**3. خون**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **اسم آزمایشگاه:** | {{LabName}} | |
| **اسم سند:** | **دستورالعمل نمونه خون** | |
| **کد سند:** | D-006-0003 | |
| **دسته بندی سند:** | دستورالعمل های تفسیر کشت های مختلف بدن | |
| **شماره ویرایش:** | {{EditeNumber}} | |
| **تاریخ ویرایش:** | {{EditeNumber}} | |
| **تاریخ بازنگری سند:** | {{ReviewDate}} | |
| **تهیه کننده:** | **تایید کننده:** | **تصدیق و امضاء :** |
| شرکت دارا ویرا آزما  دکتر داریوش شکری | {{ConfirmerOneName}} | {{ConfirmerTwoName}} |

**(1) هدف:**

هدف از این دستورالعمل تشریح روش انجام نمونه های خون شامل نمونه گیری، حجم مورد نیاز خون، تعداد و دفعات خون گيري و زمان آن، نحوه کشت و تفسیر کشت های خون می باشد.

**(2) تعاریف و اصطلاحات:**

**باکتریمی** (Bacteremia) به معناي وجود باکتري در خون، **ویرمی** (Viremia) به معناي ويروس در خون، **پارازیتمی** (Parasitemia) به معناي وجود انگل در خون و **فانگمی** (fungemia) به معناي وجود قارچ در خون است.

**سپسیس (**Septicemia**)**: یا گندخونی زمانی ایجاد می شود که یک عفونت به خصوص عفونت خون باعث واکنش شدید سیستم ایمنی در بدن شود.

**کاتتر** (Catheter): یا سوند یک **ابزار پزشکی** ضروری است که برای انتقال مایعات یا داروها به بدن و تخلیه آن‌ها به کار می‌رود. این وسیله لوله‌ای باریک و انعطاف‌پذیر است که در موقعیت‌های مختلف پزشکی مانند درمان بیماری‌های ادراری، فرآیندهای باروری و تزریقات وریدی استفاده می‌شود.

**اندوکاردیت** (endocarditis): به التهاب پوشش داخلی دریچه های قلب و اتاقک قلب به نام اندوکارد گفته می شود. این وضعیت معمولاً زمانی اتفاق می‌افتد که قارچ‌ها، باکتری‌ها یا سایر میکروب‌ها از سایر قسمت‌های بدن مانند دهان از طریق گردش خون پخش می‌شوند و سپس خود را به مناطق آسیب‌دیده در قلب می‌چسبند.

**تب با منشأ نامشخص یاFUO :** اشاره به وضعیتی دارد که در آن بیمار دارای [تب](https://fa.wikipedia.org/wiki/%D8%AA%D8%A8) بالا (۳/38 درجه سانتیگراد) است که بیش از سه هفته طول می کشد اما با وجود بررسی‌های انجام شده توسط [پزشک](https://fa.wikipedia.org/wiki/%D9%BE%D8%B2%D8%B4%DA%A9) هیچ توضیحی برای آن یافت نمی شود.

**سيستم هاي کشت دستي خون:** در این سیستم ها در شيشه کشت خون اغلب از محيط هاي کشت مايعTSB وBHI استفاده مي شود. در نوع دوفازي يا کاستانيدا از فرم آگار محيط هاي فوق در قسمت فاز جامد استفاده مي شود. محيط هاي دوفازي بهترين محيط براي جداسازي بروسلا و قارچ ها هستند. محيط هاي براث تخصصي‌تر شامل کلمبيا، عصاره قلب-مغز، بروسلا براث يا ساير محيط هاي غني‌شده هم موجود است.

**سيستم هاي کشت خودکار** **خون**: استفاده از نسل جديد سيستم هاي خودکار کشت خون ترجیح داده مي شود که به طور پيوسته شيشه هاي کشت خون را از نظر رشد بررسي مي کنند. بسته به نوع سيستم براي سنجش از روش هاي سنجش کلريمتريک و فلورسنت برمبناي تشخيص CO2 غيرراديواکتيو استفاده مي شود و داراي بطري هاي هوازي، بيهوازي، مايکوباکتريوم و قارچ هستند. معروف ترين اين سيستم ها عبارت اند از: سیستم بک تک ساخت شرکت BD‌ آمريکا و بکتی آلرت ساخت شرکت بيومريوکس فرانسه.

**(3) شرح دستورالعمل:**

جداسازي عوامل ميکروبي از کشت خون به عوامل متعددي بستگي دارد که مهمترين آن ها عبارت اند از: نوع باکتريمي و ارگانيسم عامل، روش نمونه گيري، حجم خون گرفته شده، تعداد و دفعات خون گيري و زمان آن، روش کشت و امکانات آزمايشگاهي.

**نمونه گيري**

**مواد ضدعفوني کننده براي نمونه گيري**: از ماده ضد عفوني کننده براي کشتن باکتري هاي سطحي و زير سطحي استفاده مي شود. مواد ضدعفوني کننده معمول براي نمونه گيري شامل: بتادين يا پوويدين-يدين 10 درصد، محلول الکلي و کلرهگزيدين 2 درصد می باشند. کلرهگزيدين ترکیب بهتری است و به ويژه در نمونه گيري از کاتترها و در بخش هاي کودکان نتايج بهتري دارد (آلودگي کمتر) و عوارض پوستي که در کودکان با مصرف ترکيبات يددار ايجاد مي شود با مصرف آن کمتر است.

**روش استاندارد نمونه گيري:**

1- وريد موردنظر انتخاب شود.

2- **چربي زدايي**: پوست ناحيه با ايزوپروپيل الکل 70% یا الکل اتانول 70 تا 95 درصد با حرکت محکم دوراني از داخل به خارج به قطر تقريبي cm5 چربي زدايي شود.

3- **ضدعفونی**: پس از خشک شدن الکل همين کار را با یکی از مواد ضدعفونی کننده مانند بتادين (پوويدين-يدين 10 درصد) تکرار و حداقل يک دقيقه (ترجيحاً 5/1 تا 2 دقيقه) صبرکرده تا محل ضدعفوني شود (مهمترین مرحله). براي جلوگيري از آلودگي، رعايت زمان توصيه شده بسيار اهميت دارد.

4- در صورت لزوم به لمس مجدد وريد بايد نوك انگشت درحالي که با دستکش پوشيده شده است با بتادين ضدعفوني شود.

5- پس از نمونه گيري، خون را مستقيماً و بدون تعويض سوزن به درون شيشه کشت خون که درپوش لاستيکي آن قبلاً با الکل 70 % ضدعفوني و خشک شده است، تلقيح کنيد و شيشه را به آرامی تکان دهيد تا خون با ماده ضدانعقاد (SPS) مخلوط شود. در گذشته روش استفاده از دو سوزن، يعني تعويض سوزن اول پس از خروج از رگ و جايگزيني با سوزن استريل نو، توصيه مي شد. اما درحال حاضر، با توجه به احتمال خطر نیدل استیک شدن کارکنان، اين روش رد شده است.

6- در نهایت محل نمونه گيري با الکل 70% تميز مي شود تا از واکنش پوستي در افراد حساس به ترکيبات يد جلوگيري شود.

**تعداد کشت خون، زمان و حجم نمونه گيري، نسبت خون به محيط کشت و اتمسفر**

تعداد کشت خون لازم بسته به نوع باکتريمي احتمالی، سن و مصرف قبلي آنتي بيوتيک متفاوت است. به طور کلی، تعداد باکتري در مراحل حاد عفونت، در زمان تب و در کودکان بالاتر است.

**تعداد و زمان خون گيري**

در کساني که آنتي بيوتيک دريافت کرده اند بيش از 3 کشت خون نياز است.

1- **تب حاد**: قبل از شروع درمان، 2 نمونه از 2 رگ مختلف (ترجیحاً از هر دو دست) در 10 دقيقه گرفته شود.

2- **تب غيرحاد**: قبل از درمان، 3-2 نمونه از رگ هاي جدا طي 24 ساعت گرفته و فاصله بين نمونه ها نبايد کمتر از 3 ساعت باشد.

3- **اندوکارديت حاد**: قبل از شروع درمان، 3 نمونه از 3 رگ جداگانه طی 2-1 ساعت گرفته شود.

4- **اندوکارديت تحت حاد**: 3 نمونه از 3 رگ با فاصله زماني حداقل يک ساعت طي 24 ساعت گرفته شود. اگر کشت بعد از 24 ساعت منفي بود، 3-2 نمونه ي ديگر با همين روش گرفته شود.

5- **اندوکارديت تحت درمان**: 2 نمونه در روز اول و 3 نمونه در سه روز متوالي گرفته شود.

6- **غيراندوکارديت تحت درمان**: 6 نمونه در 48 ساعت قبل از شروع دوز بعدي آنتي بيوتيک انجام شود.

7- **تب با منشاء ناشناخته (FUO):** 2 تا 3 نمونه از رگ هاي مختلف با فاصله زماني حداقل يک ساعت و طي 24 ساعت گرفته شود. در صورت منفي بودن کشت در مدت 48-24 ساعت، 2 نمونه ديگر گرفته خواهد شد.

**نکته مهم**: با وجود این دستورالعمل، در بيشتر موارد، هيچ تفاوت معني‌داري در بازده بين کشت‌هاي خوني متعددي که به ‌طور همزمان به‌دست ‌آمده‌اند يا کشت‌هاي خوني به ‌دست‌آمده در فواصل زماني نشان داده نشده است. اگر حجم خون کافي باشد، معمولاً دو تا چهار مجموعه کشت خون با فاصله يک ساعت از يکديگر براي رسيدن به حساسيت بهينه کشت خون کافي است.

**حجم نمونه:** جمع آوري دو تا چهار مجموعه کشت با استفاده از 10 تا 20 ميلي ليتر خون در هر کشت ممکن است براي شناسايي و تشخيص صحيح عفونت هاي جريان خون در بزرگسالان مورد نياز باشد. بايد توجه داشت به ازاي هر 1 میلی لیتر خون احتمال جداسازي، 2/3 درصد زياد مي شود. بنابراین بهتر است در افراد بزرگسال در هر نوبت حداقل 10 میلی لیتر خون گرفته شود.

در کودکان کمتر از 10 سال تقريباً به ازاي هر سال حداقل 1 میلی لیتر توصيه مي شود، هر چند اخيراً به معيار وزني توجه شده است (جدول 1). حجم مطلوب خون مورد نياز براي شناسايي موفق ارگانيسم ها از نوزادان و کودکان به وضوح مشخص نشده است.

جدول 1. حجم کشت خون کودکان بر اساس وزن.

|  |  |
| --- | --- |
| **وزن بيمار (کيلوگرم)** | **حجم خون برای کشت خون (ml)** |
| < 8/6 | 1 |
| 6/13- 8/6 | 3 |
| 2/27- 6/13 | 5 |
| 8/40- 2/27 | 10 |
| 4/54- 8/40 | 15 |
| 4/54 < | 20 |

**نسبت خون به محيط کشت:** حجم محیط کشت کودکان حدود 30 میلی لیتر و بزرگسالان حدود 50 میلی لیتر است. نسبت حجم خون به حجم محیط کشت خون در مورد کودکان باید1:10تا1:20باشد، یعنی مقدار 3-1 میلی لیتر خون به ازای 20 میلی لیتر محیط کشت خون و در مورد بزرگسالان این نسبت باید 1:5 تا1:10باشد، یعنی 10-5 میلی لیتر خون به ازای 50 میلی لیتر محیط کشت خون.بهترين نسبت توصيه شده 5:1 است (خون 1 و محیط کشت 5) با اين حال، چندين محيط تجاري جديد حاوي رزين يا ساير مواد افزودني بهبود يافته نسبت 1:4 را مناسب نشان داده‌اند.

**اتمسفر:** توصيه مي شود پس از دريافت شيشه کشت خون، پس از ضدعفوني با الکل و خشک شدن درپوش لاستيکي، با يک سرسوزن استريل در کنار شعله در زير هود، يک مجراي تبادل هواي موقتي (Vent) به مدت چند ثانيه ايجاد شود تا خلاء موجود در شيشه کشت خون جبران يا فشار هواي اضافي درون آن خارج شود و شرايط مناسب براي رشد ارگانيسم هايي که به شرايط هوازي نياز دارند، مانند سودوموناس، مخمرها و مننگوکوک ايجاد شود.

**انتقال و کشت خون**

* خون ریخته شده در ویال بايد بلافاصله یا در مدت کمتر از 2 ساعت در حرارت اتاق به آزمايشگاه منتقل شود و در اسرع وقت در انکوباتور يا دستگاه خودکار قرار داده شود تا تشخيص کشت هاي مثبت به تأخير نیافتد. به علت حضور احتمالی باکتری های حساس به حرارت مثل نايسريا نمونه را نبايد در يخچال گذاشت.
* روش هاي کشت خون شامل سه دسته کشت متعارف سنتي، کشت خودکار و روش ایزولاتور یا لیز-سانتریفیوژ هستند.
* به طور کلي، هر مجموعه کشت خون شامل دو بطري کشت خون است که يکي براي بازيابي باکتري هاي هوازي و يکي براي بازيابي باکتري هاي بيهوازي تعيين شده است.
* به دليل کاهش کشت‌هاي خون مثبت با باکتری های بي‌هوازي همراه با افزايش بار مالی، توصيه شده که کشت هاي بيهوازي بايد به صورت انتخابي با دستور پزشک انجام شود و به جاي کشت بيهوازي خون، بطري دوم هوازي اضافه شود. درصورت درخواست عفونت هاي بيهوازي بايد از محيط هاي مخصوص کشت بيهوازي استفاده کرد.
* براي کشت مايکوباکتريوم ها به محيط کشت مايع ميدل بروک 7H9 و محيط هاي دوفازي اختصاصي نياز است.

**انکوباسيون:**

* انکوباسيون کشت هاي خون در C° 35 و حداقل 5 تا 7 روز به انجام مي رسد.
* براي کشت هاي اتومات معمولاً دستگاه روي 5 روز تنظيم مي شود.
* در موارد شک به قارچ ها، بروسلا و بیماری اندوکارديت مزمن انکوباسيون به مدت 6-4 هفته ادامه مي يابد. کشت هاي اتومات معمولاً در 5 روز اکثر موارد فوق را مثبت مي کنند.

**بررسي ماکروسکوپی و ميکروسکوپي و کشت:**

* در روش دستی طي مدت 7 روز شيشه هاي کشت خون بايد روزانه به صورت ماکروسکوپي از نظر علائم رشد شامل کدورت، ليزشدن، ايجاد گاز و ايجاد کلني هاي باکتري در سطح محيط جامد دوفازی از نظر وجود کلني بررسي شود و موارد مثبت کشت شوند. در ميان اين موارد، کدورت، قابل اعتمادترين مشخصه است و ساير موارد مانند ليز شدن به علت سرعت تخليه خون از سوزن يا ايجاد گاز در شيشه هاي vent نشده که ممکن است به فشار اوليه محيط مربوط باشد، چندان قابل اعتماد نيست.
* بعد از این بررسی روزانه، در مورد محيط هاي دوفازي، در روز اول 2 بار و سپس هر روز یک بار به آرامي با کج کردن بطري براي چند لحظه، فاز مايع را با تمام سطح جامد تماس می دهیم. با اين عمل کشت مجدد در خود محيط انجام مي شود. شيشه هاي کشت خون تک فازی نیز بعد از بررسی چشمی روزانه چند بار به آرامي هم می زنیم.
* در کشت هاي خودکار ويال ها هر 10 دقيقه يکبار به طور خودکار بررسي مي شوند و در صورت مثبت بودن هشدار مي دهند و نیاز به بررسی چشمی ندارند. همچنین در این کشت ها، دستگاه به طور اتومات ويالها را به آرامي تکان مي دهد و نیازی به این کار به صورت دستی نمی باشد.

**کشت و بررسی میکروسکوپی:**

**زمان کشت:** چون تعدادي از ارگانيسم ها مانند مننگوکوک و هموفيلوس معمولاً کدورت ايجاد نمي کنند بهتر است برای تمامی ویال ها (بدون کدورت یا با کدورت) پس از 18-6 ساعت، اولين کشت از محيط کشت خون انجام شود.

کشت های خون مجدد باید راس 48 ﺳﺎﻋﺖ و در صورت منفی بودن علائم ماکروسکوپی در بررسی روزانه، در آخرین روز (روز ﻫﻔﺘﻢ) ﺻﻮرت گیرد (زمان استاندارد کشت: روز اول، روز دوم و در نهایت روز هفتم).

**توجه:** اگر زمان کشت مجدد ویال کشت خون در آزمایشگاه وابسته به بررسی ماکروسکوپی است و در این بررسی هیچ علامت ظاهری از رشد دیده نمی شود، باید حداقل يک بار در فاصله زمانی 72 ساعت اوليه،کشت مجدد روی محیط شکلات آگار انجام شود و نتایج آنها ثبت گردد.

**نحوه کشت:** ﺟﻬﺖ ﺑﺮداﺷﺖ ﺧﻮن از ﻣﺤﯿﻂ کشت، درپوش ﻣﺤﯿﻂ کشت را ﺑﺎ الکل و ﺑﺘﺎدﯾﻦ ﺿﺪ عفونی کرده و بعد از چند بار هم زدن، مقدار حدود 25/0 تا 5/0 میلی لیتر را با سرنگ کشیده شده و روي محيط هاي شکلات آگار و بلادآگار و روي محیط مک کانکي يا EMB کشت شود. می توان یک تا دو قطره از کشت خون را با سر اصلی سرنگ بر روی محیط گذاشته و با لوپ استریل یا با خود سر اصلی سرنگ (به آرامی تا محیط پاره نشود) کشت را به به صورت زیگزاگی انجام داد.

* در کشت هاي خودکار در صورت مثبت شدن و هشدار دستگاه، ویال را خارج کرده و به روش گفته شده مشابه روی محیط های گفته شده کشت می دهیم.

**انکوباسیون:** محيط هاي بلادآگار و شکلات آگار را در شرایطCO2 (جار شمع دار یا انکوباتور CO2دار) و محیط مک کانکي يا EMB در هوای محیط انکوباتور گذاشته و براي حداقل 3 روز از نظر رشد به صورت روزانه بررسي مي شوند.

* در صورت منفی بودن کشت اول، ویال کشت خون و خود پلیت های کشت بايد دوباره انکوبه شوند. پلیت های کشت داده شده باید حداقل تا 72 ساعت در صورت منفی بودن انکوبه و روزانه بررسی شوند.
* منفی بودن کشت های خون نیز مهم است و می توان هر 24 ساعت به صورت سیستمی به پزشک گزارش شوند.
* **توجه** 1: پلیت شکلات آگار باید در اتمسفر CO2 انکوبه شود وبه مدت 3 تا 5 روز از نظر وجود رشد بررسی گردد.در موارد شناسايی باکتری های کند رشد، برای جلوگيری از خشک شدن پليت ها می توان آنها را در پارافيلم پيچيد و بيش از 5 روزانکوبه نمود).
* **توجه** 2: در مواردی که کشت مجدد منفی است توصيه می شود جهت افزايش احتمال جداسازی ارگانيسم، رنگ آميزی گرم انجام شود.

**بررسی میکروسکوپی:** در زمان کشت بر روی محیط ها باید يک قطره از محيط را روي لام نو قرار داده و پس از خشک شدن در زير هود و کنار شعله با متانول فيکس کرد و با رنگ گرم رنگ آميزي نمود و نتیجه آن در صورت مثبت بودن را سریعاً باید به پزشک گزارش نمود. تثبيت اسمير با متانول مورفولوژي سلولي و باکتريايي را حفظ مي کند، که ممکن است به ويژه براي تشخيص باکتري هاي گرم منفي در بين بقاياي گلبول قرمز ارزشمند باشد.

**گزارش و تفسير کشت خون**

1- **گزارش شفاهي**: گزارش لام گرم باید هم شامل نوع باکتری و هم مورفولوژی آن باشد، برای مثال در مورد شک به پنوموکوک و استافیلوکوک به ترتیب به صورت زیر گزارش خواهد شد:

Gram-positive diplococci (in pairs) were seen.

Gram-positive cocci in clusters were seen.

2- **گزارش کتبي**: جواب کشت مثبت يا منفي پس از مدت معين بايد ثبت شود.

براي کشت منفي بعد از 7 روز مي توان به صورت زير گزارش کرد:

No growth after 7 days /No growth in 1 week.

3- **زمان مثبت شدن**: در موارد کشت خون مثبت، زمان مثبت شدن باید قيد شود، به خصوص کشت هاي مثبت با نرمال فلور مانند استافيلوکوك هاي کواگولاز منفي زيرا سرعت جداسازي باکتری علاوه بر سيستم مورد استفاده مانند سيستم هاي خودکار که در جداسازي تعداد کم اين باکتري حساسيت بالايي دارند، با تعداد باکتري در ارتباط است و در مواردي که تعداد باکتري در خون بالاتر باشد و کشت سريعتر مثبت شود، عفونت واقعي محتمل تر است.

* استاف هاي کواگولاز منفي شايع ترين باکتري هاي جداشده از کشت هاي خون و در عين حال شايع ترين آلوده کننده هاي کشت خون هستند. کشت زير 24 ساعت مي تواند بسيار مهم و نشانه عفونت واقعی باشد، کشت بين 24 تا 48 ساعت هم داراي اهميت است ولي کشت مثبت بعد از 48 ساعت با باکتري هاي فلور طبيعي معمولاً نشانه آلودگي است.

4- **میزان آلودگی:**

* توجه شود اگر ميزان آلودگي کشت خون را 3% درنظر بگيريم، احتمال جداشدن دو آلوده کننده يکسان و شايع از دو شيشه کشت خون برابر 009/= 03/0 × 03/0يا به عبارتي کمتر از 1 در 1000 خواهد بود.

5- دو کشت خون مثبت در طول 48 ساعت با استرپتوکوك های گروه ويريدانس با ارزش است.

6- در کشت بيهوازي جداسازي کلستريديوم پرفرينجنس به احتمال بسيار زياد نشانه آلودگي است، ولي درباره بقيه کلستريديوم ها به احتمال بالاي 80 درصد عفونت واقعي رخ داده است.

7- عامل ايجاد کننده باکتريمي اکثراً يک ارگانيسم است، ولي در 5-3 درصد موارد ممکن است چند ميکروب عامل آن باشد؛ به ويژه در معتادان تزريقي، افراد دچار سوختگي وسيع و عفونت هاي با منشأ دستگاه گوارش.

8- جداسازي يکي از اعضاي گروه HACEK از کشت خون معمولاً با اندوکارديت عفوني همراه است.

9- ساير ارگانيسم هاي سختگير مانند کاپنوسيتوفاگا، روتيا دنتوکاريوزا، فلاووباکتريوم و کروموباکتريوم نيز ممکن است از کشت خون جدا شوند. تقريباً تمام عفونت هاي جريان خون با اين ارگانيسم ها، از جمله اندوکارديت، طي 5 روز پس از انکوباسيون جداسازي شده است.

**گزارش میزان کلی آلودگی:** نمونه های کشت خون مثبت در فواصل زمانی تعيين شده در آزمايشگاه (به طور متوسط 6 ماهه) از نظر شیوع آلودگی باید بررسی و نتایج آن ثبت شود. تشخیص آلودگی باید با هماهنگی پزشک معالج و پرستار یا پزشک کنترل عفونت انجام شود. میزان آلودگی3% یا کمتر مورد قبول است و در ارزیابی بالاترین نمره را دارد. میزان آلودگی بیشتر از 6 درصد نشانه مشکل در پروسه انجام یا نمونه گیری می باشد و باید اقدامات اصلاحی به انجام برسد. حضور فلور طبیعی مانند استافیلوکوک های کواگولاز منفی، دیفتروئیدها، میکروکوک و باسیلوس ها در کشت های خون معمولاْ جزو آلودگی در نظر گرفته می شوند. در صورت استفاده از کشت های خودکار خون اگر ساعت مثبت شدن با این باکتری ها بالای 24 ساعت باشد می توان آنها را جزو آلودگی حساب نمود.

**تشخيص عفونت هاي خوني وابسته به کاتتر**

براي تشخيص عفونت هاي خوني وابسته به کاتتر 5 روش اصلي پيشنهاد شده است: 1- کشت کيفي از خون و کاتتر، 2- کشت نيمه کمي از نوك کاتتر، 3- کشت کمي از نوك کاتتر، 4- مقايسه زمان مثبت شدن کشت کاتتر و کشت خون وريد محيطي در دستگاه خودکار، 5- استفاده از سيستم ليز-سانتريفيوژ برای کشت کمي.

**1. کشت کيفي از خون و کاتتر**

* در اين روش دو کشت مجزا از خون وريد و محل ورودي (هاب) کاتتر انجام مي شود.
* براي افزايش دقت، بايد در هنگام نمونه گيري از هاب در ابتدا محل ضدعفوني شود و با يک سرنگ مقداري از خون (تا حداکثر 10 میلی لیتر) کشيده و دور ريخته شود و با سرنگ دوم نمونه براي کشت تهيه شود.
* در پورت هاي نصب شده براي بيماران سرطاني و بقيه بيماران که احتمالاً خون در محل لخته شده است ابتدا باید با سرنگ مقداري سرم فيزيولوژي استريل حاوي هپارين رقيق شده را به پورت وارد کرده و سپس مقدار 10-5 میلی لیتر خون حاوی این هپارین تزریق شده کشيده و دور ريخته شود و بلافاصله با یک سرنگ دیگر نمونه گيري انجام شود. کشت مثبت در اين روش، هميشه دليل عفونت نيست و کشت منفي آن با ارزشتر است.
* يک مورد کشت خون مثبت از سوند با يک ارگانيسم نرمال فلور پوست نمي تواند نشان دهنده يک عفونت واقعي باشد و احتمالاً نشانه کلنيزه شدن است. تشخيص صحيح در کشت کيفي علاوه بر علائم باليني بر اساس اين موارد مهم است: 1-يک ارگانيسم مشابه در چند نوبت از کشت خون جدا شود. 2-زمان مثبت شدن کشت خون زیر 48 ساعت باشد (نشانه تعداد بيشتر باکتري). 3-يک باکتري مشابه با الگوی آنتی بیوگرام مشابه از خون وريدي و کاتتر به طور همزمان جدا شود.

**2. کشت نيمه کمي از نوك کاتتر**

* در کشت نيمه کمي نوك کاتتر (tip) کشت مي شود.
* معمولاً کشت نوك کاتتر به روش رولينگ روي پليت به انجام مي رسد که توضیح داده مي شود. درباره ارزش آن اختلاف نظر زيادي هست و حساسيت آن نسبتاً بالا ولي ويژگي آن کم است. بايد توجه داشت در مواردي که کلنيزاسيون در سطح خارجي سوند باشد، مانند سوندهاي کار گذاشته شده براي کمتر از 10 روز که منشأ آلودگي آنها معمولاً از سطح پوست است، اين روش ارزش بيشتري دارد.
* درباره استافيلوکوك ها محدوده با ارزش بيشتر يا مساوي 15 کلني رشد کرده ( CFU/tip15) است. در عفونت با گرم منفي ها، قارچ ها و استرپتوکوك گروهA که ممکن است در آنها عفونت واقعي با تعداد کمتر از CFU/tip 15 اتفاق بيافتد براي بالا بردن حساسيت محدوده CFU/tip 5 با ارزش در نظر گرفته شده است، ولي در اينجا ويژگي روش، کاهش مي يابد.
* کشت خون همزمان وريدي از رگ جداگانه براي مقايسه توصيه مي شود.

**روش انجام رولینگ**

1- محل ورود سوند به پوست را با الکل ضدعفوني و پس از خشک شدن، سوند را خارج مي کنيم.

2-به اندازه 5-4 سانتي متر آخر سوند را با قيچي استريل بريده و در لوله يا ظرف ادراري استريل گذاشته و در کمتر از 15 دقيقه و قبل از خشک شدن به آزمايشگاه مي رسانيم.

* سوند نبايد در سالين يا محيط ترانسپورت قرار گيرد چون سالين تعداد را رقيق و کاهش مي دهد و محيط ترانسپورت باکتری های جداره خارجي تيپ را به خود جذب و تعداد را کاهش مي دهد. در صورت ارسال اشتباه به این دو صورت گفته شده و کشت مثبت با کانت کمتر از 15 کلنی، برای جلوگیری از قضاوت اشتباه پزشک باید گزارش بدون کانت باشد و مي توان کامنت زير را به جواب اضافه کرد:

**Comment**: Unable to quantitate the culture because specimen received in transport media (or saline).

* در سوندهاي بلند در صورت دستور پزشک مي توان سوند نزديک به پوست را نيز به طور جداگانه کشت داد.
* اندازه کوتاه تر يا بلندتر از 5-4 سانتي متر در نتيجه آزمايش تأثير مي گذارد چون عدد 15≤ براي اين اندازه استاندارد شده است. در صورت رعايت نکردن زمان ارسال قبل از 15 دقیقه، مي توان نمونه را تا 2 ساعت در يخچال C° 4 نگهداري کرد.

3- نوك سوند را به وسيله پنس استريل چندين بار روي يک محيط بلاد آگار يا شکلات آگار با حرکت رفت و برگشت و غلت دادن (رولينگ) حرکت مي دهيم. با سواب هم مي توان غلتاندن را انجام داد. اگر احتمال مخلوط بودن با چند باکتري مي رود غلتاندن در قسمت اول پليت انجام شود و سپس به روش کشت 4 قسمتي کشت خطي به انجام برسد.

4- محيط را در انکوباتور C° 35 و در جارCO2 دار براي مدت 96-72 ساعت انکوبه و روزانه بررسي مي کنيم. در صورت مثبت شدن و وجود چند نوع کلني، هريک را جداگانه مي شماريم و گزارش مي دهيم.

5- نياز به تعيين حساسيت ميکروبي نيست، مگر به درخواست پزشک يا مثبت شدن همزمان کشت خون با همان باکتري مشابه.

**3. کشت کمي از نوک کاتتر**

* کشت کمي از نوک کاتتر در بين سه روش توضيح داده شده دقيق ترين روش است.
* در اين روش از محيط مايع استفاده مي شود و بسته به روش آزمايش، محدوده تعداد کلني با ارزش CFU/ml 102-103≤ گزارش شده است (103< بيشتر مورد توجه است).
* با يک پنس استريل، نوك کاتتر را در يک لوله استريل درپيچ دار قرار داده روي آن محيط مايع استريل مانندTSB بسته به طول آن به گونه اي که کامل روي آن پوشانده شود (معمولاً 5 میلی لیتر) مي ريزيم تا کاملاً غوطه ور شود (از سرم فيزيولوژي هم مي توان استفاده کرد)، يا مي توان تيپ را با پنس استريل داخل لوله استريل حاوي محيط مايع استريل از قبل تهيه شده انداخت. سپس لوله را در صورت وجود امکانات ابتدا سونیکاسیون کرده و سپس به شدت به مدت حداقل يک دقيقه ورتکس کرد تا کل باکتريها از تيپ جدا شده و وارد محيط مايع شود. سپس به روش کمي با کمک لوپ کاليبره یک صدم (یک لوپ پر) يا سمپلر (میزان 100 ميکروليتر) در محيط هاي بلاد آگار، شکلات آگار و در صورت شک به گرم منفي ها در محيط مک کانکي يا EMB کشت مي دهيم.
* در اين روش به خارج کردن کاتتر نياز نيست.
* اگر فقط نوع باکتري مهم است مي توان محيط براث حاوي تيپ را هم انکوبه کرد و در صورت ايجاد کدورت روي محيط هاي فوق کشت داد. اين کار و مقايسه رشد محيط براث و پليتها در رد آلودگي هم کمک کننده است.
* در نهايت تعداد کلني ها در 1 ميلي لیتر محاسبه مي شود و چون 5 میلی لیتر محيط اضافه شده است، هر تعداد باکتري به دست آمده در 5 ضرب مي شود. سپس عدد به دست آمده در عکس ضریب لوپ (100) ضرب می شود تا تعداد کل بر حسبCFU/ml به دست آید.

**4. مقايسه زمان مثبت شدن کشت کاتتر و کشت خون وريد محيطي**

* اين روش به دستگاه هاي کشت خون خودکار نسل جديد مثل بک تک و بکتي آلرت نياز دارد که پيوسته شيشه هاي کشت خون را از نظر رشد بررسي مي کنند.
* هرچه قدر تعداد باکتري موجود در خون بيمار بيشتر باشد، کشت سريع تر مثبت مي شود و با ارزش تر است. اگر کشت خون کاتتر 2 ساعت زودتر از نمونه خون محيطي و با یک باکتری مشابه مثبت شود، با ارزش است و نشان می دهد منشأ عفونت کاتتر بوده است (بار میکروبی بیشتری داشته است و بنابراین زودتر مثبت شده است).
* اين روش براي مراکز درماني بزرگ با تعداد کشت خون بالا روش بسيار مناسبي باشد. اين روش با توجه به عدم نياز به خروج سوند از بدن، سهولت و سرعت بالاتر توصيه مي شود.

**5. استفاده از سيستم ليز-سانتريفيوژ برای کشت کمي**

* در اين روش از سيستم ليز-سانتريفيوژ برای آماده سازی نمونه گرفته شده از کاتتر و خون محیطی استفاده می شود و نمونه ها پس از آماده سازي که قبلاً روش آن گفته شد به طور مستقيم روي محيط هاي جامد در پليت تلقيح شده و پس از زمان 72-24 ساعت تعداد کلني شمارش می شود.
* اگر نسبت تعداد باکتري نمونه خون کاتتر به خون وريدی 5:1 يا 10:1 باشد (1 وريد و 10 سوند) منشأ عفونت، کاتتر است و مشخص کننده سپتي سمي وابسته به کاتتر است.
* در اينجا کشت خون مثبت بايد با بالين بيمار مقايسه شود. در مواردي که کشت خون از کاتترهاي نوع Tunneld انجام مي شود، به کشت خون از وريد نياز نيست و تعداد 102≤ باکتري نشانه عفونت وابسته به سوند است.

**بررسي آلودگی ماده تزريقي**

* برای بررسي عامل عفونت در ماده تزريقی، چند میلی لیتر از ماده تزریقی در محيط کشت مايع مانند TSB تلقيح و به صورت هوازي و بيهوازي به مدت 10 روز در حرارت °C30-32 نگهداري مي شود.
* همزمان کشت خون از وريد بيمار انجام و نتیجه دو کشت مقایسه مي شود که اگر نتیجه باکتری مشابه باشد نشان دهنده آلودگی ماده تزریقی خواهد بود.

**کشت فرآورده هاي بانک خون**

* آلودگي فرآورده هاي خونی با باکتريها هر چند نادر اما با اهميت است.
* عوامل اصلي آلودگي اين فرآورده ها شامل موارد زير است: استافيلوکوک آرئوس و استافيلوکوک های کواگولاز منفي (از جمله استافيلوکوک اپيدرميديس)، انتروباکتر آگلومرانس، انتروباکتر کلواسه آ، اشريشياکلي، فلاووباکتريوم مننژوسپتيکوم، کلبسيلا پنومونيه، کوتی باکتريوم آکنه، سودوموناس آئروجينوزا، بورخولدريا سپاسيا، سودوموناس پوتيدا، سودموناس فلورسنت، سالمونلا کلراسوئيس و يرسينيا انتروکوليتيکا.
* تعدادي از باکتری های گرم منفي شامل سودوموناس پوتيدا، سودموناس فلورسنت، يرسينيا انتروکوليتيکا و گونه هاي انتروباکتر توانايي رشد و تکثير در دماي کم (°C 0-6) را دارند و حتي تعداد کم اين باکتري ها مي توانند در فرآورده هاي خوني در مدت 3-2 هفته مقادير زيادي اندوتوکسين توليد کنند که به شوك هاي خطرناك پس از تزريق منجر مي شود.

**روش تعيین عوامل آلودگي:**

براي تعیين عوامل آلودگي فرآورده هاي خوني، از شيشه هاي کشت خون به روش زیر استفاده مي شود:

1. میزان ml 20 از خون کيسه يا فرآورده هاي خوني مشکوك را در 4 شيشه کشت خون به طور مساوي (هر شيشه 5 میلی لیتر) تلقيح مي کنيم که حجم نهايي فرآورده تلقيح شده به محيط بايد 1:10 باشد. بطري ها را درC ° 35 و حرارت اتاقC ° 25 تحت شرايط هوازي و بيهوازي قرار مي دهيم (دو شيشه در شرایط هوازي و دو شيشه در شرايط بيهوازي در دو دماي فوق). در صورت وجود دستگاههاي خودکار از ويال هاي هوازي و بيهوازي استفاده مي کنيم.

2. ميزان نيم تا یک میلی لیتر از فرآورده را براي رنگ آميزي گرم استفاده مي کنيم و در صورت مثبت بودن، نيم میلی لیتر از فرآورده را مستقيماً روي محيط شکلات آگار و مک کانکی (در صورت مشاهده باکتری گرم منفی) تلقيح مي کنيم.

3. تا يک هفته رشد شيشه هاي کشت خون را بررسي مي کنيم. پس از 18 ساعت و 48 ساعت نيم میلی لیتر از محيط مايع را روي محيط شکلات و مک کانکي آگار ساب کالچر مي دهيم و همزمان رنگ گرم تهيه مي کنيم.

4. محیط های کشت تلقیح شده را حداقل به مدت 48 ساعت (ترجيحاً 5-3 روز) در حرارت مناسب انکوبه مي کنيم. درصورت منفي شدن نتايج کشت، احتمال آلودگي فرآورده هاي خوني بسيار کم است و در صورت مثبت شدن، براي تأیید، ارگانيسم بايد به طور همزمان از کشت خون وريدي بيمار نيز جدا شده باشد و به اين دليل، کشت همزمان از بيمار ضروري است. در صورتي که بيمار کاتتر عروقي داشته باشد، کشت بايد از کاتتر و ساير مايعات تزريقي نيز انجام شود تا بتوان منشأ واقعي عفونت را مشخص نمود.

**(4) موارد رد و تکرار نمونه**

* اطلاعات روی برچسب با اطلاعات درخواست شده مطابقت نداشته باشد، یا برچسب ناقص یا نمونه اصلاً برچسب گذاری نشده باشد (نام بیمار یا منبع نمونه متفاوت است). همچنین اگر نمونه خون بر سطح ویال به گونه ای ریخته باشد که مشخصات یا برچسب ناخوانا باشد باید نمونه رد و تکرار شود.
* ویال کشت خون باید در اختیار بخش های بیمارستان باشد و بلافاصله بعد از نمونه گیری، نمونه داخل آنها تزریق شود تا لخته نشود. ارسال نمونه خون به طور مستقیم با سرنگ باید رد و نمونه تکرار شود.
* همچنین اگر نمونه داخل ویال به خوبی هم زده نشده باشد و لخته واضح داخل ویال دیده شود، نمونه باید تکرار شود زیرا در نمونه های لخته شده جداسازی ارگانیسم ها دشوار است.
* اگر درب ویال کنده شده باشد یا شل باشد احتمال آلودگی وجود دارد و باید نمونه رد و تکرار شود. این مورد به خصوص در مورد کشت خون خودکار باید مدنظر قرار گیرد چون بعد از قرارگیری نمونه داخل دستگاه، محتویات آن داخل دستگاه خالی خواهد شد که می تواند منجر به خرابی دستگاه شود.
* زمان انتقال نمونه بیشتر از زمان توصیه شده پس از جمع آوری تا انجام باشد (برای مثال بیشتر از 2 ساعت برای کشت خون و بیشتر از 15 دقیقه برای نوک کتتر یا تیپ).
* اگر ویال کشت حاوی خون در یخچال قرار گرفته باشد نمونه باید تکرار شود.

**(4) محدوديت ها و تداخلات:**

در شرايط استاندارد و استفاده از نمونه گيرهاي کارکشته هم حدود 3 درصد کل کشت هاي خون گرفته شده از بيماران آلوده مي شوند. همچنين نشان داده شده است حدود نصف کل کشت هاي خون که مثبت شده اند، آلودگي بوده است. به اين دليل، تعداد کشت خون در رد آلودگي يا تعيين يک عفونت غيرمعمول با آلوده کننده ها، در کنار علائم باليني بسيار مهم است.

* درباره استافیلوکوکهاي کواگولاز منفي، با توجه به وضعيت باليني بيمار، گاهي براي تأیید عفونت واقعي به 4-3 کشت خون مثبت نياز است.
* هنگامي که فقط يک کشت خون انجام شود يا از چند نوبت کشت خون انجام شده، فقط يک نوبت کشت با آلوده کننده هاي شايع مثبت شود، احتمال آلودگي زياد است. در اين موارد به آزمايش تعيين حساسيت ميکروبي نياز نيست، مگر به درخواست پزشک. پس از گزارش باکتري (باکتري X) بهتر است توصيه به تکرار نمونه گیری به صورت زیر به جواب بيمار اضافه شود:

**Comment**: The bacterium X can be as normal microbiota (a Probable Contaminant). Repeat of sample with correct sampling is recommended.

**(5) نتایج بحرانی:**

* هر نتيجه مثبت کشت و اسمیر نمونه های خون، در هر رده سنی جزو نتایج بحرانی می باشد و بايد به صورت تلفني به پزشک اعلام شود چون ميزان مرگ و مير موارد سپتي سمي حاد که به شوک سمي منجر مي شود، 40-20 درصد است و این گزارش اولیه در درمان اولیه بسیار می تواند کمک کننده باشد.

**(6) مستندات و سوابق:**

* مستندات مربوط به نحوه نمونه گیری و کشت و تفسیر کشت خون باید در بخش موجود باشد.
* مستندات مربوط به دلایل رد نمونه باید در بخش موجود باشد.
* تمامی اطلاعات تماس و مستندات کشت و لام خون مثبت باید در فرم های مقادیر بحرانی ثبت گردد.
* در موارد کشت خون مثبت زمان مثبت شدن باید قيد شود، به خصوص کشت هاي مثبت با نرمال فلور مانند استافيلوکوك هاي کواگولاز منفي و مستندات آن موجود باشد.

**(6) منابع**:

1. کتاب آزمایشگاه باکتری شناسی پزشکی. جلد اول: تشخیص. دکتر داریوش شکری و همکاران. انتشارات تیمورزاده نوین و کیا. 1402.
2. کتاب آزمایشگاه باکتری شناسی پزشکی. جلد دوم: تفسیر کشت. دکتر داریوش شکری و همکاران. انتشارات تیمورزاده نوین و کیا. 1402.
3. کتاب آنالیز و کشت مایعات بدن. دکتر داریوش شکری و همکاران. انتشارات تیمورزاده نوین و کیا. 1403.
4. Baron EJ، Thomson RB Jr: Specimen collection، transport، and processing: bacteriology. In Versalovic J، et al، editors: Manual of clinical microbiology، Ed 10، Washington، DC، 2011، ASM Press، p. 228.
5. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th Edition, HHS Publication No. (CDC) 21-1112, Revised December 2009.
6. Committee on Infectious Diseases. 2006 red book: report of the Committed on Infectious Diseases. ed 27. Elk Grove Village، IL: American Academy of Pediatrics; 2006.
7. Isenberg D. Henry: *Clinical Microbiology Procedures Handbook*، American Society for Microbiology. 2007.
8. Koneman، Elmer W، et al. Color Atlas and Text book of Diagnostic Microbiology. *Philedelphia: Lippincott-Raven Publishers. Seventh edition.* 2021.
9. Mahon CR, Lehman DC. Textbook of Diagnostic Microbiology-E-Book: Textbook of Diagnostic Microbiology. Elsevier Health Sciences; 2022 Nov 2.
10. Tille، Patricia. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology-e-book*. Elsevier Health Sciences، fifteenth edition. 2021.