

کشت خون:

عفونت خون یکی از مهم‌ترین عفونت‌هایی است که بیماران مختلف در شرایط متفاوت ممکن است با آن مواجه شوند. به همین دلیل کشت خون یکی از متداول‌ترین نمونه‌هایی است که به آزمایشگاه میکروبی‌شناسی ارسال می‌گردد. به منظور جلوگیری از نتایج نادرست لازم است به استانداردهای مربوط به نحوه کشت، حجم خون مورد نیاز، زمان انجام، تعداد کشت، مدت زمان انکوباسیون و ... توجه شود.

جمع‌آوری صحیح نمونه:

قبل از هر اقدامی باید ویال کشت خون از نظر آلودگی (کدورت مایع، پارگی فاز جامد، رشد باکتری) و تاریخ انقضاء بررسی شود. سپس روی ویال به درستی برچسب گذاری شده به طوری که مشخصات بیمار، تاریخ نمونه گیری، بخش مربوطه و ... بر روی ویال درج گردد. بهتر است از ورید نمونه‌گیری شود (نه از شریان) و توصیه می‌گردد از محل کاتترهای خونی نمونه‌گیری انجام نگیرد زیرا احتمال افزایش آلودگی وجود دارد. ترجیحا برای کشت خون 2 تا 4 دفعه و هر بار از محل‌های مختلف نمونه‌گیری انجام گیرد. طبق توصیه CLSI بهتر است نمونه‌گیری از اندام‌های فوقانی صورت پذیرد زیرا خون گیری از اندام‌های تحتانی یا از شریان‌ها موجب خطر بیشتر برای بیمار شده و منجر به افزایش احتمال آلودگی نمونه می‌شود. در صورت امکان توصیه می‌شود نمونه‌گیری قبل از مصرف آنتی‌بیوتیک توسط بیمار انجام گیرد.

جهت خون‌گیری ابتدا موضع با الکل 70٪ تمیز شده سپس با محلول iodine-povidone %1-10 (یا کلرهگزیدین گلوکونات) ضد عفونی کرده و پس از خشک شدن موضع، مجددا جهت حذف ید و کلرهگزیدین با الکل تمیز می‌گردد. کلرهگزیدین گلوکونات برای شیرخواران کمتر از دو ماه نامناسب بوده

ولی در بزرگسالان دارای حساسیت نسبت به ید گزینه مناسبی است. به دنبال خونگیری باید خون را در عرض 1 دقیقه به محیط کشت تلقیح نمود. برای نوزادان زیر دو ماه ایزوپروپیل الکل 70٪ جهت ضدعفونی مناسب می‌باشد.

درب ویال‌های کشت خون نیز باید قبل از تلقیح با الکل 70٪ و محلول iodine-povidone %1-10 (بتادین) ضدعفونی گردد و محیط کشت تلقیح شده چندین بار تکان داده شود. نسبت حجم خون به حجم محیط کشت خون در مورد کودکان باید 1:10 تا 1:20 باشد، یعنی مقدار 1-3 ml خون به ازای 20 ml محیط کشت خون و در مورد بزرگسالان این نسبت باید 1:5 تا 1:10 باشد، یعنی 5-10 ml خون به ازای 50 ml محیط کشت خون.

بعد از انجام مراحل فوق، محیط‌های کشت بلافاصله باید به آزمایشگاه ارسال شده و به هیچ وجه نباید در یخچال یا فریزر نگهداری شوند. در آزمایشگاه نیز محیط‌ها باید هر چه سریع‌تر به انکوباتور 35°C منتقل شوند زیرا تاخیر در این کار باعث کاهش تیتراژ باکتری‌ها می‌گردد. کشت خون در بزرگسالان نباید در یک نوبت انجام شود زیرا این کار منجر به حجم ناکافی خون کشت داده شده و نتیجه منفی کاذب می‌شود.

تکنیک‌های آزمایشگاهی برای کشت خون:

تکنیک دستی:

دو نوع محیط کشت منوفازیک و دی‌فازیک وجود دارد. مزیتی که محیط دو‌فازی دارد این است که در صورت رشد باکتری بی‌هوازی در فاز جامد آن، امکان مشاهده رشد میکروارگانیسم میسر است. محیط کشت دو‌فازی از نظر بازیابی باکتری و قارچ از خون موثرتر از محیط منوفازی می‌باشد. توصیه می‌شود انکوباسیون محیط‌های کشت در انکوباتور 35°C شیکردار انجام شود. هم‌زدن بطری کشت خون منجر به افزایش اکسیژن رسانی در

جهت برداشت خون از محیط کشت، درپوش محیط کشت با الکل و بتادین ضد عفونی شده و حدود 0.5 میلی لیتر از نمونه به محیط آگار انتخاب شده منتقل می شود.

پس از ساب کالچر در محیط های کشت مناسب و رشد میکروارگانیسم ها، مجدداً رنگ آمیزی گرم شده و با نتیجه رنگ آمیزی مستقیم مقایسه می شود. بعد از انجام تست های تشخیصی جهت شناسایی دقیق تر و آنتی بیوگرام نتیجه نهایی به صورت کتبی گزارش می گردد.

سیستم اتوماتیک کشت خون:

فرایند بررسی دستی کشت های خون در بیمارستان‌ها همیشه طاقت‌فرسا، پرتکرار، پرخطر و همچنین با توجه به تمامی این موارد، با احتمال خطای بالا توسط پرسنل بوده است. با تکیه بر تکنولوژی‌های عصر نوین، فرآیندهای آزمایشگاه‌های میکروبی بالینی به سمت اتوماسیون پیش می‌روند تا بتوان در کمترین زمان ممکن به نتیجه دلخواه رسید. یک سیستم کشت خون اتوماتیک شامل کیت و دستگاه می‌باشد. هر کیت دارای یک بطری است. این بطری‌های کشت دارای یک محیط مایع مغذی، رزین‌های جاذب آنتی‌بیوتیک و همچنین یک سنسور در انتهای بطری هستند. هر کدام از بطری‌ها با تلقیح نمونه به داخل آن می‌تواند با قرار گرفتن در دستگاه، آلوده بودن نمونه به یک نوع پاتوژن را با تغییر رنگ سنسور خود در اثر تولید CO₂ توسط عوامل عفونی اعلام نماید. دستگاه با حفظ دما، هم زدن بطری‌ها و در نهایت خوانش اطلاعات رنگ‌سنجی انتهای هر بطری، کشت مثبت یا منفی را در زمان کوتاه‌تری اطلاع می‌دهد. در شرایطی که بیمار تحت درمان با آنتی‌بیوتیک باشد، رزین‌های جاذب آنتی‌بیوتیک موجود در ویال‌های کشت خون، با جذب آنتی‌بیوتیک نمونه، منجر به رشد بهتر عامل باکتریایی حاضر در کشت خون بیمار می‌شوند. مزیت مهم روش دستگاهی این است که در هر 12-24 دقیقه مانیتورینگ انجام می

محیط برات شده و افزایش رشد میکروارگانیسم ها و تشخیص سریع تر را در پی خواهد داشت.

محیط های کشت خون باید طی انکوباسیون در روز اول، دو بار و سپس به طور روزانه از نظر وجود علائم رشد میکروارگانیسم ها نظیر همولیز، لخته، کدورت، تولید گاز و وجود کلنی تا 7 روز بررسی گردند. از محیط های کشت خون، بر روی محیط شکلات آگار و بلاد آگار در فاصله زمانی 72 ساعت اولیه کشت مجدد انجام شده و نتایج آنها ثبت می گردد. لازم به ذکر است که پلیت شکلات آگار باید در اتمسفر CO₂ دار انکوبه شده و به مدت 3-5 روز از نظر وجود رشد باکتری بررسی گردد. در موارد شناسایی باکتری های کند رشد، برای جلوگیری از خشک شدن پلیت ها می توان آنها را پارافیلیم پیچید و بیش از 5 روز انکوبه نمود. توصیه می‌گردد جهت افزایش احتمال جداسازی ارگانیسم، 24-48 ساعت بعد از انکوباسیون از محتویات ویال کشت خون، رنگ آمیزی گرم یا آکریدین نارنجی انجام شود. البته باید توجه کرد که نتیجه رنگ آمیزی کشت خون با چالش هایی مواجه می باشد مثلاً برخی از باکتری ها مثل Abiotrophia اشکال و اندازه تیپیک ندارند. یا باکتری های فرانسسیلا بسیار کوچک هستند؛ به طوری که قابل تشخیص نیستند. مایکوپلاسماها رنگ گرم نمی‌گیرند و باید با آکریدین نارنجی رنگ آمیزی شوند و در رنگ آمیزی کمپلوباکتر، هلیکوباکتر و بروسلا بهتر است از کربول فوشین (به جای سافرانین) استفاده شود.

کشت های خون در موارد مشکوک به بروسلوز و اندوکاردیت مزمن یا باکتری های سخت رشد و عفونت های قارچی، حداقل به مدت 4 هفته انکوبه و بررسی می شوند. از آنجایی که کشت خون مثبت به عنوان یک داده بحرانی برای بیمار می باشد پس نتایج رنگ آمیزی و کشت‌های مثبت اولیه باید سریعاً به پزشک و سایر کادر درمانی مرتبط اطلاع رسانی گردد.

● گونه های لژیونلا: استفاده از محیط BCYE آگار و اغلب بعد از 5 روز انکوباسیون نیاز به ساب کالچر دارد.

● گونه های مایکوپلاسما: استفاده از محیط SP4 گلوکز در PH: 4.5

* برای تشخیص صحیح میکروارگانیسم هایی مانند لژیونلا، بارتونلا و مایکوپلاسما، روش هایی مانند تست های مولکولی یا روش های تشخیصی ایمونولوژیک بسیار کارآمد می باشد.

* مایکوباکتریوم ها در شرایطی که زمان انکوباسیون طولانی گردد قادر به رشد در محیط کشت خون معمولی هستند اما برای گرفتن نتیجه سریع تر افزودن اسیدهای چرب، آلبومین و CO₂ لازم است. دمای انکوباسیون برای گونه های مختلف از 25-35 °C متفاوت است. موارد مشکوک به مایکوباکتریوم ها باید تا یک ماه انکوبه شوند و جهت تلقیح خون به محیط کشت، نیاز به همولیز خون به منظور آزاد شدن باکتری های درون سلولی می باشد.

* یکی از مواردی که حین کار با کشت خون باید به آن توجه شود این است که احتمال پاشیدن خون به ویژه حین برداشت خون با سرنگ از ویال کشت خون وجود دارد؛ بنابراین کارکنان باید از محافظ صورت و چشم مقاوم در برابر مایعات و از هود ایمنی کلاس II یا II A B استفاده نمایند. همچنین به دلیل کار با نمونه خون احتمال انتقال عوامل عفونی دیگر همچون HIV، HCV، HBV و ... وجود دارد که مستلزم رعایت نکات ایمنی و دقت بالا می باشد.

* نتیجه کشت خون به فاصله 2-5 روز پس از شروع درمان در خون محیطی منفی نخواهد شد؛ بنابراین جهت اطمینان از نتیجه درمان نایستی در این بازه زمانی کشت مجدد انجام شود.

شود که این کار منجر به تشخیص سریع و شروع درمان به موقع بیماران می گردد.

در صورت اعلام مثبت بودن، باید ساب کالچر انجام شده و نوع باکتری و نتیجه آنتی بیوگرام گزارش گردد اما در شرایطی که کشت خون تا 5 روز در دستگاه انکوبه گشته و نتیجه مثبتی گزارش نشود نیازی به ساب کالچر نیست زیرا این کار فقط احتمال آلودگی و گزارش نتیجه اشتباه را افزایش می دهد.



نکته: در صورتی که نمونه مشکوک به باکتری های زیر باشد باید به موارد ذکر شده جهت ساب کالچر توجه شود:

● باکتری های گروه HACEK: این باکتری ها شامل 5 جنس از باکتری های گرم منفی از جمله هموفیلوس، آسینتوباسیلوس، کاردیوباکتریوم، اکینلا و کینگلا می باشند که یکی از عوامل اصلی اندوکاردیت عفونی هستند. باکتری های سخت رشدی هستند که جهت رشد خود نیاز به CO₂ دارند.

● گونه های بارتونلا: پلیت ها در دمای 35 °C در رطوبت بالا و حاوی CO₂ به مدت 14-21 روز باید انکوبه شود.

● گونه های کمپیلوباکتر: رشد بهتر در 42 °C و زمان انکوباسیون پلیت 48 ساعت می باشد.

● گونه های هلیکوباکتر: ساب کالچر بر روی بلاداگار غنی شده و انکوباسیون در شرایط میکرو هوازی به همراه اتمسفر هیدروژن