دستورالعمل تشخیص آزمایشگاهی
اشریشیاکلی مولد اسهال

آزمایشگاه مرجع کشوری اشریشیاکلی(آمکا)

فهرست مطالب

عنوان صفحه

مقدمه ۱

فصل اول:

۱-۱) انتروباکتریاسه ها ۳

۱-۲) تقسیم بندی ۳

۱-۳) صفات عمومی ۳

۱-۴) مکانیسم های بیماریزایی ۴

فصل دوم:

۲-۱) اشریشیاکلی و پاتوتایپ های آن ۶

۲-۲) بیماریزایی و عوامل ویرولانس ۷

۲-۳) راه های تشخیص و شناسایی سویه های اشریشیاکلی ۱۱

۲-۳-۱) روش کلاسیک ۱۱

۲-۳-۲) روش مولکولی ۱۳

۲-۳-۳) روش کشت سلولی ۱۳

۲-۴) مراحل تشخیص اشریشیاکلی انتروپاتوژنیک ۱۳

۲-۵) مراحل تشخیص اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک ۱۶

۲-۶) مراحل تشخیص اشریشیاکلی انتروهموراژیک ۱۹

۲-۷) مراحل تشخیص اشریشیاکلی انترواینویسیو ۲۲

۲-۸) مراحل تشخیص اشریشیاکلی انترواگریگیتیو ۲۵

فصل سوم:

۳-۱) نمونه گیری ۲۹

۳-۲) روش جمع آوری نمونه مدفوع ۲۹

الف) تهیه نمونه مدفوع و سوآپ مدفوع ۲۹
ب) سوآپ مقعدی ۲۹
ج) تلقیح به محیط انتقال ۳۰
۳-۳) انتقال نمونه ۳۰

فصل چهارم:

۴-۱) تجهیزات مورد نیاز جهت آزمایش های تشخیصی ۳۲
۴-۲) دستورالعمل تهیه، استریلیزاسیون و نگهداری محیط های کشت ۳۲
۴-۳) محیط های مورد نیاز برای کشت مدفوع در آزمایشگاه ۳۴
۴-۴) دستورالعمل انجام تست های افتراقی..... ۴۲

فصل پنجم:

راهنمای مقدماتی دریافت و ارسال نمونه های مدفوع به آزمایشگاه مرجع کشوری اشریشیاکلی جهت تشخیص پاتوتایپ های اشریشیاکلی ۴۵
۵-۱) راهنمای جمع آوری نمونه و شرایط انتقال ۴۵
۵-۲) نحوه دریافت نمونه های ارسالی در آزمایشگاه مرجع کشوری اشریشیاکلی ۴۶
۵-۳) شرایط عدم پذیرش نمونه در آزمایشگاه مرجع کشوری اشریشیاکلی ۴۶
۵-۴) وسایل و مواد لازم جهت تهیه و ارسال نمونه ۴۶
۵-۵) دستورالعمل حمل و ارسال نمونه های مدفوع به آزمایشگاه مرجع کشوری اشریشیاکلی ۴۷

منابع ۴۹

پیوست (۱) ۵۰
پیوست (۲) ۵۱
پیوست (۳) ۱-۷
پیوست (۴) ۱-۹

مقدمه:

بیماری اسهال عامل مهم مرگ و میر کودکان در کشورهای در حال توسعه می باشد. تخمین زده می شود کـه سـالانه ۴ تـا ۶ میلیـون کودک بر اثر بیماری های اسهال، جان خود را از دست می دهند. اگرچه در برخی موارد بیماری اسهال حاد، بدون هیچ گونه درمانی خود به خود بهبود می یابد ولی در بسیاری از موارد درمان ضرورت دارد.

اسهال از شایع ترین علائم کلینیکی عفونت قسمت های تحتانی دستگاه گوارش است. سازمان بهداشت جهانی (WHO) اسـهال را بـه صورت دفع مدفوع آبکی یا شل حداقل سه مرتبه در یک دوره ۲۴ ساعته تعریف کرده است.

اسهال را می توان به دو دسته حاد و مزمن تقسیم بندی کرد. اسهال حاد شدیدترین نوع اسهال بوده و توسط بسیاری از عوامل عفـونی ویروسی (روتاویروس)، باکتریایی (اشریشیا کلی، کمپیلوباکتر، سالمونلا، شیگلا، یرسینیا، ویبریوکلرا، باکتروئیدس فراژیلیس و ...) و انگلـی (ژیاردیا و انتاموبا هیستولیتیکا) به وجود می آید و از عوامل اصلی مرگ ومیر در کودکان محسوب می شود. روتاویروس ها و اشریـشیاکلی های اسهال زا ، از عمده ترین عوامل ایجادکننده اسهال می باشند.

امروزه با مجهز شدن آزمایشگاه ها حدود ۷۰ تا ۸۰ درصد عوامل اتیولوژیک اسهال قابل شناسایی بوده و با بهبـود امکانـات بهداشـتی و مراقبتی و همچنین تشخیص به هنگام همه گیری ها روبه کاهش می باشد. در این میان بیشترین توجه برروی روش هـای تشخیـصی ای می باشد که نسبتاً ساده، ارزان و دقیق باشند. روش های بسیاری پیشنهاد شده است تا هر آزمایشگاه با توجـه بـه امکانـات موجـود خـود بهترین را انتخاب کند. این نکته که اکثر آزمایشگاه ها در فراهم کردن محیط های کشت، مواد و دستگاه های تشخیصی با مشکل مواجـه هستند لزوم تهیه محیط ها و مواد معادل آن را ضروری می سازد.

فصل اول

۱-۱) انتروباکتریاسه ها :

خانواده انتروباکتریاسه بزرگترین و ناهمگون ترین مجموعه باسیل های گرم منفی هستند که از لحاظ بالینی اهمیت دارند در مجموع ۳۲ جنس و بیش از ۱۳۰ گونه از این خانواده توصیف شده اند. جنس های این خانواده بر اساس خصوصیات بیوشیمیایی، ساختار آنتی ژنیک و ترادف یابی اسیدهای نوکلئیک طبقه بندی شده اند. این باکتری ها باعث ایجاد بیماری های مختلفی در انسان می شوند.

برخی از ارگانیسم ها مانند سالمونلا تیفی و گونه های شیگلا همیشه مرتبط با بیماری هستند ولی برخی دیگر مانند اشریشیا کلی، کلبسیلا ، پروتئوس و ... به عنوان فلور طبیعی روده بوده و با ایجاد شدن شرایطی مانند کسب ژن های بیماری زا از طریق پلاسمید و باکتریوفاژ، به هم خوردگی فلور میکروبی، جابه جایی فلور میکروبی و ... قدرت بیماری زایی را به دست آورده و سبب ایجاد عفونت های فرصت طلب می شوند.

۱-۲) تقسیم بندی انتروباکتریاسه ها:

روده انسان از زمان تولد به وسیله باکتری های گوناگون کلونیزه می شود. این باکتری ها به ۲ گروه تقسیم می شوند.

- ❖ باکتری های کومنسال: مانند کلبسیلا و انتروباکتر
- ❖ باکتری های انتروپاتوژن: مانند سالمونلا و شیگلا

۱-۳) صفات عمومی انتروباکتریاسه ها عبارتند از:

- باسیل های گرم منفی می باشند.
- اکسیداز آن ها منفی است.
- هوازی - بی هوازی اختیاری می باشند.
- گلوکز را تخمیر می کنند.
- قادر به احیای نیترات به نیتریت هستند.
- در انواع متحرک فلاژل از نوع پری تریش دارند.

۴-۱) مکانیسم های بیماریزایی عبارتند از:

- تهاجم
- تولید توکسین
- اتصال به دیواره روده

جدول ۱-۱: مثال هایی از مکانیسم بیماری زایی برخی از باکتری های انتروپاتوژن در جدول ۱-۱ ذکر گردیده است.

مکانیسم	نام باکتری
تولید انتروتوکسین	ویبریوکلرا، شیگلا دیسانتری تیپ یک، اشریشیا کلی انتروتوکسیژنیک، سالمونلا، آئروموناس، کمپیلوباکتر ژژونی
تولید سیتوتوکسین	شیگلا، اشریشیا کلی انتروهموراژیک
تولید نوروتوکسین	کلستریدیوم بوتولینوم، استافیلوکوک اورئوس، باسیلوس سرئوس
چسبندگی و اتصال به سلول های مخاطی	اشریشیا کلی انتروپاتوژنیک ، اشریشیا کلی انترواگریگیتیو
تهاجم	شیگلا، اشریشیا کلی انتروایتویسیو، کمپیلوباکتر ژژونی، یرسینیا انتروکولیتیکا ، سالمونلا، ادواردسیلا تاردا

فصل دوم

۱-۲) اشریشیاکلی و پاتوتایپ های آن:

اشریشیا کلی اولین بار در سال ۱۸۸۵ توسط تئودور اشریش تعریف گردید. این ارگانیسم به عنوان قسمتی از فلور نرمال روده چند ساعت بعد از تولد، سیستم گوارش انسان و حیوانات پستاندار را کلونیزه نموده و با این عمل نقش مهمی در فیزیولوژی سیستم گوارش ایفا می نماید. لازم به ذکر می باشد که برخی از سویه های اشریشیا کلی با بدست آوردن عوامل ویرولانس از طریق عوامل ژنتیکی قابل انتقال مانند پلاسمیدها و ترانسپوزنها و باکتریوفاژها و لوکوس های پاتوژنیسیتی به صورت سویه های بیماریزا در می آیند.

بر اساس ظهور علائم کلینیکی اشریشیا کلی های پاتوژن به گروههای مختلف تقسیم بندی می شوند:

۱-اشریشیا کلی های اسهال زا

۲-اشریشیا کلی های پاتوژن مجاری ادراری

۳-مننژیت و سپتیسمی

اشریشیاکلی های اسهال زا متعاقباً به شش زیر گروه تقسیم می شوند که براساس خصوصیت ویرولانس، مکانیسم بیماریزایی و علائم کلینیکی در اکثر موارد به سروگروپ و سروتایپ های خاصی تعلق می گیرند:

- اشریشیا کلی انتروپاتوژنیک (EPEC)[1]: علت عمده اسهال کودکان در کشورهای توسعه نیافته است.
- اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک(ETEC)[2]: عامل اسهال کودکان زیر ۵ سال و اسهال مسافران در کشورهای در حال توسعه است.
- اشریشیاکلی انتروواینویسیو(EIEC)[3]: سویه های آن از نظر خصوصیات ظاهری و بیماریزایی شباهت زیادی به شیگلا دارند و باعث ایجاد اسهال شبه شیگلایی می شوند.
- اشریشیاکلی انترواگریگیتیو (EAEC)[4]: سویهٔ EAEC به عنوان یک پاتوژن نوظهور با شیوع روز افزون شناخته شده است.
- اشریشیاکلی انتروهموراژیک(EHEC) [5] : یکی از عوامل اسهال های ناشی از مواد غذایی در کشورهای توسعه یافته است.
- اشریشیاکلی با چسبندگی پراکنده(DAEC)[6] : اسهال غیرخونی در کودکان ۱ تا ۵ ساله ایجاد می کند.

1- Enteropathogenic *Escherichia coli*(اشریشیاکلی انتروپاتوژنیک)
2- Enterotoxigenic *Escherichia coli* (اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک)
3- Enteroinvasive *Escherichia coli* (اشریشیاکلی انتروواینویسیو)
4- Enteroaggregative *Escherichia coli* (اشریشیاکلی انترواگریگیتیو)
5- Enterohemorragic *Escherichia coli* (اشریشیاکلی انتروهموراژیک)
6- Diffusely Adherent *Escherichia coli* (اشریشیاکلی با چسبندگی پراکنده)

۲-۲) بیماریزایی و عوامل ویرولانس:

اشریشیا کلی ا نترو پاتوژنیک:

اشریشیاکلی انتروپاتوژنیک(EPEC)عامل بیماری اسهال نوزادان به صورت تک گیر و همه گیر در کشور های در حال توسعه بوده و از قدیمی ترین پاتوتایپ های شناسائی شده اشریشیاکلی می باشند که در روده کوچک تکثیر یافته و اساساً باعث اسهال حاد وغیرخونی می گردند.

این ارگانیسم از طریق اتصال به دیواره روده باعث به هم ریختگی ساختار در سلول گردیده و منجر به ایجاد ضایعات هیستوپاتولوژیک A&E[1] در سطح روده می شود و با این عمل پدیده جذب و دفع روده مختل می گردد.

شایعترین سرو گروپ های EPEC که عامل اصلی اسهال در انسان شناخته شده اند شامل O142، O85، O86، O111ab، O119، O125ac، O55، O127، O126، O128ab و O114 می شود. انسان مخزن اصلی این پاتوتایپ ها بوده و در سال ۱۹۹۵ این سویه ها به دو دسته مجزا تقسیم شدند :

I. سویه های انتروپاتوژنیک تیپیک[2] :به سویه هایی از سروگروپ های بالا گفته می شود که دارای دو ژن به نام های eae (ژن کدکنندهٔ پروتئین غشای خارجی) و bfp[3] (ژن کدکنندهٔ پیلی) باشند.

II. سویه های انتروپاتوژنیک آتیپیک[4]: به سویه هایی از سروگروپ های بالا اطلاق می شود که دارای ژن eae بوده و فاقد ژن bfp باشند.

مطالعات اپیدمیولوژیک بیانگر این امر می باشند که سویه های آتیپیک در کشور های پیشرفته و صنعتی شایع هستند در حالیکه سویه های تیپیک در کشور های در حال توسعه شیوع دارند. درکشور ما ایران مطالعات موجود نشان می دهد که هم سویه های تیپیک و هم آتیپیک از موارد اسهال جدا می شوند و با توجه به اینکه اشریشیا کلی نوع پاتوژن و غیر پاتوژن برروی محیط کشت قابل تمایز نمی باشند، تشخیص پاتوتیپ های اشریشیاکلی همیشه با اشکال مواجه بوده و در بسیاری از موارد باعث عدم گزارش صحیح این ارگانیزم می گردد.

1- Attaching and Effacing
2- Typical EPEC
3- bundle forming pili
4- Atypical EPEC

اشریشیا کلی انترو توکسیژنیک:

اشریشیا کلی انتروتوکسیژنیک (ETEC) به سویه هایی از اشریشیا کلی اطلاق می گردد که قابلیت تولید حداقل یکی از دو نـوع انتـرو توکسین حساس به حرارتLT [۱] و مقاوم به حرارتST [۶] را دارا می باشند. سویه های ETEC توسط پیلی های خاص به دیواره روده می چسبند و سپس ازطریق توکسین باعث ایجاد اسهال می شوند. سویه هایETEC اولین بار در اسـهال حیوانـات و سـپس در انـسان نیـز مشاهده شدند. این ارگانیسم تولید دو نوع انتروتوکسین می نماید که توسط ژنهای موجود برروی پلاسمید کد مـی شـود و مـی توانـد بـا تولید این انتروتوکسین باعث ترشح مایعات به داخل روده شده و اسهال آبکی ایجاد نماید. سویه هایETEC یکی از اصلی تـرین عوامـل اسهال در مسافران و همچنین از عمده ترین عوامل اسهال در گوساله ها و بره ها و خوک ها می باشد. آب و مواد غذایی آلوده از مهمترین عوامل انتقال بیماری می باشد. سویه های ETEC منجر به اسهال حاد شده و شروع علائم اسهال با یک زمان انکوباسـیون کوتـاه همـراه می باشد (۵۰-۱۴ساعت) و اسهال آبکی معمولاً بدون خون و مخاط بوده و در اکثر موارد تب و استفراغ مشاهده نمی شـود. اسـهال ایجـاد شده توسط سویه هایETEC خود محدود کننده می باشد و پس از دو یا سه روز بهبودی حاصل می گردد و موارد مرگ و میر صرفاً در کودکان شیر خوار درکشورهای در حال توسعه مشاهده می شود.

سروگروپ های شایع ETEC بشرح زیر می باشد :

O153،O63,O78,O85,O115 ,O128ac ,O148 , O159 ،O167،O6 ,O8 ,O15 ,O20 ,O25 ,O27,O49.

اشریشیا کلی انترو هموراژیک:

اشریشیاکلی انتروهموراژیک(EHEC) از جمله زیر گروه های اشریشیا کلی تولید کننده ی شیگا توکسین می باشند که باعث ایجاد کولیت هموراژیک و سندرم همولیتیک اورمیک در انسان می شوند.مهمترین سروتایپ شایع، O157:H7 می باشد که تا کنون باعث اپیدمی و مرگ و میر درکشورهای آمریکای شمالی،اروپا و کانادا شده است، از طـرف دیگـر سـویه هـای تولیـد کننـدهٔ شیگاتوکـسین دیگری هستند که به سروتایپ های دیگر متعلق می باشند و اصطلاحاً به آنان Non O157:H7 می گویند. اطلاعـات موجـود نـشان می دهد که آلودگی با سویه های Non- O157:H7 در قاره اروپا و استرالیا و امریکای لاتین نشانگر وجود پراکندگی سـویه هـا بـر مبنای تنوع جغرافیایی می باشد . دام ها از مهمترین منابع عامل بیماری می باشند . آب و مواد غذایی و سبزیجات از مهمترین راه های

5- Heat Labile Toxin
6-Heat Stable Toxin

انتقال بیماری می باشند. سروتایپ های اشریشیا کلی انتروهموراژیک که عمدتا" وابسته به بیماری هستند شامل موارد زیر می شود: O157:H7، O145:H28، O111:H8، O103:H2، O26:H11، O9:NM، O5:NM، O2:H6، O1:NM، O91:NM، O83:H1، O79:H7، O55:H7، O50:H7، O48:H21، O45:H2، O26:NM، O22:H5، O118:H16، O118:H12، O118:H2، O113:H21، O111:H2، O111:NM، O104:H21، O104:NM، O91:H21، O153:H25، O153:H2، O165:H25، O172:NM، Orough:H9، O128:H2، O128:H45، O137:H41، O145:NM، O157:NM، O165:NM، O163:H19، O128:NM، O128:H19 و O121:H19.

سویه های O157:H7 با دوز عفونی بسیار کم (۱۰-۱۰۰ ارگانیسم) می تواند بیماری را ایجاد نمایند. همه گیری های ایجاد شده توسط این ارگانیسم معمولاً با مصرف آب وغذای آلوده با مدفوع گاو و همچنین شیر غیر پاستوریزه و آبمیوه و سبزیجات تازه همراه بوده است .در ضمن انتقال از فرد به فرد نیز در پانسیون ها مشاهده شده است.آلودگی با اشریشیا کلیO157:H7 تقریباً در تمامی دنیا گزارش شده است. البته گزارشات جداسازی Non O157:H7 از موارد اسهال نیز در بسیاری از کشور ها موجود می باشد. نظر به دوز بسیار کم ارگانیسم برای ایجاد بیماری و تولید شیگا توکسین برای بروز علایم کلینیکی،از جمله عوامل موثری می باشند که زمان نمونه گیری و جدا سازی سویه های O157:H7 و Non-O157:H7 را تحت تاثیر قرار می دهند **و به همین علت جدا سازی و تشخیص این گونه سویه ها با مشکلات متعددی مواجه می باشد.**

- ❖ نتایج مطالعات قبلی انجام شده توسط محققین آزمایشگاه مرجع کشوری اشریشیاکلی نشان می دهد که سویه های Non-O157:H7 در ایران موجود می باشند، لازم به ذکر می باشد که جداسازی سویه های O157:H7 از مراکز دیگر در ایران که تاکنون گزارش شده اند نیاز به تأیید نهایی توسط مراجع ذیصلاح را دارند.

اشریشیا کلی انترو اینویسیو:

اشریشیاکلی انترواینویسیو (EIEC) میتوانند هم اسهال آبکی و هم اسهال خونی که شبیه دیسانتری می باشد را ایجاد نمایند. سویه های EIEC از نظر خواص بیوشیمیایی، ژنتیکی و پاتوفیزیولوژیک شبیه به سویه های شیگلا می باشند.

انسان مهمترین مخزن EIEC می باشد و بیشتر همه گیریهای ایجاد شده توسط سویه های EIEC از طریق آب و مواد غذایی بوده است. انتقال فرد به فرد در مورد EIEC به علت دوز عفونی بالا بسیار کم می باشد. **به علت مشابهت های زیاد این ارگانیسم با شیگلا، تشخیص این سویه ها با مشکلات جدی روبرو می باشد** و در برخی موارد عدم گزارش سویه های EIEC به همین علت

می باشد. ضمناً گزارشات متعددی از این ارگانیسم در دست نمی باشد. سروگروپهای شایع EIEC که تاکنون گزارش شده انـد شـامل: 028ac,029,0112,0124,0136,0143,0144,0152,0164, 0167 می باشند.

اشریشیاکلی ا نترواگریگیتیو

اشریشیاکلی ا نترواگریگیتیو(EAEC) زیر گروهی از اشریشیاکلی های اسهال زا می باشند و در عرض ده سال گذشته توجه خاصی بـه این گروه شده است. EAEC باعث ایجاد اسهال حاد و مزمن می شود.

سویه های EAEC از کودکان و بزرگسالان در سراسر دنیا جداسازی شده است. EAEC باعث ایجـاد همـه گیـری هـای زیـادی در اروپا و انگلستان، سوئیس و ژاپن شده است. EAEC همچنین باعث ایجاد اسهال در مسافران به کشورهای در حال توسعه و کودکان و افراد آلوده به ویروس HIV که در کشورهای پیشرفته و در حال توسعه زندگی می کنند نیز می شود.

EAEC به عنوان یک پاتوژن نوظهور با شیوع روز افزون شناخته شده و همچنین به عنوان دومین عامل اتیولوژیک بعـد ازETEC در اسهال مسافران می باشد. احتمال همه گیری های خاموش اسهال توسط ETEC و EAEC که تشخیص داده نمی شوند وجود دارد و این عدم تشخیص به لحاظ عدم آگاهی دست اندرکاران بهداشتی از EAEC و نقش آن در بیمـاری مـی باشـد. از مـشکلات دیگـر در تشخیص این سویه ها می توان از نبود امکانات آزمایشگاهی پیشرفته و نیروی انسانی آموزش یافته برای انجـام تـست هـای تشخیـصی اختصاصی نام برد. EAEC مانندETEC ، از راه مدفوعی-دهانی انتقال می یابد و فاکتور های ریسک شامل مسافرت به کـشور هـای در حـــال توســـعه ، اســـتفاده از غـــذا و آب آلـــوده، ســـطح پـــایین بهداشـــت، ایمنـــی میزبـــان و آلـــودگی بـــهHIV می باشد. پاتوژنز سویه های این پاتوتایپ ها بسیار ناهمگن بوده و مکانیسم بیماریزایی پیچیده ای دارند. پاتوژنز این سویه ها شامل سه مرحله است:

۱) اتصال به لایه موکوس روده توسط پیلی خاص(AAFs) [1]

۲)تولید موکوس توسط باکتری و سلولهای میزبان که باعث ایجاد بیوفیلم بروی سطح آنتروسیتهای روده می شود.

۳)تولید و آزاد سازی توکسین های مختلف و بروز پاسخ التهابی که در نهایت توکسیسیتی موکوس و ترشح روده را سبب می گردد.

سویه های EAEC دارای علائم کلینیکی مختلفی از جمله اسهال آبکی، درد شکم، تهوع و تب پایین می باشد. سویه هـای EAEC می توانند اسهال حاد و مزمن (بیشتر از ۱۴ روز) را ایجاد نمایند.سروگروپ های شایع شناخته شده در مورد سـویه هـای EAEC بـه شرح زیر است:

1- Aggregative Adherence Factors

.O3,O15,O114,O77,O86,O92,O111,O127

❖ نتایج مطالعات انجام شده توسط محققین آزمایشگاه مرجع کشوری اشریشیاکلی نشان می دهد که سویه های EAEC در ایران شایع می باشند ولی احتمالاً عدم آگاهی کافی و نبود امکانات تشخیصی علت عدم گزارش این سویه ها باشد.

اشریشیاکلی با چسبندگی پراکنده[1]:

این دسته از اشریشیاکلی ها با اتصال به سلول های اپی تلیال بصورت پراکنده و نامنظم به یک گروه خاص و مجزا با قابلیت و پتانسیل پاتوژنیک تقسیم بندی شده اند. هر چند که مکانیزم پاتوژنز آنها مشخص نیست و اطلاعات بسیار کمی در این زمینه موجود می باشد. مطالعات اپیدمیولوژیک گزارشات متفاوتی را ارائه می دهند،برخی گزارشات اشاره به این موضوع دارند که ممکن است سویه های DAEC نقش مهمی در اسهال در کشور های پیشرفته داشته باشند.

۳-۲) راههای تشخیص و شناسایی سویه های اشریشیا کلی:

۱-۳-۲) روش کلاسیک:

این روش شامل ۲ مرحله کشت و سرولوژی می باشد که هر دو به صورت همزمان توسط دو گروه کارشناس به طور مجزا انجام می گیرد و نتایج حاصل از این دو روش در نهایت می تواند منجر به شناسایی سروتیپ خاص موجود در نمونه گردد.

2 - Diffusely adherent *Escherichia coli*

الف) کشت:

در مجموع برای هیچ یک از پاتوتایپ های اشریشیاکلی محیط کشت اختصاصی وجود ندارد و باید ترکیبی از روش های کلاسیک، سرولوژی و مولکولی را برای شناسایی آنها استفاده نموده لذا جهت تشخیص اینگونه سویه ها اطلاعات موجود بیمار از قبیل سن بیمار ، نوع اسهال و علائم کلینیکی بیمار می توانند به عنوان عوامل کمکی در تشخیص استفاده شوند. در کنار این اطلاعات رشد یکدست و غالب اشریشیا کلی در محیط مکانکی به صورت کلنی های صورتی رنگ حائز اهمیت می باشد.(درغیاب پاتوژن های شناخته شده مانند سالمونلا ، شیگلا ...).

مراحل کشت: ابتدا از روی نمونه مدفوع (موجود در محیط ترانسپورت) بر روی محیط های مک کانکی[1]، بلاد [2] ، EMB[3]، سوربیتول مک کانکی[4] ، CT-SMAC[5]، وکنگورد[6] کشت می دهیم.. تعداد ۵ کلنی لاکتوز مثبت و ۲ کلنی لاکتوز منفی از روی محیط مکانکی انتخاب کرده و هر کدام را جداگانه بر روی TSI[7] کشت می دهیم سپس محیط TSI را به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه می گذاریم. پس از ۲۴ ساعت نتایج کشت را بررسی کرده و از روی محیط TSI بر روی محیط های افتراقی جهت تشخیص افتراقی و محیط نوترینت آگار جهت سرولوژی کشت می دهیم و نتایج را بعد از مدت زمان ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه مشاهده می کنیم.

ب) سرولوژی:

این روش به همراه کشت از محیط نوترینت آگار برای تشخیص آنتی ژن های O و H و تعیین سروتیپ های مختلف موجود در سویه های اشریشیاکلی انجام می گیرد. هر سویه دارای آنتی ژن های سوماتیک (O) و آنتی ژن های تاژکی (H) خاصی می باشند. در این روش سویه ها توسط آنتی سرم های تجارتی O و H شناسایی می شوند.

1- MacConkey Agar
2- Blood Agar
3- Eosin Methylene Blue
4- Sorbitol Mac Conkey Agar
5- Cefixim Tellurite Sorbitol MacConkey Agar
6- Congo Red Agar
7- Triple Sugar Iron Agar

۲-۳-۲) روش مولکولی:

انجام تست های مولکولی مانند PCR و هیبریداسیون از طریق روش های استاندارد صورت می پذیرد. انجام PCR برای تشخیص مولکولی پاتوتایپ های اشریشیا کلی در آزمایشگاه مرجع کشوری اشریشیا کلی راه اندازی شده است و تشخیص سویه های مشکوک با کمک روش های مولکولی قابل انجام می باشد. آزمایش PCR توسط پرایمرهای خاص که برای ژن های ویرولانس طراحی شده اند بر روی DNA هایی که از سویه های مورد نظر جدا شده اند صورت می پذیرد.

۲-۳-۳) روش کشت سلولی:

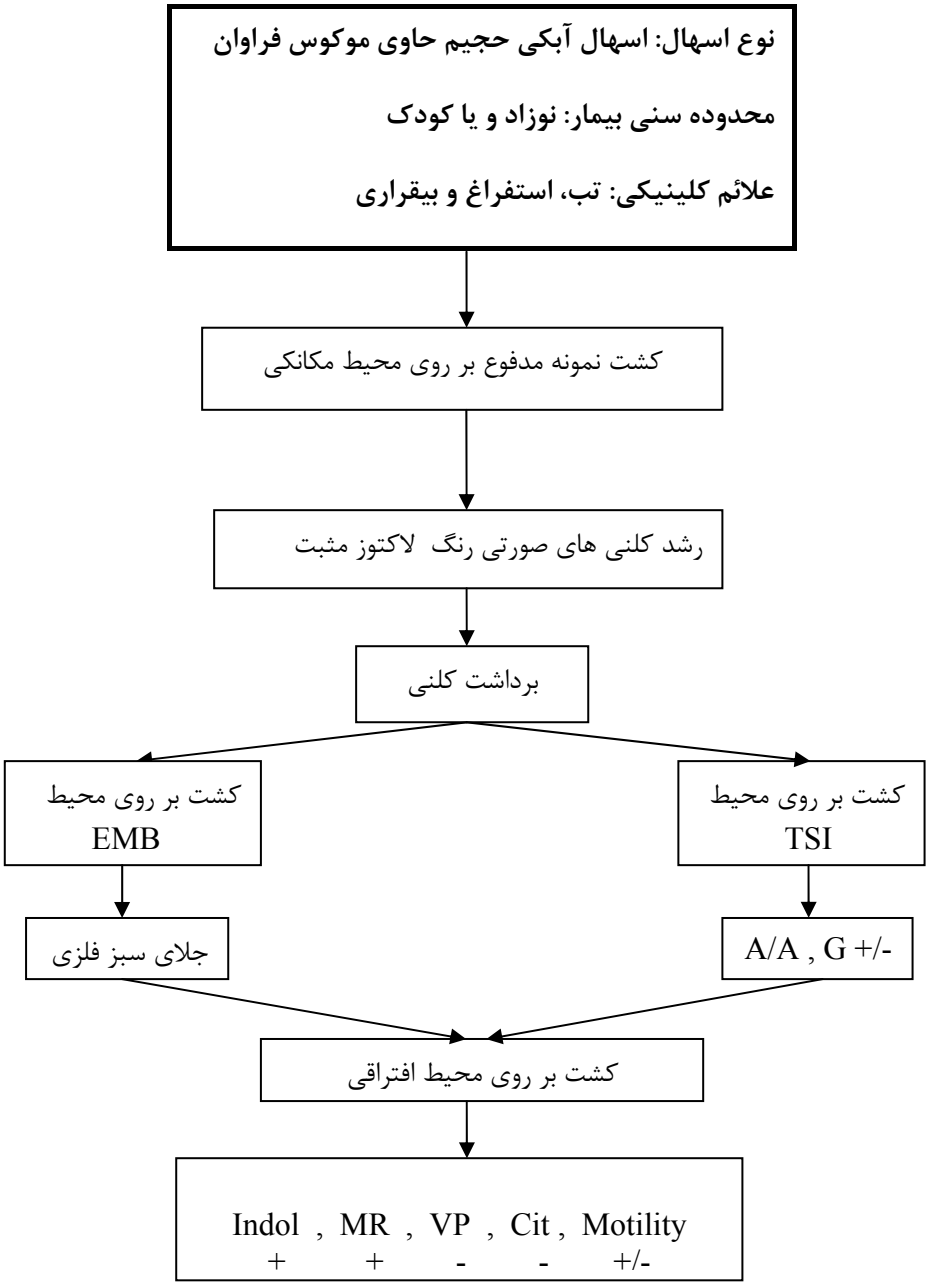
این روش به دو منظور صورت می گیرد:

- تعیین الگوی چسبندگی سویه باکتری به سلول های اپی تلیال HEP-2 یا HeLa
- تشخیص نوع توکسین تولید شده توسط سویه های اشریشیاکلی به کمک سلول های فیبروبلاست مانند سلول های Vero و یا CHO انجام این تست در تمامی آزمایشگاه ها به علت نبود امکانات و پرسنل متخصص امکان پذیر نمی باشد ولی این روش در آزمایشگاه مرجع کشوری اشریشیا کلی راه اندازی شده و سویه های مورد مطالعه می توانند از این نظر مورد بررسی قرار گیرند.

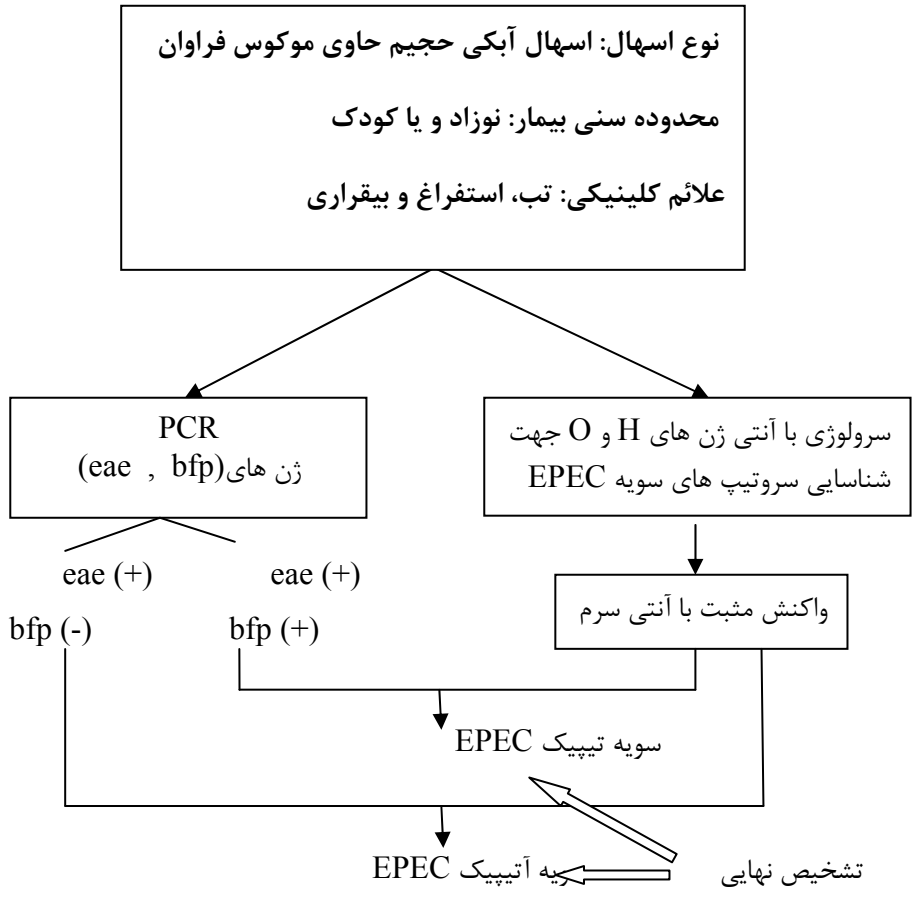
۲-۴) مراحل تشخیص اشریشیاکلی انتروپاتوژنیک:

در صورتی که بیمار نوزاد یا کودک بوده و اسهال غیر خونی همراه با تب و استفراغ داشته باشد، نمونه با روش های استاندارد میکروبشناسی برای تشخیص قطعی اشریشیاکلی کشت داده می شود و پس از حصول اطمینان، سرولوژی انجام می گیرد. دسته بندی سویه آنتروپاتوژنیک جدا شده به عنوان تیپیک (eae+ و bfp+) یا آتیپیک (eae+ و bfp+) توسط PCR صورت می گیرد.

A) تشخیص اولیه



B) تشخیص نهایی

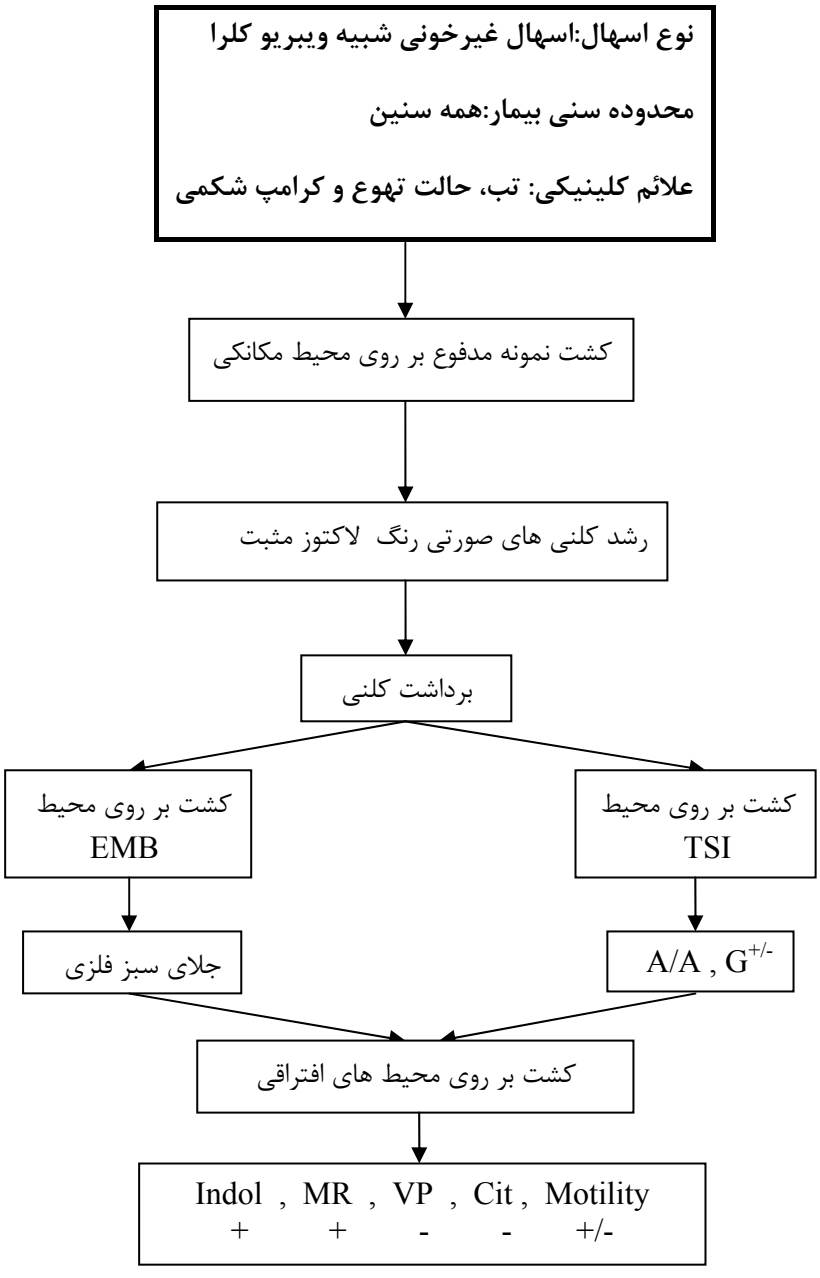


۵-۲) مراحل تشخیص اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک:

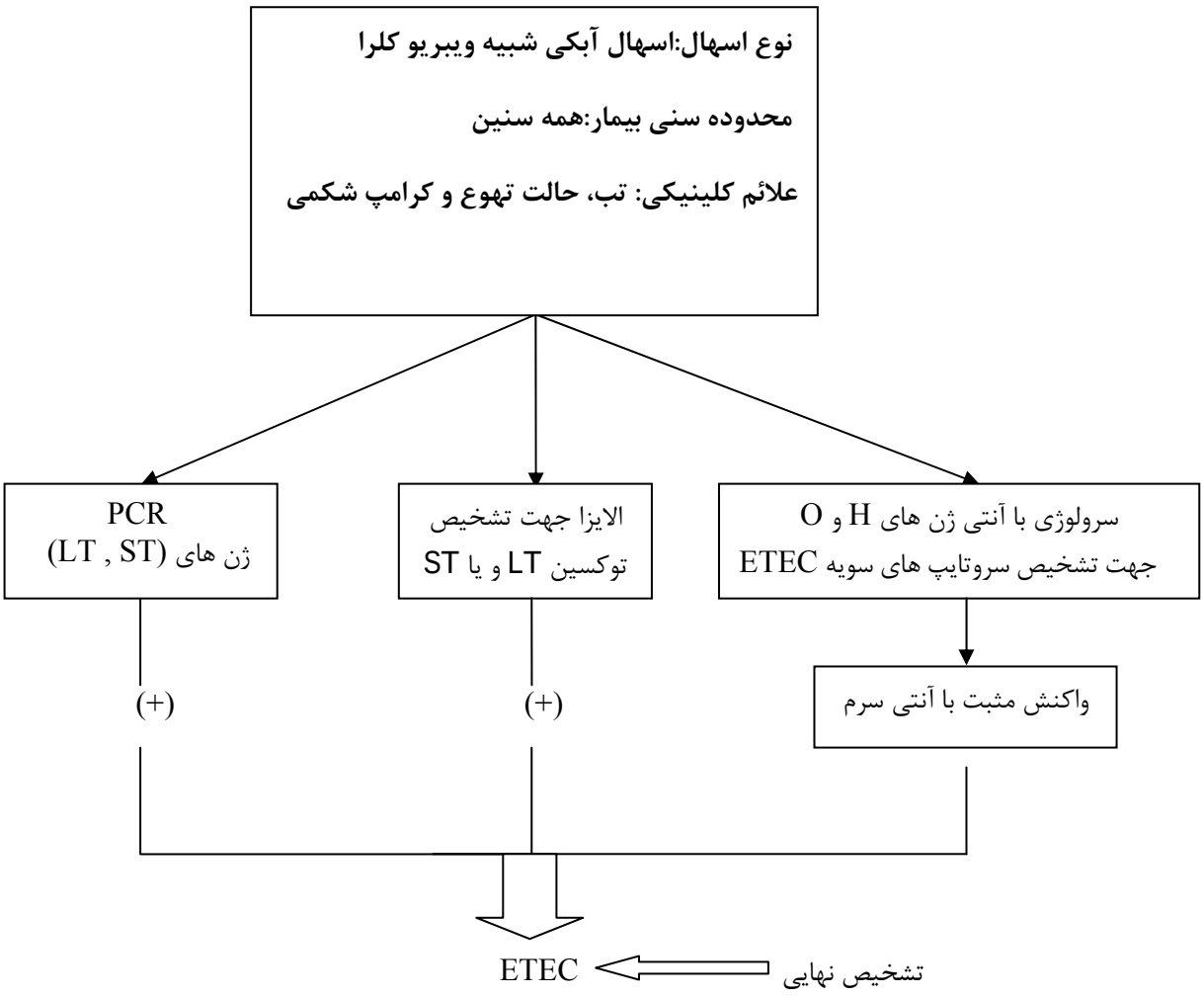
اگر بیماری (بدون توجه به سن) با اسهال غیر خونی (مشابه ویبریوکلرا) که در اثر خوردن غذا وآب آلوده ایجاد شده، به مرکز بهداشتی مراجعه کند ما را مشکوک به سویه ETEC می کند. این بیماری معمولا" با علائم بالینی تهوع و استفراغ و شکم درد و تب همراه می باشد.

اساس تشخیص ETEC بر مبنای شناسایی دو انتروتوکسین LT و ST می باشد که به کمک الایزا و PCR صورت می گیرد و این آزمایشات پس از تعیین هویت باکتری با استفاده از روش های استاندارد میکروب شناسی انجام می گیرد. سروتیپ این سویه ها به کمک سرولوژی با آنتی سرم های تجاری تعیین می شود.

A) تشخیص اولیه



B) تشخیص نهایی



6-۲) مراحل تشخیص اشریشیا کلی انتروهموراژیک :

این سویه درکودکان و بزرگسالان مبتلا به این سویه اسهال خونی و یا غیرخونی همراه با علائم بالینی شکم درد ایجاد می نماید. بیماران اغلب در اثر خوردن آب و مواد غذایی و سبزیجات آلوده به این سویه مبتلا می گردند . سویه های گروه انتروهموراژیک اشریشیاکلی شامل سویه O157:H7 و سویه های Non- O157:H7 می باشد. سویه ی O157:H7 قادر به تخمیر سوربیتول نمی باشد ولی گروهی از Non- O157:H7 ها قادرند که سوربیتول را تخمیر کرده و کلنی های صورتی رنگ روی محیط SMAC ایجاد کنند. ضمنا" سویه O157:H7 به سفکسیم و تلوریت مقاوم بوده و رامنوز را تخمیر نمی کند و روی محیط CT-SMAC کلنی های بی رنگ ایجاد می نماید. (البته مشخصات ذکر شده فقط در مورد سویه O157:H7 استاندارد مشاهده شده و در آزمایشگاه مرجع کشوری اشریشیاکلی سویه بومی O157:H7 با مشخصات ذکر شده جداسازی نشده است.)به همین دلیل محیط کشت SMAC و CT-SMAC محیط کشت کلیدی و اختصاصی در تشخیص سویه های EHEC می باشد .

مراحل کار جهت جداسازی سویه ی O157:H7 و Non- O157:H7 :

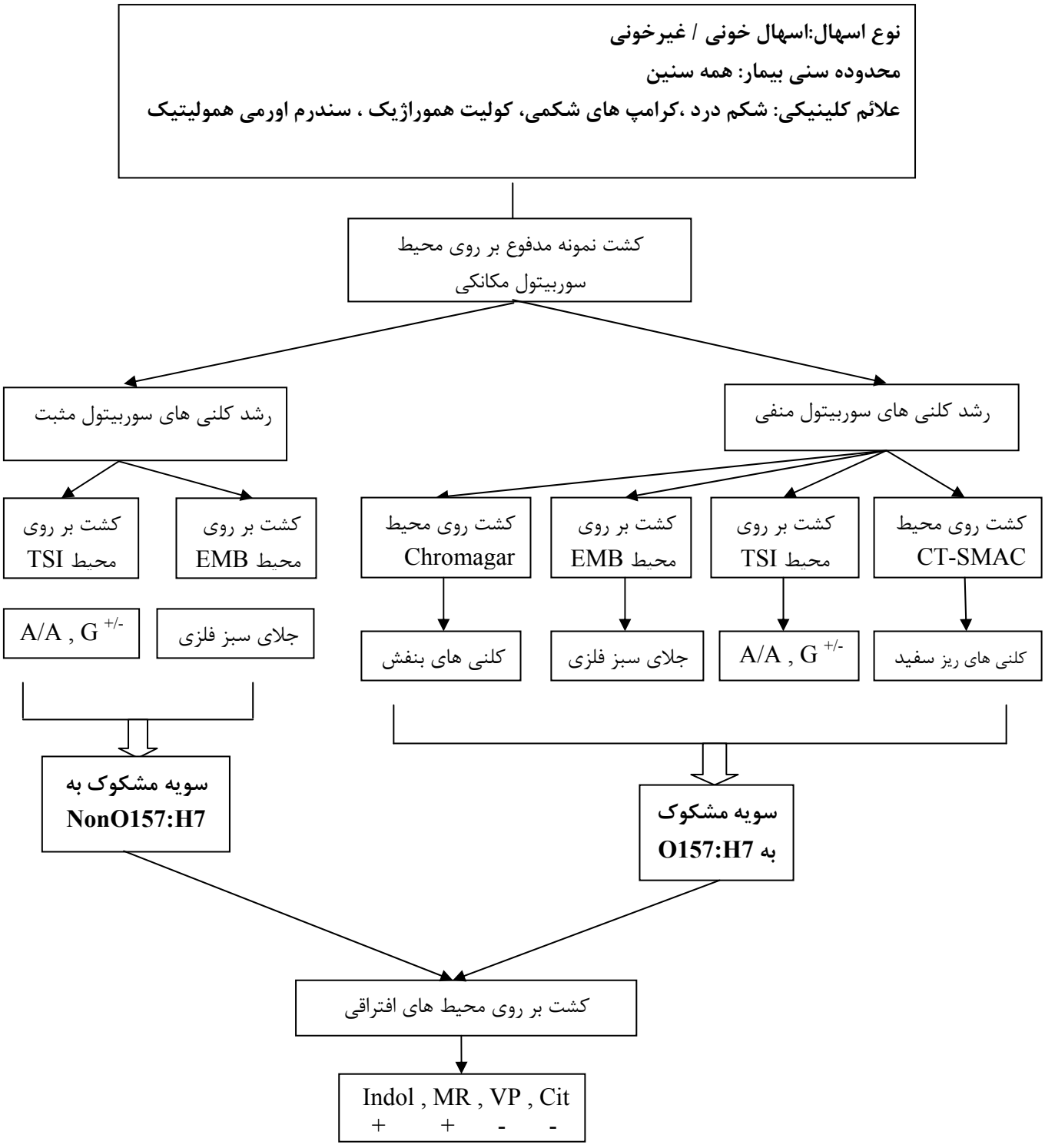
ابتدا پس از بررسی محیط های کشت اولیه ۵ کلنی سوربیتول مثبت و ۵ کلنی سوربیتول منفی از محیط کشت SMAC انتخاب می گردد و با استفاده از روش های استاندارد میکروب شناسی هویت آنها تعیین می گردد . پس از تشخیص اشریشیاکلی، سویه ها با آنتی سرم O157:H7 سرولوژی شده و برای تشخیص نهایی، آزمایش PCR بر روی DNA جدا شده از سویه های EHEC برای سه ژن eae (ژن پروتئین غشایی) ، Stx (ژن شیگاتوکسین) و hlyA (ژن همولیزین) انجام می گیرد. نتایج به ۳ صورت می تواند باشد:

- سویه غیرتخمیری بوده و با انتی سرم O157:H7واکنش مثبت دهد PCR آن به صورت eae(+) ، Stx(+) و hly(+) باشد که در این صورت سویه مورد نظر E.coli O157:H7 است.

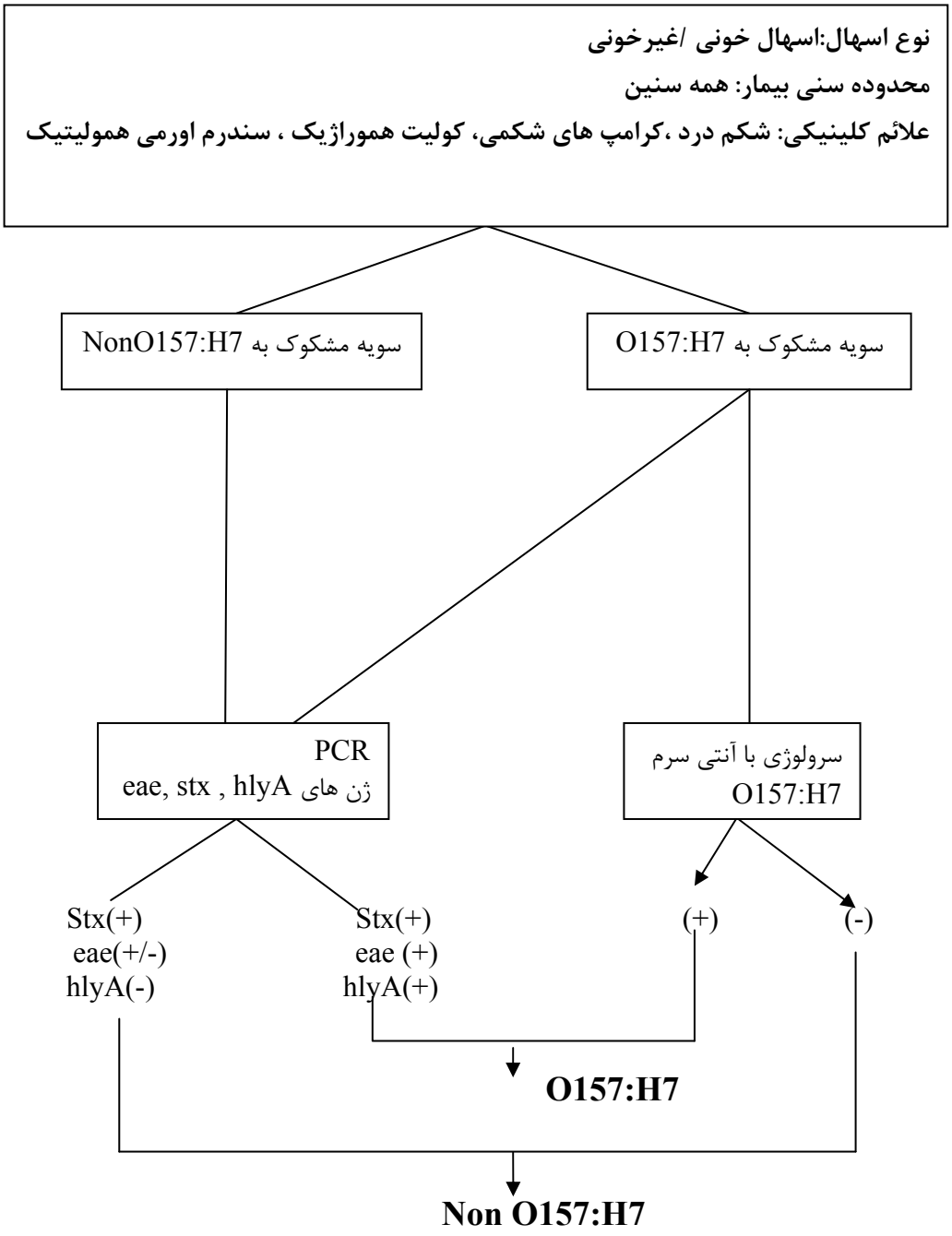
-سویه غیرتخمیری بوده و با آنتی سرم O157:H7 جواب منفی دهد و PCR آن به صورت eae(+) ، Stx(+) و hly(-) باشد که در این موارد سویه E.coli NonO157:H7 است.

-سویه تخمیری بوده و با آنتی سرم O157:H7 جواب منفی دهد و PCR آن به صورت eae(-) ، Stx(+) و hly(-) باشد که در این موارد سویه E.coli NonO157:H7 است.

A) تشخیص اولیه



B) تشخیص نهایی



۷-۲) مراحل تشخیص اشریشیاکلی انترواینویسیو:

سویه های EIEC منجر به ایجاد اسهال خونی شبیه دیسانتری همراه با علائم بالینی تب ، کولیت و شکم درد می شوند. این سویه از طریق آب و غذای آلوده به انسان منتقل می گردد.

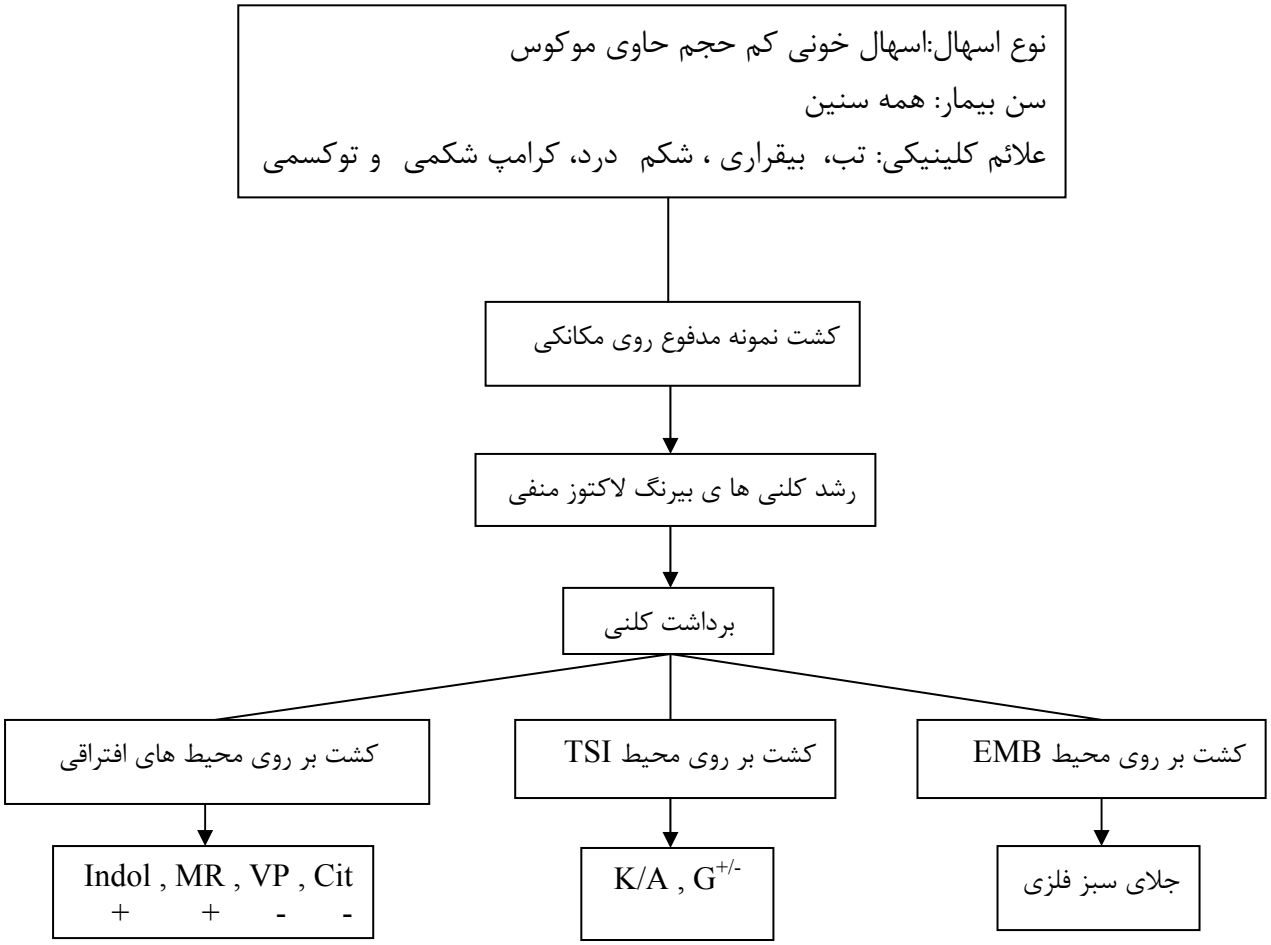
محیط کشت کلیدی و اختصاصی این سویه Congo red است. سویه های EIEC می توانند کنگورد را از محیط جذب کرده و به صورت کلنی های آجری پررنگ بر روی محیط ظاهر شوند. در حالیکه اشریشیاکلی های غیر پاتوژن یا غیر از سویه های EIEC این قابلیت را ندارند. این سویه ها لاکتوز منفی و غیر متحرک بوده و کلنی های بی رنگ روی محیط مکانکی ایجادکرده و از این حیث شبیه به سویه های شیگلا می باشند.

مراحل کار جهت جداسازی سویه های اشریشیاکلی انترواینویسیو:

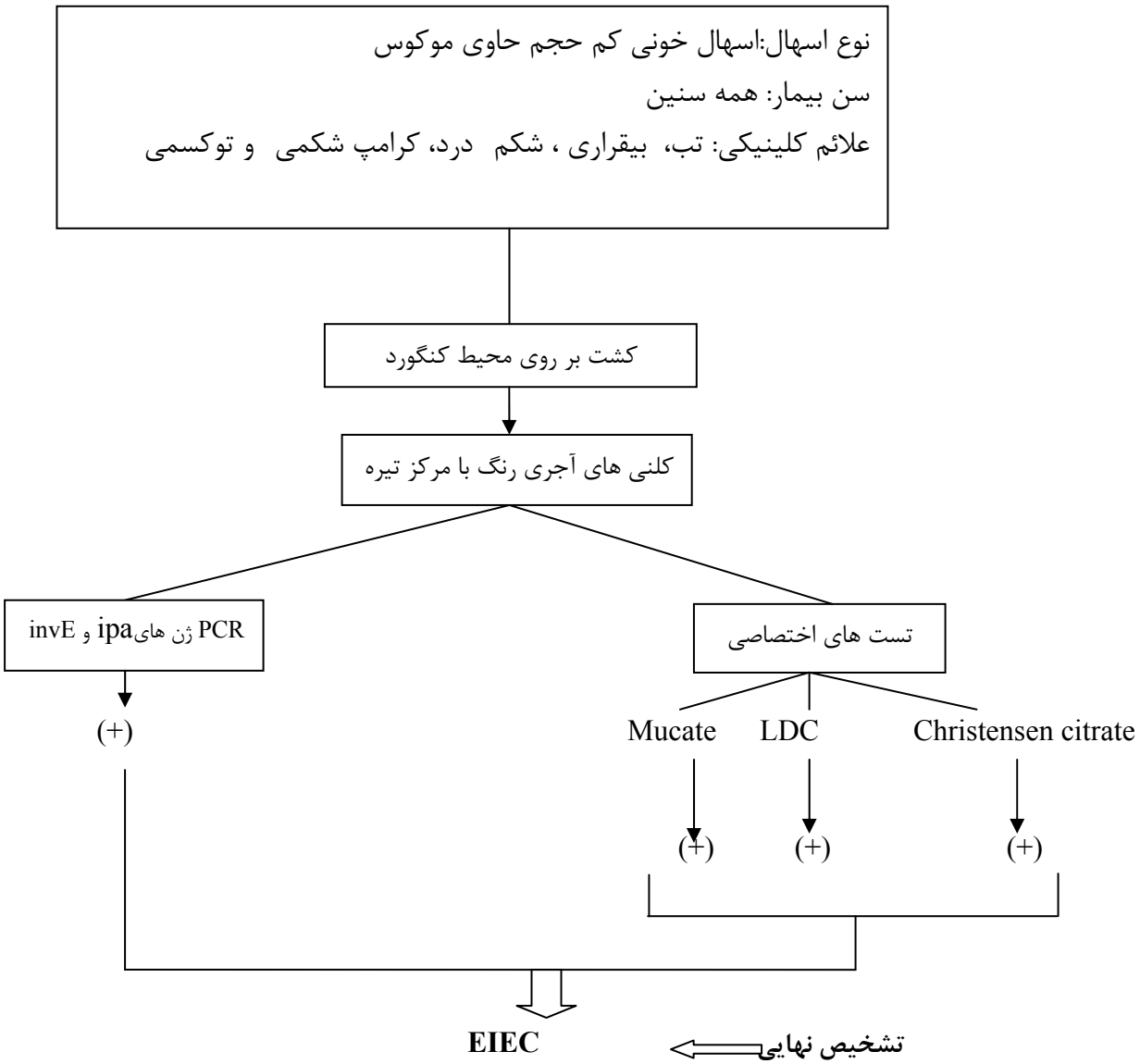
پس از انجام تست های افتراقی بر روی ۵ کلنی لاکتوز منفی که از محیط مک کانکی انتخاب شده اند و حصول اطمینان از اینکه سویهٔ جدا شده اشریشیاکلی می باشد، سویه ها را روی محیط کنگورد کشت داده و توانایی جذب این ماده توسط این سویه بررسی می گردد. آزمایشات تکمیلی برای اشریشیاکلی های جدا شده از این موارد، استفاده از محیط های افتراقی Christensen citrate ، Mucate و Lysine decarboxylase می باشد.

تشخیص نهایی با انجام PCR برای ژن های ipa و invE صورت می گیرد.

A) تشخیص اولیه



B) تشخیص نهایی



۸-۲) مراحل تشخیص اشریشیاکلی انترواگریگیتیو:

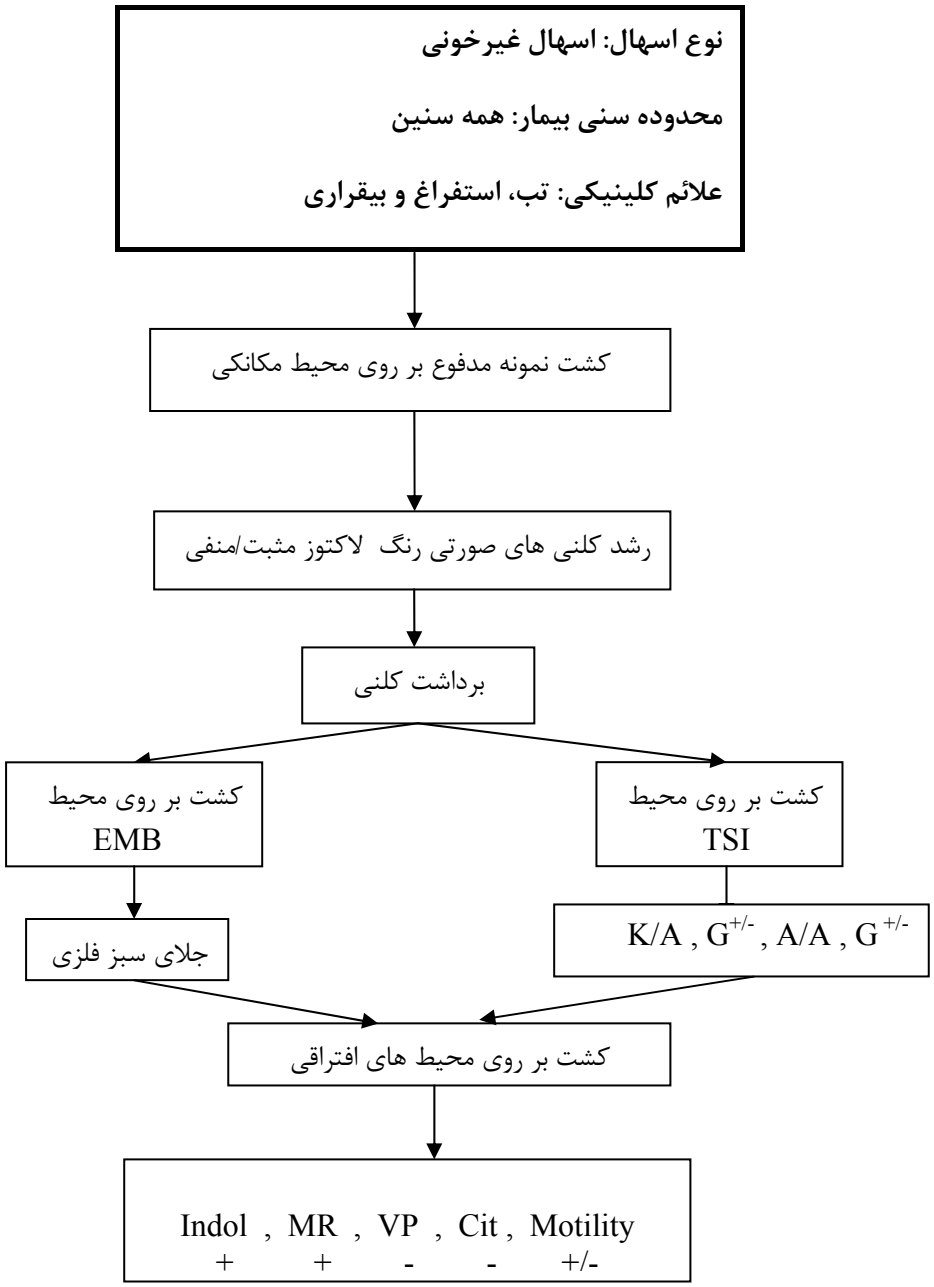
سویه های انترواگریگیتیو باعث ایجاد اسهال خونی و غیرخونی حاد و مزمن می شوند. این سویه عامل ایجاد اسهال در مسافران نیز می باشد و انتقال آن از طریق آب و غذای آلوده صورت می گیرد.

در حال حاضر در اکثر نقاط دنیا تشخیص سویه های EAEC محدود به آزمایشگاه تحقیقاتی می باشد.

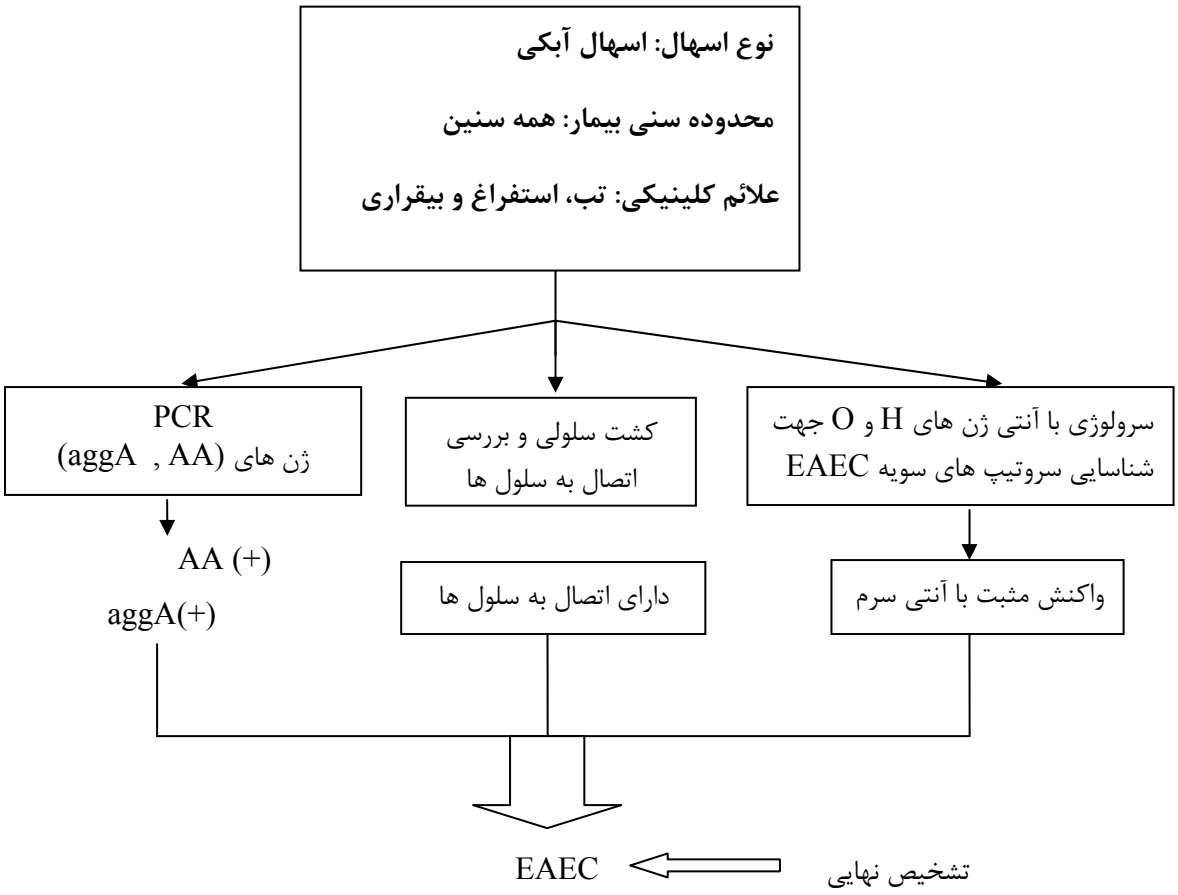
در آزمایشگاه مرجع کشوری اشریشیاکلی از دو روش تشخیصی PCR و کشت سلولی جهت شناسایی این سویه استفاده می گردد. در روش PCR حضور ژن های AA و aggA بررسی شده و در روش کشت سلولی اتصال این سویه به سلول های اپی تلیال HEP-2 مطالعه می گردد که این نتایج منجر به تشخیص و شناسایی این سویه می شود .

سروتایپ این سویه ها به کمک سرولوژی تعیین می شود.

A) تشخیص اولیه



B) تشخیص نهایی



فصل سوم

۳-۱) نمونه گیری :

اولین قدم در راه تشخیص صحیح آزمایشگاهی ، نمونه گیری دقیق و درست در زمان بروز بیماری است که در ذیل به تفصیل شرح داده می شود.

نمونه گیری مدفوع بایستی در مراحل اولیه بیماری (حداکثر ظرف ۱ تا ۲ روز که عامل بیماری زا به تعداد بیشتری در مدفوع وجود دارد) و قبل از درمان با آنتی بیوتیک صورت پذیرد.اصولا" نمونه مدفوع (در صورت قوام دار بودن حداقل ۵ گرم و یا در صورت کاملا" آبکی بودن معادل ۵ cc) نسبت به سوآب برتری دارد و حداقل باید دو نمونه سوآب مقعدی یا سوآب از مدفوع تازه برای هر بیمار جمع آوری و در محیط انتقال Cary Blair تلقیح شود.

۳-۲) روش جمع آوری نمونه مدفوع :

الف) تهیه نمونه مدفوع و سوآب از مدفوع

- برای نمونه مدفوع ، از یک ظرف درپیچدار تمیز با اندازه مناسب استفاده نمایید .

- در صورت عدم دسترسی به ظروف یکبار مصرف ، حتما" از ظرف تمیز استفاده کنید.

هنگامی که نمونه به آزمایشگاه می رسد لازم است به سرعت آزمایش بر روی آن انجام شود . (بیشتر از ۲ ساعت از زمان نمونه گیری نگذشته باشد.)

- اگر ناچار به نگهداری نمونه ها بیشتر از ۲ ساعت هستید ، سوآب را درون نمونه مدفوع قرار داده و پس از حرکت چرخشی، آن را در یک محیط انتقالی تلقیح کنید.

-اگر مدفوع حالت مخاطی دارد سعی کنید نمونه را همراه مخاط در محیط ترانسپورت تلقیح نمایید.

ب)سوآب مقعدی

برای نمونه گیری از سوآب پنبه ای سالم استفاده کنید و دقت کنید که پنبه سر آن کنده نشده باشد.

ابتدا سوآب را با فرو کردن در محیط ترانسپورت استریل مرطوب کرده و سپس به اندازه ۲/۵ تا ۳/۵ سانتی متر داخل اسفنکتر رکتوم نموده و بچرخانید و بیرون بکشید. با توجه به تغییر رنگ پنبه ی سر سوآب مطمئن شوید سوآب به مدفوع آغشته است.تعداد سوآب مورد نیاز بستگی به تعداد عوامل پاتوژن مورد مطالعه دارد معمولا" حداقل ۲ سوآب باید تلقیح شود. در موارد نمونه گیری از

اسهال های ناشی از باکتریهای مهاجم مانند شیگلا به هنگام تهیه سوآب مقعدی ، ساییدن سوآب به مخاط انتهایی روده جهت جمع آوری نمونه بسیار مهم است.

ج)تلقیح به محیط انتقال :

در صورتی که ناچار به تلقیح نمونه پس از ۲ ساعت باشیم لازم است نمونه ها را در یخچال و یا در محیط های انتقالی جهت بقاء بیشتر قرار دهیم. محیط انتقالی تلقیح شده نیز باید در سرما نگهداری شود. زیرا این شرایط برای پاتوژن هایی مانند شیگلا و کمپیلو باکتر بسیار مهم است. البته بیشتر عوامل پاتوژن به استثناء این دو ارگانیسم قابلیت زنده ماندن برای مدتی در محیط انتقالی ، در دمای محیط را دارند (حداکثر یک هفته). هنگامی که نمونه ها در محیط انتقالی قرار داده شده و نیاز به نگهداری آنها برای مدت بیشتری می باشد لازم است که در یخچال یا فریزر نگهداری شوند.

۱-ج) محیط انتقال:

محیط انتقال Cary Blair برای نگهداری و انتقال سالمونلا ، شیگلا ، اشریشیاکلی ، ویبریوکلره ، ویبریو پارا هموليتیکوس و یرسینیا انتروکولیتیکا بسیار مورد استفاده قرار می گیرد .این محیط به میزان ۵ cc (PH=8.4) در لوله در پیچدار با اندازه متوسط ^{mm}(۱۰۰ × ۱۳) ریخته می شود و باید قبل از استفاده و بعد از تلقیح نمونه به آن ، در ۴ ċ نگهداری شود. (چنانچه محیط تازه تهیه شده باشد باید قبل از استفاده ۱ تا ۲ ساعت خنک شده باشد و در یخچال نگهداری گردد.)این محیط انتقالی پس از آماده سازی حداکثر ۱۲ ماه قابل استفاده است به شرطی که، حجم آن کاهش پیدا نکرده و هیچگونه علائم آلودگی و تغییر رنگ در آن مشاهده نشود.

۲-ج) مراحل تلقیح نمونه در محیط انتقالی Cary Blair:

-حداقل ۲ سوآب مدفوع یا مقعدی را به ته لوله حاوی محیط وارد کنید.

-پس از قرار دادن سوآب در لوله ، قسمت چوبی بیرون از لوله را بشکنید.

-در لوله را محکم ببندید.

-نمونه ها را داخل یخچال نگهداری کنید و اگر امکان نگهداری در یخچال وجود ندارد ، محیط انتقال حاوی سوآب را در مکانی خنک و دور از نور جهت پایین نگه داشتن دما قرار دهید.

۳-۳) انتقال نمونه :

به دستورالعمل آزمایشگاه مرجع سلامت که به پیوست می باشد مراجعه شود.

فصل چهارم

۴-۱) تجهیزات مورد نیاز جهت آزمایش های تشخیصی به روش کلاسیک

تجهیزات:

-لوپ برای کشت

-انکوباتور

-شعله گاز

- ارلن

-ترازو، لوله، پلیت استریل، اتوکلاو و بن ماری

مواد:

- سرم فیزیولوژی

-آنتی سرم

معرف ها:

- معرف MR- VP

-محلول کواکس

محیط های کشت:

TSI ، نوترینت آگار ، مک کانکی آگار ، EMB آگار، بلاد آگار ، کنگورد آگار، سوربیتول مک کانکی آگار(SMAC) ، CT-SMAC آگار، Chroma آگار، سیترات آگار ، SIM ، MR-VP)

۴-۲) دستور العمل تهیه ، استریلیزاسیون ونگهداری محیط های کشت

۴-۲-۱) تهیه محیط های کشت:

۱- جهت تهیه هر نوع محیط کشت، ابتدا بر چسب روی بسته محیط کشت که حاوی مشخصات و طرز تهیه آن می باشد به دقت خوانده شود.

۲- به مقدار لازم از پودر خشک محیط کشت را وزن شود.

۳- پودر وزن شده در مقدار مناسبی آب مقطر حل شود.

۴- ارلن حاوی محیط کشت حرارت داده شود .

۵- در ظروف مناسب تقسیم و قبل از مصرف استریل شوند.

- ❖ محیط هایی که باید در لوله تهیه گردند قبل از استریلیزاسیون به مقدار مناسب در لوله ریخته شده سپس اتوکلاو می گردند.
- ❖ محیط هایی که باید در پلیت تهیه گردند بعد از اتوکلاو در کنار شعله و تحت شرایط استریل در پلیت تقسیم می گردند.
- ❖ ۳ تا ۵ درصد پلیت های تهیه شده قبل از استفاده باید به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردند تا استریل بودن آنها مورد تائید قرار گیرد.

۴-۲-۲) استریلیزاسیون:

ظروف حاوی محیط کشت جهت انجام استریلیزاسیون در اتوکلاو طبق شرایط مناسب با محیط های کشت ، استریل خواهند شد .

۴-۲-۳) شرایط نگهداری پودر محیط های کشت:

- محیط های کشت در موقع مصرف نباید تاریخ گذشته باشند.
- محیط های کشت نباید به صورت توده یا خشک شده باشند.
- محیط های کشت نباید تغییر رنگ داده باشند.
- محیط های کشت باید در دمای مناسب وشرایط خشک نگهداری شوند.

۴-۲-۴) نگهداری محیط های کشت آماده:

۱- تمام محیط ها جهت پرهیز از خشک و خراب شدن می بایستی در یخچال نگهداری شوند.

۲- محیط های خشک شده نبایستی مورد استفاده قرار گیرند.

۳- پلیت های آماده می بایستی در کیسه های در بسته در داخل یخچال قرار گیرند.

۴- شرایط نگهداری لوله ها ی حاوی محیط های کشت که با سر پوش پنبه ای بسته شده اند مانند پلیت می باشند.

۵- پلیت های حاوی محیط کشت بسته بندی شده در کیسه فریزر به مدت ۶ هفته در یخچال قابل نگهداری می باشند.

۶- لوله های با سرپوش پنبه ای ۱ تا ۲ هفته قابل نگهداری هستند.

۷- لوله های سر پیچ دار به مدت ۳ ماه قابل نگهداری می باشند.

۳-۴) محیط های مورد نیاز برای کشت مدفوع در آزمایشگاه مرجع کشوری اشریشیاکلی و طرز تهیه آنها

- Blood Agar(بلاد آگار)
- MacConkey Agar(مک کانکی آگار)
- Eosin Methylene Blue (EMB)
- Sorbitol MacConkey Agar (سوربیتول مک کانکی آگار)
- CHROMagar(کروم آگار)
- Congo Red Agar (کنگورد)
- Tryptic Soy Broth (TSB)
- Triple Sugar Iron Agar (TSI)
- Simmons Citrate
- MR (متیل رد)
- VP (Voges – Proskauer)
- SIM
- Muller Hinton Agar(مولر هینتون آگار)

محیط کشت Blood Agar

تشخیص سویه های همولیتیک موجود در نمونه مدفوع ارسالی به آزمایشگاه مرجع کشوری اشریشیاکلی به کمک این محیط صورت می گیرد. برای تهیه این محیط ابتدا مقدار معینی از پودر مربوطه را وزن کرده و در یک لیتر آب مقطر مخلوط کرده و آن را حرارت داده تا کاملاً حل و رنگ محیط شفاف شود. سپس آن را اتوکلاو نموده (۱۲۱ $^{\circ}C$ به مدت ۱۵ دقیقه) و پس از آن زمانی که دمای محیط کشت به حدود ۵۵ $^{\circ}C$ رسید به میزان ۱۰-۵ ٪ خون دفیبرینه گوسفند را

به آرامی به آن اضافه کرده و کمی تکان داده تا به خوبی مخلوط شود. پس از این مراحل محیط آماده شده در پلیت های استریل توزیع می گردند. پس از کنترل کیفی (۴۸ ساعت در $^{\circ}C$ ۳۷) و بررسی عدم آلودگی ، محیط ها قابل استفاده می باشند. سویه هایی که دارای همولیزین می باشند بر روی این محیط کلنی هایی با هاله همولیز ایجاد می کنند.

محیط کشت مک کانکی آگار

تشخیص سویه های تخمیرکننده لاکتوز از سویه هایی که قادر به تخمیر لاکتوز نمی باشند به کمک این محیط صورت می گیرد.در ضمن این محیط به خاطر داشتن نمک های صفراوی برای رشد باکتریهای داخل روده مناسب می باشد.

برای تهیه این محیط مقدار معینی از پودر مربوطه را وزن کرده و در یک لیتر آب مقطر حل کرده و آنرا حرارت داده تا کاملاً حل گردد و رنگ محیط شفاف شود، سپس آن را اتوکلاو نموده(۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه) و پس از آن زمانی که دمای محیط کشت به حدود ۵۵ درجه سانتیگراد رسید در پلیت های استریل توزیع می گردند. پس از بررسی کنترل کیفیت و اطمینان از عدم آلودگی(انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت) این پلیت ها قابل استفاده می باشند.

معرف موجود در این محیط ، نوترال رد است که در PH اسیدی به رنگ قرمز مایل به ارغوانی و در PH خنثی ، صورتی کم رنگ می باشد. باکتری های لاکتوز منفی قادر به تولید اسید از قند لاکتوز نبوده و در نتیجه رنگ معرف را تغییر نداده، کلنی هایی بی رنگ در محیط ایجاد می کنند. اما باکتری های لاکتوز مثبت با تولید اسید از تخمیر لاکتوز محیط را قرمز نموده و نفوذ رنگ به داخل آن ها نیز سبب ایجاد کلنی های قرمز مایل به ارغوانی می شود. وجود نمک های صفراوی از رشد باکتری های گرم مثبت و برخی باکتری های گرم منفی سخت رشد در این محیط جلوگیری می نماید.

- این محیط کشت، یک محیط افتراقی و انتخابی است، به طوریکه فقط باکتریهای گرم منفی روی آن رشد می کنند. همچنین در این محیط کشت میتوان باکتریهای تخمیر کننده لاکتوز را از باکتریهایی که لاکتوز را تخمیر نمی کنند تفریق داد.

محیط کشت Eosin Methylene Blue (EMB)

جداسازی و تشخیص گونه های تخمیرکننده لاکتوز از سایر گونه های غیرتخمیری و نمایش جلای فلزی برخی از گونه های انتروباکتریاسه مانند اشریشیاکلی و سیتروباکتر بر روی این محیط میسر می گردد.

برای تهیه این محیط مقدار معینی از پودر مربوطه را وزن کرده و در یک لیتر آب مقطر حل کرده و آن را حرارت داده تا کاملاً حل و رنگ محیط شفاف گردد سپس آن را اتوکلاو نموده (۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه) و پس از آن که دمای محیط کشت به ۵۵ درجه سانتی گراد رسید در پلیت های استریل تقسیم و پس از کنترل کیفیت (انکوباسیون چند پلیت به طور تصادفی در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت) قابل استفاده می باشند. گروهی از کلی فرم ها از تجزیه لاکتوز استالدئید پایدار ایجاد می کنند که این ترکیب با آزادسازی مواد موجود در محیط (ائوزین y و متیلن بلو) و اکسیداسیون آن ها در مجاورت هوا ایجاد جلای فلزی در سطح کلنی ها می شوند. اشریشیاکلی و سیتروباکتر قادر به ایجاد جلای فلزی می باشند. گروهی دیگر از کلی فرم ها ی لاکتوز مثبت استالدئید ناپایدار ایجاد کرده و تنها کلنی های ایجاد شده توسط این باکتری ها به رنگ قرمز مایل به بنفش بدون جلای فلزی دیده می شود.

محیط کشت سوربیتول مک کانکی آگار

۹۰٪ سویه های اشریشیا کلی قادر به تخمیر سوربیتول هستند و درصد کمی از سویه ها سوربیتول را تخمیر نمی کنند. لذا از این محیط جهت تشخیص سویه های O157:H7 و سویه های NonO157:H7 که سوربیتول را تخمیر نمی کنند استفاده می گردد. برای تهیه این محیط مقدار معینی از پودر مربوطه را وزن کرده و در یک لیتر آب مقطر حل کرده و آنرا حرارت داده تا کاملاً حل گردد و رنگ محیط شفاف گردد، سپس آنرا اتوکلاو نموده(۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه) و پس از آن زمانی که دمای محیط کشت به حدود ۵۵ درجه سانتیگراد رسید در پلیت های استریل توزیع کرده، پس از بررسی کنترل کیفیت و حصول اطمینان از عدم آلودگی(انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت) این پلیت ها قابل استفاده می باشند.

معرف موجود در این محیط نوترال رد است که در PH اسیدی به رنگ قرمز مایل به ارغوانی و در PH خنثی به رنگ صورتی کم رنگ می باشد. قند موجود در این محیط سوربیتول است که باکتری های سوربیتول منفی قادر به تولید اسید از

این قند نبوده و در نتیجه رنگ معرف را تغییر نداده و کلنی هایی بی رنگ در محیط ایجاد می کنند. اما باکتری های سوربیتول مثبت با تولید اسید از تخمیر سوربیتول محیط را قرمز نموده ونفوذ رنگ به داخل آن ها سبب ایجاد کلنی های قرمز مایل به ارغوانی می شود. وجود نمک های صفراوی و کریستال ویوله از رشد باکتری های گرم مثبت و برخی از باکتری های گرم منفی سخت رشد در این محیط جلوگیری می نماید.

محیط کشت CHROMagar:

این محیط فقط برای تشخیص سویه O157:H7 مورد استفاده قرار می گیرد.

برای تهیه این محیط مقدار معینی از پودر مربوطه را وزن کرده و پس از حل کردن در یک لیتر آب مقطر حرارت داده تا کاملاً حل و شفاف گردد، پس از آن زمانی که دمای محیط کشت به حدود ۵۵ درجه سانتیگراد رسید در پلیت های

استریل توزیع می گردند. پس از بررسی کنترل کیفیت و اطمینان از عدم آلودگی(انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت) این پلیت ها قابل استفاده می باشند.

- ❖ این محیط مانند SS آگار نیازی به اتوکلاو ندارد.
- ❖ این محیط **حساس به نور** می باشد بنابراین پلیت ها را در مدتی که برای جامد شدن در محیط آزمایشگاه قرار می دهیم کاملاً می پوشانیم.
- ❖ پلیت حاوی محیط کروما آگار در دمای آزمایشگاه به مدت یک روز و در یخچال در دمای ۸-۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲ هفته قابل نگهداری می باشد، در این مدت زمان نیز محیط را با فویل کاملاً می پوشانیم.

سویه O157:H7 بر روی این محیط کلنی های بنفش رنگ و کلی فرم ها (۴ جنس اشریشیا ، انتروباکتر ، کلبسیلا و سیتروباکتر در زمرهٔ کلی فرم ها می باشند) کلنی های آبی رنگ ایجاد می کنند.

محیط کشت Congo Red

تشخیص سویه های اشریشیاکلی انترواینویسیو در نمونه مدفوع ارسالی به آزمایشگاه مرجع کشوری اشریشیاکلی توسط این محیط کشت صورت می گیرد.

برای تهیه این محیط مقدارمعینی از پودر را وزن کرده و در یک لیتر آب مقطر ریخته و آن را حرارت داده تا کاملاً حل و رنگ محیط شفاف گردد سپس آن را اتوکلاو نموده (۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه) و پس از آن به میزان ۰/۵گرم از رنگ کنگورد در ml ۵۰ محیط TSA و یا به میزان ml ۱ کنگورد را در ml ۱۰۰ محیط TSA اضافه کرده و تکان می دهیم تا به خوبی مخلوط شود ، سپس محیط آماده شده حاوی رنگ را در پلیت های استریل تقسیم کرده و پس از کنترل کیفیت (انکوباسیون چند پلیت به طور تصادفی در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت) و بررسی عدم آلودگی قابل استفاده می باشند .

در صورت حضور سویه EIEC در نمونه مدفوع کلنی های آجری رنگ با مرکز آجری تیره در محیط کشت کنگورد رشد خواهند کرد.

محیط کشت Tryptic Soy Broth (TSB)

از این محیط جهت غنی سازی رشد باکتریها استفاده می گردد.

برای تهیه این محیط مقدار معینی از پودر مربوطه را وزن کرده و در یک لیتر آب مقطر حل کرده و آنرا حرارت داده تا کاملاً حل گردد و رنگ محیط شفاف گردد، سپس محیط را در لوله های با درب پنبه ای توزیع کرده، آنها را اتوکلاو(۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه) می نماییم. پس از بررسی کنترل کیفیت و اطمینان از عدم آلودگی(انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت) قابل استفاده می باشند. رشد باکتری باعث کدر شدن محیط کشت می شود.

محیط کشت Triple Sugar Iron Agar (TSI)

این محیط برای بررسی تولید گاز، H_2S و تولید اسید از تخمیر قندهای گلوکز و لاکتوز که در تشخیص افتراقی گونه های انتروباکتریاسه کمک کننده می باشد، به کار می رود.

برای تهیه این محیط مقدار معینی از پودر مربوطه را وزن کرده و پس از حل کردن در یک لیتر آب مقطر حرارت داده تا کاملاً حل و رنگ محیط شفاف گردد، سپس محیط را در لوله های با درب پنبه ای تقسیم و اتوکلاو می نماییم(۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه) پس از اتوکلاو محیط ها را با کمی ارتفاع به صورت مایل خوابانیده به طوریکه حداقل ۳ سانتیمتر ته لوله کاملاً از محیط پر باشد و مابقی محیط شیب مناسبی را ایجاد نماید.

پس از جامد شدن محیط، کنترل کیفی و حصول اطمینان از عدم آلودگی(انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت) قابل استفاده می باشند.

بررسی تخمیر قند: این محیط حاوی ۳ قند گلوکز، لاکتوز و سوکروز و همچنین دارای سولفات آهن می باشد..

از آنجایی که گلوکز سهل الهضم ترین قند برای باکتری هاست، لذا ابتدا گلوکز تخمیر می شود که از تجزیه آن اسید تولید می شود. گلوکز موجود در محیط TSI تا حدود ۶ ساعت پس از کشت به طور کامل مصرف می گردد.

در این حالت در اکثر محیط ها سطح و عمق محیط به رنگ زرد دیده می شود. زیرا معرف فنل رد در PH اسیدی به رنگ زرد درمی آید) از طرفی میزان گلوکز در این محیط ۰/۱ درصد میزان دو قند دیگر است. اگر باکتری پس از تجزیه

گلوکز، هر یک از ۲ قند لاکتوز، ساکارز و یا هر دوی آن ها را تخمیر نماید به دلیل زیاد بودن اسید تولید شده سطح و عمق محیط تا ۲۴ ساعت یا بیشتر زرد رنگ می ماند. (A/A یا زرد/زرد) اگر باکتری فقط قادر به استفاده از گلوکز بوده و

قادر به تجزیه دو قند دیگر نباشد به دلیل کم بودن میزان اسید تولید شده این اسید به تدریج در مجاورت هوا از بین رفته و پس از ۲۴ ساعت سطح محیط قرمز شده ولی عمق آن زرد می ماند(Alk/A یا زرد/قرمز).

بررسی تولید H_2S: در محیط TSI تیوسولفات سدیم و سیترات فریک نیز وجود دارد که باکتری های مولد H_2S با استفاده از این ترکیبات H_2S تولید کرده و محیط به رنگ سیاه در می آید.

بررسی تولید گاز: برخی از باکتری ها گلوکز را تا سرحد H_2O و CO_2 تجزیه می نمایند که گاز CO_2 سبب ایجاد شکاف، حباب می شود و محیط کشت به سمت بالای لوله حرکت می کند.

محیط کشت Simmons Citrate

برخی از باکتریها می توانند انرژی را از مسیری غیر از تخمیر کربوهیدرات،بوسیله مصرف سیترات به عنوان یگانه منبع کربن فراهم کنند. تعیین این خصوصیت توسط این محیط انجام می گیرد.

برای تهیه این محیط مقدار معینی از پودر مربوطه را وزن کرده و در یک لیتر آب مقطر مخلوط کرده و آنرا حرارت داده تا کاملاً حل و رنگ محیط شفاف شود، سپس محیط را در لوله های با درب پنبه ای تقسیم کرده، آنها را اتوکلاو می نماییم. پس از اتوکلاو(۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه) محیط ها را با کمی ارتفاع به صورت مایل خوابانیده به طوریکه شیب مناسبی را ایجاد نماید. پس از جامد شدن محیط، کنترل کیفیت و بررسی عدم آلودگی(انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت) قابل استفاده می باشند.

آبی شدن رنگ محیط پس از ۴۸-۲۴ ساعت نشانه قلیایی شدن محیط در نتیجه مصرف سیترات و مثبت بودن نتیجه آزمایش است. گاهی رشد قابل رویتی از باکتری در طول خطوط کشت مشاهده می شود (بدون آنکه محیط تغییر رنگ یابد) این حالت نشانه مثبت بودن آزمایش است، تفسیر نتایج مثبت را می توان از رشد باکتری بر روی خطوط کشت با یک انکوباسیون ۲۴ ساعته اضافی و ظهور رنگ آبی تایید نمود. از این محیط جهت بررسی توانایی ارگانیزم در استفاده از سیترات به عنوان منبع کربن به کار می رود.

محیط کشت MRVP

برای تشخیص باکتری هایی که از گلوکز مقدار زیادی اسید تولید می کنند از این محیط و معرف های متیل رد و VP استفاده می گردد. برای تهیه این محیط مقدار معینی از پودر مربوطه را وزن کرده و در یک لیتر آب مقطر حل کرده و آنرا حرارت داده تا کاملاً حل و رنگ محیط شفاف گردد، سپس محیط را در لوله های با درب پنبه ای توزیع کرده، آنها را اتوکلاو(۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه) می نماییم. پس از کنترل کیفی و بررسی عدم آلودگی(انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت) قابل استفاده می باشند.

در آزمایش متیل رد (MR) ظهور رنگ قرمز پایدار در سطح محیط نشانه تولید اسید است که توانسته PH را کمتر از ۴/۴ نگهدارد از اینرو آزمایش مثبت تفسیر می شود. برخی از باکتریها از گلوکز مقدار کمی اسید تولید می کنند بنابراین رنگی بین قرمز و زرد یعنی نارنجی تولید می کنند این ارگانیسم ها متیل رد منفی می باشند.و در آزمایش

VP ظهور رنگ قرمز ۱۵ دقیقه بعد از افزودن معرف ها نشانه واکنش مثبت است زیرا حضور دی استیل نشانه اکسیداسیون استوئین می باشد .

محیط کشت SIM

از این محیط جهت بررسی احیاء سولفور، تولید ایندول و حرکت باکتری استفاده می گردد.

برای تهیه این محیط مقدار معینی از پودر مربوطه را وزن کرده و در یک لیتر آب مقطر ریخته و آنرا حرارت داده تا کاملاً حل و رنگ محیط شفاف گردد، سپس محیط را در لوله های با درب پنبه ای توزیع کرده، آنها را اتوکلاو(۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه) می نماییم. پس از جامد شدن، کنترل کیفیت و بررسی عدم آلودگی(انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت) قابل استفاده می باشند.

ظهور رنگ قرمز چند ثانیه بعد از اضافه کردن معرف کواکس نشانه حضور ایندول و مثبت بودن تست است. قبل از ریختن معرف ابتدا حرکت باکتری مورد بررسی قرار می گیرد .

محیط کشت Muller Hinton Agar

این محیط در بررسی تست حساسیت به آنتی بیوتیک گونه های مختلف باکتریایی مورد استفاده قرار می گیرد.

برای تهیه این محیط مقدار معینی از پودر مربوطه را وزن کرده و در یک لیتر آب مقطر حل ریخته و آن را حرارت داده تا کاملاً حل و رنگ محیط شفاف گردد سپس آن را اتوکلاو نموده (۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه) و پس از آن زمانی که دمای محیط کشت به حدود ۵۵ درجه سانتی گراد رسید در پلیت ها ی استریل تقسیم می گردد.

۴-۴) دستور العمل انجام تست های افتراقی

الف)تست متیل رد (Methyl Red)

- طرز تهیه محلول رنگی

- Methyl Red 0.1 gr
- Ethanol 300 ml
- DDW 200 ml

- روش انجام تست:

۵ قطره از محلول رنگی به ۵ میلی لیتر محیط کشت حاوی باکتری افزوده می گردد.

ایجاد رنگ قرمز نشان دهنده پاسخ مثبت و ایجاد رنگ زرد نشاندهنده پاسخ منفی است.

ب)تست VP

- طرز تهیه محلول KOH ۴۰٪

- KOH 40 gr
- DDW 100 ml

- طرز تهیه محلول آلفا نفتول

- Alpha-Naphtole 5gr
- Absolute Ethanol 100 ml

❖ در صورت نگهداری در یخچال، این دو محلول تا مدت ۳ -۲ هفته پایدار می باشند.

- روش انجام تست:

۱- ۱ میلی لیتر از محیط کشتMR-VP حاوی باکتری در یک لوله تمیز می ریزیم.

۲- ۰/۶ میلی لیتر از محلول آلفا نفتول ۵ در صد به آن اضافه کرده و خوب مخلوط می کنیم.

۳- ۰/۲ میلی لیتر از محلول پتاسیم هیدروکسید ۴۰ در صد به آن اضافه کرده و خوب مخلوط می نمائیم.

۴- اجازه می دهیم مخلوط بدست آمده ۱۰ الی ۲۰ دقیقه در محیط آزمایشگاه بماند.

۵-ایجاد یک حلقه قرمز رنگ در بالای محلول نشاندهنده تست مثبت و عدم ایجاد حلقه قرمز به منزله تست منفی می باشد.

ج)تست اندول

- طرز تهیه محلول کواکس

- Pure isoamyl alcohol 150 ml
- Para-dimethyl amino benzaldehyde 10 gr
- Concentrated pure hydrochloric acid 50 ml

❖ محلول کواکس میبایستی در حجم کم تهیه گردد و در یخچال نگهداری شود.

- روش انجام تست:

۱-۲ تا ۳ قطره از محلول کواکس به محیط Motility test medium اضافه می کنیم.

۲-ایجاد رنگ بنفش بر روی سطح محیط نشان دهنده تست مثبت و ایجاد رنگ زرد نشان دهنده تست منفی می باشد.

فصل پنجم

راهنمای مقدماتی دریافت و ارسال نمونه های مدفوع به آزمایشگاه مرجع کشوری اشریشیا کلی جهت تشخیص پاتوتایپ های اشریشیاکلی

۱-۵) راهنمای جمع آوری نمونه جهت بیماران از کل کشور و شرایط انتقال آن به آزمایشگاه مرجع کشوری اشریشیاکلی

نمونه های ارسالی به آزمایشگاه مرجع کشوری اشریشیا کلی باید شرایط زیر را دارا باشند:

- میبایستی نمونه به همراه پرسشنامه کامل و امضاء شده توسط نمونه گیر باشد.
- میبایستی تمام نمونه ها دارای بر چسب حاوی نام و مشخصات بیمار، زمان و تاریخ نمونه گیری و قرارگیری نمونه در محیط انتقالی باشد.
- میبایستی برای نمونه گیری از رکتوم ازسواپ استریل استفاده گردد.
- میبایستی که سواپ ها در محیط ترانسپورت حمل و قسمتی که با دست در تماس بوده بریده گردد بطوریکه درب لوله کاملا بسته شود.
- میبایستی که سواپ حاوی مدفوع به طور کامل در محیط ترانسپورت قرار گرفته باشد.
- میبایستی که سواپ رکتال در محیط ترانسپورت حاوی مدفوع باشد بطوریکه نمونه مدفوع در محیط ترانسپورت قابل رویت باشد
- میبایستی که اگر نمونه های ارسالی به آزمایشگاه مرجع کشوری اشریشیا کلی مدفوع کامل باشد در ظرف مخصوص و تحت شرایط استریل در همان روز ، جهت ارزیابی سریع به آزمایشگاه فرستاده شود.
- میبایستی که از نمونه مدفوع کامل سواپ تهیه گردد.(در مواقعی که ارسال نمونه مدفوع کامل امکان پذیر نمی باشد) .
- میبایستی که در صورتی که امکان ارسال سریع وجود نداشته باشد نمونه های مدفوع را در محیط ترانسپورت قرارداده و سپس حداکثر ظرف مدت ۷۲ ساعت بعد از نمونه گیری که در ۴ درجه نگهداری شده به آزمایشگاه مرجع کشوری اشریشیا کلی فرستاده شوند.
- میبایستی که نمونه ها هنگام ارسال بر روی یخ حمل شوند.

۵-۲) نحوه دریافت نمونه های ارسالی در آزمایشگاه مرجع کشوری اشریشیاکلی

*مواردی که از نمونه مدفوع بیمار، پاتوژن دیگری جدا نشده است و تشخیص انواع اشریشیاکلی بیماری زا ضروری می باشد، نمونه ها به آزمایشگاه مرجع کشوری اشریشیاکلی ارجاع می شود.

* تمام نمونه ها یی که در آزمایشگاه های مراکز بهداشتی- درمانی تشخیص اولیه داده شده اند باید به همراه پرسشنامه پیوست (۱) و معرفی نامه از معاونت بهداشتی جهت تشخیص و تأ یید نهایی به آزمایشگاه مرجع کشوری اشریشیاکلی ارسال گردد.

*نمونه هایی که شرایط مندرج در بند ۳-۵ را نداشته باشند پذیرفته نخواهند شد.

۵-۳)شرایط عدم پذیرش نمونه در آزمایشگاه مرجع کشوری اشریشیاکلی

- نمونه هایی که فاقد برچسب می باشند.
- نمونه هایی که فاقد پرسشنامه کامل و امضا شده توسط مسئول نمونه گیری باشد.
- نمونه هایی که از زمان نمونه گیری و قرار دادن آن در محیط ترانسپورت بیش از ۷۲ ساعت گذشته باشد.
- نمونه های کامل مدفوع که در محیط ترانسپورت حمل نمی شوند و بیش از ۲۴ ساعت از زمان نمونه گیری گذشته باشد.
- نمونه هایی که درب لوله آنها بسته نباشد.
- نمونه هایی که لوله حاوی محیط کشت و سواپ آن شکسته باشد.
- نمونه هایی که برای ارسال به آزمایشگاه مرجع کشوری اشریشیا کلی زنجیره سرد در آنها رعایت نشده باشد.
- نمونه هایی که بیش از ۲۴ ساعت از شروع علائم اسهال در بیمار گرفته شده باشد.
- نمونه هایی که بیمار قبل از نمونه گیری در معرض درمان با آنتی بیوتیک قرار گرفته باشد.

۵-۴) وسایل ومواد لازم جهت تهیه نمونه و ارسال به آزمایشگاه مرجع کشوری اشریشیاکلی

- سواپ استریل
- محیط ترانسپورت Cary Blair(طرز تهیه محیط ضمیمه)

- ترموس با یخ جهت حمل نمونه ها
- یخچال جهت نگهداری نمونه برای ارسال به آزمایشگاه مرجع کشوری اشریشیا کلی
- پرسشنامه تکمیل شده و همراه با نمونه ارسال می گردد کد روی پرسشنامه و محیط حاوی سواپ باید یکسان باشد(طبق نمونه)

۵-۵) دستورالعمل حمل و ارسال نمونه های مدفوع به آزمایشگاه مرجع کشوری اشریشیاکلی

برای ارسال مواد آلوده و یا احتمالاً آلوده قوانین ملی و بین المللی بسیار دقیقی وجود دارد. این قوانین چگونگی بسته بندی و همچنین مواد لازم برای ارسال را توضیح میدهد. کارکنان آزمایشگاه باید طبق دستورالعمل مشخصی نمونه های آلوده را ارسال نمایند. به کارگیری این قوانین میتواند آسیب دیدن بسته را که ممکن است عامل نشت و در نتیجه آلودگی محیط و یا فردی که نمونه ها را جابجا می کند گردد را کاهش دهد و در نهایت باعث بهبود کارایی تحویل نمونه گردد.

الف) مشخصات ظرف حاوی نمونه

۱ – نمونه ارسالی باید در یک بسته سه لایه قرار گیرد.(طبق نمونه)

۲ – در لوله میبایستی غیر قابل نفوذ و بدون نشت باشد.

۳ – لوله بایستی دارای برچسب حاوی اطلاعات نمونه مربوطه باشد.

۴ – در کنار لوله بایستی لفافی که جاذب رطوبت می باشد قرار گیرد.

۵ – لوله به همراه لفاف میبایستی در لوله درپیچ دار گذاشته شود.

۶ – برچسب جعبه خارجی باید حاوی نام فرستنده ، نام گیرنده و نوع نمونه باشد.

۷ – اطلاعات مربوط به نوع نمونه ارسالی ، فرمهای مربوطه ، نامه درخواست و هر مطلب مرتبط با نمونه میبایستی همراه با نمونه ، ارسال گردد.

۸- نمونه ها باید زنجیره سرد را رعایت کنند و بر روی یخ حمل شوند.

ب) دستورالعمل ضدعفونی کردن در صورت شکستن و یا نشت نمونه های آلوده

۱ – افراد میبایستی از دستکش ، ماسک و لباس مناسب (روپوش) هنگام تحویل و کار بر روی نمونه برای محافظت از آلودگی استفاده نمایند.

۲ – در صورت هر نوع نشت یا شکستگی لوله حاوی نمونه محل آلودگی میبایستی با حوله کاغذی و یا پارچه پوشانیده شود تا از انتشار آلودگی جلوگیری شود.

۳ – روی حوله و یا پارچه و محل مجاور آن میبایستی محلول ضدعفونی کننده (محلول ۵ ٪ وایتکس) ریخته شود.

۴ – در صورت نشت و ریختن نمونه بر روی زمین یا محیط کار آزمایشگاه محلول ضدعفونی میبایستی به صورت دایره ای و از خارج به طرف مرکز آلودگی ریخته شود. مواد آلوده میبایستی بعد از ۳۰ دقیقه جمع آوری و محل تمیز گردد.

منابع:

1. **Donnenberg, M. S.** 1995. Enteropathogenic *Escherichia coli*, p. 709–726. *In* M. J. Blaser, P. D. Smith, J. I. Ravdin, H. B. Greenberg, and R. L. Guerrant (ed.), Infections of the gastrointestinal tract. Raven Press, New York, N.Y.

2. **Johnson, R. P., R. C. Clarke, J. B. Wilson, S. C. Read, K. Rahn, S. A. Renwick, K. A. Sandhu, D. Alves, M. A. Karmali, H. Lior, S. A. McEwen, J. S. Spika, and C. L. Gyles.** 1996. Growing concerns and recent outbreaks involving non-O157:H7 serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli*. J. Food Prot. **59:**1112–1122.

3. **Savarino, S. J., P. Fox, D. Yikang, and J. P. Nataro.** 1994. Identification and characterization of a gene cluster mediating enteroaggregative *Escherichia coli* aggregative adherence fimbria I biogenesis. J. Bacteriol. **176:**4949–4957.

4. **Parsot, C., and P. J. Sansonetti.** 1996. Invasion and the pathogenesis of *Shigella* infections. Curr. Top. Microbiol. **209:**25–42.

5. **Henry D.Isenberg** volume 1 . 1993 washington , Dc

Clinical Microbiology procedures Handbook

6. Patrick R.murray; Ellen Jo Barron ,…[et al.]-8th.2003. *Manual of clinical microbiology*.(Volume1)

7. Ronald M.Atlas, Edited by Lawrence C.parks.1993 by CRC press, Inc.*Hand book of Microbiological Media.*

۸. میکروبیولوژی پزشکی جاوتز-ترجمه: دکتر مهدی خزعلی- مریم جنابی نمین. ویرایش بیست و چهارم /۲۰۰۷.

۹. راهنمای کشوری نظام مراقبت بیماری های منتقله از غذا – پیوست ۴(دکتر حسین معصومی اصل، دکتر محمود سروش، دکتر سید محسن زهرایی و ... تحت نظر دکتر سید موید علویان، دکتر محمد مهدی گویا)

پیوست (۱)

	آزمایشگاه مرجع کشوری اشریشیاکلی(آمکا)	کد:P1 -آمکا
		صفحه50 از 50

پرسشنامه

شماره: تاریخ:

مشخصات

نام بیمار: سن:□ جنس: مذکر□ مونث□

آدرس بیمار:

شماره تماس بیمار: نام بیمارستان:

نام پزشک معالج: سرپائی□ بستری□ مدت زمان بستری بودن:

علائم کلینیکی

تهوع□ تب□ شکم درد□ درد مفاصل□ علائم دیگرنام ببرید:

نوع مدفوع

آبکی □ همراه با خون□ تاریخ بروز اسهال□ تاریخ نمونه گیری بعد از شروع اسهال:

علت بیماری

مصرف مواد غذائی□ مسافرت□ علل دیگر:

نحوه ابتلاء

در پنج روز قبل از شروع بیماری:

آیا در رستوران غذا خورده اید؟ بلی□ خیر□

آیا میوه یا سبزیجات نشسته مصرف کرده اید؟ بلی□ خیر□

آیا گوشت گاو، گوساله، گوسفند، مرغ مصرف کرده اید؟ بلی□ خیر□

آیا شیر وابمیوه مصرف کرده اید؟ بلی□ خیر□

آیا درتماس با حیوانات بوده اید؟ بلی□ خیر□

درطی پنج روزقبل از شروع بیماری با افرادی که علائم کلینکی مشابه داشتند تماس داشته اید؟

بلی□ خیر□

درمان

قبل از مراجعه به پزشک دارو مصرف کرده اید: بلی□ خیر□

در صورت بلی، نوع دارو واسم آن:

پیوست (۲)

کد:P2 -آمکا	**آزمایشگاه مرجع کشوری اشریشیاکلی(آمکا)**	
صفحه51 از 51		

فرم گزارش نتایج

کشت اولیه مدفوع بر روی محیط های استاندارد

- کشت سالمونلا مثبت □ منفی□

- کشت شیگلا مثبت □ منفی□

جهت شناسایی پاتوتایپ های اشریشیاکلی درغیاب سالمونلا وشیگلا

۱- نتیجه کشت بر روی محیط مکانکی

کلنی صورتی □ کلنی بی رنگ □ کلنی مخلوط □

۲- نتیجه کشت بر روی محیط سوربیتول مکانکی

کلنی صورتی □ کلنی بی رنگ □ کلنی مخلوط □

۳- نتیجه کشت بر روی محیط EMB

کلنی هایی با جلای فلزی □ کلنی هایی بدون جلای فلزی □

۴- نتیجه کشت بر روی محیط TSI

□ K/A □ A/A

۵- نتیجه کشت بر روی محیط IMViC

Motility	Citrate	VP	MR	Indol
□	□	□	□	□

پیوست (۳)

آزمایشگاه مرجع سلامت	**کنترل کیفیت محیط ها ی کشت**	کد: M-01/00 صفحه1 از 70

مقدمه

محیط های کشت نقش اساسی را در آزمایشگا ه میکروب شناسی ایفا می کنند و بطور گسترده ای جهت جداسازی، تعیین هویت و آنتی بیوگرام میکروارگانیسم های بیماریزا بکار میروند. بسیاری از آزمایشگاهها بطور روتین محیط های کشت مورد نیاز برای مصارف تشخیصی وتحقیقاتی را خودشان تهیه می نمایند. با این همه جهت اطمینان از اینکه محیط های کشت، کیفیت خوب و نتایج مطلوبی داشته باشند بایستی روشهای کنترل کیفی مناسبی بکار گرفته شود. برای رسیدن به این هدف بایستی در تهیه و مصرف محیط های کشت معیارهای زیر را در نظر گرفت.

مواد خام

کیفیت محیط ها بطور مستقیم بستگی به کیفیت مواد خام مورد استفاده در تهیه آنها دارد. آب یکی از مهمترین مواردی است که در تهیه محیط های کشت بکار میرود. سه معیار مهم آب مورد استفاده در تهیه محیط ها ی کشت شامل وجود یونهای مس، قدرت هدایت الکتریکی و pH می باشد. در شرایط ایده آل نباید یونهای مس در آب مورد استفاده جهت تهیه محیط های کشت وجود داشته باشد چون خاصیت مهار کنندگی برای میکرو ارگانیسم ها را دارد. قدرت هدایت الکتریکی آن باید کمتر از ۱۵میکروزیمنس باشد. pH آب مورد استفاده بهتر است کمی اسیدی باشد ولی در هر حال نباید کمتر از ۵/۵ باشد.

پتری دیش

کیفیت پتری دیش های مورد استفاده در تهیه محیط نیز اهمیت دارد. معمولا پتری دیش ها را با اتیلن اکساید و یا اشعه گاما استریل می کنند. درصورت استفاده از پتری دیش هائی که با اتیلن اکساید استریل شده باشند بایستی به روش کروماتوگرافی وجود یا عدم وجود بقایای این ماده بررسی شود. اتیلن اکساید دارای خاصیت مهار کنندگی برا ی میکروارگانیسم ها میباشد. در صورت استفاده از پتری دیش های شیشه ای بایستی از پتری دیش هایی از جنس بوروسیلیکات استفاده کرد. استفاده از پتری دیش هایی از جنس قلیائی ممکن است موجب آزاد سازی قلیا در داخل محیط کشت گردد.

استریل کردن محیط های کشت

استریل کردن، یک مرحله اساسی در تهیه محیط های کشت است. معمولا برای استریل کردن محیط های کشت از اتوکلاو استفاده می کنند. با این همه ارتباط نزدیکی بین مدت زمان لازم جهت استریل کردن و حجم محیط وجود دارد. حرارت بیش از حد ممکن است منجر به تخریب محیط های کشت گردد. بنابراین تنظیم دما و مدت زمان آن اهمیت ویژه ای دارد. در شرایط معمولی دمای 121 درجه سانتیگراد به مدت 15 دقیقه برای استریل کردن یک لیتر محیط کشت کافی است.

در صورتیکه حجم محیط کشت بیش از یک لیتر باشد ممکن است مدت زمان بیشتری لازم باشد. کنترل کیفی اتوکلاو، کنترل دما و فشار اتوکلاو بایستی بطور مداوم انجام گردد. برای کنترل اتوکلاو از اندیکاتورهای شیمیائی استفاده می کنند. از اند یکاتورهای بیولوژیکی که جهت کنترل کارآرائی اتوکلاو استفاده می‌کنند اسپور *Bacillus stearothermophilus* را می توان نام برد که بصورت تجارتی قابل دسترس می‌باشد.

پارامتر های فیزیکی

محیط کشت های تهیه شده باید از لحا ظ فیزیکی و ظاهری بررسی شوند. معیارهای ظاهری قابل بررسی شامل وجود حباب، حفره، ناصافی سطح محیط، ترک خوردگی، یخ زدگی می باشد. ضخامت محیط نیز اهمیت دارد. ضخامت محیط کشت های پلیتی۴میلی متر است. pH نیز از مهمترین معیارهای فیزیکی میباشد که باید قبل ازاتوکلاو کردن و پس از آن با pH متر کالیبره شده اندازه گیری گردد.

نگهداری محیط های کشت تهیه شده:

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

جدول شماره۱ علل اشکالات رایج در محیط های کشت

اشکال	علت
نرم بودن آگار	حرارت بیش از حد، pH پائین که موجب هیدرولیز آگار می گردد. توزین غلط، مخلوط نکردن خوب و عدم حل شدن
pH نامناسب	استفاده از شیشه های قلیائی، آب ناخالص، حرارت بیش از حد، آلودگی شیمیائی، اندازه گیری pH در حرارت نامناسب، استفاده از pH متر استاندارد نشده و استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده
رنگ نامناسب	ناخالص بودن آب، استفاده از شیشه آلات کثیف، استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده، حرارت دادن بیش از حد و pH نامناسب
تیره شدن شدن محیط	حرارت دادن بیش از حد، استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده
سمیت	حرارت دادن بیش از حد (سوزاندن محیط)، استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده
رشد ضعیف ارگانیسم	استفاده از آب و یا شیشه آلات آلوده، استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده، توزین غلط وعدم بهم زدن کافی محیط و حرارت بیش از حد.
داشتن خاصیت ضعیف انتخابی و یا افتراقی	استفاده از آب ویا شیشه آلات آلوده، استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده،توزین غلط وعدم بهم زدن کافی محیط و حرارت بیش از حد.

کنترل کیفی محیط های کشت

برای کنترل کیفی محیط های کشت از سویه های کنترل کیفی استفاده می کنند. سویه های کنترل کیفی از منابع مختلف مانند American Type Culture Collection (ATCC) قابل تهیه می باشند.

روش انجام آزمون کنترل کیفیت میکروبیولوژیکی محیط های کشت

یک کشت از ارگانیسم کنترل را روی پلیت تهیه کنید. بعد از انکوباسیون ۵-۳ کلنی ایزوله را در مقدار کمی TSB و BHI استریل سوسپانسیون کرده وآن را برای چهار یا پنج ساعت انکوبه نمائید. کدورت را با استاندارد نیم مک فارلند تنظیم کنید (استاندارد نیم مک فارلند در طول موج ۶۲۵nm وجذب ۰/۰۸ تا۰/۱۳ می باشد). به این روش می توان یک سوسپانسیون در سرم فیزیولوژی از کلنی های ۲۴ ساعته تهیه و کدورت آن را مطابق روش فوق تنظیم نمود.

برای آزمایش ظرفیت مغذی بودن (Nutritional activity) یک محیط کشت پلیتی، سوسپانسیون اولیه را به نسبت ۱ به ۱۰۰ در نرمال سالین رقیق نموده و به هرپلیت ۱۰میکرولیتر از سوسپانسیون رقیق شده را تلقیح می نمائیم. تعداد کلنی های مورد انتظار در هر پلیت $۱۰^{۴}\times۲$-۱ عدد می باشد. اگر برای محیط های خاصی کلنی های ایزوله بدست نیاید سوسپانسیون باید ده بار رقیق تر تهیه شود.

برای آزمایش ظرفیت مهارکنندگی (Inhibitory activity) محیط های کشت انتخابی، سوسپانسیون اولیه را به نسب۱ به ۱۰ درنرمال سالین یا آب تخلیص شده رقیق نموده و در هر پلیت ۱۰میکرولیتر یا۰/۱. میلی لیتر سوسپانسیون رقیق شده تلقیح می کنیم. تعداد کلنی های مورد انتظار در هر پلیت $۱۰^{۵}\times$ ۲-۱ می باشد. جهت اجتناب از رشد زیاد باکتری در بعضی از محیط های کشت انتخابی ممکن است نیاز باشد که سوسپانسیون ده بار رقیق تر شود. برای آزمایش محیط های کشت لوله ای، هر لوله باید با ۱۰میکرولیتر یا ۰/۱. میلی لیتر از سوسپانسیون اولیه مطابق با نیم مک فارلند تلقیح شود. گاهی ممکن است به تلقیح کمتر یا بیشتر نیاز باشد.

محیط کشت مورد کنترل کیفی را بعد از تلقیح تحت شرایطی که در جدول ۲-۴ آمده است انکوبه نما ئید. به طور نرمال مدت زمان انکوباسیون ۲۴- ۱۸ ساعت یا ۴۸-۲۴ ساعت در ۲ ± ۳۵ درجه سانتی گراد می باشد. شکلات آگار و محیط های کشت برای جداسازی انتخابی گونه های نیسریای بیماریزا باید در ۱۰-۵٪ Co_2 انکوبه شوند و در ۲۴-۱۸ ساعت و ۴۸-۲۴ ساعت بررسی شوند. برای بی هوازی ها، کشتها عموما به حداقل ۴۸ ساعت انکوباسیون در شرایط بی هوازی وغنی از Co_2 نیاز دارند. برای کمپیلوباکترآگار، پلیتها باید در۴۲ درجه سانتی گراد در شرایط میکروآئروفیلیک غنی از Co_2 به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شوند.

تفسیر نتایج

یک محیط کشت زمانی قابل قبول می باشد که با همه سویه های آزمون پیشنهادی برای محیط کشت در جدول ۲-۴، رشد کافی داشته و خصوصیات رشد و مورفولوژی کلنی ها بارز باشد. در محیط های انتخابی، رشد بعضی از ارگانیسمهای خاص مهار می شود، در ضمن اینکه اجازه رشد کافی به ارگانیسم های دیگر می دهد. در بعضی موارد واکنشهای رنگی خاص یا همولیز همچنانکه در جدول ۲ آمده است باید ایجاد شود.

جدول شماره ۲ کنترل کیفی محیط های کشت باکتریولوژیک متداول

		شیگلا فلکسنری ۱۲۰۲۲	رشد و کلنی های سبزتا سبز متمایل به آبی با مراکز سیاه رنگ
		انتروکوکوس فکالیس۲۹۲۱۲	مهار نسبی رشد، کلنی های زرد
		اشریشیا کولی ۲۵۹۲۲	مهاررشدکامل ویا نسبی، در صورت رشد کلنی به رنگ زرد تا صورتی مایل به نارنجی
مکانکی آگار	هوازی ۲۴- ۱۸ ساعت دمای ۳۵°c	اشریشیا کولی ۲۵۹۲۲	رشد، کلنی های صورتی
		پروتئوس میرابیلیس ۱۲۴۵۳	رشد، کلنی های بیرنگ ، ممانعت از سوارمینگ (تا اندازه ای)
		سالمونلا تایفی موریوم ۱۴۰۲۸	رشد، کلنی های بیرنگ
		انتروکوکوس فکالیس۲۹۲۱۲	مهار رشد نسبی
مانیتول سالت آگار	هوازی ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت، دمای ۳۵°c	استافیلوکوکوس اورئوس ۲۵۹۲۳	رشدکلنی های با هاله زرد پس از ۴۸ ساعت
		استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس ۱۲۲۲۸	رشد کلنی های با هاله قرمز رنگ پس از ۴۸ساعت
		پروتئوس میرابیلیس ۱۲۴۵۳	عدم رشد (نسبی)

سالمونلا شیگلا آگار	هوازی ۲۴ ساعت دمای ۳۵°c	سالمونلا تایفی موریوم ۱۴۰۲۸	رشد،کلنی های بیرنگ با ویا بدون رنگ سیاه در مرکز
		شیگلا فلکسنری۱۲۰۲۲	رشد، ،کلنی های بیرنگ
		انتروکوک فکالیس۲۹۲۱۲	مهار رشد(کامل)
		اشریشیا کولی۲۵۹۲۲	مهار رشد (کامل ویا نسبی ، در صورت رشد کلنی های صورتی تا قرمز گل سرخی همراه با رسوب)
تیو گلیکولات با و یا بدون معرف	هوازی ۴۸ ساعت (درپوش محکم شده) دمای ۳۵°c	باکتروئیدوس فراژیلیس۲۵۲۸۵	رشد
محیط کشت های لوله ای مانند BHI ,TSB	هوازی۲۴-۴۸ ساعت دمای ۳۵°c	اشریشیا کولی ۲۵۹۲۲	رشد
		استافیلوکوکوس اورئوس ۲۵۹۲۳	رشد
زایلوز لیزین دکربوکسیلاز XLD	هوازی ۲۴ ساعت دمای ۳۵°c	سالمونلا تایفی موریوم ۱۴۰۲۸	رشد- کلنی های قرمز-مرکز سیاه
		شیگلا فلکسنری۱۲۰۲۲	رشد-کلنی های قرمز
		انتروکوک فکالیس ۲۹۲۱۲	مهار رشد (نسبی)
		اشریشیا کولی ۲۵۹۲۲	مهار رشد (نسبی تا کامل- کلنی های زرد تا قرمز متمایل به زرد)

References:
1- National Committee for Clinical Laboratory Standards: Quality assurance for commercially prepared microbiology culture media ed2 Approved standards; M22-A22) Wayne, Pa 1996 NCCLS
2- Mahon CR. Manuselis. Text book of Diagnostic Microbiology Ed. 2 –W. B Saunders Company .2000

پیوست (۴)

آزمایشگاه مرجع سلامت	**راهنمای ایمنی جهت انتقال نمونه های عفونی**	کد: M-11/00 صفحه 1 از 9

انتقال نمونه های آلوده یا نمونه هایی که احتمال آلودگی آنها وجود دارد از یک آزمایشگاه به آزمایشگاه دیگر، از بخش های مختلف بیمارستان به آزمایشگاه بیمارستان یا آزمایشگاه خارج از بیمارستان و نیز از مطب پزشکان به آزمایشگاه، باید تحت شرایط استاندارد صورت گیرد. این روند باید با استفاده از ظروف مناسب ، بسته بندی به روش استاندارد با درج علائم وبرچسب های لازم روی بسته ، رعایت اصول ایمنی جهت انتقال نمونه، و درنظرداشتن شرایط مناسب طی انتقال نمونه به نحوی که کیفیت و تمامیت نمونه حفظ شود ، صورت پذیرد.

حمل ونقل نمونه ها می تواند از راه هوا، دریا ، جاده و راه آهن طبق قوانین موجود در هر کشور ودستورالعمل مربوطه، با رعایت شرایط صحیح بسته بندی و انتقال انجام شود.

برای انتقال نمونه های عفونی از طرق مختلف، سازمان ملل متحد (United Nations) قوانین مشخصی تبیین نموده است.همچنین انجمن حمل ونقل هوایی بین المللی (International Air Transport Association,IATA) در مورد چگونگی حمل ونقل مواد عفونی قوانین سخت گیرانه ای تدوین نموده که در بیشتر کشورها مورد استفاده قرار می گیرد.

سازمان جهانی بهداشت نیز کتابی تحت عنوان مقررات انتقال نمونه های عفونی منتشر نموده است.

راهنمای ذیل خلاصه ای از مراجع فوق و ویرایش پانزدهم قوانین سازمان ملل متحد بوده و در مورد شرایط استاندارد نقل وانتقال نمونه های عفونی یا بالقوه عفونی بحث می کند.طبق قوانین International Airline Transport Association= IATA اصولا مواد خطرناک به ۹ گروه تقسیم می شوند. این ۹ گروه بیشتر شامل مواد شیمیایی خطرناک می شوند، در این تقسیم بندی مواد عفونی درگروه ۶ قرار می گیرند. این گروه، مواد عفونی شناخته شده ویا موادی که ممکن است عفونی باشند، را دربر گرفته و شامل باکتری ها، ویروس ها، ریکتزیا، انگل ها، قارچ هاونیزعوامل دیگری مانندپریون ها می باشند. این مواد در صورتی که به دلیل بسته بندی نامناسب به بیرون نشت کنند، می توانند در تماس فیزیکی با انسان ویا حیوان باعث ایجاد بیماری گردند.

مواد عفونی خود به دو گروه**A**, **B**تقسیم می شوند.

<u>موادعفونی گروه A</u> : موادی هستندکه می توانند باعث ناتوانی دائمی ویا بیماری های کشنده ویا تهدید کننده زندگی در انسان ویا حیوان سالم شوند و بسته به بیماری های بومی وشرایط هرمنطقه متفاوت می باشند. به طور مثال نمونه کشت باکتری سل، بروسلا، وکشت انواع ویروس ها مانند هپاتیت B در این گروه قرار می گیرند. موادعفونی این گروه تحت عنوان ***UN 2814*** =**United Nations Number**طبقه بندی شده- اند.

آن دسته از مواد عفونی گروه Aکه فقط باعث بروز بیماری درحیوانات می شوند، تحت عنوان ***UN 2900*** قرار می گیرند.

<u>موادعفونی گروه B</u>: موادعفونی که شرایط فوق را از نظر بیماری زایی دارا نمی باشند، جزء نمونه های بیولوژیکی گروهB و ***UN 3373*** **United Nations Number=** طبقه بندی می شوند

بسته بندی نمونه ها

بسته بندی کلیه نمونه ها می بایست به روش استاندارد و با استفاده از سه محفظه صورت گیرد با توجه به نوع نمونه ای که منتقل می شود اطلاعات روی برچسب الصاق شده روی محفظه خارجی نمونه متفاوت است نحوه بسته بندی نمونه های مختلف درشکل های پیوست آمده است.

روش بسته بندی:

جهت بسته بندی نمونه ها طبق شرایط استاندارد، باید از سه محفظه که واجد شرایط ذیل باشد، استفاده گردد :

نمونه ایتدا باید داخل یک ظرف درپیچ دارکه غیرقابل نفوذ به مایعات و همچنین غیر قابل نشت بوده، قرار داده شود. بیشتر اوقات نمونه ها داخل لوله آزمایش حمل می شوند.

درصورتی که تعداد نمونه ها و بالطبع تعداد لوله ها زیاد باشد، برای جلوگیری از تماس بین آنها می توان مطابق اشکال پیوست و به ویژه شکل شماره ۵ لوله ها را توسط جداکننده های مقوایی ضخیم و یا جداکننده هایی ازجنس دیگر مانند اسفنج از یکدیگر جدا کرده و بسته بندی نمود .

در صورتی که نمونه مایع باشد، باید اطراف لوله ها به طور جداگانه ماده جاذب الرطوبه مانند تکه های ابر ویا ماده مشابه گذاشت و سپس درمحفظه دوم قرارداد، در واقع این مواد جاذب بین محفظه اول (لوله آزمایش) و محفظه دوم قرار می گیرند تا در صورت شکستن لوله ها یا آسیب محفظه اول، مواد آلوده به محفظه بیرونی نشت ننماید. مقدار و حجم ماده جاذبی که بین محفظه اول و دوم قرار می گیرد باید متناسب با حجم نمونه باشد طوری که بتواند در صورت شکسته شدن یا آسیب به لوله ، کل حجم نمونه مایع را جذب نماید تا رطوبت به خارجی ترین محفظه نرسد.

پس از قراردادن محفظه اول در داخل محفظه دوم که مقاوم ، غیرقابل نشت وغیرقابل نفوذ به مایعات می باشد، می بایست مشخصات نمونه روی آن درج گردد.

درمرحله بعد محفظه دوم داخل محفظه سوم که مقاوم به ضربه و شرایط محیطی نامساعد بوده، قرار داده می شود . در مورد نمونه هایی که نیاز به رعایت زنجیره سرد دارند محفظه سوم می تواند Cold Box باشد.

نمونه های عفونی گروهA (UN 2814, UN2900) مطابق شکل پیوست شماره ۱ و نمونه های عفونی گروهB (UN 3373)مطابق شکل پیوست شماره ۲ بسته بندی می شوند.

علامت گذاری

کلیه بسته ها باید قبل از انتقال بطور مناسب علامت گذاری شده طوری که حاوی اطلاعات لازم در خصوص ماهیت نمونه ، خطرات آن و استانداردهای رعایت شده جهت بسته بندی ، باشد.

علائم روی بسته ها باید واضح درج شده و خوانا باشند وبه گونه ای قرار گیرند که کاملا قابل مشاهده بوده و توسط برچسب یا علامت دیگری پوشانده نشده باشد. روی محفظه خارجی (محفظه سوم)هر بسته باید اطلاعات زیر درج گردد:

- نام و آدرس فرستنده یا ارسال کننده کالا
- نام و آدرس حمل کننده کالا
- شماره تلفن شخص مسئول تایید شرایط بسته بندی نمونه
- نام و آدرس دریافت کننده (گیرنده) کالا
- نوع نمونه
- شماره UN

- نام گذاری ویژه برای گروه های خطر(Proper shipping name): برای انتقال نمونه هایی که درگروههای خطر مختلف قرار می گیرند نامگذاری ویژه ای وجود دارد که بر روی محفظه بیرونی نمونه درج می گردد مثلا برای انتقال موادعفونی گروه UN2814 باید عبارت INFECTIOUS SUBSTANCE AFFECTING HUMANS بر روی محفظه بیرونی درج شود.

برای انتقال مواد آلوده در گروه UN 2900 باید عبارت INFECTIOUS SUBSTANCE AFFECTING ANIMALS only بر روی بسته مربوطه درج گردد.(مطابق شکل پیوست شماره ۱)

برای انتقال نمونه های گروه UN3373 باید عبارت Clinical Specimens ویا Diagnostic Specimens برروی بسته مربوطه درج شود.

بطور مثال

UN 2814"INFECTIOUS SUBSTANCE AFFECTING HUMANS"

ویا

UN 2900"INFECTIOUS SUBSTANCE AFFECTING ANIMALS"

- برچسب دارای علامت خطر زیستی (مربوط به مواد عفونی) باید به صورت لوزی شکل برروی محفظه بیرونی الصاق شود به طوری که عبارت ""گروه ۶ " در قسمت پایین آن درج شده باشد.(مطابق شکل ۳)

- محدوده دمایی قابل قبول جهت انتقال و ذخیره سازی

در مواردی که از یخ خشک یا نیتروژن مایع استفاده می شود، نوع و مقدار آن باید مشخص شود.

شایع ترین مواد خنک کننده که جهت حفظ زنجیره سرد در هنگام انتقال استفاده می شوند یخ (Ice Pack)، یخ خشک و نیتروژن مایع می باشند. در این صورت لایه های اول و دوم باید در برابر درجه حرارت پایین مقاوم و نشت ناپذیر باشند . در هنگام انتخاب لایه خارجی باید به نوع ماده خنک کننده توجه گردد .

در صورتی که از یخ معمولی استفاده می گردد ، کافیست که لایه خارجی کاملا نشت ناپذیر باشد .

در صورت استفاده از یخ خشک لایه خارجی باید نشت ناپذیر بوده ولی قابلیت عبور گاز دی اکسید کربن را داشته باشد .

در مواردی که نیاز به استفاده از نیتروژن مایع می باشد، این لایه ها باید قابلیت تحمل درجه حرارت های بسیار پایین را داشته باشند.

- برچسب Package Orientation در هنگام انتقال نمونه های مایع، بویژه با حجم بیشتر از ۵۰ میلی لیتر می بایست نصب گردد و نشان دهنده جهت رو به بالا برای حمل محفظه حاوی نمونه باشد.(مطابق شکل ۴)

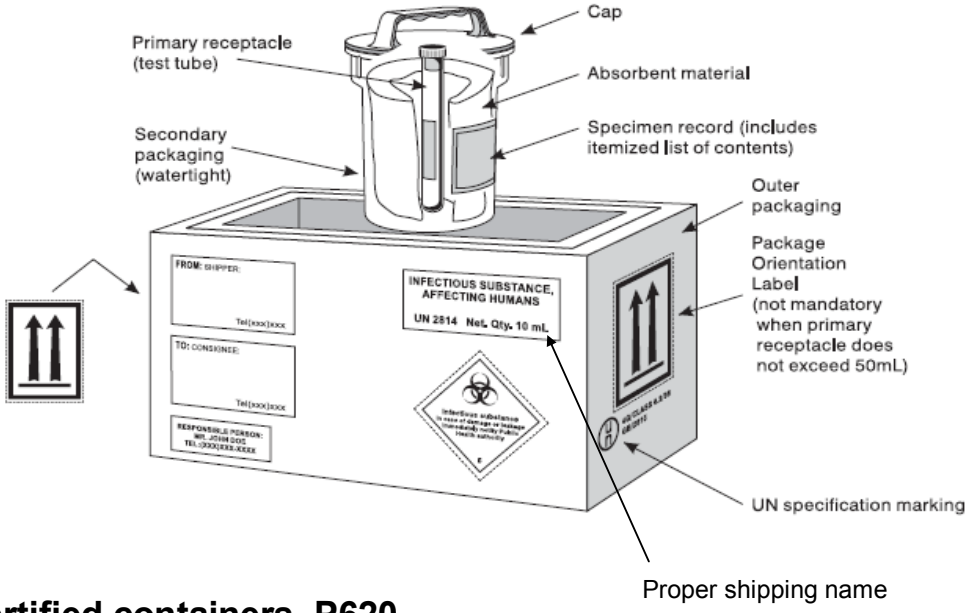
حجم قابل انتقال

برای نمونه هایی که از راه زمینی جابجا می شوند محدودیتی برای حجم مواد تعیین نشده است. نمونه هایی که درگروه2814 UN قرار می گیرند و نمونه های با حجم بیش از ۵۰ میلی لیتر و یا ۵۰ گرم را نباید در هواپیمای مسافربری بارگیری نمود. حداکثر حجم نمونه هایی را که می توان با هواپیمای باربری انتقال داد ۴ لیترو یا ۴ کیلوگرم می باشد.

- انتقال نمونه های عفونی به صورت شخصی و بوسیله افراد از طریق هوایی کاملاً غیر قانونی می باشد.
- در صورت آسیب دیدن بسته بندی ویا نشت مواد باید فوراً به مسئولین مربوطه اطلاع داد.
- در شرایطی مسئولیت ارسال کننده نمونه به پایان می رسد که نمونه عفونی تحت شرایط استاندارد منتقل شده وارسال کننده از دریافت آن توسط گیرنده مطمئن شود.

شکل ۱

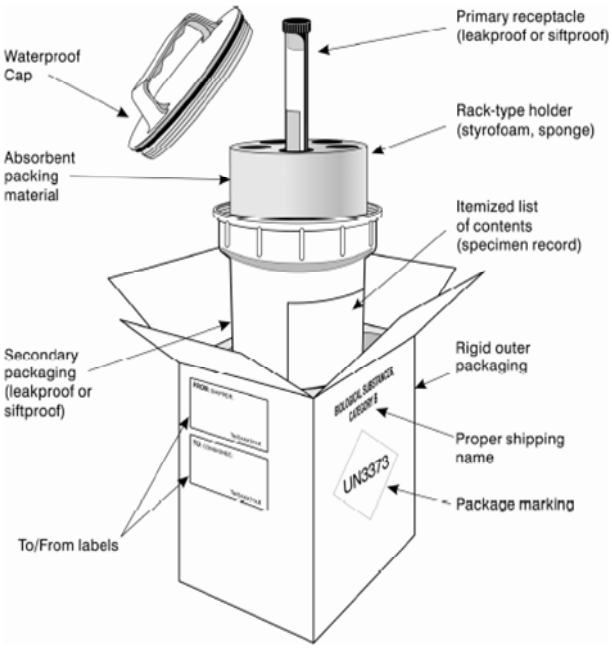
Packaging instructions for UN 2900 and UN 2814: category A



UN certified containers, P620

شکل ۲

Packaging for UN 3373 (category B, P650)



Primary receptacle:
- Leakproof or stiftproof
- absorbent material (eg. Kleenex)

Secondary packaging:
- Leakproof or stiftproof

Rigid outer packaging:
Never envelopes

شکل ۳

Figure 7.2.A
Class 6 — Infectious Substances (Division 6.2)

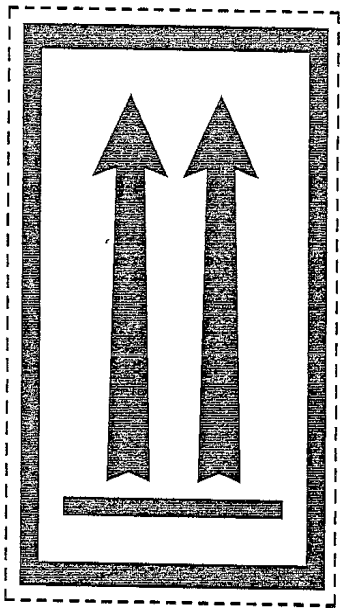
The lower part of the label should bear the inscription:
INFECTIOUS SUBSTANCE
In case of Damage or Leakage
Immediately Notify
Public Health
Authority

Name: Infectious Substance
Minimum dimensions: 100 × 100 mm

For small packages the dimensions may be 50 × 50 mm
Symbol (three crescents superimposed on a circle) and inscription:
Black
Background: White

شکل ۴

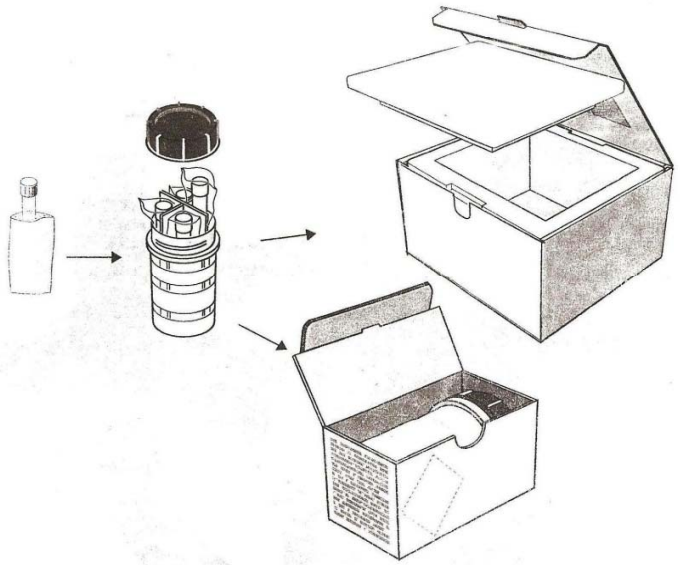
Figure 7.2.F
Package Orientation



Name: Package Orientation (This Way Up)
Minimum dimensions: 74 × 105 mm
Colour: Red or Black on a contrasting background

noax

Transportation packagings for
Class 6.2 Infectious Substances
according to ICAO-TI and IATA/DGR
Packinginstructions 602 and 650



Noax Sys AB
PO Box 2022, SE-18202 Stockholm-Danderyd Sweden
Phone +46 8753 46 80 Fax +46 8753 06 70
Mail address: mail@noax.se
WWW.noaxsys.se