

# بِسْمِ اللّٰهِ الرَّحْمٰنِ الرَّحِیْمِ

نمونه گیری کشت میکروبی

سارا کتابفروش

کارشناس ارشد میکروبیولوژی پزشکی

# مقدمه

- ▶ نقش آزمایشگاه میکروب شناسی در شناسایی، کنترل و پایش عفونت های بیمارستانی انکارناپذیر است.
- ▶ از آنجا که بسیاری عفونت های بیمارستانی توسط میکروارگانیسم های فرصت طلب و کم ویرو لانس که در سطوح پوستی و مخاطی کلنیزه هستند، ایجاد می شود، جمع آوری صحیح و دقیق نمونه ها از محل تعیین شده به شناسایی دقیق عوامل بالقوه بیماریزا یا قطعاً بیماری زا کمک شایانی می نماید.

# عقودت های ادراری

# عفونت های ادراری

✓ عفونت های ادراری شایع ترین عفونت های بیمارستانی است که حدود ۱/۳ موارد را تشکیل میدهد.

➤ اکثر این عفونتها به دنبال استفاده مستقیم از وسایل و ابزار پزشکی در سیستم ادراری بوجود می آید که حدود ۸۰ درصد به علت استفاده از کاتترهای ادراری است.

➤ در بیمارانی که سوند ادراری دارند به ازای هر روز، ۵ درصد احتمال بروز باکتریوری وجود دارد و در افرادی که بین ۴ تا ۶ هفته سوند داشته اند، احتمال باکتریوری به ۱۰۰ درصد افزایش مییابد.

# دستور العمل جمع آوری نمونه های ادراری

## ۱- شرایط آمادگی بیمار قبل از جمع آوری نمونه

- در مواردی که بیمار سوند ادراری ندارد، بهترین نمونه اولین ادرار صبحگاهی است که حداقل به مدت ۸ ساعت داخل مثانه باقیمانده و تغلیظ شده در غیر اینصورت، میتوان از نمونه های ادرار تصادفی استفاده نمود.
- در نمونه ادرار تصادفی، بیمار ترجیحاً باید از آشامیدن آب و مایعات اضافی به منظور تولید ادرار خودداری نماید؛ زیرا این امر موجب رقیق شدن ادرار و کاهش تعداد باکتری می شود.

## ۲- بیماران دارای سوند ادراری

➤ در مواردی که از سوندهای ادراری طولانی مدت استفاده می شود، برای نمونه گیری، سوند را قبل از محل اتصال به لوله کیسه ادراری با یک پنس یا وسیله مشابه مسدود می نماییم.

➤ حدود ۰.۵ تا ۱ ساعت بعد لوله کیسه ادرار را جدا و محل اتصال را با الکل تمیز می کنیم و پس از خروج مقداری

ادرار، باقی نمونه را در ظرف استریل جمع می کنیم. همچنین، میتوان برای نمونه گیری از سرنگ یا سوند ادراری تازه تعویض شده استفاده نمود.

## توجه

□ نمونه گیری ادرار نباید از کیسهٔ سوند ادراری صورت گیرد.

□ نمونه گیری و کشت از نوک کاتتر فولی قابل قبول نیست.

## ▶ حجم نمونه ادراری

در افراد بزرگسال حداقل حجم ادرار 10ml است هر چند در شرایط خاص مثلا نوزادان ممکن است کمتر از 10ml هم باشد.

## ▶ شرایط نگهداری و انتقال

نمونه ادرار تهیه شده تا ۲ ساعت در حرارت اتاق و تا ۲۴ ساعت در یخچال قابل نگهداری است.

## شرایط رد نمونه ادراری

- ▶ نمونه های بدون برچسب مشخصات بیمار
- ▶ نمونه هایی که در ظرفهای نامناسب به آزمایشگاه رسیده باشد.
- ▶ نمونه ادرار ۲۴ ساعته
- ▶ نمونه ادراری که بیش از ۲ ساعت در حرارت اتاق مانده باشد یا نحوه نمونه گیری صحیح نباشد؛
- ▶ کشت از نوک کانتنر ادراری

# **Stool exam**

# **Stool culture**

## شرایط نمونه قابل پذیرش

- ▶ ۱- بهترین زمان دریافت نمونه:
  - ظرف ۳۰ دقیقه از زمان دفع، شکنندگی فوق العاده شیگلا در مدفوع
  - قابل قبول: تا ۲ ساعت احتمال کاهش ریکواری باکتری
- ▶ ۲- حجم: حداقل ۵ml در موارد اسهال آبکی، به اندازه یک گردو یا حدود ۱ گرم در موارد فرم
- ▶ ۳- ظرف
- ▶ جعبه مقوایی پارافینه یا ظروف پلاستیکی تمیز و در پیچ دار بدون نشستی مناسب
- ▶ ۴- شرایط بیمار:
  - از بیماران بیش از ۳ روز بستری کشت روتین درخواست نشود.

□ اگر مدفوع تازه برای کشت ارسال شود که در محیط انتقالی نیست ، نمونه باید پس از جمع آوری به آزمایشگاه منتقل و در مدت ۲ ساعت کشت داده شود. اگر کشت مدفوع اولیه منفی باشد ، نمونه های مدفوع دیگری می تواند برای آزمایش ارسال شود به شرطی که بیمار مدفوع را روزهای متوالی جمع آوری کند.

□ نمونه در مرحله حاد عفونت (معمولاً ۵ تا ۷ روز) ارسال شود ، زیرا عوامل بیماریزا با گذشت زمان کاهش می یابند.

# نمونه های غیرقابل قبول

- ▶ کشت مدفوع نباید برای بیمارانی که با آنتی بیوتیک های با طیف وسیع تحت درمان قرار می گیرند انجام شود ، زیرا این احتمال وجود دارد که درمان ضد میکروبی مسئول اسهال باشد.
- ▶ برای جمع آوری مدفوع از دستمال توالت استفاده نکنید ، زیرا ممکن است با نمکهای باریم آغشته شود ، که این مواد ارزشد برخی عوامل بیماری زای مدفوع جلوگیری می کنند.
- ▶ نمونه نباید با ادرار مخلوط شود.

## معیارهای رد نمونه مدفوع

- ۱- مدفوع اسهالی که ۲ ساعت پس از جمع آوری به آزمایشگاه ارسال نشده است قابل قبول نیست چون در صورت وجود شیگلا در مدفوع باکتری از بین میرود.
- ۲- چندین نمونه مدفوع از یک بیمار که در یک روز ارسال شده اند نباید کشت داده شود.
- ۳- کشت مدفوع دریافت شده از بیماران بزرگسالان و اطفال که به مدت ۳ تا ۴ روز در بیمارستان بستری شده اند رد میشود ، مگر اینکه بیمار به عنوان ویروس نقص ایمنی انسانی مثبت شناخته شود یا بیماری همه گیر وجود داشته باشد.

▶ ۴- مدفوع سفت و جامد راکه نمی توان برای تلقیح نمونه برداری کرد ، رد می شود.

▶ ۵. سواب خشک کشت داده نمی شود.

▶ ۶. بیش از سه مدفوع از یک بیمار در یک دوره ۳ هفته ای یا چندین نمونه دریافت شده در همان روز رد می شود.

# کشت خون، کانتورهاپی خونی

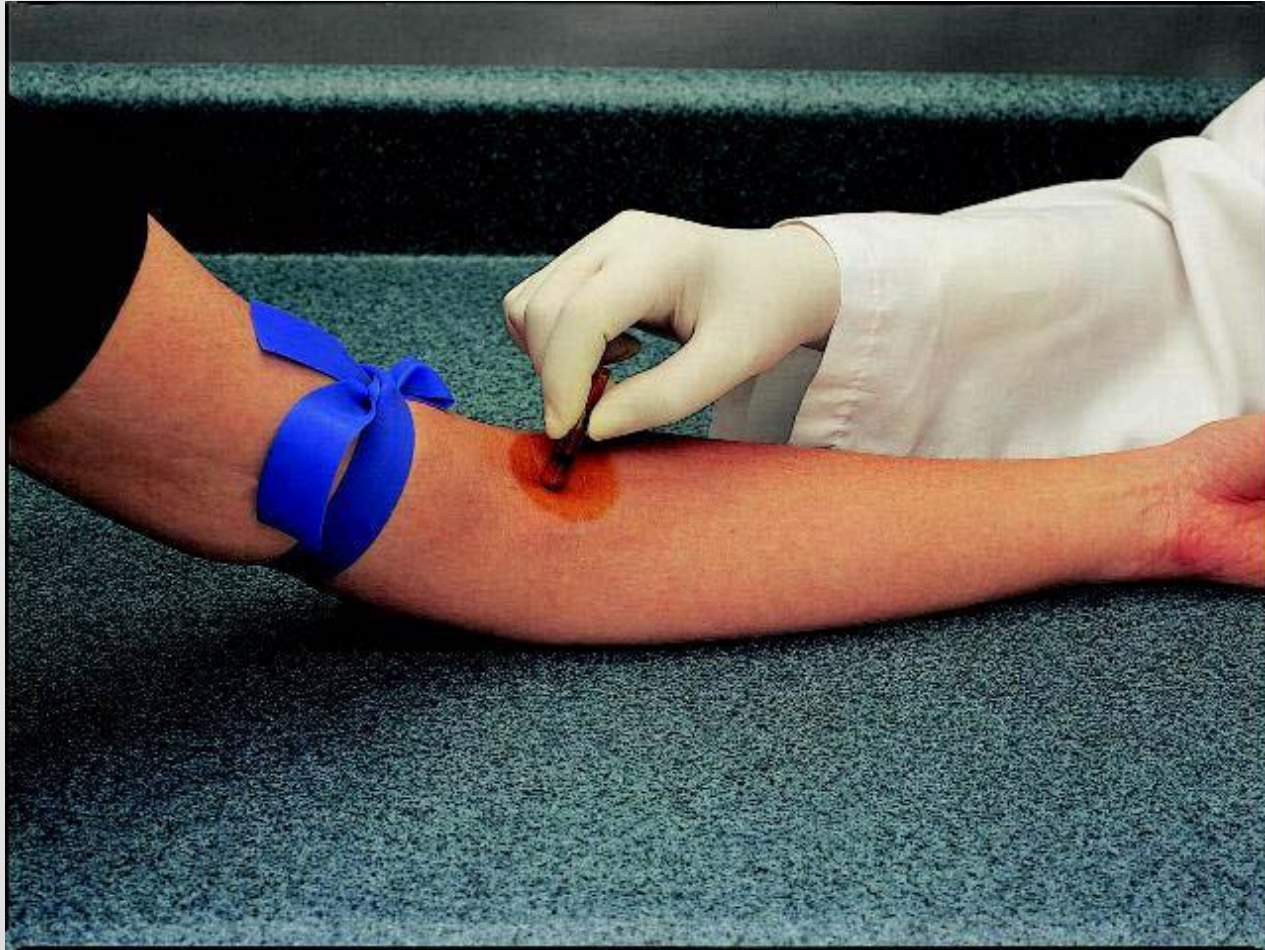
▶ خون یکی از مهمترین نمونه هایی است که آزمایشگاه میکروبیولوژی برای کشت دریافت می کند و کشت خون معمولاً حساس ترین روش برای تشخیص باکتری و قارچ است.

▶ در بهترین شرایط به طور معمول حدود ۳ درصد کشت های خون دچار آلودگی می شوند.

▶ مهمترین عوامل آلودگی استافیلوکوک های کوآگولاز منفی (شایعترین)، کورینه باکتریوم ها، میکروکوکها، باسیلوس های غیرگونه آنتراکس

# مواد ضد عفونی کننده برای نمونه گیری خون

- ▶ ۱. بتادین ۱۰ درصد
- ▶ ۲- محلول الکلی ۲ درصد کلرهگزیدین
- ▶ در حال حاضر، کلراهگزیدین بهترین ماده ضد عفونی کننده توصیه شده است. به ویژه در نمونه گیری از کاتترها، این ماده در بخشهای کودکان نتایج بهتری دارد (آلودگی کمتر) و عوارض پوستی که در کودکان با مصرف ترکیبات یددار ایجاد می شود در مصرف کلرهگزیدین کمتر است.



# نحوه نمونه گیری خون

- ▶ انتخاب ورید موردنظر
- ▶ ضد عفونی کردن پوست ناحیه با الکل ۷۰ درصد با حرکت محکم دورانی از داخل به خارج به قطر تقریبی 5cm
- ▶ پس از خشک شدن الکل همین کار را با بتادین (۱۰ درصد) انجام می دهیم و دقیقه صبر میکنیم تا موضع خشک شود.
- ▶ در صورت لزوم به لمس مجدد ورید باید نوك انگشت درحالی که با دستکش پوشیده شده است با بتادین ضد عفونی شود.
- ▶ درپوش لاستیکی بطری کشت خون باید با الکل ۷۰ درصد ضد عفونی و خشک شود.
- ▶ با دقت شیشه های کشت خون بوسیله خون گرفته شده تلقیح میگردد . لازم به ذکر است که هرگز نباید هوای داخل سرنگ به داخل شیشه کشت خون تزریق گردد.
- ▶ برچسب که شامل شماره بیمار ، نام بخش و زمان اخذ خون است در روی شیشه های کشت خون چسبانده میشود .

- ▶ کشت خون نباید از کاتترهای داخل وریدی در زمانی که این کاتترها نصب می شوند انجام شود.
- ▶ از خونگیری برای کشتها از کاتتر داخل عروقی ثابت باید تا حد امکان جلوگیری شود ، زیرا پورت ها اغلب با فلور پوست کلونیزه می شوند ، در نتیجه احتمال کشت مثبت کاذب افزایش می یابد.
- ▶ اگر کشت خون از یک لاین داخل وریدی گرفته شود ، یک نمونه دوم باید از یک محل رگ محیطی گرفته شود.

# حجم نمونه خون

- ▶ در افراد بزرگسال در هر نوبت حداقل ۱۰ سی سی خون
- ▶ به ازای هر ۱ سی سی خون احتمال جداسازی ۳ درصد زیاد می شود.
- ▶ در کودکان کمتر از ۱۰ سال تقریباً به ازای هر سال حداقل ۱ سی سی توصیه می شود.

# تعداد کشت خون، زمان نمونه گیری

▶ تعداد باکتری در مراحل حاد عفونت، در زمان تب و در کودکان بالاتر است.

❖ در باکتری می متناوب با یک کشت خون ۸۰ درصد و با سه کشت خون ۹۹ درصد عامل مشخص می شود.

-- یک عدد کشت خون به ندرت توصیه می شود. یک نتیجه مثبت کشت منفرد ممکن است قابل تفسیر نباشد ، مگر اینکه یک پاتوژن صریح جدا شود.

-- در صورت مشکوک بودن به باکتری می مداوم و احتمال پیش بینی باکتری می زیاد ، در مجموع دو مجموعه کشت خون کافی است.

▶ سه مجموعه کشت خون برای شرایطی مناسب است که در آن باکتری ناشی از یک عامل بیماری زا که احتمالاً به علت یک contamination نمی باشد پیش بینی شده است و هنگامی که احتمال باکتری کمی کم یا متوسط است.

▶ کشت های خون اول و دوم حتما باید از رگ های جداگانه نمونه گیری شود. سومین کشت خون باید چهار تا شش ساعت بعد انجام شود.

▶ کشت خون حتما باید قبل از شروع یا اوایل درمان آنتی بیوتیکی انجام شود.

# انتقال بطری های کشت خون

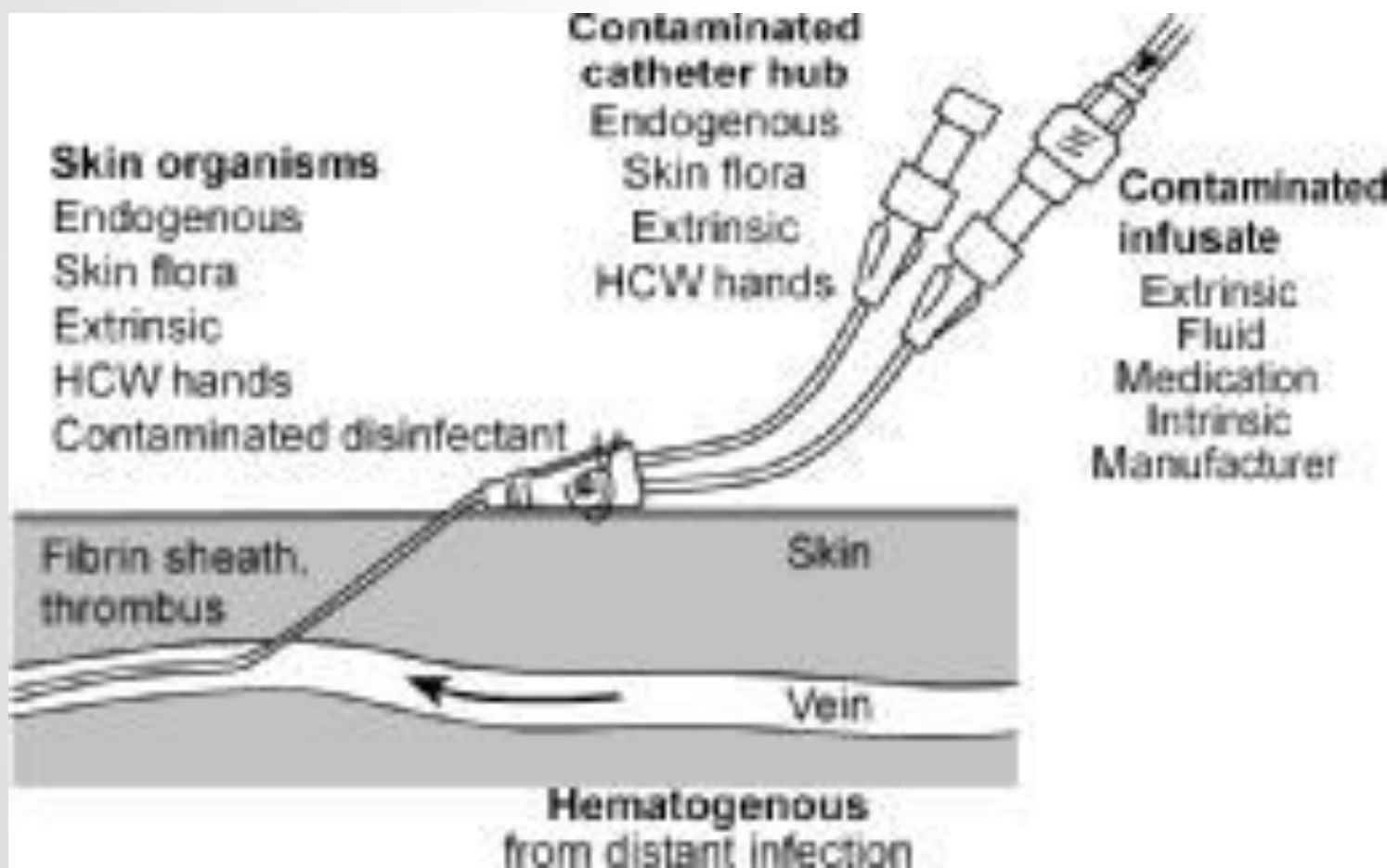
▶ در مدت ۲-۴ ساعت

▶ در حرارت اتاق

▶ بطری ها در شرایط زنجیره سرد و یخچال گذاشته نشود.

# کاتترهای خونی

- ▶ مهم ترین عامل استافیلوکوکوک ها به خصوص در بیماران نقص ایمنی
- ▶ توانایی تولید بیوفیلم در چسبیدن به سطح کاتترها
- ▶ استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) با ۸/۹ درصد اصلی ترین عامل
- ▶ میزان مرگ در عفونتهای وابسته به کاتترها ۱۹-۱۴ درصد است.
- ▶ استافیلوکوکوس کواگولاز منفی کمترین عامل مرگ و میر



# نمونه گیری و ارسال کاتتر به آزمایشگاه

- ▶ محل ورود کاتتر به پوست را با الکل ضد عفونی و پس از خشک شدن آنرا را خارج می کنیم.
- ▶ 4-5 cm آخر کاتتر کوتاه یا بلند را با قیچی استریل جدامی کنیم و در لوله استریل ارسال می کنیم.
- ▶ مدت زمان کمتر از ۱۵ دقیقه و قبل از خشک شدن
- ▶ سر کاتتر نباید در محیط ترانسپورت یا سالین قرار بگیرد.
- ▶ در صورت رعایت نکردن زمان، میتوان نمونه را تا ۲ ساعت در یخچال ۴ درجه نگهداری کرد.

# ڪرونا وروس covid-19

- ▶ کرونا ویروس ها خانواده بزرگی از RNA ویروس ها هستند که می توانند حیوانات و انسان ها را بیمار کنند.
- ▶ شایع ترین علائم بالینی عفونت COVID-19 عبارت اند از: تب (۸۷/۹٪)، سرفه (۶۷/۷٪) و خستگی (۳۸/۱٪)؛ اسهال (۳/۷٪) و استفراغ (۵٪)
- ▶ سندرم دیسترس تنفسی حاد (Acute respiratory distress syndrome) یا به اختصار ARDS ، حدوداً ۹ روز پس از شروع عفونت بروز می کند. این ویروس علاوه بر ریه به سایر بافت ها از جمله قلب، کلیه، کبد، چشم و سیستم عصبی آسیب می زند
- گیجی، فراموشی، تضعیف و محو شدن قدرت بویایی و چشایی و دردهای عصبی تا تشنج و سکته مغزی، از جمله علائم عصبی این ویروس اند که مربوط به کمبود اکسیژن خون و التهاب مغز است.

# تشخیص آزمایشگاهی

▶ لنفوپنی، ترومبوسایتوپنی، افزایش سطح D-dimer، CRP، ESR، LDH، CK، فریتین و طولانی شدن زمان پروترومبین (PT) در تعداد قابل توجهی از بیماران مشاهده می شود، در حالی که سطوح افزایش یافته ترانس آمینازها، آنزیم های قلبی و کراتینین در تعداد کمتری دیده می شود. ترومبوسیتوپنی و بالا بودن سطح D-dimer نیاز به ونتیلاتور، بستری شدن در ICU و میزان مرگ را افزایش می دهد. بالا بودن میزان IL-6 و IL-10 و همچنین پایین بودن تعداد سلول های CD4+T و CD8+T با شدت بیماری همخوانی دارد.

▶ IgM به عنوان اولین آنتی بادی از روز هفتم شروع به سنتز می کند و حدود روز ۲۱ بیماری ناپدید می شود. IgG از روز ۱۴ شروع به سنتز کرده و تولید آن ادامه پیدا می کند. دوره بدون علامت بیماری از زمان ابتلا تا روز پنجم و دوره شروع علائم بالینی از روز پنجم تا حدود هشتم است. بیماری از روز ۱۴ شروع به فروکش کردن می کند که با شروع شیفت پاسخ ایمنی هومورال از IgM به IgG همخوانی دارد. بیماری حدوداً تا روز ۲۸ برطرف می شود.

▶ تشخیص اسیدهای نوکلئیک ویروس با RT-PCR real-time روشی استاندارد برای تعیین آلودگی به کرونا ویروس هاست؛ هرچند این روش از ویژگی بالا ولی حساسیت پایینی برخوردار است، طوری که منفی کاذب داشته و زمان بر است. نتایج منفی باعث این نتیجه‌گیری شد که استفاده ترکیبی از CT, علائم بالینی و تست‌های آزمایشگاهی می‌تواند به تشخیص اولیه پنومونی ناشی از COVID-19 کمک کند.

▶ . تکنیک‌های ایمونواسی (سنجش میزان آنتی بادی IgM, IgG)، به عنوان ابزار مکمل در کنار تکنیک‌های مولکولی قرار می‌گیرند. این تکنیک‌ها سریع و ارزان قیمت‌اند، ولی حساسیت پایینی دارند و بهترین ابزار در مطالعات اپیدمیولوژیک بیماری و تشخیص بیماران فاقد علامت هستند.

# نمونه گیری کرونا

▶ قبل از انجام آزمایش، جمع‌آوری مناسب نمونه دستگاه تنفسی در زمان مناسب و از محل آناتومیک مناسب برای تشخیص سریع و دقیق مولکولی ویروس، ضرورتی حیاتی دارد. ۵ الی ۶ روز پس از شروع بیماری، میزان ویروس در مجاری تنفسی فوقانی و تحتانی بالاست و نمونه سوآپ نازوفارنکس و اوروفارنکس مناسب است. زمانی که نمونه‌گیری با تأخیر صورت می‌گیرد، بهترین نمونه از مجاری تنفسی تحتانی و از طریق لاواژ برونکوالوئولار به دست می‌آید.

# نمونه گیری از دستگاه تنفس

## سواب دهانی حلقی ( Oropharyngeal ) و بینی حلقی (Nasopharyngeal)

- ▶ تنها از سواب های با الیاف مصنوعی و دسته پلاستیکی استفاده شود. از سواب های دارای آلژینات کلسیم و سواب های دارای دسته چوبی استفاده نگردد چرا که دارای موادی هستند که ویروس ها غیرفعال نموده و باعث مهار آزمایش PCR می شوند.
- ▶ سواب ها بلافاصله در لوله استریل دارای ۲ الی ۳ سی سی ماده انتقال ویروس VTM- viral transport media قرار داده شوند.
- ▶ نمونه را تا زمان ارسال ( ماکزیمم 22 ساعت ) در درجه حرارت پائین یخچال 2 الی 8 درجه سانتی گراد نگهداری نمایید.
- ▶ اگر بیش از 22 ساعت برای ارسال نمونه زمان لازم است نمونه را در سرمای منفی 21 درجه سانتی گراد منجمد ( فریز ) نمایید و در شرایط منجمد آنرا منتقل نمایید.

▶ **سواب بيني حلقى ( نازوفارنژيال ):** سواب را بطور موازى با استخوان كام وارد بيني نموده و چند ثانيه در محل نگاه داريد تا ترشحات را جذب نمايد. از هر دو حفره بيني بايد نمونه تهيه شود.

▶ **سواب دهاني حلقى ( اوروفارنژيال ):** بدون برخورد سواب با زبان و لوزه ها، از ته حلق نمونه تهيه گردد.

# علل نتایج منفی کاذب تست PCR

- ▶ کیفیت پائین نمونه تهیه شده، مانند آلوده شدن نمونه ترشحات تنفسی با مواد موجود در حفره دهانی-حلقی.
- ▶ نمونه در مراحل خیلی زود یا خیلی دیر در سیر بیماری تهیه شده باشد.
- ▶ -حمل و نقل و نگهداری نمونه بدرستی انجام نشده باشد.
- ▶ -دلایل تکنیکی منجر به منفی شدن نمونه می شود.



**THANK YOU  
FOR YOUR  
ATTENTION**