

پیوست ۱: اصول نمونه گیری و ارسال نمونه ها به آزمایشگاه

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

اصولاً نمونه مدفوع تازه نسبت به سوآب (سوآب مدفوع یا سوآب مقعدی) برتری دارد، چرا که امکان بررسی همزمان عوامل بیماری زای باکتریایی، انگلی و ویروسی را برای آزمایشگاه امکان پذیر می نماید. البته در برخی شرایط سوآب کاربرد بیشتری 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 سوآب ارجحیت دارد.

الف) مدفوع تازه:

نمونه مدفوع باید در ظرف پلاستیکی یکبار مصرف تمیز (نیاز به استریل بودن نیست)، خشک، دهان گشاد با اندازه مناسب، با درپوش محکم و فاقد نشتی جمع آوری شود. این ظرف باید عاری از مواد نگهدارنده، شوینده، یونهای فلزی، باریوم یا کاغذ توالت باشد (کاغذ توالت ممکن است به املاح باریوم آغشته باشد که باعث مهار رشد میکروارگانیسم های انتروپاتوژن می شود). نمونه مدفوع نباید با ادرار مخلوط شود. حدود ۵ میلی لیتر مدفوع آبکی (liquid) یا شل (soft)، یا ۰/۵ تا ۲ گرم مدفوع سفت (formed) برای کشت نیاز است. ظروف نمونه گیری باید دارای برچسب شامل شماره نمونه، نام کامل بیمار و تاریخ نمونه گیری باشد. نمونه مدفوع تازه باید در مدت ۳۰ دقیقه (این موضوع برای جداسازی شیگلا و کمپیلوباکتر بسیار حائز اهمیت است) و حداکثر ۲ ساعت بعد از نمونه گیری کشت داده شود. در مواردی که نمی توان نمونه ها را به فاصله ۲ ساعت از نمونه گیری کشت داد، یا در مواردی که بیمار مانع از نمونه گیری با استفاده از رکتال سوآب می شود، باید از نمونه مدفوع تازه، سوآب مدفوع تهیه نموده و به محیط انتقال وارد کرد.

ب) سوآب مدفوع:

برای قرار دادن نمونه مدفوع در محیط انتقال، یک سوآب استریل را درون نمونه مدفوع قرار داده و پس از حرکت چرخشی، مقدار کمی از آن را بردارید. در صورت مشاهده موکوس در مدفوع باید با سوآب از آنها نیز نمونه گرفت. سوآب را تا عمق لوله محیط انتقالی فرو کنید و قسمت بالایی چوب را که با انگشتان لمس می کنید، بشکنید و دور

ببندازید. درب لوله را کاملاً ببندید. لوله را در دمای محیط و در مکانی دور از نور قرار دهید. محیط کری بلر حاوی سواب مدفوع/سواب رکتال که برای بررسی از نظر ویبریو کلرا تهیه شده است، در یخچال نگهداری نشود. چنانچه دمای محیط بالاتر از 40°C و در حدی است که احتمال دارد محیط انتقال کری بلر درون لوله تغییر حالت داده و آبکی شود در زمان انتقال از کیسه یخ برای کاهش نسبی دما تا حدی که از آبکی شدن محیط کری بلر پیشگیری شود، استفاده نمایید.

ج) سواب مقعدی:

در موارد استفاده از سواب مقعدی به جای نمونه مدفوع از سواب پنبه ای سالم استفاده کنید و دقت نمایید که پنبه سر آن کنده نشده باشد. از ژل جهت چرب کردن مقعد استفاده نشود. ابتدا سواب را با فرو کردن در محیط انتقالی استریل مرطوب کرده، سپس به اندازه ۳-۲ سانتی متر داخل اسفنکتر رکتوم فرو برید، به آرامی بچرخانید تا با مخاط انتهایی رکتوم تماس یابد، سپس سواب را خارج کنید. با توجه به تغییر رنگ پنبه سر سواب مطمئن شوید سواب به مدفوع آغشته است. سواب را تا عمق لوله محیط انتقالی آن چنان که در بالا توضیح داده شده است، فرو کنید. درب لوله را کاملاً ببندید. لوله را در دمای محیط و در مکانی دور از نور قرار دهید. محیط کری بلر حاوی سواب مدفوع/سواب رکتال که برای بررسی از نظر ویبریو کلرا تهیه شده است، در یخچال نگهداری نشود. چنانچه دمای محیط بالاتر از 40°C و در حدی است که احتمال دارد محیط انتقال کری بلر درون لوله تغییر حالت داده و آبکی شود در زمان انتقال از کیسه یخ برای کاهش نسبی دما تا حدی که از آبکی شدن محیط کری بلر پیشگیری شود، استفاده نمایید.

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

د- نگهداری نمونه بعد از نمونه گیری

نمونه مدفوع تازه باید هر چه سریع تر تا ۳۰ دقیقه و حداکثر در مدت ۲ ساعت بعد از نمونه گیری کشت داده شود. در غیر این صورت باید سواب مدفوع به محیط انتقال تلقیح شود محیط انتقال حاوی سواب مدفوع را در دمای محیط و در مکانی دور از نور قرار دهید. محیط کری بلر حاوی سواب مدفوع/سواب رکتال که برای بررسی از نظر ویبریو کلرا تهیه شده است، در یخچال نگهداری نشود و باید در مدت ۲۴ ساعت و حداکثر ۷۲ ساعت به آزمایشگاه منتقل شود.

چنانچه دمای محیط بالاتر از 40°C و در حدی است که احتمال دارد محیط انتقال کری بلر درون لوله تغییر حالت داده و آبکی شود در زمان انتقال از کیسه یخ برای کاهش نسبی دما تا حدی که از آبکی شدن محیط کری بلر پیشگیری شود ، استفاده نمایید.

و- محیط انتقال Cary-Blair برای نمونه مدفوع

محیط کری بلر، محیط انتقال مناسبی برای بسیاری از عوامل بیماری زای روده ای از جمله شیگلا، سالمونلا، اشریشاکلی O157:H7، یرسینیا انتروکولیتیکا و کمپیلوباکتر می باشد. قوام نیمه جامد آن موجب آسانی حمل و نقل شده، همچنین کری بلر به دلیل pH بالا (۸/۴)، محیط انتقالی و نگهداری برای ویبریو کلرا می باشد.

آماده سازی و کنترل کیفیت محیط کری بلر: محیط کری بلر را مطابق دستور سازنده تهیه کنید. توصیه می شود از محیط کشت کری بلر اصلاح شده که در آن مقدار آگار $1/6$ گرم (به جای ۵ گرم) می باشد، استفاده شود. هنگام آماده کردن کری بلر، مقداری که داخل هر ظرف ریخته می شود باید به اندازه ای باشد، که حداقل ۴ سانتی متر عمق در لوله ایجاد شود. برای مثال مقدار ۵-۶ میلی لیتر را در لوله های 13×100 میلی متر با درب محکم می توان توزیع کرد. در حالی که درب لوله ها شل هستند، در بن ماری 100°C به مدت ۱۵ دقیقه (یا مطابق دستور سازنده) استریل کنید. درب لوله ها را پس از استریل کردن و خنک شدن محکم ببندید. کری بلر باید در ظروف یا لوله های پلاستیکی شفاف (در صورت عدم دسترسی، در ظروف یا لوله های شیشه ای) درپوش دار ساخته شده و در مکانی خنک و دور از نور نگهداری گردد. در صورت کاهش نیافتن حجم محیط، عدم تغییر رنگ و آلودگی ۶ ماه تا ۱ سال قابل استفاده است.

برای انجام آزمایش کنترل کیفیت هر سری ساخت محیط کری بلر از هر یک باکتریهای *V. cholerae* non O1, *Sh. flexneri* ATCC 12022, *Sal. Typhimurium* ATCC 14028 سوسپانسیون های جداگانه مطابق استاندارد نیم مک فارلند تهیه نمایید. یک سواب استریل را کاملاً در هر سوسپانسیون آغشته نموده، آب اضافه سواب را با فشردن آن به دیواره لوله خارج نمایید و آنرا داخل محیط کری بلر فرو برده، محیط کری بلر حاوی سواب را به مدت یک شبانه روز در دمای اتاق نگهداری نمایید. سپس از این سواب روی پلیت مناسب مانند بلاد آگار حاوی خون گوسفند کشت دهید، که باید رشد قابل قبولی مشاهده شود.

شماره نمونه، نام بیمار و تاریخ نمونه گیری باید به شکلی خوانا بر روی برچسب ضد آب روی لوله نمونه نوشته شود. همچنین برای هر نمونه، اطلاعات بیمار و نمونه باید ثبت شود، یک نسخه از برگه حاوی اطلاعات ثبت شده با نمونه‌ها ارسال و دیگری توسط فرستنده نگهداری شود.

اطلاعات بیمار شامل نام کامل بیمار، جنس، سن یا تاریخ تولد، آدرس و شماره تماس با بیمار می باشد. همچنین تاریخ نمونه گیری، تاریخ بروز اولین علائم، ذکر وجود خون در نمونه، مصرف آنتی بیوتیک قبل از جمع‌آوری نمونه، اطلاعات کلینیکی مفید و سابقه مسافرت یا مصرف مواد غذایی برای تفسیر نتایج میکروبیولوژی ضروریست.

آماده کردن نمونه ها برای ارسال

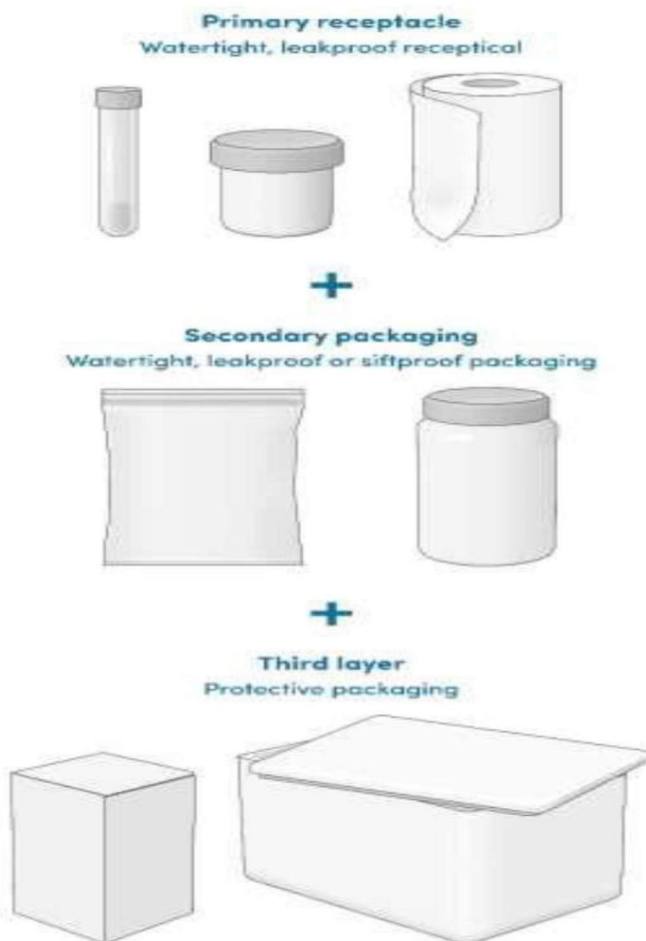
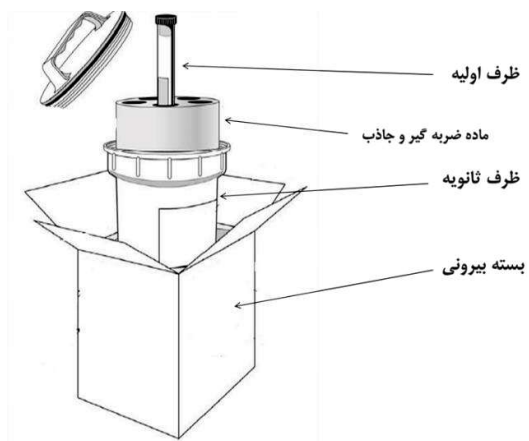
انتقال نمونه های بالینی باید با دقت انجام شود تا خطری که انسان یا محیط اطرافش را تهدید می کند، به کمترین اندازه ممکن برسد. همچنین عوامل بیماریزای احتمالی زنده نگاه داشته شوند. در صورت امکان نمونه ها را زمانی ارسال کنید که در ساعات اداری به آزمایشگاه برسد که کار بر روی نمونه به موقع و درست انجام شود. آزمایشگاه تحویل گیرنده را در کوتاه ترین زمان ممکن و ترجیحا پیش از ارسال، از راه بودن نمونه باخبر کنید. کسانی که عوامل عفونی یا نمونه های تشخیصی را ارسال می کنند باید تمامی قوانین کشور مربوط به بسته بندی آنها را رعایت کنند. این افراد باید از رسیدن نمونه ها به مقصد در شرایط خوب و از این که خطری انسان یا حیوانات را به هنگام ارسال تهدید نمی کند، اطمینان حاصل کنند.

بسته بندی و انتقال نمونه های بالینی

- بسته بندی و انتقال نمونه های بالینی باید تحت شرایط استاندارد صورت گیرد. این روند باید با استفاده از ظروف مناسب، بسته بندی به روش استاندارد با درج علائم و برچسب های لازم روی بسته، رعایت اصول ایمنی جهت انتقال نمونه و در نظر داشتن شرایط مناسب طی انتقال نمونه به نحوی که کیفیت و تمامیت نمونه حفظ شود، صورت پذیرد. جهت بسته بندی و انتقال امن و ایمن نمونه ها باید از سه محفظه که واجد شرایط ذیل باشد، استفاده نمایید:
- نمونه ابتدا باید داخل یک ظرف درپنج دار که غیر قابل نفوذ به مایعات و همچنین غیر قابل زشت بوده، قرار داده شود. بیشتر اوقات نمونه ها داخل لوله آزمایش حمل می شوند. در صورتی که تعداد نمونه ها و در نتیجه تعداد لوله ها زیاد باشد، برای جلوگیری از تماس بین آنها می توان لوله ها را توسط جداکننده های مقوایی ضخیم و یا جداکننده هایی از جنس 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 رطوبت گذاشت و سپس در محفظه دوم قرار داد. 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 نکنند. در مرحله بعد محفظه دوم، داخل محفظه سوم که مقاوم به ضربه و شرایط محیطی نامساعد بوده، قرار داده می شود. محفظه سوم می تواند Cold Box به همراه کیسه های یخ باشد.

■ جهت دریافت اطلاعات بیشتر در خصوص بسته بندی و انتقال نمونه ها به "راهنمای ایمنی جهت انتقال نمونه های عفونی" تهیه شده توسط آزمایشگاه مرجع سلامت مراجعه نمایید.



مراحل ارجاع نمونه های مشکوک به ویبرئو کلرا جهت تایید تشخیص

