

میکروب‌شناسی تشخیصی

جدا سازی و تعیین هویت میکروارگانیسمهای بیماریزا

مولفین:

محمد یوسف علیچانی، عضو هیات علمی دانشگاه علوم پزشکی همدان، گروه میکروب‌شناسی

محمد رضا عربستانی، عضو هیات علمی دانشگاه علوم پزشکی همدان، گروه میکروب‌شناسی

عباس بهادر، عضو هیات علمی دانشگاه علوم پزشکی تهران، گروه میکروب‌شناسی

رضا کمالی کاحلی، دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی همدان

سید مسعود موسوی، دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی همدان

عنوان و نام پدیدآور	:	میکروب شناسی تشخیصی: جداسازی و تعیین هویت میکروارگانیسمهای بیماری زا/ مولفین: محمدیوسف علیخانی... [و دیگران]
مشخصات نشر	:	همدان: دانشگاه علوم پزشکی همدان، ۱۳۹۳
مشخصات ظاهری	:	۴۶۱ص: جدول، نمودار، مصور(رنگی)
فروست	:	دانشگاه علوم پزشکی همدان: ۲۲۸
یادداشت	:	کتابنامه
شابک	:	۹۷۸-۹۶۴-۹۹۵۰-۸۱-۵
موضوع	:	میکروب شناسی
شناسه افزوده	:	علیخانی، محمدیوسف، پدیدآور
رده بندی دیویی	:	۶۱۶/۹۰۴۱
رده بندی پزشکی	:	QW ۴/۹۷۶ م ۱۳۹۳

نوبت چاپ: اول

شمارگان: ۱۰۰۰ نسخه

قطع: وزیری

قیمت:

شماره کتاب: ۹۳/۱۹/۲۱۴
۲۲۸

همدان، مقابل پارک مردم، دانشگاه علوم پزشکی همدان، معاونت تحقیقات و فناوری، اداره انتشارات
کدپستی ۶۵۱۷۸، تلفاکس ۰۸۱-۳۸۳۸۰۹۲۴
e-mail: medicalnashr@yahoo.com

مقدمه مولفین

بنام آنکه جان را حکمت آموخت

اعتقاد بر این است که میکروپزشناسی علاوه بر علم یک هنر نیز می‌باشد. اطلاعات علمی در مورد متابولیسم، فیزیولوژی، و ویژگیهای ژنتیکی میکروارگانیسمها پایه و اساس آزمایشهای بالینی برای شناسایی آنها را فراهم کرده است.

به نظر می‌رسد که شناخت ویژگیهای مورفولوژیکی میکروسکوپی و ماکروسکوپی میکروارگانیسمها هنرمیکروپزشناسی پزشکی است که به انتخاب اولیه آزمونهای مناسب و ضروری برای شناسایی سویه‌های بالینی خواهد انجامید. اگرچه، فرآیند شناسایی عامل یک عفونت به مراتب پیچیده و مشکل می‌باشد، اما این فرآیند توسط پزشک با بررسی سابقه بیماری، علائم، نشانه‌ها و یافته‌های فیزیکی آغاز می‌گردد که منجر به جمع‌آوری نمونه مناسب و به احتمال زیاد تایید تشخیص بیماری خواهد شد.

ضروری است که میکروبیولوژیست با پزشکان برای ایجاد دستورالعمل جمع‌آوری نمونه‌های بالینی با توجه به علت و محل عفونت همکاری نزدیکی داشته باشند. همچنین این مسئولیت میکروبیولوژیست پزشکی است که اطمینان حاصل نماید نمونه‌ها نه تنها به درستی جمع‌آوری شده باشند، بلکه به سرعت و بطور صحیح به آزمایشگاه انتقال داده شوند. با توجه به این واقعیت که نمونه‌ها توسط افراد مختلفی جمع‌آوری می‌شوند، ضروری است که میکروبیولوژیست بالینی معیار مناسب و علمی هم برای رد نمونه، یا به دلیل جمع‌آوری نادرست و یا درخواست آزمونهای نامناسب برای نمونه داشته باشد. هنگامی که یک نمونه مناسب در آزمایشگاه دریافت شد، میکروبیولوژیست باید از دستورالعمل‌های پردازش نمونه و انجام تستهای مربوطه اطمینان حاصل نماید.

این کتاب به ارائه دستورالعملها و روشهای مناسب برای تشخیص آزمایشگاهی عوامل بیماریهای عفونی پرداخته است. در متن کتاب روشهای دقیق برای جمع‌آوری و حمل و نقل نمونه، روشهای پردازش نمونه، آزمون مورد استفاده برای شناسایی ارگانیسمها، نمودار و جداول فهرست تستها و واکنشهای مورد نیاز برای شناسایی میکروارگانیسمها اشاره شده است. نمودارها، جداول و تصاویر به منظور برجسته نمودن نکات کلیدی متن آورده شده است.

به این ترتیب، این کتاب راهنمای جامعی برای میکروپزشناسی تشخیصی است که می‌تواند مورد استفاده پزشکان متخصص بیماریهای عفونی، آسیب شناسی، میکروبیولوژی بالینی و کارشناسان و تکنسین‌های آزمایشگاه و همینطور دانشجویان علوم آزمایشگاهی و میکروپزشناسی در مقاطع مختلف قرار گیرد.

مؤلفین

بهار ۱۳۹۳

alikhani43@yahoo.com

mr_arabestani@yahoo.com

فهرست مطالب

مقدمه.....	۱
------------	---

بخش اول: نمونه‌ی جمع‌آوری نمونه

فصل اول: کشت خون.....	۲۰
فصل دوم: مایعات بدن.....	۳۳
فصل سوم: اندام تناسلی.....	۴۰
فصل چهارم: مجرای تنفسی تحتانی.....	۴۸
فصل پنجم: مجرای تنفسی فوقانی.....	۵۴
فصل ششم: چشم.....	۵۹
فصل هفتم: نمونه مدفوع.....	۶۳
فصل هشتم: نمونه‌های بیوپسی.....	۶۶
فصل نهم: نمونه‌های حاصل از جراحی.....	۷۱
فصل دهم: نمونه ادرار.....	۸۵
فصل یازدهم: جداسازی ویبریو کلرا از منبع آبی و ویروس پولیو از محیط.....	۸۹

بخش دوم: باکتری‌شناسی تشخیصی

فصل دوازدهم: طبقه‌بندی باکتری‌ها بر اساس مشخصات مورفولوژی.....	۹۲
فصل سیزدهم: میکروکوکاسیه (استافیلوکوک، میکروکوک، استوماتوکوک).....	۹۵
فصل چهاردهم: استرپتوکوکوس، انتروکوکوس و سایر کوکسی‌های گرم مثبت کاتالاز منفی.....	۱۰۷
فصل پانزدهم: کوکسی‌های گرم منفی هوازی (نایسریا و موراکسلا).....	۱۲۳
فصل شانزدهم: خانواده‌ی انتروباکتریاسیه.....	۱۳۱
فصل هفدهم: باسیل‌های گرم منفی غیر تخمیر کننده.....	۱۶۳
فصل هجدهم: باسیل‌های بی‌هوازی اختیاری و کوکو باسیل‌های هوازی گرم منفی.....	۱۷۶
فصل نوزدهم: ویبریو و گونه‌های وابسته، آئروموناس، پلزیوموناس، کمپیلوباکتر و سایر باکتری‌ها.....	۱۹۱
فصل بیستم: اسپیروکت‌ها و سایر ارگانیسم‌های مارپیچی شکل.....	۲۰۱
فصل بیست و یکم: باسیل‌های اسپوردار هوازی یا بی‌هوازی اختیاری.....	۲۰۶
فصل بیست و دوم: باسیل‌های گرم مثبت هوازی فاقد اسپور.....	۲۱۲
فصل بیست و سوم: پردازش نمونه‌های بالینی برای باکتری‌های بی‌هوازی.....	۲۲۹

۲۶۱.....	فصل بیست و چهارم : باسیلهای گرم مثبت بی‌هوازی
۲۸۳.....	فصل بیست و پنجم : باسیلهای گرم منفی بی‌هوازی
۳۰۵.....	فصل بیست و ششم : کوکسی‌های بی‌هوازی
۳۱۶.....	فصل بیست و هفتم : باکتری‌های درون سلولی اجباری و غیر قابل کشت
۳۳۰.....	فصل بیست و هشتم : باکتری‌های بیماری‌زای غیر معمول
۳۴۷.....	فصل بیست و نهم : باکتری‌های فاقد دیواره سلولی: مایکوپلاسما و اوره آپلاسما
۳۶۴.....	فصل سی‌ام : مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و سایر مایکوباکتریوم‌های غیر توبرکلوزیس
۳۹۱.....	فصل سی و یکم : انواع روش‌های رنگ‌آمیزی رایج در میکروپ شناسی
۴۱۶.....	فصل سی و دوم : تست‌های حساسیت آنتی بیوتیکی
۴۴۸.....	فصل سی و سوم : تعیین MIC و MBC
۴۶۰.....	منابع

مقدمه

رعایت نکات ایمنی در آزمایشگاه باکتری شناسی

آزمایشگاههای میکروب شناسی محیطهای خاص و اختصاصی هستند که ممکن است باعث انتقال عوامل ایجاد کننده بیماریهای عفونی برای کارمندان یا افرادی که وارد این آزمایشگاهها می شوند، گردند. قبل از ورود به آزمایشگاه میکروبیولوژی باید بدانید به چه محیطی وارد می شوید، به طور مسلم محیطی که دارای میکروبهای متنوع و بعضاً بیماری زا می باشد. لذا قبل از ورود به آزمایشگاه لازم است نکات زیر را به خاطر بسپارید:

- ۱- نکته اول پوشیدن روپوش قبل از ورود به آزمایشگاه است. پوشیدن روپوش نه تنها از آلودگی شما و لباسهایتان جلوگیری می کند بلکه از احتمال انتقال آلودگی به بیرون نیز می کاهد، قابل ذکر است که روپوش را باید هر چند وقت یکبار به کمک مواد شوینده و جدا از سایر لباس ها شست.
- ۲- نکته دوم اینکه در تمام مدت حضور در آزمایشگاه باید متوجه آزمایش مورد نظر بوده و از صحبت کردن بی مورد و یا خوردن امتناع ورزید.
- ۳- سوم اینکه چون اکثر کارهای آزمایشگاهی میکروبیولوژی در کنار شعله انجام می شود باید توجه داشته باشید زمانیکه شعله گاز به طور کامل می سوزد معمولاً روشنایی آن نامعلوم است لذا باید مواظب باشید که سر، صورت، یا لباستان بوسیله شعله نسوزد.
- ۴- همیشه میز کار و وسایل مورد استفاده از جمله میکروسکوپ را از قبل مشخص نموده و در همان محل کار کنید.
- ۵- هنگام کار با میکروبها و کشت آنها یا انتقال آنها به محیط دیگر باید کار را کنار شعله دنبال کنید و از صحبت کردن خودداری نموده تا محیط کشت شما آلوده نگردد.
- ۶- نکته آخر اینکه پس از اتمام کار لازم است دستها را با ساوِلن و مایع دستشویی بشوئید تا در صورت آلودگی، این آلودگی به جای دیگر منتقل نشود.

طبقه بندی عوامل بیولوژیکی بر پایه خطر (hazard):

الف- عوامل خاص سطح ۱ (Level agents 1): شامل آنهایی است که اطلاعی در خصوص پتانسیل پاتوزنیک آن برای افراد با نقض ایمنی وجود ندارد. این عوامل در آزمایشگاهها برای آموزش دانشجویان سطح اول (اولیه) میکروبیولوژی مفید است. عوامل سطح ۱ شامل باسیلوس سوبتیلیس (*Bacillus Subtilis*) و مایکوباکتریوم گوردونه (*Mycobacterium Gordona*) می باشد.

ب - عوامل خاص سطح ۲ (Level agents): آنهايي هستند که به طور شایعتر در نمونه‌های بالینی جستجو می‌شوند. شامل تمامی عوامل شایع بیماری‌های عفونی همین طور هیپاتیت B، سالمونلاها و گونه‌های توکسوپلاسما گوندی می‌باشند. شایع‌ترین عامل عفونت کسب شده از آزمایشگاه عبارتند از: ویروس هیپاتیت B، کوکسیلا برونچی، گونه‌های بروسلا، فرانسیسلا، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، گونه‌های سالمونلا، شیگلا و آریوویروسهاست.

پ - عوامل سطح ۳ (Level agents 3): شامل موارد مشکوک به ویروس‌های خاص مانند: ویروس آنسفالیت سنت لوتیس، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و کوکسیلا برونچی.

ت - عوامل سطح ۴ (Level agents 4): شامل تنها ویروس‌های خاصی از آریوویروس‌ها، آرنای ویروسها یا فیلو ویروس هستند که هیچ کدام به طور رایج دیده نمی‌شوند. نیاز به استفاده از تسهیلات ماکزیمم هستند و بیشتر در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی مورد استفاده قرار می‌گیرند.

آلودگی زدایی

تمامی مواد آلوده شده با عوامل بالقوه عفونی باید قبل از دور ریختن، آلودگی زدایی شوند. این مواد شامل نمونه بیماران و محیط‌های کشت مصرف شده، چه آنهایی که باکتری رشد کرده باشد و چه آنهایی که فاقد رشد باکتری باشند، وسایل مصرفی مانند قیچی و محافظ اسکالپل باید درون ظرف فلزی سربسته قرار داده شوند و بوسیله اتوکلاو کردن استریل گردند.

مواد عفونی‌زا باید در ظرف مخصوص با علامت و بر چسب مشخص کننده خطر بیولوژیک (این گونه ظروف به طور تجارتی در دسترس هستند) بسته بندی و پس از اتوکلاو کردن دور انداخته شوند. به منظور رعایت ایمنی باید از سرنگ‌های یک بار مصرف دارای سر سوزنی مسدود در محفظه استریل استفاده نمود. محافظ‌های طراحی شده خاص به منظور بدون خطر کردن (resheathing) سوزن‌ها به صورت تجارتی برای کارکنان وجود دارد. قرار دادن سر سوزن در داخل محافظ اصلی پس از استفاده نمودن همیشه همراه خطراتی برای پرسنل بیمارستانی و آزمایشگاهی بوده است.

عمل آلودگی زدایی مواد بالقوه عفونی‌زا، که در آزمایشگاه‌های میکروب شناسی بوجود می‌آیند، اغلب با استریلیزاسیون بوسیله بخار اتوکلاو انجام می‌شود. اتوکلاو دستگاهی است که با ایجاد بخار مرطوب در فشار بالا و حرارت باعث کشته شدن عوامل عفونی می‌گردد. ایجاد فشار بالا باعث افزایش دمای بخار از نقطه جوش و کاهش زمان استریلیزاسیون می‌شود.

موادی که بدین طریق استریل می‌شوند باید به صورت شل بسته بندی شوند بطوریکه جریان بخار به آزادی بتواند در آنها نفوذ نماید. موادی که بالقوه خطر بیشتری دارند مانند محیط‌های کشت و نمونه‌های مربوط به آزمایشگاه، اغلب به مدت یک ساعت (به جای ۳۰-۴۰ دقیقه) در دمای 121°C و فشار ۱۵ پوند بر اینچ مربع استریل می‌شوند. بهتر است که اتوکلاو داخل آزمایشگاه قرار داشته باشد، در غیر اینصورت انتقال مواد جهت استریلیزاسیون به محل اتوکلاو باید در ظرف بدون نشت و استریل شونده صورت گیرد.

کنترل کیفی اتوکلاو به طور منظم در جهت اطمینان از نظر استریل کنندگی باید بررسی شود. ظرفیت و جای گیری مواد در اتوکلاو، در جهت چگونگی استریل نمودن باید مشخص باشد. یکی از احتیاط‌های مهم ایمنی، باز کردن در اتوکلاو، پس از یک سیکل استریلیزاسیون است کارکنان متعددی بوسیله بخار اتوکلاو حین باز کردن در اتوکلاو دچار سوختگی گردیده‌اند.

استفاده از ماسک محافظ در این موارد از حوادث یاد شده می‌تواند جلوگیری نماید. میزهای کار و سایر سطوح افقی باید حداقل در هر شیفت کاری، آلودگی زدائی شوند و بلافاصله پس از هر گونه تماس مواد عفونی‌زا با سطح آنها نیز با مواد آنتی‌سپتیک مایع، شسته شوند. مواد ضدعفونی کننده محلول عبارت‌اند از: ترکیبات فنل، الکل ۷۰ درصد، محلول پنج درصد سدیم هیپوکلرید و محلول بلیچ ۱۰ درصد در آب.

محلول بلیچ بیشترین تاثیر در مقابل آلودگی‌های ویروسی مانند هپاتیت B، HIV را دارد و بدین ترتیب در آزمایشگاه‌هایی که احتمال آلودگی ویروس وجود دارد محلول بلیچ رقیق شده به عنوان آنتی‌سپتیک انتخابی توصیه می‌گردد. این محلول همچنین می‌تواند پروتئین‌های عفونی‌زا که پریون نامیده می‌شوند را غیر فعال نماید.

پریون عامل بیماری کروتزفولدت جاکوب است. سطوح بلندتر بایستی با عوامل گندزدا، مرطوب شوند تا آنتی‌سپتیک تأثیر بیشتری داشته باشد (حداقل به مدت ۱۰ دقیقه). مواد جرمکش در صورتیکه به صورت محلول تهیه شوند فعال خواهند شد. بیشتر مواد گندزدا اسپور باکتری‌ها را از بین نمی‌برد ولی این فرم باکتری‌ها به جز اسپور آنتراکس معمولاً برای پرسنل خطری ندارد. یک گندزدائی تجارتي مناسب به عنوان عامل اسپورکش بنام آل‌سید (Alcide) در دسترس می‌باشد. سطوح خارجی دستگاه‌های آزمایشگاهی، مانند سانتریفوژ، مخلوط کن (Vortex)، تلفن‌ها و حتی لامپ فلورسانس بالای میز کار، بطور مستقیم باید با گندزداها تمیز شوند.

با اتوکلاو می‌توان اغلب مواد آلوده، محیط‌های کشت مصرف شده و غیره را آلودگی زدایی کرد. موادی با پتانسیل زیادتر آسیب رسانی، مانند کشت‌ها و نمونه‌های آزمایشگاهی مایکو باکتریولوژی اغلب به جای ۳۰ تا ۴۵ دقیقه معمول (در 121°C و ۱۵ پوند بر اینچ مربع Psi) فشار به مدت ۱ ساعت استریلیزه می‌شوند.

میز کار و سطوح دیگر حداقل بعد از هر شیفت و فوراً پس از هر بار ریختن با یک عامل آنتی‌سپتیک مایع مانند ترکیبات فنلیک، اتانول ۷۰٪ یا یک محلول ۵۰٪ سدیم هیپوکلریت، سفید کننده رقیق شده (Bleach) ضد عفونی کرد. محلول سفید کننده خانگی با غلظت ۱۰٪ مفیدترین عامل در مقابل آلودگی ویروسی مانند HIV و هپاتیت B می‌باشد.

حداقل ۱۰ دقیقه تماس برای عمل آن لازم است (توصیه شده است).