثبت نمود:

Percentage of agglutination:	Record reaction as:
100%	4+
75%	3+
50%	2+
25%	1+
0%	negative

Score and record the results as follows:

4+	All organisms are clumped and the supernatant, or suspending fluid is clear
3+	About 75% agglutination, the supernatant fluid is slightly cloudy
2+	About 50% agglutination, the supernatant fluid is moderately cloudy
1+	About 25% agglutination, the supernatant fluid is cloudy
Tr	Trace amount of agglutination present
Negative	No agglutination apparent and suspension remains homogenous.



4+ 3+ 2+ 1+ Negative

سویه های کنترل کیفی

- وجود سویه های کنترل در بخش میکروب شناسی، به منظور کنترل کیفیت محیط های کشت، آنتی سرم ها، رنگ ها و معرف ها و استفاده از آنها
  - استفاده از سویه های میکروبی استاندارد (ATCC یا PTCC)
  - استفاده از سویه های ارزیابی خارجی کیفیت شناسنامه دار
  - استفاده از سویه های شناخته شده بیماران که دارای ثبات فنوتیپی می باشند
- تهیه فهرستی از سویه های کنترل موجود:
  - نام جنس و گونه (یا سروگروه) و شماره ATCC
  - منبع و تاریخ تهیه
  - محل دقیق نگهداری
  - تعداد ویال موجود در فریزر
- وجود دستورالعمل روش نگهداري كوتاه مدت و بلند مدت سويه هاي ميكروبي واستفاده از آنها

فهرست سویه های کنترل کیفی مورد نیاز

نام سویه	منبع تهیه سویه	مشخصه سویه (لیبل)	طبقه/شماره فریزر	شماره کرایورک	شماره ردیف در کرایورک	تعداد موجود	تاریخ ذخیره سازی
Escherichia coli ATCC 25922							
Staphylococcus aureus ATCC 25923							
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853							
Enterococcus faecalis ATCC 29212							
Salmonella Typhimurium ATCC 14028							
Shigella flexneri ATCC 12022							
Proteus mirabilis ATCC 43071							
Klebsiella pneumoniae ATCC 13188							
Vibrio parahaemolyticus							
Vibrio cholerae NON-O1							
Streptococcus agalactiae ATCC 12386							
Streptococcus pyogenes ATCC 19615							
Streptococcus pneumoniae ATCC 6305							
Enterobacter aerogenes ATCC 13048							
Klebsiella pneumoniae ATCC 13883							

سویه های کنترل کیفی

دستورالعمل نگهداری و استفاده از سویه های باکتریایی به روش بلند مدت و کوتاه مدت

آزمایشگاه مرجع سلامت

وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی

تابستان ۱۳۹۶

تجهیزات و ابزار پایه

- وجود دستورالعمل های فنی و آگاهی کارکنان به محتویات آنها
  - فور، اتوکلاو و انکوباتور
  - یخچال، فریزر
  - pH متر
  - سمپلر
- وجود سوابق پایش عملکرد آنها به طور منظم و مطابق با دستورالعمل
- برای ثبت دمای انکوباتور و یخچال باید از دماسنج کالیبره یا دماسنجی که با یک دماسنج کالیبره، کالیبر شده باشد، استفاده گردد و در صورت وجود خطا، باید اعمال گردد.
- بخش میکروب شناسی باید مجهز به دستگاه pHمتر کالیبره بوده یا به گونه ای به آن دسترسی داشته باشد. pH محیط APW و مولر هینتون آگار ساخته شده در آزمایشگاه باید پس از هر بار ساخت محیط و برای محیط آماده مصرف (تجاری) پس از هر بار خرید محیط، با دستگاه pH متر اندازه گیري شود. همچنین این دستگاه باید هر بار قبل از استفاده با بافر استاندارد pH ۷ کالیبر شود و سوابق آن موجود باشد.
- تنظیم pH محیط APW معمولاً با استفاده از هیدروکسید سدیم ۴۰ گرم در لیتر (تقریباً یک مولار) و یا با استفاده از اسید کلریدریک ۳۶.5 گرم در لیتر (تقریباً یک مولار) انجام می شود.

دستورالعمل فنی

فور، اتوکلاو و انکوباتور

آزمایشگاه مرجع سلامت

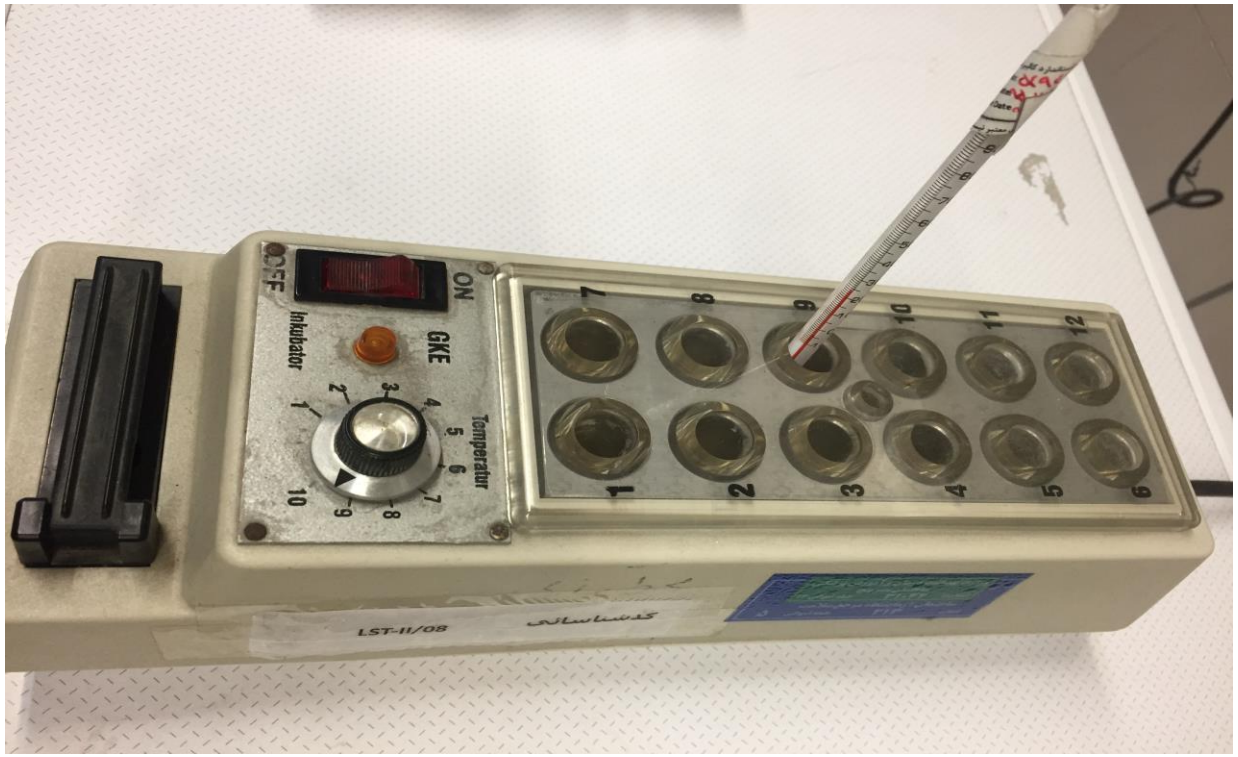
وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی

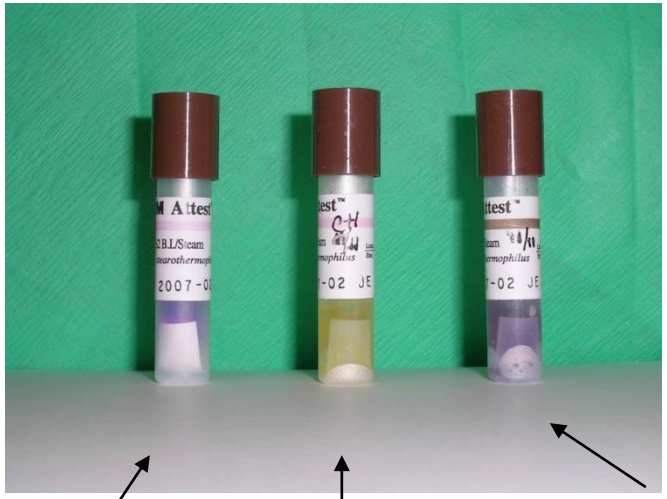
تابستان ۱۳۹۶

اتوکلاو

- استفاده از اندیکاتورهای شیمیایی TST کلاس ۵ یا ۶ براي پايش مستمر اتوکلاو در هر بار استفاده و ثبت نتایج آن
- استفاده از اندیکاتورهای بیولوژیک (*Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953) ($6\log_{10}$) متناسب با بار کاری اتوکلاو براي ارزیابي صحت عملکرد دستگاه و اعتباربخشی آن و ثبت نتایج آن
- برای این فرآیند به دستگاه انکوباتور ۵۶ درجه سانتیگراد نیاز می باشد.
- پیشنهاد می شود برای صرفه جویی در هزینه، این دستگاه انکوباتور برای یک آزمایشگاه منتخب خریداری گردد و هر آزمایشگاه پس از استفاده از معرف مذکور آن را به آزمایشگاه منتخب ارسال نموده و آن آزمایشگاه بعد از مشخص شدن نتیجه، هر چه سریعتر نتیجه را به صورت مکتوب گزارش و اطلاع دهد.
- برای کنترل کیفیت اندیکاتور بیولوژیک باید بعد از هر بار خرید و قبل از استفاده و سپس هر چند وقت یک بار، کنترل مثبت گذاشته شود و سوابق آن موجود باشد.

انکوباتور مخصوص اندیکاتور بیولوژیک





unprocessed positive control processed

کنترل کیفیت اندیکاتور بیولوژیک اتوکلاو

- کنترل مثبت

- هر سری ساخت از اندیکاتور خریداری شده و هر چند وقت یکبار برای بررسی صحت کیفیت اندیکاتور 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 تا ۷۲ ساعت در دمای ۵۶ درجه سانتیگراد انکوبه نمایید.
- اسپور باسیلوس موجود در این ویال حتما باید رشد کند و رنگ محتویات ویال به زرد تغییر یابد. اگر رنگ این ویال از بنفش به زرد تغییر یابد، نتایج سایر ویال ها قابل اعتماد است.
- اگر این ویال تغییر رنگ ندهد، نشان دهنده از بین رفتن خودبخودی اسپور باسیلوس است. بنابراین نتایج سایر ویال ها نیز قابل اعتماد نیست.

کنترل کیفیت اندیکاتور بیولوژیک اتوکلاو

Interpretation results		
Autoclave Indicator	**Positive control**	
No growth	Growth	Sterilization of spores achieved
Growth	Growth	Autoclave cycle failure
Growth	No growth	Operator error; test again with new biological indicator
No growth	No growth	Indicator maybe expired, Test again with new Lot

کارکنان و آموزش

- برگزاری کارگاه های آموزشی برای کارکنان بخش میکروب شناسی به خصوص برای کارکنان جدید به طور دوره ای و منظم، شامل:
  - روش کشت نمونه های بالینی (مدفوع و ادرار)
  - تشخیص عوامل بیماریزای شایع و عوامل بیماریزا در بیماری های منتقله از آب و غذا
  - کنترل کیفیت در آزمایشگاه میکروب شناسی
  - روش انتقال استاندارد نمونه های عفونی (بسته بندی سه لایه)
- تایید صلاحیت کارکنان بخش میکروب شناسی توسط سوپروایزر
- وجود سوابق شرکت در کارگاه و تایید صلاحیت
- ارزیابی کارکنان بخش میکروب شناسی از نظر توان تشخیص رنگ ها (عدم کوررنگی) و ثبت نتیجه ارزیابی

گزارش دهی

- گزارش نهایی کشت مدفوع با اشاره به نوع باکتری های مورد بررسی
  - آزمایشگاه باید به صورت مشخص ارگانیسم را گزارش کند، مانند

" No *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. isolated".

"No *Vibrio cholerae* isolated"

  - گزارش کلی به صورت زیر قابل قبول نیست:

No Enteropathogenic bacteria isolated.

No growth.

- وجود دستورالعمل شیوه گزارش دهی و مکتوب کردن نتایج بحرانی بر اساس "فهرست موارد بحرانی در آزمایشگاه میکروب شناسي مراکز بهداشت"
- مکتوب کردن مراحل گزارش نتایج بحرانی در دستورالعمل گزارش دهی
- وجود سوابق گزارش نتایج بحرانی

گزارش دهی

موارد بحرانی در

آزمایشگاه میکروب شناسی

آزمایشگاه مرجع سلامت

وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی

تابستان ۱۳۹۶

گزارش دهی

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 تمامی 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.

از توجه شما سپاسگزارم