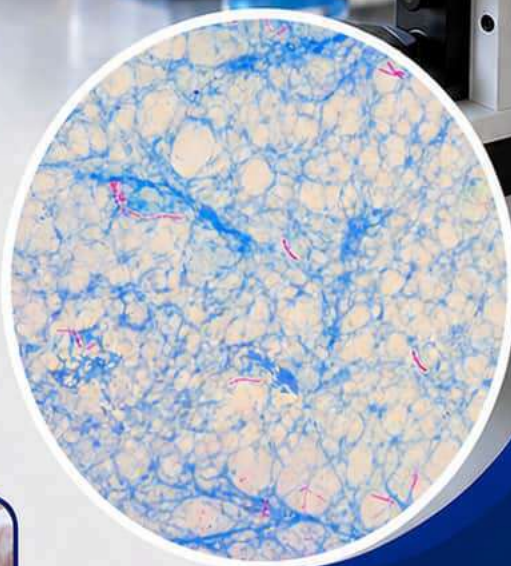




دانشگاه علوم پزشکی تبریز
معاونت بهداشت

دستورالعمل های تشخیص آزمایشگاهی بیماری سل

به روش اسمیر مستقیم میکروسکوپی و کشت



اسمیر مستقیم میکروسکوپی

بررسی سریع و اولیه

باسیل های اسید فست (AFB)



کشت

تشخیص قطعی و تعیین

حساسیت دارویی



کنترل و تضمین کیفیت

در آزمایشگاه های

مایکوباکتریولوژی



آزمایشگاه مرجع منطقه ای سل

معاونت بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تبریز

پیش‌گفتار

بسمه تعالی

تشخیص صحیح، سریع و استاندارد بیماری سل، یکی از ارکان اساسی برنامه کنترل سل و تضمین سلامت جامعه است. کیفیت خدمات آزمایشگاهی و اجرای دقیق دستورالعمل‌های استاندارد، نقش تعیین‌کننده‌ای در شناسایی بیماران، آغاز به‌موقع درمان و پیشگیری از انتقال بیماری دارد.

این مجموعه با عنوان "دستورالعمل‌های تشخیص آزمایشگاهی بیماری سل به روش اسمیر مستقیم میکروسکوپی و کشت" با هدف یکسان سازی فرآیندهای آزمایشگاهی، ارتقای کیفیت خدمات تشخیصی و فراهم نمودن مرجعی کاربردی برای کارشناسان آزمایشگاه‌های تشخیص سل تدوین شده است.

تدوین این دستورالعمل حاصل تلاش، تجربه و همت کارشناسان آزمایشگاه مرجع منطقه‌ای سل شبکه آزمایشگاهی معاونت بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تبریز بوده و بر اساس آخرین دستورالعمل‌های ملی و منابع معتبر علمی تهیه گردیده است.

به منظور تسهیل در ارجاع، آموزش، بازنگری و به‌روزرسانی، تمامی دستورالعمل‌های این مجموعه بر اساس کد اختصاصی طراحی و شماره‌گذاری شده‌اند. این کدها امکان شناسایی سریع هر دستورالعمل، ثبت تغییرات و مدیریت نسخه‌ها را فراهم می‌سازد. همچنین در پایان هر دستورالعمل، منابع و مراجع علمی مورد استفاده، شامل دستورالعمل‌های ملی، راهنماهای سازمان جهانی بهداشت (WHO)، مراکز کنترل و پیشگیری از بیماری‌ها (CDC) و سایر منابع معتبر علمی، درج شده است تا امکان استناد، مطالعه بیشتر و بازنگری علمی برای کاربران فراهم باشد.

بدیهی است هیچ دستورالعملی بی‌نیاز از بازنگری و اصلاح نیست. از این‌رو، از تمامی اساتید، متخصصان، کارشناسان و همکاران محترم درخواست می‌شود پیشنهادهای، انتقادهای و دیدگاه‌های اصلاحی خود را به‌صورت مکتوب از طریق پست الکترونیکی زیر ارسال فرمایند.

پست الکترونیکی:

firoozi.saeed@tbzmed.ac.ir

آزمایشگاه مرجع منطقه‌ای سل

معاونت بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تبریز

(SOP) دستورالعمل تهیه رنگ فوشین قلیائی ۰/۳ درصد

روش رنگ آمیزی زیل-نلسن به توانایی منحصر به فرد دیواره های سلولی میکوباکتری ها در حفظ رنگ اولیه علی رغم رنگ زدایی با محلول اسید-الکل متکی است. رنگ اولیه مورد استفاده در این روش، کاربول فوشین، محلولی حاوی رنگ فوشین و فنل است. اثربخشی رنگ کاربول فوشین به شدت به غلظت هر دو رنگ فوشین و فنل وابسته است. فنل به عنوان یک ماده ی خورنده عمل می کند و نفوذ رنگ را به دیواره ی سلولی مومی میکوباکتریوم تسهیل می کند.

مطالعات نشان داده اند که تغییر غلظت فوشین بازی در رنگ آمیزی زیل-نلسن می تواند بر حساسیت آن تأثیر بگذارد. همچنین غلظت فنل نیز یک عامل حیاتی است، به طوری که کاهش غلظت فنل به طور بالقوه منجر به کاهش میزان مثبت بودن اسمیر می شود.^۲

۱-۲ ویژگی های رنگ فوشین بازی

فوشین بازی از لحاظ بیوشیمی متعلق به گروه تری فنیل متان است. رنگ فوشین بازی رنگ پودری دارای گواهی نامه کمیسیون رنگ بیولوژیکی (BSC) برای رنگ آمیزی و شناسایی میکروسکوپی موسین ها، اجسام نگری و ارگانیس م های مقاوم به اسید استفاده می شود و دارای مجوز برای رنگ آمیزی اسید-فاست، به عنوان محیط کشت ENDO و به عنوان معرف شیف در تکنیک های پرئودیک اسید فاست (PAS) و فولگن می باشد. فوشین بازی همچنین برای رنگ آمیزی لیگنین در نمونه های بافت گیاهی استفاده می شود.^۱

فوشین بازی ترکیبی از رنگ های روزانیلین، پاراروزانیلین، فوشین جدید (New Fuchsin) و مگنتا II است. تمام ترکیبات این رنگ در آب و الکل محلول هستند.^۲

فوشین بازی محلول در محلول های فنلی به عنوان تقویت کننده رنگ عمل می کند و فوشین کربول (carbol fuchsin) نامیده می شود، در نتیجه فرآیند رنگ آمیزی را تسهیل می کند.^۲

کیفیت فوشین بازی از نظر خلوص و حلالیت در بین تولیدکنندگان مختلف متفاوت است. میزان فوشین بازی باید ۸۵ تا ۸۸ درصد وزن را تشکیل دهد. اگر خلوص کربول فوشین در برچسب موجود روی آن مشخص باشد، باید از آن برای محاسبه غلظت نهایی رنگ ۰/۳ درصد استفاده شود. برای محاسبه ضریب تصحیح مقدار مورد نیاز فوشین بازی، مقدار واقعی را بر میزان رنگ تقسیم کنید. به عنوان مثال، اگر میزان رنگ ۷۵ درصد باشد، باید مقادیر را بر ۰/۷۵ تقسیم کنید. بنابراین ۳ گرم بر ۰/۷۵ = ۴ گرم برای رنگ ۰/۳ درصد وزن می شود. اگر از پودری با میزان رنگ بیش از ۸۵ درصد استفاده شود، نیازی به محاسبه ضریب تصحیح نیست.^۳ اگر خلوص رنگ مشخص نیست یا اگر فوشین بازی به خوبی حل نمی شود یا رسوبات پس از فیلتراسیون هنوز قابل مشاهده هستند، استفاده از غلظت بالاتر (۱ درصد) هنگام تهیه معرف رنگ آمیزی توصیه می شود.^۴ توصیه می شود که درانتخاب و خرید فوشین بازی دقت لازم بعمل آورده شود تا پودر فوشین اصل تهیه شود. برای استفاده از پودرهای اصلی موارد زیر را می توان مورد توجه قرار داد:^۵

- برچسب روی شیشه باید ثابت و در صورت کشیدن انگشت مرطوب روی نوشته ها، پخش نشود.
- رنگ پودر اصلی (فوشین و متیلن بلو) باید رنگ سبز یشمی باشد و در صورت مشاهده رنگ های دیگر، اصل بودن رنگ زیر سوال خواهد رفت.
- در صورت استفاده از رنگ های تجاری مانند برند کمپانی مرک Merck، دقت نمایید که در مشکی آن قبل از باز شدن پرچها در جا به مقدار ۵ درجه می پیچد و سپس پلمب در باز می شود. در شیشه

های پودرهای قلبی بدلیل پرس بودن، خلاصی فوق را نداشته و به محض پیچاندن پلمب، در باز می شود.

○ ماهیت رنگها بصورت پودر یا گرانول ریز است. مشاهده گرانولهای بزرگتر نشان دهنده پایان تاریخ انقضای رنگ است. در این صورت در گستره رنگ آمیزی شده رسوب مشاهده خواهد شد.

○ نگهداری، پایداری و تاریخ انقضا: رنگ پودری فوشین بازی را در بسته‌بندی اصلی محکم بسته شده در دمای بین ۱۵ تا ۲۵ درجه سانتیگراد در مکان‌های خشک نگهداری کنید. از یخ زدگی جلوگیری شود و از قرار گرفتن در معرض نور مستقیم خورشید خودداری شود. تاریخ تولید و انقضا روی برچسب محصول چاپ شده است.^۱

همچنین در فرآیند تهیه محلول فنل دقت لازم به عمل آورده شود که کریستال‌های فنل باید بی‌رنگ باشند. با توجه به خاصیت خورنده و سمی بودن کریستال فنل ممکن است باعث سوختگی شوند. لطفاً از تماس با پوست و مخاط خودداری کنید و در مکانی با تهویه مناسب محلول را تهیه کنید.^۱

مواد مورد نیاز جهت تهیه محلول کربول فوشین ۰/۳ %	
فوشین بازیک	۴ گرم با احتساب ناخالصی مطابق دستورالعمل آزمایشگاه مرجع یا ۳ گرم بر اساس دستورالعمل آزمایشگاه سوئد با محاسبه ضریب تصحیح
اتانول ۹۶ درصد	۱۰۰ میلی لیتر
کریستال فنل	۵۰ میلی لیتر
آب مقطر	۸۵۰ میلی لیتر

۲-۲ روش تهیه رنگ فوشین قلیائی

برای تهیه محلول کربول فوشین ۰/۳ درصد موارد زیر را به ترتیب انجام دهید:

۱- ابتدا کریستال فنل را در بن ماری با دمای ۴۲ درجه سانتی گراد ذوب نمایید (با توجه به طولانی بودن زمان ذوب شدن کریستال فنل در این مرحله ، توصیه می شود از دمای ۵۴ درجه سانتی گراد بن ماری استفاده شود. بهتر است درب محفظه کریستال فنل در این فرآیند کمی شل باشد و فرایند ذوب شدن برای مقدار مصرف مورد نیاز لازم است و نیازی به ذوب کردن تمام کریستال فنل داخل محفظه نمی باشد).

۲- برای تهیه محلول شماره ۱ فوشین، در یک بالن ته صاف مقدار ۳ تا ۴ گرم (پس از محاسبه با ضریب تصحیح) از پودر رنگ فوشین بازیک را در ۱۰۰ میلی لیتر اتانول ۹۶ درصد (یا الکل مطلق) حل کنید. در بالن را با پارافیلیم پوشانده و هم می زنیم تا پودر کاملاً حل شود.

۳- برای تهیه محلول شماره ۲ فنل، در زیر هود شیمیایی میزان ۸۵۰ سی سی آب مقطرتازه (پیشنهاد می شود از آب مقطر تازه استریل استفاده شود) را در ارلن یک لیتری ریخته، سپس به آرامی ۵۰ سی سی فنل مایع ذوب شده در مرحله اول را به آن اضافه کرده، در آن را کاملاً بسته و داخل بن ماری قرار دهید تا محلول گرم بماند.

۴- وجود پودر یا کریستالهای باقی مانده در قسمت پایین بالن ته صاف حاوی الکل ۹۶ و فوشین بازیک (محلول شماره ۱) را بررسی کنید. در صورت وجود هرگونه رسوب، فلاسک را در داخل بن ماری با دمای ۵۴ درجه سانتی گراد قرار دهید.

۵- در زیر هود شیمیایی به آرامی محلول رنگ شماره ۱ رنگ را به محلول شماره ۲ فنل اضافه کرده و هم زده

تا یکدست شود. شود. سپس در ارن را بسته و آن را داخل ظرف آب سرد قرار داده تا به آرامی سرد شود. رنگ را با کمک قیف و کاغذ صافی در شیشه قهوه ای رنگ تمیز نگهداری نمایید.

۲-۳ نگهداری محلول رنگ فوشین بازیک ۳/۰ درصد

ظرف های حاوی معرف های تازه تهیه شده باید تا زمان انجام مراحل کنترل کیفیت و ارزیابی نتایج در بسته و پوشانده شوند. محلول ها باید در بطری های قهوه ای تمیز نگهداری شده و به وضوح برچسب گذاری شوند. برچسب باید نام معرف، غلظت و تاریخ تهیه و نام تهیه کننده محلول را نشان دهد.^۴ معرف هایی که در بطری های محکم بسته نگهداری می شوند، می توانند ۶ ماه تا یک سال استفاده شوند. بطری ها باید دور از نور مستقیم خورشید نگهداری شوند.^۴

اگر در مدت نگهداری رنگ، رسوبات و ذراتی در محلول کربول فوشین تشخیص داده شوند محلول باید دوباره فیلتر شده و تاریخ فیلتراسیون مجدد رنگ بر روی بطری ثبت شود.^{۳و۶}

۲-۴ کنترل کیفیت محلول های رنگ آمیزی تازه تهیه شده

باید پس از تهیه محلول های رنگ آمیزی، بررسی های کنترل کیفیت برای هر سری ساخت از معرف ها انجام شود. انجام کنترل کیفیت برای اطمینان از اثربخشی محلول های رنگ آمیزی و مشاهده باسیل های اسید فست در لام کنترلی مثبت و عدم وجود باسیل اسید فست در لام کنترل منفی ضروری است.^۴

بر اساس توصیه آزمایشگاه فراملی رفرانس سل سوئد، کنترل کیفیت محلول رنگ آمیزی کربول فوشین ۳/۰ درصد تازه تهیه شده، با رنگ آمیزی و بررسی دو اسمیر با گزارش موردی (scanty) یا ۱+ مثبت که یک بار رنگ آمیزی شده اند و دو اسمیر منفی که سه بار رنگ آمیزی شده اند، انجام می شود.^۳

رعایت این نکته ضروری است که اسمیر بیمار فقط باید زمانی بررسی و گزارش شود که اسلایدهای کنترل رنگ قابل قبول باشند. اگر اسلایدهای کنترل غیرقابل قبول باشند، باید روش ها و آماده سازی معرف ها بررسی شود. پس از شناسایی و اصلاح مشکل، تمام لام های بیمار باید با مجموعه ای جدید از کنترل ها تکرار و بررسی شوند.^۶

لازم است نتایج کنترل کیفیت در یک دفتر ثبت شود و برای هر سری ساخت، نام محلول و تاریخ آماده سازی آن از روی برچسب شیشه ها نوشته شده و سری ساخت رنگ روی لام های کنترل ثبت گردد و این لام ها در جعبه لام مخصوص نمونه های کنترل رنگ، به مدت ۱ سال نگهداری شود.^{۴و۵}

References:

- 1- National Center for Biotechnology Information (2026). PubChem Compound Summary for basic fuchsin.
- 2- A Comparative Guide to Fuchsin-Based Stains for Acid-Fast Bacilli Detection: New Fuchsin and Carbol Fuchsin Date: December 2025 <https://share.google/IGTyAOWNAvzKXxh2T>
- 3- Handbook on tuberculosis laboratory diagnostic methods in the European Union – Updated 2025. Stockholm: ECDC; 2025.
- 4- https://www.aphl.org/programs/infectious_disease/tuberculosis/TBCore/TB_AFB_Smear_Microscopy_TrainerNotes.pdf
- 5- National Standard Operating Procedures for Tuberculosis laboratory version 2 January, 2017

۶- دستورالعمل تشخیص آزمایشگاهی باسیل های اسید فست (مایکوباکتریوم های توبرکلوزیس و غیر توبرکلوزیس) به روش بررسی میکروسکوپی گستره مستقیم- آزمایشگاه مرجع سلامت وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی ویرایش ۱۴۰۴

تهیه شده در آزمایشگاه مرجع منطقه ای سل معاونت بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تبریز

(SOP) دستورالعمل تهیه محلول اسید الکل ۳ درصد

مواد لازم برای تهیه محلول اسید الکل ۳ درصد	
۳۰ میلی لیتر	اسید هیدروکلریک غلیظ
۹۷۰ میلی لیتر	الکل اتانول ۹۶ درجه

۳-۱ ویژگی های محلول اسید هیدروکلریک غلیظ

اسید هیدروکلریک غلیظ (۳۸-۳۶٪) مایعی بی‌رنگ با بوی تند و آزاردهنده است. این اسید بسیار خورنده^۲ اما غیرقابل احتراق است. در آب، الکل و بنزن محلول است. برای حمل و نقل، اسید هیدروکلریک در دسته مواد خطرناک کلاس ۸ یا مواد خورنده (Corrosive) قرار می‌گیرد. این ماده یک محرک قوی برای چشم و پوست است و بخارات آن در صورت استنشاق مضر هستند.^۱

قرار گرفتن در معرض استنشاق حاد (کوتاه مدت) اسید هیدروکلریک ممکن است باعث سوزش و التهاب چشم، بینی و دستگاه تنفسی و ادم ریوی در انسان شود. قرار گرفتن در معرض حاد دهانی ممکن است باعث خوردگی غشاهای مخاطی، مری و معده شود و تماس پوستی ممکن است باعث سوختگی شدید، زخم و اسکار پوستی در انسان شود.^۱

بسیاری از اسیدهای قوی از طریق دنا توراسیون پروتئین‌ها و هیدرولیز جزئی پروتئین‌ها باعث سوختگی بافت می‌شوند. اکثر پروتئین‌ها در pH کمتر از ۳ یا ۴ دناتوره می‌شوند. دنا توراسیون گسترده پروتئین‌ها، داستریفیکاسیون لیپیدها و خشک شدن بعدی بافت‌ها منجر به سوختگی شیمیایی می‌شود. علائم شامل خارش، سفید شدن یا تیره شدن پوست یا بافت‌ها، تاول زدن و احساس سوزش است.^۳

۳-۲ روش تهیه محلول اسید هیدروکلریک غلیظ

برای آماده کردن محلول اسید الکل ۳ درصد مقدار ۳۰ میلی از اسید کلریدریک غلیظ (۳۷ درصد) را زیر هود داخل یک استوانه مدرج به آرامی اندازه گیری کرده سپس در مقدار ۹۷۰ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد که از قبل در یک ارلن مایر ۲ لیتری (فلاسک) آماده کرده اید به آرامی و بادقت جریان اسید را در امتداد قسمت داخلی آن هدایت کنید. ارلن مایر را به آرامی به هم بزنید تا اسید و الکل کاملاً مخلوط شوند.^۴ پس از حل شدن نام و غلظت محلول، تاریخ تهیه، نام تهیه کننده با برچسب روی شیشه ثبت شده و به صورت درب بسته در بطری تیره رنگ به دور از نور خورشید در داخل کابینت نگهداری شود.^۴

۳-۳ روش تهیه محلول اسید هیدروکلریک غلیظ

- همیشه اسید را به آرامی به محلول الکل اضافه کنید نه برعکس.^۴
- لطفا هنگام کار با اسید همیشه از روپوش مناسب، دستکش و عینک ایمنی محافظ آزمایشگاهی استفاده کنید. در صورت مواجهه با اسید، قسمت آسیب دیده بدن را بلافاصله با آب فراوان بشویید.^۱
- برای کاهش قرار گرفتن در معرض بخارات سمی فنل، معرفها و محلول رنگ آمیزی حاوی فنل باید در مکانی با تهویه مناسب یا در کابینت ایمنی شیمیایی تهیه شوند.^۵

۳-۴ کنترل کیفیت محلول اسید هیدروکلریک غلیظ

باید پس از تهیه محلول های رنگ آمیزی، بررسی های کنترل کیفیت برای هر سری ساخت از معرف ها انجام شود. انجام کنترل کیفیت برای اطمینان از اثربخشی محلول های رنگ آمیزی و مشاهده باسیل های اسید فست در لام کنترلی مثبت و عدم وجود باسیل اسید فست در لام کنترل منفی ضروری است.^۵ نتایج کنترل کیفی باید در دفتر یا فرم مربوط ثبت شود.^۴

References:

- 1- National Center for Biotechnology Information (2026). PubChem Compound Summary for CID 313, Hydrochloric Acid. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hydrochloric-Acid>.
- 2- [ILO-WHO International Chemical Safety Cards \(ICSCs\)](#)
- 3- 3- Acute Exposure Guideline Levels for Selected Airborne Chemicals Volume 4/2004
- 4- 4-Handbook on tuberculosis laboratory diagnostic methods in the European Union – Updated 2025. Stockholm: ECDC; 2025.

۵- دستورالعمل تشخیص آزمایشگاهی باسیلهای اسید فست (مایکوباکتریومهای توبرکلوزیس و غیر توبرکلوزیس) به روش بررسی میکروسکوپی گستره مستقیم- آزمایشگاه مرجع سلامت وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی ویرایش ۱۴۰۴

(SOP) دستورالعمل تهیه رنگ متیلن بلو ۰/۳ درصد

۴-۱ ویژگی های رنگ متیلن بلو

متیلن بلو یک نمک کلرید آلی و یک رنگ رایج که با خواص آنتی اکسیدان، عامل ضد میکروبی، ضد افسردگی، مهارکننده آنزیمهای کولین استرازو مونوآمین اکسیدازو گوانیلات سیکلاز، ضد مالاریا، نشانگر اسید-باز، به عنوان عامل محافظت کننده عصبی و قلب، همچنین یک رنگ بافت‌شناسی عمل می‌کند.^۱

متیلن بلو یک عامل اکسیداسیون-احیا است. فرم داخل وریدی متیلن بلو توسط FDA برای درمان بیماران کودک و بزرگسال مبتلا به متهموگلوبینی اکتسابی تایید شده است. از لحاظ تاریخی، این دارو به طور گسترده در آفریقا برای درمان مالاریا استفاده می‌شده است، اما اکنون با ورود کلروکین (CQ) و سایر داروها به بازار، دیگر استفاده نمی‌شود. استفاده از آن به عنوان ضد عفونی کننده مجاری ادراری نیز مورد بررسی قرار گرفته است. متیل تیونینیوم کلراید یا متیلن بلو، (نام تجاری پیشنهادی Rember) یک داروی تحقیقاتی است که در آزمایشات بالینی اولیه نشان داده شده است که مهارکننده تجمع پروتئین تاو است و برای درمان بیماران مبتلا به آلزایمر مورد توجه بالقوه می باشد.^۱

۴-۲ روش تهیه محلول رنگ متیلن بلو

در یک استوانه مدرج، مقدار ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر اندازه گیری کنید و مقدار ۵۰۰ میلی لیتر از آن را داخل یک فلاسک مخروطی (Conical Flask) اضافه کنید.^۲ برای تهیه محلول ۰.۳ درصد از رنگ متیلن بلو مقدار ۳ گرم پودر متیلن بلو را وزن کرده و به فلاسک مخروطی حاوی ۵۰۰ میلی لیتر از آب مقطر اضافه کنید.^۳ با چرخاندن فلاسک، اجازه بدهید رنگ داخل آب مقطر حل شود. سپس ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر باقیمانده در استوانه مدرج را اضافه کرده و دوباره مخلوط کنید.

پیشنهاد می شود جهت اطمینان از عدم وجود رسوب رنگ و کیفیت بهتر رنگ زمینه در روش رنگ آمیزی زبل نلسن، محلول تهیه شده را با استفاده از قیف از کاغذ صافی عبور داده و در یک بطری شیشه ای تمیز قهوه ای رنگ، نگهداری کنید.

مواد مورد نیاز جهت تهیه محلول متیلن بلو ۰/۳ %	
متیلن بلو	۳ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

۴-۳ نگهداری محلول رنگ متیلن بلو ۰/۳ درصد

ظرف‌های حاوی معرف‌های تازه تهیه شده باید تا زمان انجام مراحل کنترل کیفیت و ارزیابی نتایج در بسته و پوشانده شوند. محلول‌ها باید در بطری‌های قهوه‌ای تمیز نگهداری شده و به وضوح برچسب گذاری شوند. برچسب باید نام معرف، غلظت و تاریخ تهیه و نام تهیه کننده محلول را نشان دهد. معرف‌هایی که در بطری‌های محکم بسته نگهداری می‌شوند، می‌توانند ۶ ماه تا یک سال استفاده شوند. بطری‌ها باید دور از نور مستقیم خورشید نگهداری شوند. در صورت استفاده از بطری‌های شفاف، باید موجودی معرف‌ها در یک کابینت در بسته نگهداری شود.^۳

۴-۴ کنترل کیفیت محلولهای رنگ آمیزی تازه تهیه شده

باید پس از تهیه محلولهای رنگ آمیزی، بررسیهای کنترل کیفیت برای هر سری ساخت از معرفیها انجام شود. انجام کنترل کیفیت برای اطمینان از اثربخشی محلولهای رنگ آمیزی و مشاهده باسیلهای اسید فست در لام کنترلی مثبت و عدم وجود باسیل اسید فست در لام کنترل منفی ضروری است. بر اساس توصیه آزمایشگاه فراملی رفرانس سل سوئد، کنترل کیفیت محلول رنگ آمیزی متیلن بلو ۰.۳ درصد تازه تهیه شده، با رنگ آمیزی و بررسی دو اسمیر با گزارش موردی (Scanty) یا ۱+ مثبت که یک بار رنگ آمیزی شده اند و دو اسمیر منفی که سه بار رنگ آمیزی شده اند، انجام می شود.^۲ لازم است نتایج کنترل کیفیت در یک دفتر ثبت شود و برای هر سری ساخت، نام محلول و تاریخ آماده سازی آن از روی برچسب شیشه ها نوشته شده و سری ساخت رنگ روی لامهای کنترل ثبت گردد و این لامها در جعبه لام مخصوص نمونه های کنترل رنگ، به مدت ۱ سال نگهداری شود.^۲

References:

- 1- National Center for Biotechnology Information (2026). PubChem Compound Summary for CID 6099, Methylene Blue. Retrieved February 17, 2026 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methylene-Blue>.
- 2- Handbook on tuberculosis laboratory diagnostic methods in the European Union – Updated 2025. Stockholm: ECDC; 2025.

۳- دستورالعمل تشخیص آزمایشگاهی باسیلهای اسید فست (مایکوباکتریومهای توپر کلوزیس و غیر توپر کلوزیس) به روش بررسی میکروسکوپی گستره مستقیم-۱۴۰۴ آزمایشگاه مرجع سلامت وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی

(SOP) دستورالعمل رنگ آمیزی زیل نلسن

مطابق با آخرین دستورالعمل آزمایشگاه رفرانس سل سوئد ۲۰۲۵ و آزمایشگاه مرجع سلامت وزارت بهداشت ۱۴۰۴

- Cover the entire surface of each heat-fixed slide with carbol-fuchsin.
- Using a Bunsen burner, gently heat the slides until vapour rises . Do not allow them to boil.
- Allow the stain to remain on the slide for ten minutes. Adequate time is required for the carbol-fuchsin to penetrate and stain the cell well.
- Gently wash the stain from each slide with a stream of cold water until all the free stain has washed away. slides again carefully with water, drain and air dry.
- Cover each slide with acid alcohol; wait three minutes.
- Rinse slides again carefully with water and tilt each slide to remove excess water.
- Flood the slide with the methylene blue counterstain for one minute.
- Rinse slides again carefully with water, drain and air dry.^۱

۱- لام های خشک شده را با دقت با استفاده از پنس بلند در روی رک رنگ آمیزی با سطحی صاف و تراز به طوری که سطح گستره رو به بالا باشد، با فاصله مناسب حداقل ۲ سانتی متری از یکدیگر قرار دهید.

۲- با استفاده از پنبه آغشته به الکل (صنعتی) و تهیه شعله با ارتفاع حدود ۵ سانتیمتری، به آرامی شعله را از زیر لام ها ۲ تا ۳ بار به مدت ۲ تا ۳ ثانیه عبور داده و حرارت دهید تا اسمیر روی سطح لام ها فیکس شود. همچنین برای فیکس کردن لام ها قبل از این مرحله می توانید لام را با یک پنس گرفته و با زاویه ۴۵ درجه ۲ تا ۳ بار به مدت ۲ تا ۳ ثانیه به آرامی از روی شعله عبور دهید. سایر روشهای فیکس کردن لام ها، شامل استفاده از کناره لوپ سوز الکتریکی یا با استفاده از قراردادن لام ها به مدت ۲ ساعت در دستگاه Hot plate با دمای ۶۵ تا ۷۵ درجه سانتی گراد می باشد. حرارت بالا و قراردادن لام ها روی شعله ثابت در مرحله فیکس کردن، باعث سوختن سطح گستره و منجر به نتایج منفی کاذب خواهد شد.^۲

۳- قبل از ریختن رنگ روی لامها، زمان سنج آزمایشگاهی را روی ۱۰ دقیقه تنظیم کرده و سپس تمام سطح لام فیکس داده را با حدود ۵ میلی لیتر کربول فوشین بپوشانید و دکمه شروع زمان سنج را فشار دهید.

۴- با استفاده از پنبه آغشته به الکل و تهیه شعله با ارتفاع حدود ۵ سانتی متری به آرامی شعله را از زیر لام ها عبور داده و حرارت دهید تا زمانی که از سطح لام بخار متصاعد شود. (جهت جلوگیری از نتایج مثبت کاذب دقت کنید رنگ نجوشد و خشک نشود و از اضافه کردن دوباره رنگ فوشین حین این مرحله به اسمیرها جدا خودداری کنید. همچنین حرارت ناکافی در این مرحله باعث نتایج منفی کاذب خواهد شد).

۵- اجازه دهید به مدت ۱۰ دقیقه رنگ روی لام ها بماند.

۶- پس از پایان زمان ۱۰ دقیقه ای، رنگ را از روی هر لام به آرامی با جریان آب سرد بشویید تا تمام رنگ های آزاد (متصل نشده به مایکوباکتریوم ها) شسته شوند.

۷- با کج کردن هر لام و خارج کردن آب اضافی آن سطح لام را به مدت ۳ دقیقه با محلول اسید-الکل ۳ درصد بیوشانید. مطابق پیشنهاد کارگروه تشخیص آزمایشگاهی سل آزمایشگاه مرجع سلامت وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی (دستورالعمل مهرماه ۱۴۰۴) مرحله رنگ بری با محلول اسید الکل، به دو زمان یک و نیم دقیقه ای تقسیم می گردد:^۲

الف. برای یک و نیم دقیقه اول تمام سطح لام را به آرامی با رنگبر بیوشانید (در این مرحله رنگ اضافی از روی لام خارج میشود. سپس رنگ بر را از روی لام خارج کرده و لام را با آب بشویید.

ب. برای یک و نیم دقیقه دوم تمام سطح لام را مجدد و به آرامی با رنگبر بیوشانید (در مرحله دوم، رنگبری باکتریهای غیر اسید فست انجام خواهد شد). سپس رنگبر را از روی لام خارج کرده و لام را با آب بشویید. این روش رنگبری دو مرحلهای برای جلوگیری از رسوب رنگ و نتایج مثبت کاذب انجام میشود.

در پایان این مرحله، هر لام را کج کنید تا آب اضافه آن خارج شود.

۸- تمام سطح لام را بطور کامل با رنگ متیلن بلو به مدت یک دقیقه بیوشانید.

۹- لام ها را دوباره با آب بشویید و آب اضافه را خارج کرده و اجازه دهید در مجاورت هوا خشک شوند. پشت لام ها را با یک دستمال تمیز کرده و زیر میکروسکوپ بررسی نمایید.

لازم به ذکر است به منظور کنترل کیفیت، برای هر بار رنگ آمیزی یک اسمیر کنترل مثبت و یک اسمیر کنترل منفی که از قبل فیکس کرده و بایگانی کرده اید را استفاده نمایید.

نکته مهم این است که رعایت دقیق مراحل رنگ آمیزی، آموزش و تجربه پرسنل آزمایشگاه و دفع متناوب AFB همگی می توانند بر حساسیت اسمیر AFB تأثیر بگذارند.

پس از بررسی میکروسکوپی، تمام نتایج گزارش شده باید با مشخصات کامل و ذکر ران گزارش نتایج و رنگ آمیزی ثبت شوند. گستره های مثبت و منفی ابتدا تمیز و سپس جداگانه در جعبه نگهداری لام بایگانی گردد. گستره های مثبت بیماران تا ۲ سال و گستره های منفی تا ۶ ماه نگهداری شوند.^۲

References:

- 1- Handbook on tuberculosis laboratory diagnostic methods in the European Union – Updated 2025. Stockholm: ECDC; 2025.

۲- دستورالعمل تشخیص آزمایشگاهی باسیلهای اسید فست (مایکوباکتریومهای توبرکلوزیس و غیر توبرکلوزیس) به روش بررسی میکروسکوپی گستره مستقیم-۱۴۰۴ آزمایشگاه مرجع سلامت وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی

(SOP) دستورالعمل بررسی اسمیر میکروسکوپی

باسیل اسید فست و نگهداری میکروسکوپ نوری

۱-۱۲ خوانش گستره رنگ آمیزی شده با روش زیل نلسن:

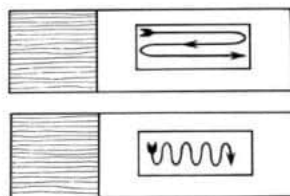
قبل از مشاهده لام بیمار، باید کیفیت رنگ آمیزی تایید شود. گستره کنترل مثبت و منفی باید در هر ران رنگ آمیزی قرار گیرد تا عملکرد صحیح روش و کیفیت رنگ آمیزی باسیلهای اسید فست تأیید شود. اگر لام کنترل از کیفیت قابل قبول برخوردار بود، می توان گستره بیماران را رنگ آمیزی و مشاهده کرد. اگر لام کنترل غیرقابل قبول باشد، باید محلولهای رنگ آمیزی مجدد ساخته شوند. پس از شناسایی و اصلاح مشکل، باید لام کنترل جدید رنگ آمیزی، مشاهده و در نهایت تایید شود.^۱

در زمان مشاهده میکروسکوپی گستره، باید ابتدا کنترل مثبت مشاهده شده سپس لنز به خوبی تمیز شود. پس از آن کنترل منفی مشاهده شده و در صورت بدست آمدن نتایج مورد انتظار، مشاهده گستره های بیمار شروع شود.^۵

۲-۱۲ بررسی گستره رنگ آمیزی شده به روش زیل نلسن و گزارش دهی

در موارد اسمیر منفی باید تمام طول گستره (بیش از ۳۰۰ میدان میکروسکوپی) بصورت طولی و عرضی مطابق روش و شکل زیر مشاهده و بررسی شود (دو بار رفت و برگشت طولی و دو بار رفت و برگشت عرضی).^۶ یک طول گستره، معادل ۲ سانتیمتر یا ۱۰۰ میدان میکروسکوپی با بزرگنمایی $1000\times$ (عدسی ۱۰۰ روغنی) است.^۷

Patterns for Examining Slides



در موارد بسیار اندک (Scanty) اگر کمتر از ۱۰ باسیل اسید فست در ۱۰۰ میدان مشاهده شود، باید تعداد باسیل های اسید فست شمارش شده، گزارش گردد.^۱ در این موارد و در صورت وجود اندیکاسیون بالینی توصیه به تکرار نمونه گیری می شود.

در موارد ۱ مثبت (۱۰ تا ۹۹ باسیل اسید فست در ۱۰۰ میدان) حداقل ۱۰۰ میدان، در موارد ۲ مثبت (۱ تا ۱۰ باسیل اسید فست در هر میدان) حداقل ۵۰ میدان و در موارد ۳ مثبت (بیش از ۱۰ باسیل اسید فست در هر میدان) مشاهده حداقل ۲۰ تا ۳۰ میدان جهت گزارش دهی نتایج بررسی اسمیر میکروسکوپی لازم است. پس از مشاهده و گزارش گستره مثبت (بیمار یا کنترل مثبت) برای مشاهده گستره بعدی، ابتدا روغن ایمرسیون روی لنز را با دستمال کاغذی/ گاز طبی برداشته سپس با استفاده از الکل اتیلیک ۷۰ درصد لنز را پاک نمایید. بلافاصله با دستمال کاغذی/ گاز طبی لنز را خشک نمایید. این کار از انتقال باکتری و ایجاد نتایج مثبت کاذب جلوگیری می کند.^۷

از تماس نوک قطره چکان حاوی روغن ایمرسیون با گستره بیماران اجتناب شود. در انتهای کار لنز پاک شود. هرگز از پنبه برای تمیز کردن لنز استفاده نشود.

از تماس دست با گستره خودداری نمایید. تمام نمونه های خلط را باید بالقوه عفونی در نظر گرفت. برای جلوگیری از مخدوش شدن گستره برای بررسی های بعدی، از تماس سطح روغنی گستره با برگه های کاغذ حاوی نوشته خودداری نمایید. برای بایگانی گستره ها، روغن اضافی آنها را با استفاده از برگه کاغذ سفید بردارید.

گستره ها را پس از خشک شدن، به درستی در جعبه نگهداری لام قرار دهید. گستره های مثبت بیماران ۲ تا ۶ سال و گستره های منفی تا ۶ ماه نگهداری شوند. اولویت برای شمارش باسیل ها، میدان های میکروسکوپی دارای لکوسیت، سلولهای اپیتلیال و موکوس است. میدان های میکروسکوپی بدون سلول کم ارزش میباشند. مطابق با استانداردهای بین المللی نتایج مثبت باید با رنگ قرمز در دفاتر و برگه های کار و فرم های بیماریابی ثبت شود.

جدول شماره ۵. گزارش دهی گستره های میکروسکوپی با روش زیل نلسن

IUATLD/WHO* scale (1000x field - HPF)	Bright field (1000x magnification: 1 length = 2 cm = 100 HPF)
Result	
Negative	Zero AFB/100 HPF
Scanty	1-9 AFB/ 100 HPF
1+	10-99 AFB/ 100 HPF
2+	1-10AFB/per 1HPF in at least 50 fields
3+	>10 AFB/ per1 HPF in at least 20 fields

*IUATLD: International Union against Tuberculosis and Lung Disease, WHO: World Health Organization

۱۲-۳ میکروسکوپ نوری و روش کار

میکروسکوپ را روی یک سطح ثابت، صاف و هموار، دور از نور مستقیم خورشید، گرد و غبار، لرزش (مانند سانتریفیوژ)، آب (سینک، پاشیدن از شیر آب)، معرفهای شیمیایی و یا رطوبت قرار دهید. ضروری است در زمانی که از میکروسکوپ استفاده نمی شود آن را با کاور بپوشانید. میکروسکوپ نوری نیاز به تعمیر و نگهداری روزانه خاصی ندارد، اما در استفاده از آن دقت قابل توجهی لازم است^۱. انتخاب ضدعفونی کننده، غلظت آن و زمان قرار گرفتن در معرض آن بسته به عوامل بیولوژیکی مورد بررسی میکروسکوپی، متفاوت است. برای ضدعفونی کردن باکتری ها، از محلول آبی ۷۰٪ درصد ایزوپروپانول (که به

آن الکل ایزوپروپیل نیز گفته می‌شود) استفاده کنید. مطمئن شوید که محلول حداقل به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح مورد نظر از میکروسکوپ اعمال شده باشد.

به خاطر داشته باشید که همه اجزا و مواد سیستم میکروسکوپ نمی‌توانند در برابر مواد شیمیایی مقاومت کنند. به عنوان مثال، لاستیک‌ها، چسب‌ها، اجزای پلاستیکی یا پوشش‌های سطحی اجزای نوری می‌توانند تحت تأثیر مواد ضدعفونی کننده خاصی قرار گیرند.

۱۲-۲-۱ نگهداری میکروسکوپ

هنگام نگهداری میکروسکوپ، مطمئن شوید که با یک پوشش از گرد و غبار، خاک، گرده، پرز و غیره محافظت می‌شود. رها کردن میکروسکوپ در فضای باز می‌تواند باعث شود کیفیت تصویر به مرور زمان کاهش یابد. ایده خوبی است که میکروسکوپ را در حین نگهداری از برق بکشید و روغن را از عدسی شیئی غوطه‌ور در روغن با یک دستمال مرطوب ظریف پاک کنید. نگهداری میکروسکوپ در جای خشک و خنک نیز به افزایش عمر میکروسکوپ کمک می‌کند. آن را از هرگونه بخار شیمیایی احتمالی دور نگه دارید زیرا این بخارات می‌توانند برای لنزها و سایر قطعات فلزی مضر باشند.^۲

۱۲-۲-۲ مراقبت از لنز و عدسی شیئی

لنزهای میکروسکوپ بسیار شکننده هستند و برای جلوگیری از خراش باید با احتیاط حمل شوند. هرگز اجازه ندهید لنز با لام میکروسکوپ تماس پیدا کند و هرگز با انگشتان خود هیچ یک از لنزها را لمس نکنید. تمیز کردن لنزهای میکروسکوپ دشوار است و مراقبت مناسب بسیار مهم است. برای تعیین اینکه کدام یک از لنزهای شیئی نیاز به تمیز کردن دارند، یک لام شیشه‌ای تمیز بردارید و آن را زیر میکروسکوپ خود قرار دهید، وقتی میکروسکوپ فوکوس شد، می‌توانید لام را حرکت دهید و مشخص کنید که آیا گرد و غبار قابل مشاهده با لام حرکت می‌کند یا در همان محل باقی می‌ماند (این بدان معناست که گرد و غبار روی لنز شیئی است).^۲

روغن ایمرسیون برای عملکرد نوری خوب میکروسکوپ ضروری است. استفاده صحیح از روغن و اطمینان از پاک کردن روغن پس از هر بار استفاده مهم است. عدم انجام این کار می‌تواند منجر به ورود روغن به مکانیسم‌هایی شود که باعث آسیب به میکروسکوپ می‌شوند و گاهی اوقات این آسیب می‌تواند برگشت‌ناپذیر باشد. پاک کردن روغن بهتر است به آرامی و با دستمال مخصوص لنز انجام شود.

توصیه می‌شود میکروسکوپ خود را به صورت دوره‌ای توسط یک تکنسین سرویس واجد شرایط آزمایش کنید. به طور کلی، سرویس میکروسکوپ پس از ۲۰۰ ساعت یا هر ۳ سال، هر کدام که زودتر اتفاق بیفتد، لازم است. بسته به نوع میکروسکوپی که دارید، ممکن است نیاز به سرویس بیشتر آن داشته باشید.

میکروسکوپی که برای مدت طولانی بدون استفاده باقی بماند، می‌تواند گرد و غبار و ذرات معلق در هوا را در خود جمع کند که می‌تواند منجر به کاهش کیفیت تصویر شود، حتی اگر دستگاه عملاً نو باشد. با این حال، حتی اگر در دوره‌های عدم فعالیت با دقت برای محافظت پوشانده شود، میکروسکوپ‌هایی که به طور مرتب مورد استفاده قرار می‌گیرند، در معرض تجمع آلاینده‌ها هستند. برخی از این آلاینده‌ها به طور اجتناب‌ناپذیری از محیط و برخی دیگر توسط خود میکروسکوپیست‌ها، به ویژه در مناطقی که دست‌ها، مژه‌ها و حتی رطوبت ناشی از تنفس با گذشت زمان با دستگاه تماس پیدا می‌کنند، وارد دستگاه می‌شوند. نواحی بحرانی و حساس میکروسکوپ برای آلودگی عبارتند از:

سطح خارجی لنز جلویی عدسی شیئی

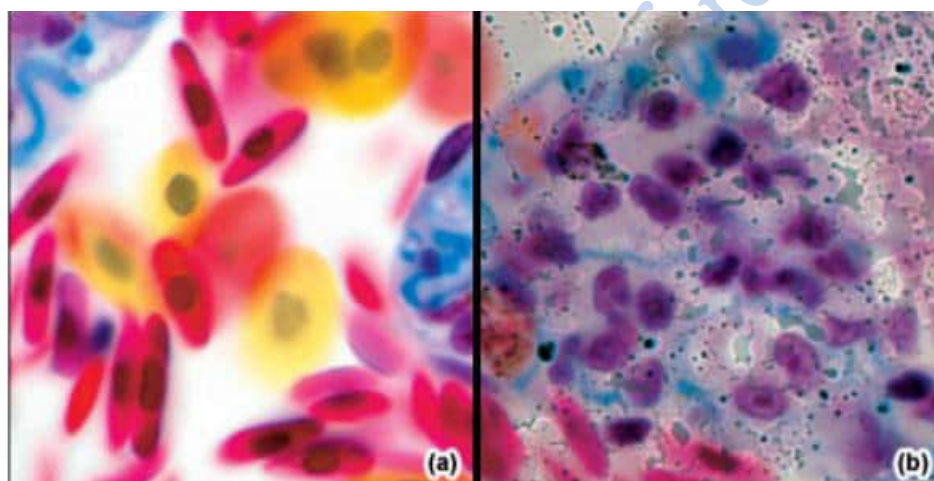
سطح حسگر دوربین و پوشش شیشه‌ای محافظ آن

هر دو سطح پوشش
سطح اسلاید میکروسکوپ
سطح اپتیک آداپتور دوربین
سطح لنز بالایی کندانسور

سطوح بیرونی و داخلی چشمی و همچنین سطح بالایی شبکه

سطح بیرونی هر شیشه محافظی که روزه‌های خروجی نور را می‌پوشاند

سایر سطوح شیشه‌ای در مسیر نور مانند لامپ‌های هالوژن، لنزهای جمع‌کننده یا فیلترهای کنتراست و گرما. برخی از سطوح نوری نسبت به سایر سطوح نسبت به آلودگی حساس‌تر هستند. لنز جلویی عدسی شیئی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، زیرا وقتی عناصر نوری در صفحات میدان مزدوج (تصویر) یا نزدیک آنها کثیف، آسیب‌دیده یا معیوب باشند، احتمالاً آثار هنری با وضوح بالا روی تصویر نمونه ظاهر می‌شوند (شکل ۱ را ببینید). بنابراین، هرچه کیفیت اجزای اپتیکی، مانند کندانسور و لنزهای جمع‌کننده و رله، بالاتر باشد، این لکه‌ها بیشتر تداخل ایجاد می‌کنند و به نویز نوری کمک می‌کنند. قبل از هر استفاده‌ی حساس، لنز جلویی عدسی شیئی را از نظر کثیفی بررسی کنید.^۵



شکل شماره ۱. نائیر گرد و غبار و آلودگی میکروسکوپ بر کیفیت تصویر - تصویر (a) : لنز تمیز / تصویر (b) : لنز کثیف

برای هر عدسی شیئی خشک، هرچه فاصله‌ی کاری آزاد کمتر و سطح مقطع عدسی مقعر جلویی کوچکتر باشد، خطر کثیف شدن لنز جلویی با محیط‌های جاسازی، روغن ایمرسیون یا گرد و غبار بیشتر است. لنز جلویی یک عدسی شیئی غوطه‌ور در روغن ایمرسیون باید پس از استفاده و قبل از استفاده از روغن ایمرسیون تازه، تمیز شود تا بقایای آن از بین برود. مخلوط کردن روغن‌های ایمرسیون مختلف و همچنین مقادیر مختلف از یک روغن می‌تواند منجر به تار شدن تصاویر شود. اگرچه استفاده از روغن ایمرسیون برای به حداکثر رساندن عملکرد نوری میکروسکوپ ضروری است، اما استفاده‌ی نادرست از آن یا عدم حذف فوری روغن پس از هر بار استفاده، جدی‌ترین آلودگی است که باید در نگهداری دستگاه به آن پرداخته شود.^۵

در بررسی میکروسکوپی، باید از روغن‌های ایمرسیون مناسب و بدون حباب استفاده شود. اگرچه ویسکوزیته روغن ایمرسیون هرگونه مهاجرت فوری به مکان‌های ناخواسته را به حداقل می‌رساند، اما اگر به سرعت حذف نشود و اجازه تجمع پیدا کند، اثرات نیروی جاذبه و موینگی در نهایت منجر به حرکت روغن به بخش‌هایی از مکانیسم زیر صحنه و پایه میکروسکوپ و شاید حتی به داخل عدسی شیئی می‌شود. این تجمع ممکن است به راحتی قابل مشاهده نباشد و تا زمانی که مشکلات مکانیکی یا نوری به اندازه‌ای شدید نشوند که نیاز به

سرویس توسط یک مرکز تعمیر میکروسکوپ داشته باشند، قابل توجه نباشد.^۵

سطوح مقعر یا محدب با استفاده از پنبه یا سواب‌های پلی‌استر تمیز می‌شوند. سطوح مسطح با دسترسی آسان را می‌توان به طور مشابه با دستمال‌های سلولزی یکبار مصرف نرم تمیز کرد. اپتیک میکروسکوپ می‌تواند از شیشه نوری، کوارتز یا پلیمرها تشکیل شود. سطح بالایی تقریباً همه اجزا با یک لایه ضد انعکاس پوشانده می‌شود تا نور سرگردان به حداقل برسد. برخی از این پوشش‌ها به دلیل نرمی‌شان ممکن است قابل پاک شدن باشند یا نباشند. به طور کلی، پوشش‌های ضد انعکاس از فلوراید منیزیم تشکیل شده‌اند و فقط باید با موادی عاری از آمونیاک و اسید تمیز شوند. چندین جایگزین برای حلال‌های خطرناک در تمیز کردن میکروسکوپ مؤثر شناخته شده‌اند و انواع مختلفی از مواد تمیزکننده و همچنین مواد تمیزکننده توسط میکروسکوپیست‌ها و تولیدکنندگان مختلف توصیه می‌شوند. برخی از اجزای نوری توسط سطوح ضد انعکاس سیاه احاطه شده‌اند که به حلال‌های آلی حساس هستند. قطعات پلاستیکی و لاستیکی چشمی نیز توسط حلال‌های آلی از جمله استون، متیلن کلرید و کلروفرم مورد آسیب قرار می‌گیرند.^۵

یکی از مهمترین خطرات بسیاری از حلال‌هایی که برای تمیز کردن اپتیک میکروسکوپ مؤثر بوده‌اند، این است که آنها پتانسیل حل کردن سیمان‌های مورد استفاده در مونتاژ لنز را دارند (همانطور که خود روغن‌های غوطه‌وری در صورت باقی ماندن روی اپتیک، این کار را انجام می‌دهند). آب مقطر خالص ایمن‌ترین مایع تمیزکننده برای هرگونه آلودگی محلول در آب است، اما اگر این کافی نباشد، مایعات تمیزکننده لنزهای عکاسی تجاری بسیار مؤثر هستند.

اجزای داخلی میکروسکوپ، شامل سطوح نوری، اجزای مجموعه فیلترهای فلورسنت، دوربین‌ها و آداپتورهای دوربین، هرگز نباید توسط کاربر تمیز شوند، بلکه باید توسط نمایندگان خدمات مشتری باتجربه از سازنده اصلی تمیز شوند. کاربر فقط باید سطح خارجی لنز جلویی شیئی، لنز جلویی کندانسور، لنزهای چشمی، فیلترهای رنگی و تبدیلی شیشه و سطح خارجی شیشه محافظ که هر روزنه ای را که از طریق آن نور خارج می‌شود، می‌پوشاند، تمیز کند.^۵

پس از بررسی هر نمونه، روغن ایمرسیون باید کاملاً پاک شود، حتی اگر قرار باشد لامهای بیشتری بررسی و مشاهده شوند. روغن ایمرسیون با خیال راحت فقط با استفاده از دستمال مخصوص عدسی و بدون استفاده از هیچ حلالی پاک می‌شود.^۵

اتاق میکروسکوپی ایده‌آل باید به طور خاص برای این منظور طراحی شود و تمام مکانیسم‌های موجود برای محدود کردن آلودگی توسط گرد و غبار، بخارات شیمیایی و سایر آلاینده‌های موجود در هوا و همچنین ایزوله کردن دستگاه از ارتعاشات صوتی و مکانیکی و تغییرات دما را در خود جای دهد. این وضعیت ایده‌آل به ندرت محقق می‌شود و اکثر میکروسکوپ‌ها در مناطقی قرار دارند که در معرض تعداد قابل توجهی از کمبودهای محیطی هستند. به دلیل سختی‌های استفاده روزانه، برخی از آلودگی‌ها اجتناب‌ناپذیر است، اما حداقل، میکروسکوپ باید در دوره‌های عدم استفاده با پوشاندن کل دستگاه با یک پوشش مناسب، تا حد امکان محافظت شود. از بین انواع مختلف پوشش‌های پلاستیکی موجود، آنهایی که از مواد نرم‌تر و انعطاف‌پذیرتر ساخته شده‌اند، احتمالاً کمتر مستعد جذب گرد و غبار هستند. روکش‌های پارچه‌ای بدون پرز نیز موجود هستند و مانع مؤثری در برابر گرد و غبار ایجاد می‌کنند که می‌تواند نیاز به تمیز کردن را به حداقل برساند.^۵

۱۲-۳ مراقبت و نگهداری از میکروسکوپ بر اساس توصیه CDC

نگهداری منظم میکروسکوپ عملکرد آن را بهبود می‌بخشد. باید هر سال از یک متخصص بخواهید که میکروسکوپ شما را سرویس کند. علاوه بر این، باید پایه و قاب میکروسکوپ را با پاک کردن آرام با یک پارچه

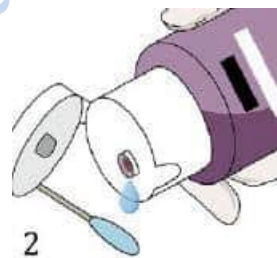
مرطوب یا دستمال مرطوب پس از هر بار استفاده تمیز کنید. هنگام استفاده از میکروسکوپ از آرایش چشم - به خصوص ریمل - خودداری کنید. این کار می‌تواند بقایایی را به جا بگذارد که پاک کردن آنها دشوار است. دستورالعمل‌های این راهنمای شغلی را مرتباً برای تمیز کردن قسمت‌های شیشه‌ای میکروسکوپ خود استفاده کنید.^۳

لوازم مورد نیاز:

کاغذ لنز تجاری، گوش پاک کن
پاک کننده لنز موجود در بازار

دستورالعمل:

۱. برای تعیین تمیز بودن عدسی‌های چشمی و شیئی، هر کدام را بین انگشتان خود بچرخانید تا بقایای آن را شناسایی کنید.
۲. نوک یک گوش پاک کن یا یک تکه کاغذ لنز را با محلول پاک کننده لنز مرطوب کنید.

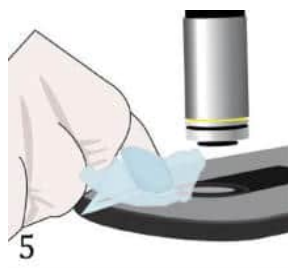


۳. با حرکت دایره‌ای از مرکز به سمت بیرون، عدسی‌های چشمی و شیئی را به آرامی تمیز کنید.
۴. با یک پنبه یا کاغذ مخصوص لنز، آنها را خشک کنید.



۵. صفحه میکروسکوپ را با یک کاغذ لنز تمیز که با محلول پاک کننده لنز مرطوب شده است، تمیز کنید.

۶. صفحه را با یک تکه کاغذ لنز جدید کاملاً خشک کنید.



۷. بالای کندانسور را با یک کاغذ لنز تمیز که با پاک کننده لنز مرطوب شده است، پاک کنید.

۸. کندانسور را با یک تکه کاغذ لنز خشک خشک کنید.^۲



۴-۱۲ دستورالعمل نگهداری روزانه میکروسکوپ نوری بر اساس توصیه WHO^۴

- میکروسکوپ را از نظر آسیب یا نقص عملکرد بررسی کنید.
- هرگونه آسیب یا نقص عملکرد را در برگه نگهداری روزانه میکروسکوپ ثبت کنید. قطعات میکروسکوپ را با یک پارچه تمیز، تمیز کنید.
- عدسی‌های شیئی را پس از هر ران کاری تمیز کنید.
- مطمئن شوید که بقایای روغن ایمرسیون پاک شده‌اند. هیچ بخشی از میکروسکوپ را با زایلن تمیز نکنید، زیرا به میکروسکوپ آسیب می‌رساند و سمی است.
- عدسی شیئی را فقط با دستمال تمیز کننده لنز تمیز کنید. هرگز عدسی‌ها را با الکل، دستمال‌های معمولی، دستمال توال، پنبه یا حوله تمیز نکنید، زیرا سطح لنز را خراش می‌دهند.
- در صورت عدم استفاده، میکروسکوپ را با یک پوشش گرد و غبار بپوشانید.
- در پایان روز برق را خاموش کنید و میکروسکوپ را از برق بکشید تا از نوسانات برق محافظت شود.
- دریاچه‌های لنز را بدون پوشش رها نکنید؛ از پوشش دریچه یا نوار آب‌بندی استفاده کنید
- در آب و هوای گرم و مرطوب، رشد قارچ به راحتی روی لنزها و منشورها ایجاد می‌شود. میکروسکوپ هنگامی که استفاده نمی‌شود، باید در شرایط خشک نگهداری شود تا از رشد قارچ روی سطوح شیشه‌ای جلوگیری شود. به عنوان مثال، میکروسکوپ را می‌توان در یک "کمد گرم" با دمای ثابت و رطوبت کم نگهداری کرد. لنزها و سر منشورها را می‌توان در جعبه‌های در بسته حاوی ماده خشک کننده (بدون

کلرید کبالت) نگهداری کرد.

- کارکنان باتجربه آزمایشگاه می‌توانند با رعایت دقیق دستورالعمل‌های سازنده، لامپ شکسته یا فیوز سوخته را تعویض کنند. سایر تعمیرات باید توسط یک مهندس یا تکنسین خدمات واجد شرایط انجام شود. سرویس معمول، مانند تنظیم مجدد اپتیک، تعویض لنز و نگهداری و روغن‌کاری صفحه، باید توسط یک تکنسین خدمات واجد شرایط انجام شود. تمام تعمیرات را در برگه نگهداری میکروسکوپ ثبت کنید.
- هرگز لنزها و پورت‌های میکروسکوپ را با لنزهای میکروسکوپ‌های دیگر تعویض نکنید.
- منبع تغذیه و اتصالات میکروسکوپ باید ایمن و تثبیت شده باشند و کارکنان را در معرض خطر برق گرفتگی قرار ندهند.
- میکروسکوپ باید به صورت ارگونومیک استفاده شود تا از فشار به کمر و گردن جلوگیری شود.
- بهتر است چک لیست بازدید و نگهداری روزانه برای هر میکروسکوپ در آزمایشگاه مطابق دستورالعمل های WHO تهیه شود و موارد بررسی شده ثبت و در اسناد کنترل کیفی آزمایشگاه نگهداری شود.

References:

- 1- Handbook on tuberculosis laboratory diagnostic methods in the European Union – Updated 2025. Stockholm: ECDC; 2025.
- 2- <https://www.westlab.com/blog/tips-to-properly-care-for-your-microscope>
- 3- <https://reach.cdc.gov/sites/default/files/job-aids-resources/care-maintenance-microscope-508.pdf>
- 4- <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/340472/WHO-HTM-GMP-MM-SOP-2016.12-eng.pdf>
- 5- <https://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/basics/care.html>
- 6- https://www.aphl.org/programs/infectious_disease/tuberculosis/TBCore/TB_AFB_Smear_Microscopy_TrainerNotes.pdf

۷- دستورالعمل تشخیص آزمایشگاهی باسیلهای اسید فست (مایکوباکتریومهای توپرکلوزیس و غیر توپرکلوزیس) به روش بررسی میکروسکوپی گستره مستقیم- آزمایشگاه مرجع سلامت وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی ویرایش ۱۴۰۴

تهیه شده در آزمایشگاه مرجع منطقه ای سل معاونت بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تبریز

(SOP) دستورالعمل رنگ آمیزی فلوروکروم اورامین O

۱۵-آمزایای رنگ آمیزی باکتری های اسید فست به روش فلوروکروم

طی سالهای متمادی از روش فلوروکروم برای رنگ آمیزی باکتریهای اسیدفست استفاده شده است. با استفاده از این روش، مایکوباکتریومها به صورت باسیلهای فلورسنت روشن در پس زمینه تیره مشاهده و شناسایی می شوند. در مقایسه با رنگ آمیزی زیل نلسن و یا کاینیون، رنگ آمیزی فلوروکروم حساسیت بیشتری دارد و زمان کمتری برای خوانش گستره ها نیاز است. این مزیت به علت مشاهده گستره ها با بزرگنمایی کمتر است.^{۲و۳}

شناسایی مایکوباکتریها با رنگ فلورسنت اورامین O بر اساس میل ترکیبی فلوروکروم با اسیدهای مایکولیک در دیواره سلولی است. اورامین O توسط نور آبی برانگیخته می شود و در ناحیه حدود ۵۰۰ نانومتر تا حدود ۶۵۰ نانومتر نور را ساطع می کند.^۱

در این روش، تصاویر فلورسنت به دلیل کنتراست بالا، تشخیص باکتریهای اسید فست را آسانتر و سریع تر می کند. استفاده از لنزهای با توان کم تا متوسط (معمولاً 10X, 20X, 40X) میدان دید بزرگتری را در مقایسه با میکروسکوپ نوری که در آن از لنز 100X استفاده می شود، فراهم می سازد. همچنین، روش رنگ آمیزی فلوروکروم ساده تر از روش زیل نلسن است و به استفاده از روغن ایمرسیون در بررسی گستره ها، نیازی ندارد.^۳

۲-۱۵ مراحل رنگ آمیزی فلوروکروم

۱. اسمیرهای تهیه شده را در حالتی که سطح گستره رو به بالا باشد، با فاصله ۲ سانتی متری از هم روی یک قفسه رنگ آمیزی قرار دهید.
۲. گستره را با حرارت فیکس کنید (با استفاده از پنبه آغشته به الکل و تهیه شعله با ارتفاع حدود ۵ سانتی متری، به آرامی شعله را از زیر لام ها ۲ تا ۳ بار به مدت ۲ تا ۳ ثانیه عبور داده و حرارت دهید تا اسمیر روی سطح لام ها فیکس شوند).
۳. مطابق تصویر ۱۷-۱ گستره را با رنگ اورامین O بپوشانید و اجازه دهید به مدت ۱۵ دقیقه رنگ شود. برخلاف روش رنگ آمیزی زیل نلسن، در این مرحله گستره را حرارت ندهید و از نوارهای کاغذی جهت صاف کردن رنگ استفاده نکنید. همچنین مطمئن شوید که رنگ روی گستره باقی بماند. افزایش زمان رنگ آمیزی می تواند باعث ایجاد نتایج مثبت کاذب شود.



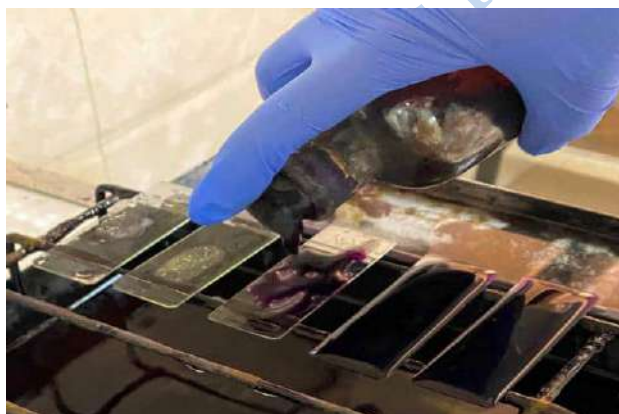
تصویر ۱۷-۱. مرحله اضافه کردن رنگ اورامین O بر روی گستره های فیکس شده^۴

۴. گستره را با آب بشویید به گونه ای که آب به آرامی از لبه لام بر روی گستره جریان یابد.
۵. مطابق تصویر ۱۷-۲ گستره را با اسید الکل ۰/۵ درصد به مدت ۳ دقیقه بپوشانید و اجازه دهید رنگ بری شود. مطمئن شوید که لام ها کاملاً با محلول رنگ بر پوشیده شده باشد.



تصویر ۱۷-۲. مرحله اضافه کردن اسید الکل جهت رنگ بری گستره های رنگ شده^۴

۶. اسید الکل ۰/۵ درصد را با آب بشویید، آب اضافی را از لام خالی کنید.
۷. مطابق تصویر ۱۷-۳ گستره را با پرمنگنات پتاسیم و به مدت دو دقیقه بپوشانید.
۸. پرمنگنات پتاسیم نباید بیش از دو دقیقه روی لام ها باقی بماند، زیرا باعث از بین رفتن ویژگی فلورسنت ماده فلوروکروم و ایجاد نتایج منفی کاذب می شود.^۱
۹. پرمنگنات پتاسیم را با آب بشویید. آب اضافی را از روی لام خالی کنید.



تصویر ۱۷-۳. مرحله اضافه کردن اسید الکل جهت رنگ بری گستره های رنگ شده^۴

- اجازه دهید گستره در معرض هوا خشک شود. برای خشک کردن گستره از کاغذ خشک کن یا موارد مشابه استفاده نکنید. پس از رنگ آمیزی در اسرع وقت گستره را با میکروسکوپ بررسی و گزارش کنید^{۲و۳و۴}
- (تصویر شماره ۱۷-۴).

۱۵-۳ نکات مهم در بررسی و نگهداری گستره های رنگ شده با روش فلوروکروم

- گستره های رنگ آمیزی شده با روش فلوروکروم، باید دور از نور (خورشید/لامپ معمولی/لامپ UV) قرار بگیرند و در داخل جعبه اسلاید تیره رنگ بایگانی شوند.
- تمام گستره های رنگ آمیزی شده باید حداکثر طی مدت ۲۴ ساعت پس از رنگ آمیزی بررسی و گزارش شوند.^۴
- گستره های رنگ آمیزی شده نباید به مدت طولانی در زیر میکروسکوپ فلورسنت باقی بمانند زیرا موجب کاهش درخشندگی رنگ فلورسنت باکتری های اسید فست و بروز نتایج منفی کاذب می شود.

- گستره ها را پس از بررسی و خوانش می توان در جعبه اسلاید تیره رنگ به مدت ۷ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد در یخچال نگهداری نمود.^۴
- نتایج مثبت رنگ آمیزی روش فلوروکروم قطعا باید با روش رنگ آمیزی زیل نلسن تایید شده و سپس گزارش شود.^{۴،۳}
- نحوه ی ثبت و گزارش نتایج با میکروسکوپ فلورسنت در جدول شماره ۱۵-۱ خلاصه شده است.

جدول ۱۷-۱. گزارش دهی بررسی گستره های رنگ شده به روش فلوروکروم و مشاهده با میکروسکوپ فلورسنت^۴

IUATLD/WHO ^a scale (1000x field - HPF)	Fluorescence (200-250x magnification: 1 length = 30 fields = 300 HPF)	Fluorescence (400x magnification: 1 length = 40 fields = 200 HPF)
Result		
Negative	Zero AFB/1 length	Zero AFB/1 length
Scanty	1-29 AFB/1 length	1-19 AFB/1 length
1+	30-299 AFB/1 length	20-199 AFB/1 length
2+	10-100 AFB/1 field on Average	5-50 AFB/1 field on average
3+	>100 AFB/1 field on average	>50 AFB/1 field on average

^a IUATLD: International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, WHO: World Health Organization

- مطابق جدول ۱۷-۲ در صورت استفاده از بزرگنمایی ۲۰۰ تا ۲۵۰ برابر، ۳۰ میدان و با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر بررسی و مشاهده ۴۰ میدان لازم است.

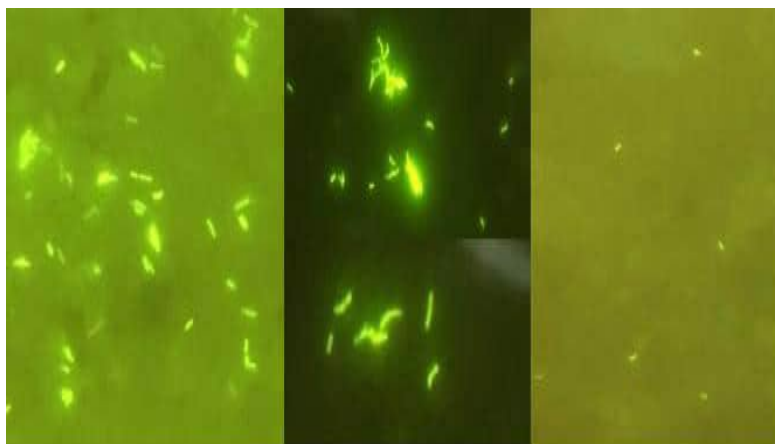
جدول ۱۷-۲. تعداد میدان های بررسی گستره های رنگ شده به روش فلوروکروم اورامین^۳

Magnification ^a	Number of Fields ^b
200x	30
250x	30
400x	55
450x	70

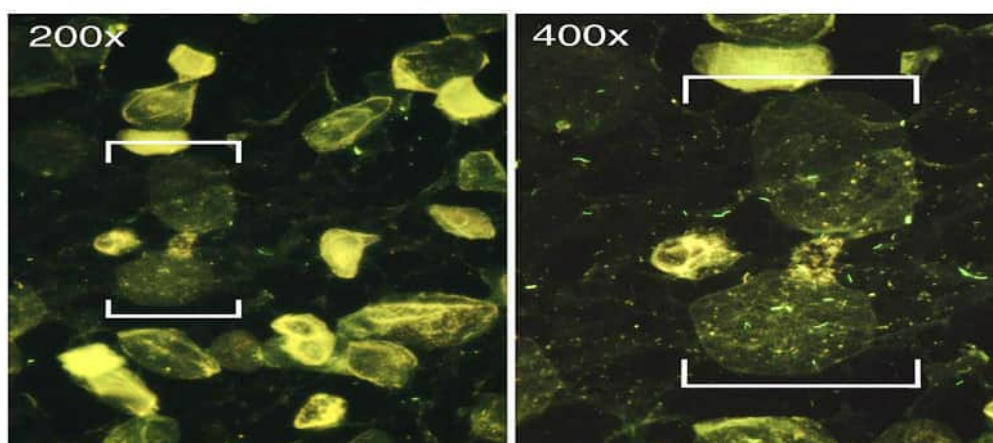
^a This final magnification represents the objective lens magnification multiplied by the eyepiece magnification

^b The minimum number of fields to examine before reporting a smear as negative for acid-fast organisms.

- گزارش منفی: برای لام هایی که هیچ باسیلی در یک طول مشاهده نشد، منفی گزارش می شود.
- گزارش مثبت: نتایج مثبت باسیل اسید فست بصورت نیمه کمی گزارش می شود (بر اساس جدول شماره ۱-۱۷). تمام نتایج گستره های مثبت این روش لازم است با روش رنگ آمیزی زیل نلسن تایید شود.



تصویر ۱۷-۴. گستره رنگ آمیزی شده مثبت به روش فلوروکروم^۴



تصویر ۱۷-۵. مقایسه اندازه باسیل اسید فست در بزرگنمایی ۲۰۰ و ۴۰۰ برابر گستره های رنگ شده به روش فلوروکروم^۳

References:

- 1- Handbook on tuberculosis laboratory diagnostic methods in the European Union – Updated 2025. Stockholm: ECDC; 2025.
- 2- Use of Fluorochrome Staining for Detecting Acid-fast Mycobacteria, CDC
- 3- https://www.aphl.org/programs/infectious_disease/tuberculosis/TBCore/TB_AFB_Smear_Microscopy_TrainerNotes.pdf

۴- دستورالعمل تشخیص آزمایشگاهی باسیلهای اسید فست (مایکوباکتریومهای توبرکلوزیس و غیر توبرکلوزیس) به روش بررسی میکروسکوپی گستره مستقیم-۱۴۰۴ آزمایشگاه مرجع سلامت وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی

تهیه شده در آزمایشگاه مرجع منطقه ای سل معاونت بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تبریز

SOP) دستور العمل تهیه محلول هیپوکلریت سدیم

۱-۱۶ ویژگی های محلول هیپوکلریت سدیم (سفید کننده خانگی)

سفید کننده خانگی یا همان هیپوکلریت سدیم یک مایع سفید کننده و ضد عفونی کننده قوی است که برای از بین بردن باکتریها، قارچها و ویروسها به کار میرود. این ماده بیشترین کاربرد را در مصارف خانگی و صنعتی دارد و معمولاً برای ضد عفونی سطوح، سفید کردن لباسها، از بین بردن بوهای نامطبوع و پاکسازی محیط استفاده میشود. سفید کننده خاصیت میکروب کشی گسترده ای دارد و برای ضد عفونی مراکز درمانی، آزمایشگاه ها و اماکن عمومی نیز کاربرد دارد.

برای استفاده ایمن، معمولاً سفید کننده خانگی را با آب سرد رقیق می کنند؛ به عنوان مثال نسبت یک واحد سفید کننده خانگی به ۹۹ واحد آب برای ضد عفونی عمومی سطوح توصیه میشود. استفاده از این محلول باید با رعایت نکات ایمنی و در محیط دارای تهویه مناسب باشد، زیرا گازهای آزاد شده می توانند مضر باشند. همچنین تولید کنندگان توصیه می کنند هنگام رقیق سازی ابتدا آب را داخل ظرف بریزید و سپس سفید کننده خانگی را اضافه کنید. وجود مواد آلی ماندخون، پروتئینها و سایر ترکیبات آلی می تواند قدرت ضد عفونی سفید کننده خانگی را کاهش دهد. این مواد با یونهای کلر فعال واکنش می دهند و باعث کاهش کلر آزاد مؤثر، در محلول می شوند که برای غیر فعال سازی میکروارگانیسم ها ضروری است. مواد معدنی موجود در آب، به ویژه سختی آب که شامل کلسیم و منیزیم است، معمولاً تأثیر قابل توجهی بر قدرت ضد عفونی سفید کننده خانگی ندارند.^۷

۲-۱۶ روش تهیه محلول هیپوکلریت سدیم

مقدار کلر موجود در محلول های سفید کننده خانگی به طور معمول، بین ۵ تا ۶/۱۵ درصد هیپوکلریت سدیم است. این مقدار برابر با ۵۰۰۰۰ تا ۶۱۵۰۰ (ppm) کلر فعال است. برای استفاده معمول از ضد عفونی کننده، محلول سفید کننده را رقیق می کنند تا غلظت کلر مطلوب، برای میکروب کشی حاصل شود. برای تهیه غلظت های کمتر، باید آن را بر اساس جدول زیر رقیق نماییم:^۸

نام محلول	مقدار سفید کننده خانگی ۵ درصد	مقدار آب	موارد کاربرد
محلول سفید کننده ۵۰۰ ppm (۱ درصد از سفید کننده خانگی)	۱۰ میلی لیتر	۹۹۰ میلی لیتر	ضد عفونی عمومی سطوح در آزمایشگاه ها و مراکز درمانی ^۵
محلول سفید کننده ۱۰۰۰ ppm (۲ درصد از سفید کننده خانگی)	۲۰ میلی لیتر	۹۸۰ میلی لیتر	ضد عفونی سطوح آلوده به مایکوباکتریوم ها در آزمایشگاه های تشخیص سل
محلول سفید کننده ۲۵۰۰۰ ppm (۵۰ درصد از سفید کننده خانگی)	۵۰۰ میلی لیتر	۵۰۰ میلی لیتر	استفاده در سiftی باکس های داخل کابینت بیولوژیکی (جهت گندزدایی اپلیکاتور چوبی یا لوپ یک بار مصرف و پسماندهای تولید شده ناشی از آزمایش و بررسی مایکوباکتریوم ها)

۱۶-۳ نکات مهم در هنگام تهیه و استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم

- غلظت سفید کننده خانگی برای کشتن مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بر روی سطوح باید حداقل ۲ درصد (۱۰۰۰ ppm از محلول سفید کننده خانگی) باشد.^۷
- محلول های هیپوکلریت سدیم رقیق شده اگر در ظروف دربسته، مات و در محیطی خنک و دور از نور نگهداری شوند،^۴ می توانند سه تا هفت روز پایداری داشته باشند و اثربخشی ضد میکروبی خود را حفظ کنند، اما توصیه می شود طی ۲۴ ساعت از آن استفاده کنید، چون کلر فعال با گذشت زمان کاهش می یابد.^۷ بنا بر این توصیه می شود محلول را روزانه به اندازه مصرف تهیه کنید.^۳
- همیشه سفید کننده خانگی را به آب اضافه کنید و نه برعکس، همچنین هنگام تهیه محلول از آب سرد استفاده کنید.
- محلول را در محیطی خنک و دور از نور خورشید، در ظرف تیره و درب دار نگهداری کنید و هنگام تهیه از دستکش و تهویه مناسب استفاده کنید.
- سیفتی باکس با میزانی از سفید کننده خانگی پر شود که قسمت آلوده سواب و لام در آن غوطه ور شوند.
- پس از انجام آزمایش و بررسی نمونه های آلوده به مایکوباکتریوم ها ، اپلیکاتور چوبی یا لوپ یک بار مصرف و پسماندها را در سیفتی باکس حاوی محلول سفید کننده خانگی رقیق شده با آب به نسبت ۱ به ۱ (یک حجم سفید کننده خانگی به اضافه یک حجم آب، معادل ۲۵۰۰۰ ppm) غوطه ور نمایید. در سیفتی باکس را قبل از خروج از کابینت ایمنی بیولوژیک ببندید و سپس محلول سفید کننده خانگی را در شرایط ایمن تخلیه نمایید. منظور از شرایط ایمن، الزامی بودن استفاده کاربر آزمایشگاه از وسایل و پوشش های حفاظت فردی کامل (شامل ماسک N95 ، گان، دستکش، عینک و شیلد محافظ صورت) در هنگام تخلیه محلول سفید کننده است. همچنین قبل از تخلیه اطمینان حاصل کنید که تمامی وسایل در محلول سفید کننده خانگی غوطه ور باشند، در غیر این صورت محلول سفید کننده خانگی رقیق شده با آب به نسبت ۱ به ۱ را در سیفتی باکس برای حداقل زمان ۳۰ دقیقه بریزید.
- قسمت تخلیه باید مجهز به هواکش قوی باشد. در مرحله بعد سیفتی باکس تخلیه شده را داخل کیسه مخصوص اتوکلاو قرار داده و در پایان هر شیفت کاری طبق دستورالعمل امحاء پسماندهای عفونی اتوکلاو کنید.^۶
- قبل از اتوکلاو سیفتی باکس، محلول سفید کننده خانگی باید در شرایط ایمن به آرامی تخلیه شود. سفیده کننده ها میتوانند موجب آتش سوزی، انفجار و تخریب اتوکلاو شوند.
- به دلیل اینکه مواد شیمیایی بسیار فرار می توانند در اثر حرارت تبخیر، منتشر و مشتعل شوند، مواد شیمیایی سمی، مواد خورنده (مانند اسیدها، بازها، فنل ها)، حلال ها یا بخارات فرار (مانند اتانول، متانول، استون، کلروفرم) موجود در پسماند، نباید اتوکلاو شوند.
- پسماندهای آزمایشگاه سل در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ تا ۴۵ دقیقه اتوکلاو می شوند.^۲
- برای گندزدایی باگت های دستگاه سانتریفیوژ هرگز از محلول هیپوکلریت سدیم (سفید کننده خانگی)

استفاده نکنید، چون به علت خاصیت خورندگی این محلول، باعث آسیب به قسمت های فلزی آن می شود. مطابق دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی (WHO) برای گندزدایی باگت های سانتریفیوژ از اتوکلاو استفاده کنید. البته توجه به این نکته ضروری است که قسمت های پلاستیکی باگت ها، حتما قابلیت اتوکلاو داشته باشند.^۴

References:

- 1- Handbook on tuberculosis laboratory diagnostic methods in the European Union – Updated 2025 Stockholm: ECDC; 2025.
- 2- Hall GS. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 16th ed. American Society for Clinical Pathology; 2025.
- 3- HANDBOOK FOR THE BACTERIOLOGIC DIAGNOSIS OF TUBERCULOSIS. PART 1: SMEAR MICROSCOPY UPDATE / Program "Strengthening of the Network of Tuberculosis Laboratories in the Region of the Americas" -- Lima: ORAS - CONHU; 2018.
- 4- WHO Tuberculosis laboratory biosafety manual 2012
- ۵- دستورالعمل فرآیند گندزدایی و سترون سازی در آزمایشگاه پزشکی. دکتر شهلا فارسی. وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، آزمایشگاه مرجع سلامت
- ۶- دستورالعمل نحوه مدیریت پسماندهای عفونی در آزمایشگاه پزشکی. دکتر شهلا فارسی. وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، آزمایشگاه مرجع سلامت
- ۷- دستورالعمل تشخیص آزمایشگاهی باسیلهای اسید فست (مایکوباکتریومهای توبرکلوزیس و غیر توبرکلوزیس) به روش بررسی میکروسکوپی گستره مستقیم-۱۴۰۴ آزمایشگاه مرجع سلامت وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی.

تهیه شده در آزمایشگاه مرجع منطقه ای سل معاونت بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تبریز

(SOP) دستورالعمل هضم و آلودگی زدایی نمونه ها با استفاده از

هیدروکسید سدیم - روش پتروف اصلاح شده

۸-۱ مزایای آلوده زدایی نمونه ها به روش پتروف اصلاح شده

جهت انجام آزمایش کشت مایکوباکتریوم ها، نمونه های آلوده باید تحت روش های دقیق آلوده زدایی قرار گیرند که باعث مایع شدن بقایای آلی و حذف فلور طبیعی (میکروبیوتای) ناخواسته می شود. در صورت عدم دقت در فرآیند آلوده زدایی نمونه، فلور طبیعی به سرعت در تمام سطح محیط کشت رشد می کند و قبل از شروع رشد باسیل های سل، مواد مغذی محیط کشت را مصرف می کند. همچنین، نمونه ها باید همگن (هموژن) شوند تا باسیل ها از مخاط، سلول ها یا بافتی که ممکن است در آن قرار گرفته باشند، آزاد شوند.^۱ هیدروکسید سدیم برای باسیلهای اسید فست و میکروبیوتای (فلور طبیعی) همراه نمونه، سمی است. بنابراین دقت در رعایت زمان های مشخص شده ضروری می باشد. این روش هضم و آلودگی زدایی می تواند فقط برای نمونه هایی که بر روی محیط های کشت جامد تلقیح می شوند، استفاده گردد.^۳ روش اصلاح شده پتروف در مقایسه با روش پتروف به زمان کمتر، میزان آلودگی کمتر و بازده بالاتر در مثبت بودن کشت نیاز دارد که آن را به روشی مناسب تر و بهتر برای تغلیظ و آلوده زدایی تبدیل می کند.

۸-۲ مراحل آماده سازی معرف های مورد استفاده در روش پتروف اصلاح شده (Modified Petroff method)

معرف ها شامل :

محلول هیدروکسید سدیم ۴٪ درصد (NaOH) و محلول بافر فسفات ۰/۰۶۷ مول / لیتر با pH= ۶/۸

۸-۲-۱ روش آماده سازی محلول هیدروکسید سدیم ۴٪

محلول هیدروکسید سدیم ۴٪ درصد	
هیدروکسید سدیم	۴ گرم
آب مقطر	۱۰۰ میلی لیتر

هیدروکسید سدیم را در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل نمایید. سپس آن را در ظروف شیشه ای دردار قابل اتوکلاو ریخته، در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو نمایید. رعایت شرایط و استفاده از ظروف شیشه ای استریل در تمام مراحل آزمایش آلوده زدایی نمونه ها، الزامی است.

۸-۲-۲ روش آماده سازی محلول بافر فسفات ۰/۰۶۷ مول / لیتر با pH=۶/۸

مقدار ۹/۴۷ گرم از پودر دی سدیم فسفات بدون آب ($\text{anhydrous Na}_2\text{HPO}_4$) را به دقت با ترازو وزن کرده و در ۱ لیتر آب مقطر حل کنید. در مرحله بعد، مقدار ۹/۰۷ گرم از پودر مونو پتاسیم فسفات (KH_2PO_4) را در ۱ لیتر آب مقطر حل نمایید. سپس بسته به نیاز، مقدار حجم مساوی از محلول ذخیره A و محلول ذخیره B را با یکدیگر مخلوط کنید (به عنوان مثال ۵۰ میلی لیتر از محلول ذخیره A و ۵۰ میلی لیتر از

محلول ذخیره B را مخلوط کنید).^۱

با استفاده از دستگاه pH متر یا کاغذ تورنسل (در صورت عدم دسترسی) اطمینان حاصل کنید که $pH = 6/8$ می باشد. در صورت تنظیم نبودن pH، مراحل تهیه محلول ها را بازنگری کنید. همچنین در صورت دسترسی بودن اسید فسفریک ۱۰٪ و هیدروکسید سدیم ۱۰٪، می توانید از آنها برای تنظیم pH استفاده نمایید. می باشد.^۳

در نهایت محلول مخلوط شده را به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد اتوکلاو کنید.

محلول بافر فسفات ۰/۰۶۷ مول / لیتر		
محلول ذخیره A	دی سدیم فسفات	۹/۴۷ گرم
	آب مقطر	۱ لیتر
محلول ذخیره B	مونو پتاسیم فسفات	۹/۰۷ گرم
	آب مقطر	۱ لیتر

۸-۲-۳ شرایط نگهداری محلول بافر فسفات ۰/۰۶۷ مول / لیتر با $pH=6/8$

حجم مخلوط محلول A و B را باید تازه و باتوجه به نیاز مصرف روزانه تهیه کرد.^۳ محلول های ذخیره A و B بافر فسفات در بطری های استریل درب دار و در یخچال با دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری می شوند. با توجه به توصیه برخی منابع بر نگهداری حداکثر تا یک هفته از تاریخ تهیه محلولهای بافر، تا هر زمانی که در محلول نشانه هایی از آلودگی شامل کدورت و تغییر رنگ مشاهده نشود، می توانید از محلولهای ذخیره استفاده کنید.^۲

جهت تایید استریل بودن بافر، چندقطره از محلول بافر فسفات آماده (اتوکلاو شده) را در محیط بلاداگارد شرایط استریل کشت دهید و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری کنید. در صورت عدم رشد کلنی، استریل بودن محلول تایید می شود.^۲

۸-۳ روش انجام آلوده زدایی نمونه ها به روش پتروف اصلاح شده^۳

- نمونه خلط را در لوله های سانتریفیوژ پلاستیکی مدرج (فالكون) استریل در پیچدار بریزید. از یک لوله فالكون استریل برای هر نمونه استفاده شود.
- با استفاده از یک ماژیک مقاوم به پاک شدن، شماره نمونه را بر روی بدنه لوله فالكون بنویسید (شماره نمونه بر روی در لوله نوشته نشود).
- حجم نمونه خلط را بر روی لوله فالكون علامت بزنید (حداقل ۲ میلی لیتر و حداکثر ۵ میلی لیتر) و به حجم مساوی از نمونه به آن سود ۴٪ اضافه کرده و در لوله را محکم ببندید.
- نمونه داخل لوله را با استفاده از دستگاه ورتکس با دور متوسط، به هم بزنید تا فرایند هضم صورت گیرد. دقت کنید فرآیند هم زدن بیشتر از ۲۰ ثانیه طول نکشد.
- اجازه دهید نمونه برای مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق بماند تا عمل هضم کامل شود.
- لوله را تا ۲ سانتیمتر بالای آن با بافر فسفات پر کنید تا اثر سود کاملاً خنثی شود.
- لوله را به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰ سانتریفیوژ کنید.
- با دقت و یکباره مایع رویی را در یک سیفتی باکس حاوی محلول سفید کننده خانگی رقیق شده با

آب به نسبت ۱ به ۱ (یک حجم سفید کننده خانگی به اضافه یک حجم آب، معادل ۲۵۰۰ ppm بریزید).
۹) مجدداً رسوب را با حدود ۰/۳ تا ۰/۵ میلی لیتر بافر فسفات حل کنید.
۱۰) مقدار ۲۰۰ میکرولیتر (معادل ۴ قطره) از رسوب را با پی پت پلاستیکی یکبار مصرف استریل برداشته و به آرامی داخل محیط کشت لون اشتاین جانسون که از قبل شماره گذاری کرده اید، تلقیح کنید.^۲
دقت کنید هنگام تلقیح، سطح محیط خراش بر ندارد و نوک پی پت آلوده نشود. در مرحله بعد، یک قطره از رسوب را با همان پی پت برداشته و بر روی لام شماره گذاری شده قرار داده و گستره را به شکل بیضی و در مرکز لام تهیه نمایید.

References:

- 1- Handbook on tuberculosis laboratory diagnostic methods in the European Union – Updated 2025. Stockholm: ECDC; 2025.
- 2- National Standard Operating Procedures for Tuberculosis laboratory version 2 January, 2017
- ۳- دستورالعمل تشخیص آزمایشگاهی باسیلهای اسید فست (مایکوباکتریومهای توپر کلوزیس و غیر توپر کلوزیس) به روش بررسی میکروسکوپی گستره مستقیم-۱۴۰۴ آزمایشگاه مرجع سلامت وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی

(SOP) دستورالعمل هضم و آلودگی زدایی نمونه ها با استفاده از

هیدروکسید سدیم - روش پتروف

۱۷-۱ آشنایی با آلوده زدایی نمونه ها به روش پتروف (Petroff method)

جهت انجام آزمایش کشت مایکوباکتریوم ها، نمونه های آلوده باید تحت روش های دقیق آلوده زدایی قرار گیرند که باعث مایع شدن بقایای آلی و حذف فلور طبیعی (میکروبیوتای) ناخواسته می شود. در صورت عدم دقت در فرآیند آلوده زدایی نمونه، فلور طبیعی به سرعت در تمام سطح محیط کشت رشد می کند و قبل از شروع رشد باسیل های سل، مواد مغذی محیط کشت را مصرف می کند. همچنین، نمونه ها باید همگن (هموژن) شوند تا باسیل ها از مخاط، سلول ها یا بافتی که ممکن است در آن قرار گرفته باشند، آزاد شوند.^۱

نمونه های بالینی ارسالی به آزمایشگاه سل شامل دو دسته هستند: نمونه های استریل و غیر استریل. نمونه های دستگاه تنفسی تحتانی غیر استریل شامل خلط، لاواژ برونکوالوئولار (BAL) و Endotracheal Aspirate است که به وسیله میکروبیوتای (فلور طبیعی) تنفسی آلوده می شوند. نمونه ادرار نیز جزو نمونه های غیراستریل محسوب می شود.

نمونه های استریل شامل مایع سینوویال، CSF، نمونه های چرک گرفته شده از آبسه سرد، نمونه های بیوپسی جراحی و مایعات حفرات داخلی بدن می باشند.^۳

به علت موکوبیدی بودن و میزان بالای آلودگی نمونه های تنفسی از جمله خلط، توصیه می شود نمونه ها همگن شوند تا در صورت وجود باسیل اسید فست در نمونه از موکوس آزاد شوند. برای آلودگی زدایی، هضم و تغلیط نمونه ها از روشهای پتروف، پتروف اصلاح شده و روش ان استیل ال سیستمین می توان استفاده کرد. هیدروکسید سدیم برای باسیلهای اسید فست و میکروبیوتای (میکروفلورا) همراه نمونه، سمی است. بنابراین دقت در رعایت زمان های مشخص شده ضروری می باشد. این روش هضم و آلودگی زدایی می تواند فقط برای نمونه هایی که بر روی محیط های کشت جامد تلقیح می شوند، استفاده گردد.^۳

۱۷-۲ مراحل آماده سازی معرف های مورد استفاده در روش پتروف (Petroff method)

معرف ها شامل :

محلول هیدروکسید سدیم ۴٪ درصد (NaOH)، محلول نرمال اسید هیدروکلریدریک و اندیکاتور فنل فتالین یا فنل رد

۱۷-۲-۱ روش آماده سازی محلول هیدروکسید سدیم ۴٪

محلول هیدروکسید سدیم ۴٪ درصد	
هیدروکسید سدیم	۴ گرم
آب مقطر	۱۰۰ میلی لیتر

هیدروکسید سدیم را در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل نمایید. سپس آن را در ظروف شیشه ای دردار قابل اتوکلاو ریخته، در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو نمایید.

توجه!

رعایت شرایط و استفاده از ظروف شیشه ای استریل در تمام مراحل آزمایش آلوده زدائی نمونه ها، الزامی است.

۱۷-۲-۲ روش آماده سازی محلول نرمال اسید هیدروکلریدریک

با استفاده از فرمول محاسبه غلظت مولار یا غلظت نرمال اسید، باتوجه به اینکه نرمالیت اسید هیدروکلریدریک ۳۷٪، تقریبا برابر با عدد ۱۲ می باشد، برای تهیه محلول نرمال اسید، مقدار ۸۳ میلی لیتر از اسید هیدروکلریدریک غلیظ را در ۹۱۷ میلی لیتر آب مقطر استریل حل کنید.

$$CM = \frac{10 \text{ a d}}{M} = \frac{\text{دانسیتة } \times \text{ درصد خلوص } \times 10}{\text{جرم مولکولی}} \Rightarrow CM_1 V_1 = CM_2 V_2$$

$$N = \frac{10 \text{ a d}}{E} = \frac{\text{دانسیتة } \times \text{ درصد خلوص } \times 10}{\text{اکی والان}} \Rightarrow N_1 V_1 = N_2 V_2$$

$$E = \frac{M}{n} = \frac{\text{جرم مولکولی}}{\text{ظرفیت}} \quad \text{اکی والان}$$

مقادیر درصد خلوص، دانسیته و جرم مولکولی محلول اسید، در کاتالوگ یا برچسب روی شیشه اسید قابل مشاهده است.

۱۷-۲-۳ روش آماده سازی محلول اندیکاتور فنل فتالئین ۰/۱٪

مقدار ۱ گرم از پودر اندیکاتور فنل فتالئین را در ۱۰۰ میلی لیتر الکل اتانول ۷۰ درصد حل کنید.

۱۷-۲-۴ شرایط نگهداری محلول ها

محلولهای ذخیره هیدروکسید سدیم ۴٪ (NaOH)، محلول نرمال اسید هیدروکلریدریک و اندیکاتور فنل فتالئین یا فنل رد، در بطری های استریل درب دار و در دمای اتاق نگهداری می شوند. توصیه می شود جهت کاهش آلودگی محلول های ذخیره، در هنگام انجام فرآیند خنثی سازی نمونه، مقدار مورد نیاز از محلولهای ذخیره را در لوله های درب دار مک کارتنی استریل ریخته و استفاده کنید.

۱۷-۳ روش آلوده زدایی نمونه ها به روش پتروف (Petroff method)

(۱) حدود ۵ میلی لیتر خلط را در فالكون با حجم ۵۰ میلی لیتر می ریزیم و ۱۰ میلی لیتر معادل دو برابر حجم نمونه به آن سود ۴٪ اضافه می کنیم. در صورتیکه حجم نمونه کمتر از ۵ میلی لیتر بود به میزان دو برابر آن سود اضافه می نماییم. به عنوان مثال ۴ میلی لیتر نمونه و ۸ میلی لیتر سود ۴٪. برای انجام صحیح عمل هضم و همگن (هموژن) شدن نمونه و مخلوط کردن مناسب توصیه می شود در حجم های نمونه بیش از ۳ میلی لیتر از فالكون با حجم ۵۰ میلی لیتر و در حجم های زیر ۳ میلی لیتر از فالكون با حجم ۱۵ میلی لیتر استفاده شود.^۳

(۲) نمونه را در حالتی که درب لوله فالكون کاملا محکم بسته شده، به خوبی با دستگاه ورتکس به هم بزینید تا همگن شود و موکوس و فلور طبیعی آن از بین برود. دقت کنید فرآیند هم زدن بیشتر از ۲۰

ثانیه طول نکشد. همچنین بهتر است جهت جلوگیری از پخش شده آيروسل های آلوده حاوی مایکوباکتریوم ها، هنگام ورتکس کردن نمونه، با قراردادن یک عدد گاز آغشته به الکل اتانول ۷۰ درصد، قسمت بالا و دور درب لوله فالكون را بپوشانید.

۳) جهت تاثیر بهتر فرآیند آلوده زدایی، اجازه دهید نمونه به مدت ۱۵ دقیقه در مجاورت سود در دمای اتاق بماند.^۳

۴) لوله های فالكون حاوی نمونه را برای مدت ۱۵ دقیقه با دور g ۳۰۰۰ تا ۳۵۰۰ سانتریفیوژ کنید. پس از پایان سانتریفیوژ، مایع رویی (supernatant) را در سیفتی باکس حاوی محلول تازه سفیدکننده خانگی ۵۰ درصد بریزید.

۵) در این مرحله جهت خنثی کردن اثر سود و آماده سازی pH نمونه برای تلقیح به محیط کشت، مراحل زیر را به دقت ادامه دهید. مقدار یک قطره فنل فتالین ۰/۱ درصد بر روی رسوب نمونه بریزید تا رنگ رسوب به ارغوانی تغییر رنگ کند. چنانچه می دانیم اندیکاتور فنل فتالین در محلولهای با pH اسیدی، بی رنگ، در شرایط خنثی صورتی کم رنگ و در محیط های قلیایی، ارغوانی رنگ می باشد. ۶) به منظور خنثی شدن، بر روی رسوب ارغوانی رنگ نمونه با استفاده از پی پت پاستور استریل، قطره قطره اسید کلریدریک ۷ درصد (یک نرمال) را بریزید تا صورتی کم رنگ شود. به محض تغییر رنگ، اضافه کردن اسید را متوقف کنید. با استفاده از نوار کاغذی نشانگر pH اطمینان حاصل کنید که pH رسوب ۷ باشد، در غیر این صورت تیتراسیون را با افزودن سود ۰/۵ نرمال و اسید هیدروکلریدریک ۰/۲ نرمال تا رسیدن به pH خنثی (صورتی کم رنگ) ادامه دهید.

۷) رسوب را با پی پت پاستور پلاستیکی استریل برداشته، قبل از تهیه لام ابتدا مقدار ۲۰۰ میکرولیتر (معادل ۴ قطره) از آن را در محیط کشت لون اشتاین جانسون شماره گذاری شده تلقیح کنید، سپس با باقی مانده رسوب در پی پت، بر روی لام شماره گذاری شده، گستره ای به طول ۲ و عرض ۱ سانتی متر تهیه کنید.^۳

۸) پس از تلقیح درب محیط کشت را بسته و با حرکت دورانی، اجازه دهید نمونه در تمام سطح محیط پخش شود. قبل از قراردادن محیط کشت در انکوباتور ۳۷ درجه، درب محیط را نیم تا یک دور به حالت نیمه شل باز کنید و پس از ۴۸ ساعت درب را ببندید تا شرایط هوازی اجباری برای رشد مایکوباکتریوم ها فراهم شود.

References:

- 1- Handbook on tuberculosis laboratory diagnostic methods in the European Union – Updated 2025. Stockholm: ECDC; 2025.
- 2- National Standard Operating Procedures for Tuberculosis laboratory version 2 January, 2017
- ۳- دستورالعمل تشخیص آزمایشگاهی باسیلهای اسید فست (مایکوباکتریومهای توپر کلوزیس و غیر توپر کلوزیس) به روش بررسی میکروسکوپی گستره مستقیم-۱۴۰۴ آزمایشگاه مرجع سلامت وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی

(SOP) دستورالعمل تعیین هویت مایکوباکتریوم ها به روش شیمیایی

(آزمایش تجمع نیاسین (Niacin Accumulation))

۱-۱۰ اساس آزمایش نیاسین

نیاسین (اسید نیکوتینیک) نقش مهمی در واکنش‌های اکسیداسیون-کاهشی که در طول متابولیسم مایکوباکتریوم‌ها رخ می‌دهند، ایفا می‌کند. نیاسین به عنوان یک محصول متابولیک توسط همه مایکوباکتریوم‌ها ایجاد می‌شود، ولی غالب مایکوباکتریوم‌ها دارای آنزیمی هستند که نیاسین را به نیاسین ریبونوکلئوتید تبدیل می‌کند. بعضی از مایکوباکتریوم‌ها مانند مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (در ۹۵ درصد موارد) فاقد این آنزیم بوده و لذا نیاسین آزاد به صورت اسید نیکوتینیک در محیط کشت آن‌ها تجمع پیدا می‌کند، که مقدار آن با تعداد کلنی‌ها و عمر کشت ارتباط دارد. در آزمایش شیمیایی برای تجسس وجود نیاسین، این ماده در حضور یک آمین اولیه مانند آنیلین یا اورتوتولوئیدین همراه با برومورسیانوزن تشکیل یک ماده زرد رنگ می‌دهد که نشان دهنده مثبت بودن نتیجه آزمایش می‌باشد.^{۱و۵}

آزمایش نیاسین برای تعیین هویت کلنی مایکوباکتریوم‌ها در محیط‌های کشت بر پایه تخم مرغ زمانی انجام می‌شود که ۳ تا ۴ هفته از زمان کشت سپری شده باشد و یا حداقل ۵۰ کلنی در محیط کشت قابل تشخیص باشد. آزمایش منفی نیاسین نیازمند تکرار با رشد کلنی در هفته‌های بیشتر است.^۱ اگر رشد کافی در محیط اولیه لون اشتاین جانسن (که محیط کشت مبتنی بر تخم، تجمع نیاسین آزاد را افزایش می‌دهد) وجود داشته باشد، تست نیاسین را می‌توان بلافاصله انجام داد. اگر رشد در کشت اولیه کم باشد، کلنی‌ها باید با یک سواب پنبه‌ای استریل (پس از تعیین سرعت رشد) پخش شوند تا تلقیح در سراسر محیط توزیع شود. سپس محیط کشت انکوبه می‌شود تا زمانی که رشد در سطح محیط بدون نور، قابل مشاهده باشد.^۴

امروزه تعیین هویت مایکوباکتریوم‌ها به روش شیمیایی به ندرت کاربرد دارد و با توجه به توصیه‌های سازمان بهداشت جهانی مبنی بر تشخیص و تعیین هویت سریع مایکوباکتریوم‌ها جهت اجرای برنامه‌های کنترل و مبارزه با بیماری سل، از روشهای سریع مانند آزمایش

بررسی تجمع نیاسین مطابق توصیه برخی منابع، نباید جهت تعیین هویت کلنی مایکوباکتریوم‌های سریع رشد مانند *M.chelonae* و *M.fortuitum* group و مایکوباکتریوم‌های اسکوتوکروموژن مانند *M.gordonae* و *M.scrofulaceum* استفاده شود.^۱

۱-۲ دستورالعمل تهیه و مواد مورد نیاز جهت انجام آزمایش تجمع نیاسین

۱-۲-۱۰ مواد مورد نیاز:^۵

(۱) محلول آنیلین ۴ درصد / اورتوتولوئیدین ۴ درصد / بنزیدین ۴ درصد

(۲) محلول سیانوزن برماید ۱۰ درصد

(۳) آب مقطر استریل

(۴) محیط کشت لون اشتاین جانسن با تعداد حداقل ۵۰ کلنی

(۵) لوپ استریل

(۶) لوله مک کارتنی ۱۵ میلی لیتری

۱۰-۲-۲ روش تهیه محلولهای مورد نیاز آزمایش تجمع نیاسین^۵:

❖ **محلول آنیلین ۴ درصد:** مقدار ۲ میلی لیتر از معرف آنیلین بی رنگ را در ۴۸ میلی لیتر الکل اتانول ۹۶ درصد حل کنید.

❖ **محلول اورتوتولوئیدین ۴ درصد:** مقدار ۲ میلی لیتر از محلول اورتوتولوئیدین را در ۴۸ میلی لیتر الکل اتانول ۹۶ درصد حل کنید. دقت کنید که اورتوتولوئیدین سمی بوده و لازم است در هنگام توزیع محلول، دستورالعمل و احتیاط های کار با محلول های سمی شیمیایی رعایت شود.

❖ **محلول بنزیدین ۴ درصد:** مقدار ۲ گرم از پودر بنزیدین را با ترازو وزن کرده در ۴۸ میلی لیتر الکل اتانول ۹۶ درصد حل کنید.

❖ **محلول سیانوژن برماید ۱۰ درصد:** به دلیل اینکه سیانوژن برماید به صورت پودر بسیار سمی و خطرناک است، لازم است تمام مراحل تهیه این محلول داخل هود شیمیایی انجام شده و همچنین قبل از تهیه محلول از لوازم حفاظت فردی (PPE) شامل ماسک، دستکش و روپوش مناسب استفاده شود. مقدار مورد نیاز از محلول سیانوژن برماید ۱۰ درصد بر اساس تعداد نمونه آزمایش تجمع نیاسین تهیه می شود. به عنوان مثال جهت تهیه ۲۰ میلی لیتر از محلول فوق، مقدار ۲ گرم از پودر سیانوژن برماید را در ترازو وزن کرده، آن را در یک لوله مک کارتنی در بسته استریل که حاوی ۲۰ میلی لیتر آب مقطر استریل است، حل کنید.

تمامی محلول های تهیه شده، در داخل شیشه های تیره با درب محکم بسته شده و با نصب برچسب مشخص نام محلول، تاریخ تهیه و نام تهیه کننده محلول، در یخچال نگهداری می شوند.^۳ توصیه می شود جهت نتایج بهتر آزمایش نیاسین، تمام محلول های فوق به صورت تازه و به مقدار مورد نیاز تهیه شود.

۱۰-۳ روش انجام آزمایش تجمع نیاسین

۱۰-۳-۱ روش لوله ای محلول های شیمیایی آزمایش تجمع نیاسین

(۱) ابتدا داخل هود کلاس ۲، محیط کشت لون اشتاین جانسن حاوی حداقل ۵۰ کلنی را با لوپ استریل بصورت منظم و از انتهای محیط به سمت درب آن و با فروبردن نصف لوپ استریل در محیط خراش دهید.

(۲) مقدار ۲ میلی لیتر از آب مقطر استریل را به آرامی روی محیط کشت اضافه کنید و درب محیط را بسته و به مدت ۳۰ تا ۴۵ دقیقه در دمای اتاق و داخل هود، جهت حل شدن بهتر نیاسین موجود در محیط حاوی آب مقطر استریل، انکوبه کنید.^{۳،۵}

(۳) پس از انجام مراحل برچسب گذاری و تطبیق شماره روی محیط با لوله های فالكون ۱۵ میلی لیتری، به تمام لوله ها مقدار ۰/۵ میلی لیتر (معادل ۵۰۰ میکرولیتر) معرف اورتوتولوئیدین ۴ درصد اضافه کنید.

(۴) مقدار ۰/۵ میلی لیتر از محلول محیط کشت را با پی پت پاستور استریل، به لوله فالكون مربوطه انتقال دهید.

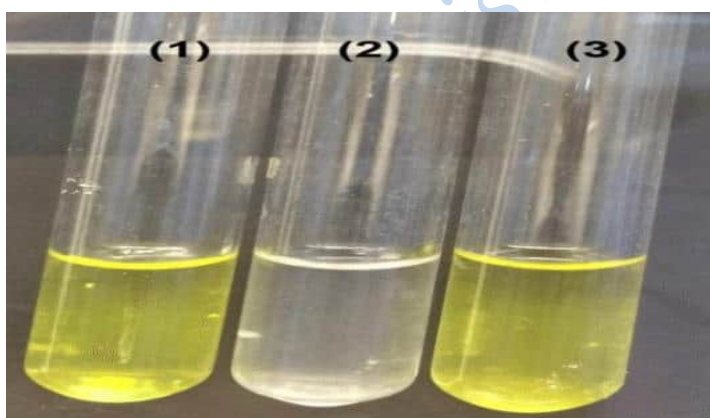
(۵) در مرحله آخر مقدار ۰/۵ میلی لیتر از معرف سیانوژن بروماید ۱۰ درصد را به تمام لوله های آزمایش اضافه کنید. نمایان شدن رنگ زرد در محلول نشانگر وجود نیاسین بوده و نتیجه را با انطباق شماره محیط مربوطه به صورت مثبت ثبت کنید. اگر تغییر رنگی مشاهده نشود نتیجه تست نیاسین منفی است (تصویر ۱۰-۱).

۶) جهت تایید نتایج مشکوک یا منفی، یک باردیگر آزمایش را با معرف بنزیدین ۴ درصد مطابق مراحل ذکر شده، تکرار کنید. در این مرحله در صورت ظهور رنگ قرمز ارغوانی همراه با کدورت در لوله، نتیجه آزمایش به صورت مثبت گزارش می شود. در پایان آزمایش نیاسین، جهت خنثی سازی و جلوگیری از ایجاد بخارهای سمی هیدروژن سیانید، فالكون های حاوی سیانوژن برماید را با محلول هیدروکسید سدیم ۱۰ درصد (سود سوزآور) تا انتها پر کرده و درب لوله را ببندید.^۳

سیانوژن برماید، در حضور آب هیدرولیز شده و می تواند هیدروژن سیانید HCN آزاد کند، که آن هم از طریق مهار آنزیم سیتوکروم اکسیداز باعث جلوگیری از تنفس سلولی، هیپوکسی بافتی، آسیب CNS و در دوزهای بالا باعث مرگ می شود. در نتیجه در مواقع استفاده آزمایشگاهی از این محلول سمی، علاوه بر رعایت حداکثر شرایط ایمنی، استفاده از هود با مکش قوی و وسایل حفاظت شخصی (PPE) الزامی است.^۷

یک تست مثبت نیاسین شواهد اولیه ای است که نشان می دهد ارگانسمی با کلنی کند رشد، خشن و ناهموار (rough) و به رنگ کرم (buff-colored) ممکن است M. tuberculosis باشد. با این حال، این تست برای تایید شناسایی کافی نیست.^۴

در آزمایش بررسی تجمع نیاسین، از نمونه کلنی محیط کشت M. tuberculosis یا محلول قرص اسید نیکوتینیک به عنوان کنترل مثبت، و از نمونه کلنی محیط کشت M. terrae و M. intracellulare به عنوان کنترل منفی استفاده می شود.^۳ همچنین در صورت عدم دسترسی به کلنی M. terrae و M. intracellulare می توانید از آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی استفاده کنید.

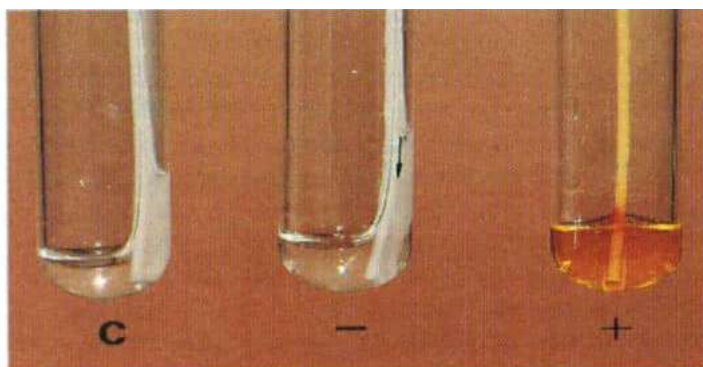


تصویر ۱۰-۱. نتایج آزمایش بررسی تجمع نیاسین. (۱) کنترل مثبت (۲) کنترل منفی (۳) نمونه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با نتیجه آزمایش نیاسین مثبت

۱۰-۳-۲ روش نواری آزمایش تجمع نیاسین (Niacin Test with Paper Strips)

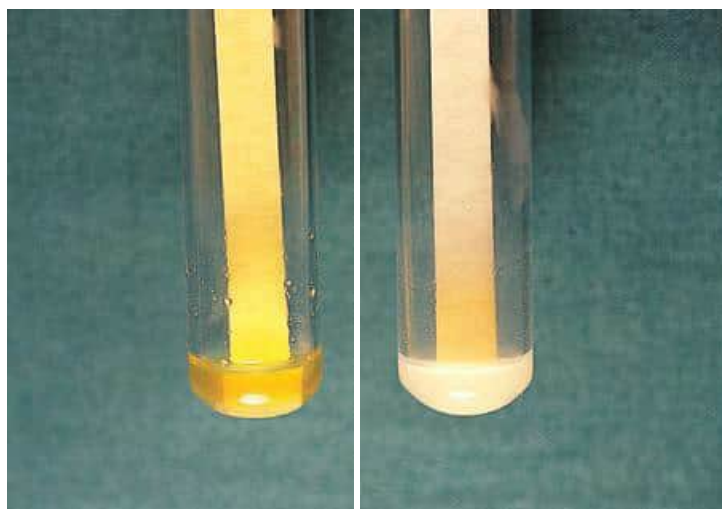
در این روش مطابق مراحل ۱ و ۲ روش لوله ای، آزمایش را انجام دهید. در یک لوله شفاف استریل یا مک کارتنی ۱۵ میلی لیتری، مقدار ۰/۵ میلی لیتر از محلول محیط کشت نمونه را داخل لوله ریخته و یک عدد نواری کاغذی نیاسین (Niacin strip) را به صورت عمودی داخل لوله قرار دهید. درب لوله را بسته و ۱۵ تا ۲۰ دقیقه در دمای اتاق و زیر کابینت بیولوژیکی (هود) در دمای اتاق، قرار دهید.^۳ مطابق تصویر شماره ۱۰-۲ ظاهر شدن رنگ زرد در محلول نشان دهنده واکنش مثبت تجمع نیاسین است. در این مرحله تغییر رنگ کاغذ را نادیده بگیرید.^{۲ و ۵}

استفاده از نمونه های کنترل مثبت و منفی مطابق روش قبلی، معتبر بوده و الزامی است.^۵



COLOR PLATE 12. Niacin paper strip test.

تصویر ۱۰-۲. نتایج آزمایش بررسی تجمع نیاسین به روش نوار کاغذی^۲



تصویر ۱۰-۳. نتایج آزمایش بررسی تجمع نیاسین به روش نوار کاغذی-سمت چپ: نیاسین مثبت، تغییر رنگ مایع به زرد
سمت راست: نیاسین منفی، باقی ماندن رنگ مایع به صورت سفید شیری و یا شفاف بدون تغییر رنگ^۴

References:

- 1- Textbook of Diagnostic Microbiology, 7th Edition-by Connie R. Mahon and Donald C. Lehman, Elsevier2023
- 2- https://www.aphl.org/programs/infectious_disease/tuberculosis/TBCore/Identification of Mycobacteria.pdf
- 3- National Standard Operating Procedures for Tuberculosis laboratory version 2 January, 2017
- 4- Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology /2022
- ۵- اصول میکوباکتریولوژی، دکتر سیدرضا مودب و دکتر عبدالناصر رفیع-مرکز تحقیقات سل و بیماریهای ریوی تبریز-۱۳۸۰
- ۶- دستورالعمل تشخیص آزمایشگاهی باسیلهای اسید فست(مایکوباکتریومهای توپرکلوزیس و غیر توپرکلوزیس) به روش بررسی میکروسکوپی گستره مستقیم-۱۴۰۴ آزمایشگاه مرجع سلامت وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی
- 7- <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cyanogen-Bromide>

تهیه شده در آزمایشگاه مرجع منطقه ای سل معاونت بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تبریز

(SOP) دستورالعمل تهیه محیط کشت لون اشتاین جانسن

۱۳-۱ محیط های کشت بر پایه تخم مرغ

رایج ترین محیط کشت بر پایه تخم مرغ مورد استفاده در آزمایشگاه های کشت سل ، محیط کشت لون اشتاین جانسن (LJ) (Löwenstein-Jensen) ، است. سایر محیط های کشت بر پایه تخم مرغ عبارتند از: محیط های کشت اوگوا، (ATS (American Thoracic Society)، Mycobactosel، Petragnani و Gruft (Modification of LJ)^۱.

در اغلب آزمایشگاه ها برای جداسازی اولیه و تعیین گونه از محیط های کشت لون اشتاین جانسن حاوی گلیسرول یا پیرووات استفاده می کنند. محیط کشت حاوی گلیسرول، امکان رشد بهتر مایکوباکتریوم توپر کلوزیس رافراهم می سازد و محیط کشت حاوی پیرووات، باعث تسریع رشد مایکوباکتریوم بوویس می شود. اغلب سوش های مایکوباکتریوم بوویس، نمی توانند به عنوان منبع کربن از گلیسرول استفاده کنند.^۴

۱۳-۲ محیط کشت لون اشتاین جانسن

در فرمولاسیون اولیه این محیط که اولین بار توسط لون اشتاین ارائه گردید از کونگو قرمز (congo red) و مالاشیت گرین جهت مهار رشد باکتری های ناخواسته (غیر مایکوباکتریوم ها) استفاده شد. فرمولاسیون حاضر توسط جانسن، با حذف کونگو قرمز و استفاده از غلظت متعادلی از مالاشیت گرین، براساس یک محیط گلیسرول بر پایه تخم مرغ، اصلاح گردید.^۳ این فرمول جدید همچنین زمان تشکیل کلنی و رشد مایکوباکتریوم ها را افزایش داد. محیط کشت لون اشتاین جانسن (Löwenstein-Jensen) دارای انواع مختلفی است. در موارد کاربردی در آزمایشگاه های تشخیص سل، به طور معمول این محیط شامل محلول نمک های معدنی، محلول مالاشیت گرین، گلیسرول و تخم مرغ هموژنیزه کامل است.^۴

در محیط کشت لون اشتاین جانسن ، آسپاراژین به عنوان منبع نیتروژن، مونوپتاسیم فسفات و سولفات منیزیم باعث افزایش رشد مایکوباکتری ها، گلیسرول منبع کربن و مواد مغذی و تخم مرغ منبع اسید چرب و پروتئین جهت متابولیسم مایکوباکتریوم ها و مالاشیت گرین مهارکننده رشد باکتری های ناخواسته (غیر مایکوباکتریوم ها) می باشند.^۳

۱۳-۳ روش تهیه محیط کشت لون اشتاین جانسن

از نمک های معدنی به مقدار مطابق جدول ۱۷-۱ جهت تهیه محیط کشت لون اشتاین جانسن در آزمایشگاه، استفاده می شود.

مقدار لازم	نام ماده مورد نظر
۲/۴ گرم	Monopotassium phosphate, KH ₂ PO ₄ (anhydrous)
۰/۲۴ گرم	Magnesium sulphate (MgSO ₄ .7H ₂ O)
۰/۶ گرم	Magnesium citrate
۳/۶ گرم	L-Asparagin
۱۲ میلی لیتر	Glycerol
۶۰۰ میلی لیتر	آب مقطر

جدول ۱۳-۱. مواد مورد نیاز جهت تهیه محیط کشت لون اشتاین جانسن

برای آماده کردن محلول نمک های معدنی، آسپاراژین را با ۳ نمک اول در ۲۰۰ میلی لیتر از آب مقطر حل کنید. بدین منظور، مایع رابه آرامی در بن ماری گرم کنید تا آسپاراژین مایع و حل شود. سپس گلیسرول را اضافه کرده و حجم محلول رابه ۶۰۰ میلی لیتر برسانید. محلول را بمدت ۱۵ تا ۳۰ دقیقه در اتو کلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد استریل کنید.^۴

۱۳-۳-۱ محلول رنگ مالاویت گرین ۲ درصد

در یک فلاسک مخروطی کوچک، مقدار ۲ گرم از پودر رنگ مالاویت گرین را در ۱۰۰ میلی لیتر از آب مقطر استریل حل کنید. سپس آن را بمدت ۱-۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید تا کاملاً حل شود. از آنجائیکه محلول به سرعت رسوب کرده و تغییر رنگ می دهد، آن را به مدت طولانی نگهداری نمی کنند.^۴

۱۳-۳-۲ تهیه محلول تخم مرغ هموژنیزه شده

برای آماده کردن محلول تخم مرغ هموژنیزه شده، تعداد ۲۰ تا ۲۵ عدد تخم مرغ تازه با اندازه متوسط (حجم هر تخم مرغ به طور متوسط ۵۰ میلی لیتر می باشد) انتخاب کنید. تخم مرغ های مورد استفاده در تهیه محیط کشت لون اشتاین جانسن، باید تازه باشند به طوری که بیش از یک هفته از تاریخ تولید آنها نگذشته باشد. قبل از برداشتن تخم مرغ ها، دست ها را کاملاً بشویید. بوسیله برس یا اسکاچ نرم، تخم مرغ ها را در محلول آب و صابون شسته و به مدت نیم ساعت در آب و صابون قرار دهید. سپس آنها را با آب جاری شسته و در سبد مشبک بگذارید تا خشک شوند. در مرحله بعد، با قراردادن تخم مرغ ها در یک سبد مشبک، تمام سطح آنها را دو مرتبه با الکل ۷۰ درصد شستشو داده، سپس آنها را با گاز آغشته به الکل ۷۰ درصد خشک نمایید. هنگام شکستن تخم مرغ ها باید به سالم بودن زرده توجه شود. تخم مرغ ها را یکی یکی شکسته و در بشر استریل بریزید. سپس آنها را به ایرلن مایر استریل انتقال دهید. بعد از بستن درب ایرلن مایر، تخم مرغ ها را کامل به هم زده و در یک فلاسک مخروطی ۲ لیتری، با استفاده از قیف شیشه ای استریل مخلوط را از گاز استریل ۴ لایه عبور دهید. در این مرحله دقت کنید دست ها کاملاً ضد عفونی شده و آلودگی به گازهای استریل انتقال داده نشود. مجموع حجم تخم مرغ ها حداقل باید ۱۰۰۰ میلی لیتر باشد.

ابتدا ۱۰۰۰ میلی لیتر از محلول تخم مرغ هموژنیزه و در مرحله بعد ۲۰ تا ۳۰ میلی لیتر از محلول رنگ مالاویت گرین ۲ درصد را به فلاسک مخروطی استریل ۲ لیتری که حاوی ۶۰۰ میلی لیتر از محلول نمک های معدنی است اضافه کنید. مخلوط رابه هم بزنید تا محیط کشت، به صورت یکنواخت در آید. بسته به ارتفاع لوله مک کارتنی، مقدار ۸ تا ۱۰ میلی لیتر از محلول تهیه شده را بوسیله پی پتور در لوله های مک کارتنی استریل یا در لوله های درب پیچ دار بریزید. حجم محیط کشت داخل لوله باید به اندازه ای باشد که پس از انعقاد تقریباً یک سوم قسمت فوقانی لوله خالی بماند. به منظور جلوگیری از رسوب املاح، بایستی محیط کشت آماده شده در اسرع وقت منعقد شوند.

برای انعقاد محیط کشت از دستکاه کواگولاتور یا انکوباتوری که دمای آن روی ۸۰ تا ۸۵ درجه سانتی گراد تنظیم شده است، استفاده می شود. لوله های حاوی محیط کشت رابه صورت شیب دار قرار داده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد منعقد می کنند. محیط کشت مناسب لون اشتاین جانسن، به رنگ سبز و سطح آن باید صاف باشد. استریل بودن محیط های کشت آماده باید کاملاً کنترل شود. بدین منظور محیط های کشت آماده را بمدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۵ تا ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید. باید دقت کرد تا باکتری های آلوده کننده در سطح ان رشد نکرده باشند. همچنین هرگونه نشانه ای از رشد کلنی های سفید رنگ در عمق محیط کشت پس از انکوباسیون، دال بر آلودگی محیط می باشد.^۴

۱۳-۳ کنترل کیفی محیط کشت لون اشتاین جانسن

کنترل کیفی محیط کشت جهت اینکه مطمئن شوید کلنی رشد کرده در محیط، مربوط به نمونه بیمار بوده و جزو اجزا و ترکیبات محیط کشت و یا به علت آلودگی نباشد، لازم است.^۲
تمامی محیط های کشتی که در آزمایشگاه سل تهیه می شوند قبل از مصرف، باید مطابق شرایط زیر مورد بررسی و کنترل کیفی قرار بگیرند:

- ۱- ظاهر محیط: از نظر تغییر رنگ، دهیدراسیون، آلودگی، وجود حباب
 - ۲- استریل بودن: انکوباسیون ۱ تا ۳ درصد از هرسری ساخت محیط ها در انکوباتور با دمای ۳۵ تا ۳۷ درجه سانتی گراد و CO₂ با شرایط ۵ تا ۱۰ درصد به مدت ۲۱ روز
 - ۳- کارایی محیط کشت: آزمایش کشت سویه های کنترل مثبت و منفی مطابق جدول ۱۷-۲ لازم است مستندات بررسی موارد فوق همراه با تاریخ تهیه، نام تهیه کننده، تاریخ انقضا محیط کشت در دفتر یا فرم کنترل کیفی محیط کشت ثبت شود.
- ارگانایسم هایی که به عنوان کنترل مثبت استفاده می شوند شامل:

M. tuberculosis H37Ra (ATCC 25177), *M. kansasii* ATCC 12478, *M. scrofulaceum* ATCC 19981, *M. intracellulare* ATCC 13950 and *M. fortuitum* ATCC 2841.

۱۳-۴-۱ تهیه سوسپانسیون آماده محیط کشت

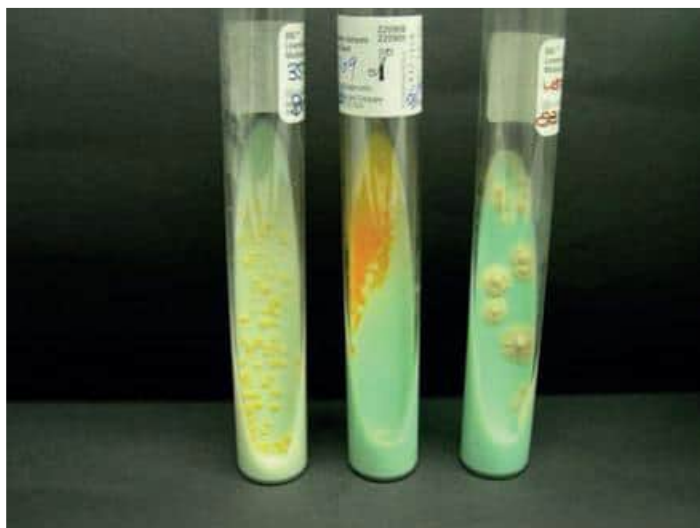
ابتدا سوسپانسیون نیم مک فارلند استریل از سویه مایکوباکتریوم مورد نظر تهیه کنید. با استفاده از یک پی پت یا لوپ استریل، مقدار ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون را داخل محیط کشت تلقیح کنید. محیط کشت را در انکوباتور با دمای ۳۵ تا ۳۷ درجه سانتی گراد و CO₂ با شرایط ۵ تا ۱۰ درصد به مدت ۲۱ روز انکوبه کنید. در این مدت نتایج رشد یا عدم رشد مایکوباکتریوم ها باید مطابق جدول ۱۷-۲ باشد.^۲

نتایج کشت	شرایط انکوباسیون			سویه مایکوباکتریوم کنترل مورد آزمایش
	اتمسفر	دما	زمان	
سویه های کنترل مثبت محیط کشت لون اشتاسن جانسن				
رشد: مشاهده کلنی در ۲ هفته- کلنی بالغ در ۳ هفته	۵ تا ۱۰ درصد CO2	۳۵ تا ۳۷ °C	۲۱ روز	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra ATCC® 25177
رشد: مشاهده کلنی در ۲ هفته- کلنی بالغ در ۳ هفته	۵ تا ۱۰ درصد CO2	۳۵ تا ۳۷ °C	۲۱ روز	M. kansasii ATCC® 12478
رشد: مشاهده کلنی در ۲ هفته- کلنی بالغ در ۳ هفته	۵ تا ۱۰ درصد CO2	۳۵ تا ۳۷ °C	۲۱ روز	M.scrofulaceum ATCC® 19981
رشد: مشاهده کلنی در ۲ هفته- کلنی بالغ در ۳ هفته	۵ تا ۱۰ درصد CO2	۳۵ تا ۳۷ °C	۲۱ روز	M. intracellulare ATCC® 13950
رشد: مشاهده کلنی در ۴ روز	۵ تا ۱۰ درصد CO2	۳۵ تا ۳۷ °C	۲۱ روز	M. fortuitum ATCC® 2841
سویه های کنترل منفی محیط کشت لون اشتاسن جانسن				
	هوازی	۳۵ تا ۳۷ °C	۲۴ ساعت	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922

جدول ۱۳-۲. بررسی شرایط رشد میکروارگانایسم های کنترل مثبت و منفی محیط کشت لون اشتاین جانسن^۲

۳-۱۳ نگهداری محیط کشت لون اشتاین جانسن

محیط کشت لون اشتاین جانسن پس از کنترل کیفی، در یخچال ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد و به دور از نور خورشید با تاریخ انقضا حداکثر یک ماه پس از تهیه، نگهداری می شود. در صورت مشاهده هرگونه علامتی ناشی از تخریب، تغییر رنگ، آلودگی یا به پایان رسیدن تاریخ انقضا نباید از محیط کشت استفاده کرد.



تصویر ۱۳-۱. رشد کلنی انواع مایکوباکتریوم ها در محیط کشت لون اشتاین جانسن^۳

References:

- 1- Textbook of Diagnostic Microbiology, 7th Edition-by Connie R. Mahon and Donald C. Lehman, Elsevier2023
- 2- Handbook on tuberculosis laboratory diagnostic methods in the European Union – Updated 2025. Stockholm: ECDC; 2025.
- 3- Tuberculosis : laboratory diagnosis and treatment strategies / Advances in Molecular and Cellular Microbiology 21/ edited by Timothy D. McHugh.

۴- اصول مایکوباکتریولوژی، دکتر سیدرضا مودب و دکتر عبدالناصر رفیع-مرکز تحقیقات سل و بیماریهای ریوی تبریز-۱۳۸۰

۵- دستورالعمل تشخیص آزمایشگاهی باسیلهای اسید فست(مایکوباکتریومهای توپرکلوزیس و غیر توپرکلوزیس) به روش بررسی

میکروسکوپی گستره مستقیم-۱۴۰۴ آزمایشگاه مرجع سلامت وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی

تهیه شده در آزمایشگاه مرجع منطقه ای سل معاونت بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تبریز

(SOP) دستورالعمل معیارهای رد و عدم پذیرش نمونه در آزمایشگاه

مایکوباکتریولوژی

بدیهی است که برای نتیجه گیری دقیق از یک آزمایش، نمونه مورد بررسی باید به روش صحیح جمع آوری شود.

نمونه ی خوب نمونه ای است که:

(الف) از محل ضایعه و به مقدار کافی گرفته شده باشد؛

(ب) در ظرفی مناسب با ثبت مشخصات کامل بیمار قرار گیرد

(ج) در وضعیت مناسب نگهداری شده و به روش صحیح به آزمایشگاه انتقال یابد.^۴

جمع آوری و انتقال نمونه ها (Sample Collection & Transportation)

بیماران باید دستورالعمل های کتبی شفاف در مورد نحوه صحیح جمع آوری نمونه خلط برای تشخیص سل دریافت کنند. برای بیماران تحت درمان، نمونه ها باید در فواصل زمانی مشخص شده طبق دستورالعمل های کشوری جمع آوری شوند.^۱

هرگز نباید جمع آوری خلط در آزمایشگاه انجام شود. این یک فرآیند مولد آئروسول عفونی است و باید فقط در فاصله دور از سایر افراد، ترجیحاً در فضاهای باز در صورت امکان، یا در اتاق های با فشار منفی و تهویه هوای کافی انجام شود.^۱

پذیرش آزمایش ها بنا به درخواست پزشک در فرم پذیرش نمونه ها (فرم بیماریابی) انجام می شود. فرم ها باید جدا از نمونه ها ارسال شود. همچنین لازم است اطلاعات بیمار بطور کامل در فرم ذکر گردد. تاریخ نمونه گیری باید بر روی نمونه های ارسالی به آزمایشگاه درج شود. در صورت آلوده شدن فرم ها، مشخصات بیمار به فرم دیگری منتقل و سپس فرم آلوده با مواد گندزدا آغشته شده و همراه با سایر مواد عفونی اتوکلاو شود.^۳

نمونه های ناکافی و معیارهای رد کردن و عدم پذیرش این نمونه ها در آزمایشگاه مایکوباکتریولوژی

شناسایی و تشخیص گونه های مایکوباکتریوم ها، پر هزینه و زمان بر است. بنابراین، ضروری است که آزمایشگاه دارای سیاست گذاری دقیقی در خصوص رد کردن نمونه های ناکافی برای شناسایی این ارگانسیم ها باشد.^۲ نمونه خلط ممکن است دارای رگه های خون یا کاملاً خونی باشد. کیفیت نمونه های خلط ارسالی به آزمایشگاه، باید ارزیابی و در فرم ارجاع گزارش شود.^۳

نمونه ها باید بر اساس دستورالعمل های زیر رد شده و پذیرش نشوند:^{۲و۳}

(۱) اگر ظرف های خلط بدون برچسب مشخصات بیمار باشد و یا مشخصات برچسب محتوی نمونه با مشخصات فرم بیماریابی یا نسخه پزشک هم خوانی نداشته باشد، نمونه گیری تکرار شود.

(۲) در مواقعی که بیمار در گرفتن نمونه خلط مشکل دارد و مقدار نمونه کم است (کمتر از ۳ میلی لیتر)، نمونه خلط توسط آزمایشگاه پذیرش و آزمایش شده و در برگه گزارش نتایج، علاوه بر تاکید بر حجم نمونه، به پزشک یا مرکز ارجاع دهنده، توصیه به تکرار نمونه و ارسال آن به آزمایشگاه به صورت کتبی اعلام شود.

(۳) امکان یافتن باسیل اسید فست در نمونه بزاق وجود دارد. نمونه مایع شفاف (آب دهان) توسط

آزمایشگاه بررسی و نتیجه گزارش شود. همچنین کیفیت پایین نمونه و حجم کم آن نیز در فرم گزارش اعلام گردد.

(۴) خشک بودن سواب (dried swabs).

(۵) مخلوط کردن نمونه‌های خلط یا ادرار (تهیه ادرار یا خلط ۲۴ ساعته) (pooled sputum or urine).

(۶) آسیب‌دیدگی، شکستگی یا نشتی ظرف حاوی نمونه (container has been compromised or is broken or leaking). همچنین اگر درب ظرف نمونه، باز باشد و باعث نشتی گردد.

(۷) نمونه باید در ظرف مخصوص و استریل جمع‌آوری و منتقل شود. استفاده از ظروف نامناسب، درپوش نامناسب (که باعث نشت یا خشک شدن نمونه شود) یا ظروف آلوده، منجر به رد نمونه خواهد شد.

(۸) طولانی بودن زمان بین جمع‌آوری نمونه تا پردازش آن (length of time from collection to processing is too long)^۲. نمونه‌ها باید در اسرع وقت (ترجیحا تا ۲۴ ساعت) به آزمایشگاه ارسال گردد.

ایده آل آن است که این کار در کمتر از ۷۲ ساعت صورت پذیرد و نباید بیشتر از یک هفته به طول انجامد.^۴ در صورت زمان طولانی انتقال، نمونه خلط ممکن است خشک شود که باعث عدم رشد

یا کاهش رشد مایکوباکتریوم‌ها در محیط کشت خواهد شد.^۶

(۹) هر نمونه‌ای که در فرمالین باشد.^۵

انتقال نمونه باید در جعبه‌های انتقال نمونه و بصورت امن و ایمن و در شرایط مناسب (دور از نور مستقیم آفتاب و تا حد امکان شرایط خنک) به آزمایشگاه ارسال شود (مطابق تصویر شماره ۲۱-۱).



تصویر شماره ۲۱-۱. شرایط قابل قبول انتقال نمونه خلط به آزمایشگاه

دستورالعمل مربوط به نمونه‌های با برچسب اشتباه یا نامنطبق^۶

در صورتی که آزمایشگاه نمونه یا درخواست با برچسب اشتباه یا نامنطبق دریافت کند، دستورالعمل‌های زیر باید اجرا شوند:

✓ برای نمونه‌ای که برچسب شناسه (ID) روی بدنه ظرف دارد اما درخواست (requisition) آن نامنطبق، ناقص یا گم‌شده است: آزمایشگاه در صورت ثبت شماره تلفن با محل ارجاع نمونه تماس بگیرد تا هرگونه اطلاعات لازم را قبل از بررسی و آزمایش نمونه دریافت کند.

- ✓ نمونه‌هایی که بدون درخواست هستند، غیرقابل قبول بوده و تا زمان دریافت فرم درخواست، آزمایش نخواهند شد. آزمایشگاه با محل ارجاع نمونه تماس بگیرد.
- ✓ برای نمونه‌های بدون برچسب: (هیچ استثنایی برای این قانون وجود ندارد). آزمایشگاه نمونه‌های بدون برچسب را پذیرش و آزمایش نخواهد کرد. نمونه‌ها باید همیشه در زمان جمع‌آوری برچسب‌گذاری شوند. هنگام دریافت یک نمونه بدون برچسب، محل ارجاع نمونه را مطلع سازید. در این موارد، نمونه در آزمایشگاه نگهداری خواهد شد و باید توسط فردی از محل ارجاع نمونه که فرم مبنی بر پذیرش مسئولیت برچسب‌گذاری را امضا می‌کند، برچسب‌گذاری شود. این فرم باید در آزمایشگاه بایگانی شود.
- ✓ فرم‌های درخواست انجام آزمایش باید به صورت ماهانه جداسازی شده و حداقل به مدت ۲ سال در محل اسناد پذیرش آزمایشگاه، بایگانی شوند.

References:

- 1- Handbook on tuberculosis laboratory diagnostic methods in the European Union – Updated 2025. Stockholm: ECDC; 2025.
- 2- Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology /2022
- ۳- دستورالعمل تشخیص آزمایشگاهی باسیلهای اسید فست (مایکوباکتریومهای توپرکلوزیس و غیر توپرکلوزیس) به روش بررسی میکروسکوپی گستره مستقیم-۱۴۰۴ آزمایشگاه مرجع سلامت وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی
- ۴- راهنمای کشوری مبارزه با سل-دکتر مهشید ناصحی، دکتر لیلی میرحقانی-مصوب کمیته کشوری مبارزه با بیماری سل چاپ ۱۳۸۹-www.cdc.hbi.ir/healthtopics/tb.htm
- 5- Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods 24th edition-2022
- 6- Mycobacteriology Laboratory Manual. First Edition, April 2014. A publication of the Global Laboratory Initiative (GLI) a Working Group of the Stop TB Partnership.

