دکتر علی بیکیان، متخصص آسیب شناسی بالینی و تشریحی

گذری برروش های مرسوم تشخیص، تعیین هویت و آنتی بیوگرام سودوموناس ائروجینوزا

سودوموناس ائروجینوزا یکی از شایع ترین باکتری های گرم منفی است که عامل عفونت های بیمارستانی بوده و مقاومت آنتی بیوتیکی زیادی نشان می دهد. این باکتری اندام ها و بافت های مختلف را عفونی می کند و اغلب در اشخاص با سیستم ایمنی ضعیف شده، فرصت طلبانه عمل می کند و در ۱۶٪ از موارد پنومونی بیمارستانی با مرگ ومیر ۳۸٪ جدا می شود، همچنین از ۱۲٪ از عفونت های دستگاه ادراری اکتسابی از بیمارستان، ۸٪ از عفونت های زخم جراحی شده و ۱۰٪ از عفونت های خون جداسازی می گردد. میزان مرگ ومیر در بخش سوختگی ۶۰٪ است؛ باکتریمی ناشی از سودوموناس ائروجینوزا یک عفونت جدی و تهدیدکننده زندگی به ویژه در افرادی است که از ضعف ایمنی رنج می برند و براساس بیمار و فاکتورهای مربوط به عفونت، میزان مرگ ومیر ۲۰ تا ۷۰ درصد گزارش شده است.

مراحل تشخیص آزمایشگاهی سودوموناس ائروجینوزا

جمع آوری سویه های باکتریایی

۱- تهیه نمونه از عفونت زخم

محل عفونت را با سرم فیزیولوژی استریل شستشو داده و با سواب استریل از ترشحات زخم برداشت می کنیم در صورت عدم وجود ترشحات، نمونه برداری توسط پزشک متخصص به طریق بیوپسی تهیه می شود.

۲-در مورد باکتریمی، طبق دستورالعمل زیر نمونه برداری برای انجام کشت خون را انجام می دهیم:

۲-۱-دستکش استریل به دست کرده و ماسک می زنیم.

۲-۲- شیشه کشت خون آماده شده و پوشش فلزی آن برداشته می شود.

۲-۳- پس از انتخاب رگ مناسب برای خونگیری، گارو از بازو بسته می شود.

۲-٤- با پنبه آغشته به الکل ۷۰ درجه، محل خونگیری را به صورت دورانی از مرکز به خارج پاک می کنیم.

۲-۵- با پنبه دیگر آغشته به محلول آنتی سپتیک، محل خونگیری و بطری کشت خون به صورت دورانی از مرکز به خار ج پاک می شود و اجازه داده می شود تا آنتی سپتیک روی پوست خشک شود.

۲-٦- دوباره با پنبه آغشته به الکل ۷۰ درجه محل خونگیری را به صورت دورانی از مرکز به خارج پاک می کنیم. تا کاملا" ماده آنتی سپتیک از پوست پاک شود و روی آن را با گاز استریل می پوشانیم.

۲-۷- سر سوزن سرنگ را در داخل ورید وارد کرده و حجم موردنیاز از خون برای کشت خون اخذ می شود.

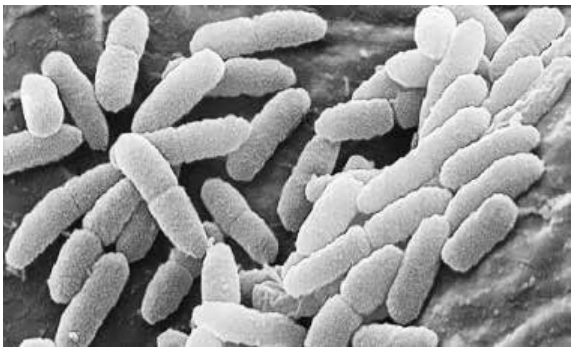
۸- بعد از کشیدن خون از ورید، سوزن سرنگ را تعویض کرده و با سرسوزن دیگری، نمونه بلافاصله در محیط کشت خون تلقیح می گردد.

۹- بطری های کشت خون تلقیح شده، نبایستی در یخچال نگهداری شود و به آزمایشگاه منتقل شده و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده می شود.

۳- نمونه برداری برای کشت ادرار

۳-۱-بزرگسالان

بعد از شستشوی محل با آبگرم و صابون و خشک کردن آن با گاز استریل، طبق دستورالعمل های جداگانه برای زنان و مردان، درب ظرف ادرار را باز کنید مقدار کمی از قسمت اول ادرار را به داخل توالت تخلیه کنید و نصف ظرف نمونه از وسط ادرار را جمع آوری کنید و قسمت آخر ادرار را داخل توالت تخلیه کنید.



۳-۲- نوزادان و کودکان

در این مورد باید از کیسه های سترون شده مخصوص جمع آوری ادرار (Urine Bag) استفاده کرد. این کیسه نباید بیش از ٤٥ دقیقه به مجرای ادرار متصل باشد. وقتی حدود ۱۰-۱۵ میلی لیتر ادرار در کیسه جمع شد، سر آن را تا کرده و سپس به آزمایشگاه انتقال دهید.

۳-۳- نمونه گیری با روش آسپیراسیون سوپراپوبیک

با سرنگ از خود مثانه مستقیما" نمونه گیری بعمل می آورند که این کار توسط پزشک متخصص انجام می گیرد در این صورت چون مثانه استریل است هر تعداد کلنی رشد کند کشت ادرار مثبت تلقی می شود.

۳-٤- نمونه گیری از سوند ادراری برای کشت ادرار

دستکش بپوشید و حدود ۳۰ دقیقه قبل از نمونه گیری، سوند را کلامپ کنید.

محل مخصوص نمونه گیری سوندرا با پنبه الکل ضدعفونی کنید. سوزن را با زاویه ۹۰درجه وارد کنید و ادرار را داخل سرنگ بکشید.

نمونه را به ظرف استریل مخصوص نمونه گیری منتقل کرده و برچسب بچسبانید و سپس به آزمایشگاه منتقل کنید.

٤- تهیه نمونه خلط برای جداسازی باکتری در موارد پنومونی

بیمار ابتدا دهان خود را شسته و دندان های خود را بدون خمیردندان مسواک کرده و دندان های مصنوعی را بردارد تا احتمال آلودگی نمونه کاهش پیدا کند.

بیمار سرفه های عمیق انجام دهد و در صورت نداشتن سرفه با چند بار تنفس عمیق از بینی می تواند به ایجاد سرفه کمک کند. بخور آب در ابتدای صبح، درست پس از بیدار شدن از خواب قبل از شستن صورت گاهی گرفتن نمونه را راحت تر می کند و شستشوی دهان با سرم فیزیولوژی یا حتی غرغره نمودن آب خالی قبل از نمونه گیری نیز به کم شدن فلور باکتریایی کمک می کند.

خلط خارج شده را در یک ظرف دهان گشاد درب دار و دارای مشخصات بریزید و دقت کنید جدار داخلی ظرف را لمس نکنید.

درب ظرف حاوی نمونه را ببندید و در اسرع وقت به آزمایشگاه ارسال کنید.

مراحل تشخیص وتعیین هویت سودوموناس ائروجینوزا در نمونه های کشت داده شده

نمونه به دست آمده از بیماران غیر از نمونه خون را روی محیط کشت انتخابی ستریماید آگار به طریق خطی کشت داده و به مدت ٢٤ تا ٤٨ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار می دهیم. کلنی های باکتری در روی محیط کشت مذکور حاشیه رنگین در اثر رسوب پیگمان هایی از قبیل پیوسیانین و پیووردین خواهند داشت. از بطری های خون نیز کشت ثانویه روی محیط های عمومی و افتراقی و ستریماید آگار به عمل می آید. پس از رشد باکتری و مشاهده رسوب پیگمان های باکتری در اطراف کلنی ها در سطح محیط کشت از سایر تست های تأییدی جهت تعیین هویت باکتری استفاده شده و در صورت تایید هویت سودوموناس ائروجینوزا، نتایج به صورت زیر خواهد بود:

- ✔ تست اکسیداز مثبت
- ✔ تولید فقط اسید از گلوکز در محیط OF
- ✔ رشد روی محیط کشت SS Agar
- ✔ اکسیداسیون گلکونات
- ✔ رشد در ٤٢ درجه سانتیگراد
- ✔ تولید اوره آز
- ✔ آرژینین دی هیدرولاز مثبت
- ✔ عدم تخمیر قندها و عدم تولید SH2 در محیط TSI Agar

ازسویه استاندارد باکتری به شماره ATCC 27853 برای کنترل کیفی محیط های کشت استفاده بعمل خواهد آمد.

روش های نگهداری سویه های ایزوله شده سودوموناس ائروجینوزا

۱-تلقیح در محیط کشت مایع Luria bertani حاوی

۵۰٪ گلیسرول در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد جهت انجام مطالعات ژنتیکی

۲- تلقیح در محیط کشت مایع تریپتیکاز سوی براث خاوی گلیسرول ۲۰ درصد و نگهداری در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد برای مطالعات کنترل کیفی محیط های کشت و دیسک های آنتی بیوتیک

۳- در صورت استفاده از محیط های کشت جامد برای ذخیره باکتری تا یک ماه دردمای ٤ درجه یخچال قابل نگهداری است.

تعیین الگوی مقاومت وحساسیت آنتی بیوتیکی یا آنتی بیوگرام سودوموناس ائروجینوزا

برای انجام آنتی بیوگرام چهار روش اصلی زیر وجود دارد:

- ✔ روش انتشار دیسک در Disc Diffusion Susceptibility Test
- ✔ روش تهیه رقت در آگار Agar Dilution Method
- ✔ روش تهیه رقت در مایع Broth Dilution Method
- ✔ E(epsilometer) Test

روش مرسوم و معمول در غالب آزمایشگاه ها روش انتشار دیسک در آگاراست که این روش بنام روش Kirby – Bauer نیز شناخته می شود.

وسائل و موارد موردنیاز برای تست آنتی بیوگرام به روش انتشار دیسک در آگار

- ✔ محیط کشت آگار مولر هینتون آگار.
- ✔ لوله حاوی محلول دارای کدورت استاندارد ۰/۵ مک فارلند
- ✔ لوله حاوی سرم فیزیولوژی استریل هم حجم لوله حاوی سوسپانسیون دارای کدورت استاندارد ۰/۵ مک فارلند
- ✔ دیسک های آنتی بیوگرام مناسب باکتری طبق پانل آنتی بیوتیکی جدول C.L.S.I
- ✔ کشت ۲٤ساعته از باکتری خالص شده در محیط کشت مناسب
- ✔ سواب، آنس، هود، چراغ گازی
- ✔ خط کش یا کولیس(ترجیحا" کولیس)برای اندازه گیری قطر هاله ممانعت از رشد
- ✔ سویه استاندارد باکتری به شماره ATCC 27853 برای کنترل کیفی دیسک های آنتی بیوتیک

مراحل انجام آنتی بیوگرام

با لوپ استریل از یک کلنی جوان باکتری برداشت کرده سوسپانسیونی معادل کدورت ۰/۵ مک فارلند در سرم فیزیولوژی استریل تهیه می کنیم.

یک سواب استریل را وارد سوسپانسیون کرده و پس از گرفتن محلول اضافی با سر لوله آن را به آرامی در چند جهت مختلف روی محیط کشت میدهیم به گونه ای که هیچ جای خالی بر روی محیط باقی نماند و باکتری به صورت یکنواخت روی محیط کشت داده شود. درروش دیگری محتوی سوسپانسیون نیم مک فارلند تهیه شده از باکتری را مستقیما" روی محیط مولر هینتون آگار ریخته پس از پخش یکنواخت اضافی آن را از محیط بیرون ریخته و صبر می کنند تا سطح محیط خشک شود.

پس از خشک شدن سطح محیط که نباید بیش از یک ربع ساعت طول بکشد دیسک های آنتی بیوتیک مناسب باکتری را توسط پنس استریل با فاصله حداقل ۲ سانتیمتری روی محیط قرار داده و با اندکی فشار ثابت می کنیم. پلیت را به مدت ١٦ الی ١٨ ساعت انکوبه می کنیم. بعد ازانکوباسیون با خط کش یا کولیس هاله های عدم رشد ایجادشده را اندازه گرفته و با جداول موجود CLSI برای آنتی بیوتیک های مختلف مطابقت می دهیم و واکنش سویه ها را در مقابل هر دارو در سه دسته حساس، نیمه حساس و مقاوم طبقه بندی می کنیم.

دیسک های آنتی بیوتیک معمول برای آنتی بیوگرام سودوموناس ائروجینوزا عبارت اند از:

آزترونام، کولیستین، سفتازیدیم، پیپراسیلین، اوفلوکساسین، توبرامایسین، کربنی سیلین، جنتامایسین، آمیکاسین، سفتریاکسون، پلی میکسین B ، ایمی پنم، مروپنم، سفپیم و سفکسیم و لووفلوکساسین.

منابع:

1.De Freitas AL, Barth AL. Antibiotic resistance and molecular typing of Pseudomonas .aeruginosa. focus on imipenem. Braz J Infect Dis:6(1): 2002

2. Iglewski BH: Pseudomonas aeruginosa. Available from http:// urmc .Rochester. Edu .smd/mbi/ bbi, 2005 .

3.Vandeman and etal: Cell to cell signaling and Pseudomonas aeruginosa infections .Available from http://www.CDC.gov/ ncidod/eid/voll 4no4/vandelden.htm, 1999 .

4.Zelenitsky Sa and etal: Treatmend and outcome of Pseudomonas aeruginosa bacteremia ,an antibiotic pharmacodynamic analysis. J of Antimicrobial Chemotherapy, 52:668-674 .2003 . .5Baron EJ and etal: Diagnostic Microbiology, 11 th edtion. Baily & Scott, s, Mosby .Sant Louise, 168-187 & 386-405, 2002 .

6.Taneja N: Imipenem resistance in non-fermenters nosocomial urinary tract infections .Indian J of Medical Siences, 57: 294-299, 2003 .

7.Cao W and etal: Risk factors and clinical outcomes of nosocomial multidrug resistant .Pseudomonas aeruginosa infections. J of Hospital Infections,57:112-118, 2004 .

8.Mendoza T: What s newin a antimicrobial susceptibility testing. Phil J Microbial Infect .Dis, 27:113-115, 1998.

9. Cormican M and etal: antimicrobial susceptibility testing in Ireland, an introduction to -the methods of the national comitte for clinical laboratory standards(NCCLS) . NUIG:1 .29, 2005.

10. CLSI 2017: Available from https:// clsi.org › media.

فرم اشتراک ماهنامه تشخیص آزمایشگاهی ۱۳۹۹

نام و نام خانوادگی: ..... رشته/تخصص: ..... کد ملی: .....

نام محل کار: ..... مسئولیت: .....

نشانی: .....

کدپستی: ..... تلفن: ..... فاکس: .....

موبایل: ..... ایمیل: .....

♦تکمیل تمام موارد فوق الزامی است ♦

اشتراک یکساله (با پست عادی)	۲۶۴۰،۰۰۰ریال	اشتراک ۶ ماهه (با پست عادی)	۱،۳۲۰،۰۰۰ریال
اشتراک یکساله (با پست سفارشی)	۳،۰۰۰،۰۰۰ ریال	اشتراک ۶ ماهه (با پست سفارشی)	۱،۸۰۰،۰۰۰ ریال

مبلغ اشتراک یکساله خارج از کشور با پست سفارشی ۳۶۰ دلار است.

لطفاً برای شروع یا تمدید اشتراک، رسید فیش واریزی را همراه با فرم تکمیل شده فوق به شماره زیر فاکس نمایید.

کارت بانک پاسارگاد به شماره کارت ۷۲۲۴-۸۲۸۷-۲۹۱۰-۵۰۲۲ و شماره حساب ۱-۱۲۰۸۴۲۳۴-۸۰۰۰-۲۰۶ به نام آقای محمود اصلانی

ایمیل: matashkhis@gmail.com تلفن: ۰۹۱۲۷۳۳۳۴۰۷-۶۶۹۱۰۶۱۶-۸۸۹۸۷۵۰۱ نمابر: ۸۹۷۷۶۷۶۹