

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۱ از ۵۱
شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01		بخش: سل و جذام استان
محدوده توزیع: تضمین کیفیت		

مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل

معاونت بهداشت

آزمایشگاه مرجع بهداشت

نام و امضاء مسئول فنی و تصویب کننده:	نام و امضاء تأیید کننده:	نام و امضاء تهیه کننده:
	علی حقی: کارشناس ارشد باکتری شناسی پزشکی	علی حقی: کارشناس ارشد باکتری شناسی پزشکی رحیمه جعفری: کارشناس علوم آزمایشگاهی

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷ شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۲ از ۵۱
محدوده توزیع: تضمین کیفیت	بخش: سل و جذام استان	

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۶.....	فصل اول
۶.....	مقدمه
۷.....	فصل دوم
۷.....	کشت در آزمایشگاه‌های حد واسط
۷.....	پیش گفتار
۸.....	فضای آزمایشگاه
۹.....	وسایل موردنیاز
۱۰.....	هود ایمنی
۱۰.....	محل قرار دادن هود
۱۱.....	نکات ایمنی مربوط به هود
۱۱.....	سانتریفوژ
۱۳.....	نکات ایمنی مربوط به سانتریفوژ
۱۳.....	گرمخانه یا انکوباتور ۳۷-۳۵ درجه سانتی‌گراد
۱۳.....	دستگاه منعقد کننده (کواگولاتور)
۱۴.....	اتوکلاو
۱۴.....	شعله برنر
۱۴.....	سایر وسایل
۱۶.....	فصل سوم
۱۶.....	جمع‌آوری نمونه‌های مختلف
۱۶.....	خلط:
۱۸.....	مایعات استریل بدن
۱۸.....	بافتهای استریل بدن

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷ شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۳ از ۵۱
محدوده توزیع: تضمین کیفیت	بخش: سل و جذام استان	

۱۹.....	نمونه‌های مشکوک به آلودگی
۱۹.....	ادرار
۱۹.....	شستشوی معده
۲۰.....	سوپ حلق
۲۰.....	بافت
۲۱.....	چرک
۲۱.....	فصل چهارم
۲۱.....	نگهداری و انتقال نمونه‌ها
۲۳.....	فصل پنجم
۲۳.....	دریافت نمونه در آزمایشگاه‌های حد واسط
۲۳.....	باز کردن نمونه در داخل هود
۲۵.....	طرز استفاده از اتوکلاو
۲۶.....	فصل ششم
۲۶.....	هضم و آلوده زدایی نمونه‌ها
۲۷.....	هیدروکسید سدیم برای هضم و آلودگی زدایی
۲۸.....	تهیه مواد
۲۸.....	طرز تهیه محلول اسیدکلریدریک دو نرمال
۲۸.....	اسید اکسالیک و اسیدسولفوریک
۲۸.....	آلودگی زدایی و کشت خلط
۲۹.....	معرف‌ها:
۳۰.....	روش:
۳۰.....	فصل هفتم
۳۰.....	محیط‌های کشت سل
۳۱.....	الف) مزایای محیط‌های تخم‌مرغ دار

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷ شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۴ از ۵۱
محدوده توزیع: تضمین کیفیت	بخش: سل و جذام استان	

- ۳۱..... (ب) معایب محیط‌های تخم‌مرغ دار
- ۳۱..... مزایای محیط‌های آگاردار
- ۳۲..... معایب محیط‌های آگاردار
- ۳۳..... (الف) محلول نمک‌های معدنی
- ۳۴..... (ب) محلول مالاشیت گرین ۲٪
- ۳۴..... (ج) هموژنیزه کامل تخم‌مرغ
- ۳۴..... (د) تهیه محیط کامل
- ۳۵..... **فصل هشتم**
- ۳۵..... کشت و شناسایی
- ۳۶..... برنامه زمان‌بندی برای مطالعه کشت
- ۳۶..... بررسی محیط‌های کشت
- ۳۸..... **فصل نهم**
- ۳۸..... کنترل کیفی محیط کشت مایکوباکتریوم ها
- ۳۹..... کنترل کیفی در بخش محیط سازی سل
- ۴۰..... کنترل کیفی، اطمینان از کیفیت و تست کنترل کیفی خارجی
- ۴۰..... **Quality control, quality assurance and Proficiency Testing**
- ۴۰..... بهبود کیفیت یا **Quality improvement**
- ۴۲..... کنترل کیفی را در موارد زیر به کار می‌برند
- ۴۲..... نظم آزمایشگاه و اداره آن
- ۴۳..... وسایل آزمایشگاهی
- ۴۳..... کنترل وسایل
- ۴۴..... معرف‌ها و محلول‌های رنگ آمیزی
- ۴۴..... هضم و آلوده زدایی
- ۴۴..... محیط‌های کشت
- ۴۵..... روش کشت

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷ شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۵ از ۵۱
محدوده توزیع: تضمین کیفیت	بخش: سل و جذام استان	

۴۵.....	کنترل کیفی آب
۴۶.....	فصل دهم
۴۶.....	ایمنی در آزمایشگاه
۴۷.....	راههای جلوگیری از ایجاد آئروسول
۴۷.....	وسایل
۴۷.....	لامپ UV
۴۸.....	مواد ضدعفونی کننده
۴۸.....	فنل
۴۸.....	هیپو کلریت
۴۸.....	گلو تارالدئید
۴۹.....	الکل ها
۴۹.....	لباسهای حفاظت کننده
۴۹.....	نظارت بهداشتی پرسنل آزمایشگاه سل
۴۹.....	حوادث
۵۰.....	حادثه با کشت مایع
۵۰.....	طرز ضدعفونی کردن آزمایشگاه با فرمالدئید
۵۱.....	نکاتی که در حین کار باید رعایت شود

آزمایشگاه مرجع بهداشت

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷ شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۶ از ۵۱
محدوده توزیع: تضمین کیفیت	بخش: سل و جذام استان	

فصل اول

مقدمه

سل یکی از بیماری‌ها عفونی دیرینه انسان است و با وجود روش‌های نوین مبارزه با آن دارای انتشار گسترده‌ای است. از سالیان دور سل یکی از علل مهم مرگ‌ومیر در کشورهای در حال توسعه بوده و اکنون این خطر متوجه کشورهای توسعه‌یافته جهان نیز شده است. آنچه مشکلات و عوارض بیماری ناشی از سل را افزون می‌کند، روش‌های درمان نادرست، ایجاد باسیل‌های مقاوم به داروهای موجود و نقش پاندمی عفونت HIV به‌عنوان عامل مهمی در گسترش سل است. به همین دلیل در سال ۱۳۹۳ سازمان جهانی بهداشت بیماری سل را به‌عنوان یک فوریت جهانی اعلام نمود.

سل شایع‌ترین بیماری با عامل میکروبی کشنده بالغین در تمام جهان می‌باشد و بعد از عفونت‌های حاد دستگاه تنفسی دومین علت مرگ در جهان بوده و مرگ به علت بیماری سل، معادل مرگ ناشی از اسهال است. طبق برآورد سازمان جهانی بهداشت بیش از تعداد ۳۰۰ میلیون نفر در ۱۰ سال آینده توسط میکروپ سل آلوده‌شده که از این تعداد ۹۰ میلیون نفر مبتلا به بیماری سل خواهند گردید.

کشور ما در منطقه‌ای قرار دارد که همسایگان آن کشورهایی دارای درصد قابل توجه بیمار مبتلا به سل هستند، که این امر می‌تواند مشکلات و عوارض بیماری را افزایش دهد. با توجه به اینکه مؤثرترین روش پیشگیری از بیماری سل، تشخیص صحیح و درمان مؤثر بیماران می‌باشد، بنابراین اهمیت درمان بیماران ریوی خلط مثبت، مخصوصاً تشخیص صحیح آن‌ها به‌وضوح مشخص می‌گردد.

این کتاب حاصل تلاش همکاران محترم عضو کمیته آزمایشگاهی تشخیص سل کشور می‌باشد که تحت عنوان " مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل، ۲- کشت " و با استفاده از رهنمودهای علمی مراجع بین‌المللی مانند سازمان جهانی بهداشت (WHO) و مرکز کنترل و پیشگیری بیماری‌ها (CDC) آمریکا و سایر مراجع معتبر تهیه گردیده است که در پی چاپ کتاب " مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل، ۱- آزمایش میکروسکوپی " که قبلاً در اختیار واحدهای مرتبط قرار گرفته است، آماده توزیع برای استفاده کارکنان فنی آزمایشگاه‌های کشور است.

امیداست که با تهیه و توزیع دو کتاب اشاره شده و دوره‌های آموزشی که برای کارکنان فنی و مسئولین آزمایشگاه‌های مراکز بهداشتی و درمانی در زمینه تشخیص باسیل سل برگزار گردیده است و همچنین اجرای برنامه تضمین کیفیت و نظارت بر اجرای آن، گامی مؤثر در جهت مبارزه با بیماری سل برداشته شود.

دکتر علی‌اکبر سیاری

معاون بهداشتی، وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷ شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۷ از ۵۱
محدوده توزیع: تضمین کیفیت	بخش: سل و جذام استان	

فصل دوم

کشت در آزمایشگاه‌های حد واسط

پیش‌گفتار

بیماری سل در حال حاضر یکی از بزرگ‌ترین مشکلات بهداشتی جهان است. تخمین زده می‌شود، یک‌سوم جمعیت جهان به میکوباکتریوم توبرکلوزیس آلوده‌اند و سالانه حدود ۹ میلیون مورد جدید بیماری رخ می‌دهد. همه‌گیری بیماری ایدز در جمعیت‌هایی که قبلاً به باسیل سل آلوده شده‌اند، نیز سیر پیشرفت بیماری سل را شدت می‌بخشد. به‌طور کلی نزدیک به سه میلیون نفر به علت ابتلا به این بیماری در سراسر جهان از بین می‌روند (آمار سال ۱۹۹۵)، و این تعداد مرگ‌ومیر بیشتر از هر بیماری عفونی دیگر از قبیل ایدز و مالاریا است. بیماری از شخص مبتلا به سل ریوی فعال از طریق آئروسول حاوی قطرات عفونی (که ضمن سرفه و عطسه منتشر می‌شوند) به اشخاص دیگر انتقال می‌یابد.

سل ریوی معمولاً در قله ریه‌ها به وجود می‌آید. در ریه این دسته از بیماران حفره‌هایی حاوی تعداد بسیاری زیادی باسیل ایجاد می‌شود. این باسیل‌ها را در مشاهده میکروسکوپی لام مستقیم می‌توان به‌وضوح دید. نشانه‌های بالینی سل ریوی شامل تب، خلط خونی، کاهش وزن، عرق شبانه، درد سینه و سرفه‌های مزمن در ۲ هفته یا بیشتر می‌باشند. باوجود این نشانه‌ها نمی‌توان سایر علل احتمالی ضایعات ریوی و غیر ریوی را رد کرد. تشخیص قطعی سل بر اساس کشف عامل عفونی در نمونه خلط یا ترشحات بیمار با مشاهده میکروسکوپی و یا انجام کشت در آزمایشگاه امکان‌پذیر است. در واقع، اولین و مهم‌ترین قدم برای تشخیص سل، آزمایش لام مستقیم خلط است. با این روش می‌توان خیلی سریع آن دسته از بیمارانی را که ریه آن‌ها حاوی تعداد زیادی باسیل است و معمولاً عامل انتقال و عفونت به حساب می‌آیند شناسایی کرد.

برای مشاهده باسیل اسید فست در لام، باید در یک میلی‌لیتر از خلط مورد آزمایش تعداد ۵۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰ باسیل وجود داشته باشد، بنابراین، آزمایش لام مستقیم خیلی سریع، ارزان و بدون دردسر است و پیشنهاد می‌شود که این آزمایش روی تمام موارد مشکوک به سل انجام گیرد. با این روش، فقط موارد سل ریوی با خلط مثبت را می‌توان شناسایی کرد و انجام کشت میزان کشف موارد ابتلا به سل را معمولاً ۳۰٪ تا ۵۰٪ افزایش می‌دهد (قبل از آنکه به حالت عفونی در آید). با توجه به روش هضم و آلوده زدایی و نوع محیط کشت مورد استفاده وجود حتی ۱۰ عدد باسیل زنده در نمونه مورد آزمایش می‌تواند نتیجه کشت را مثبت نماید. همچنین برای تشخیص هویت عامل بیماری سل و تعیین حساسیت آن نسبت به داروها، انجام کشت ضروری است. هرچند انجام کشت در نمونه‌های بالینی به‌مراتب گران‌تر از آزمایش مستقیم بوده و به وسایل، مواد و افراد کاملاً آموزش‌دیده و باتجربه در این

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷ شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۸ از ۵۱
محدوده توزیع: تضمین کیفیت	بخش: سل و جذام استان	

زمینه نیاز دارد؛ ولی تشخیص قطعی بیماری سل بر آن مبنا استوار است. در مقایسه با سایر باکتری‌ها که عموماً ظرف چند دقیقه تقسیم می‌شوند، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس خیلی آهسته تقسیم می‌شود (۱۸-۲۴ ساعت) این ویژگی مانعی برای جداسازی باکتری‌های کند رشد است. از ویژگی‌های مهم تر مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ضرورت وجود محیط‌های اختصاصی جهت رشد این باکتری است.

فضای آزمایشگاه

در بخش سل، آزمایشات دیگری به غیر از کشت و اسمیر مستقیم هم صورت می‌گیرد یا نه، ممکن است نوع تقسیم‌بندی فضای آزمایشگاه در مراکز مختلف متفاوت باشد. در عین حال مهم‌ترین عامل در طراحی و گسترش آزمایشگاه تشخیص سل استان، تعداد نمونه‌های ارجاعی از آزمایشگاه‌های شهرستان‌ها برای انجام بررسی‌های بیشتر از نظر کشت بوده که با افزایش جمعیت استان و فراوانی شیوع سل، به کارگیری پرسنل، فضا و نیروی انسانی در ارتباط است.

در آزمایشگاه مایکوباکتریولوژی حد واسط، حداقل سه واحد کاری مجزا را باید در نظر گرفت:

- ۱- **محلی به منظور دفتر آزمایشگاه،** که فعالیت امور اداری و مدیریتی آزمایشگاه در آن انجام می‌شود. در این قسمت اطلاعات بیماران، گزارش آزمایش‌ها، مواد شیمیایی و معرف‌های مورد استفاده نگهداری می‌شود (ورود کارکنان به آزمایشگاه از طریق آن دفتر صورت می‌گیرد).
 - ۲- **قسمت دریافت نمونه (Reception)،** که مستقل از دفتر آزمایشگاه است و می‌تواند با آزمایشگاه مرتبط باشد به نحوی که بیمار به طور مستقیم و بدون اینکه وارد محیط کار شود نمونه را از محوطه خارج و از طریق پنجره به فرد مسئول تحویل می‌دهد. کنترل نمونه از نظر مشخصات اهمیت خاصی دارد و از خطاهای بعدی جلوگیری می‌کند؛ بنابراین پس از انجام کنترل، نمونه برای آزمایش به واحد اصلی فرستاده می‌شود.
 - ۳- **محوطه اصلی آزمایشگاه،** که نمونه‌های بیماران پس از دریافت و کنترل به این محل منتقل می‌شوند. در این قسمت تمام تجهیزات لازم برای تهیه گسترده، آلوده زدایی و هضم نمونه بالینی، کشت و گرمخانه، همچنین وسایل مربوطه از جمله میز کار، یخچال، دستشویی با شیر مخصوص (که با آرنج کار می‌کند) و قفسه‌های مخصوص نگهداری و قرار دارد.
- از آنجایی که کار با مواد عفونی، در اتاق کشت انجام می‌شود؛ باید از نظر فیزیکی از سایر قسمت‌ها مجزا باشد. قسمت جداسازی باکتری (Isolation) در منتهی‌الیه آزمایشگاه که هود در آنجا تعبیه شده است قرار دارد.

در واقع هدف اصلی از این تقسیم‌بندی نه تنها کاهش خطر ابتلا به سل در بین کارکنان بخش مایکوباکتریولوژی است، بلکه شامل افرادی که در همان ساختمان و در بخش‌های دیگر کار می‌کنند نیز می‌شود. اتاق کشت نباید انباشته از وسایل و دستگاه‌های گوناگون باشد و نکته مهم این است که در طول ساعت کاری، هوا به طور مداوم از طریق هودهای بیولوژیک و یا به وسیله

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷ شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبنای تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۹ از ۵۱
محدوده توزیع: تضمین کیفیت	بخش: سل و جذام استان	

هواکش‌های ساده از محیط داخل به بیرون آزمایشگاه فرستاده شود. انباشتن وسایل اضافی در اتاق کشت، موجب اختلال جریان هوا در آزمایشگاه و هودها می‌گردد. تصفیه هوا و فشار داخل اتاق بر مبنای تعداد کل نمونه‌های دریافتی به نسبت درصد نمونه‌های مثبت شده در عرض سال باید محاسبه شود. به‌کارگیری روش‌ها و تکنیک‌های باکتریولوژی بر اساس استانداردهای تعیین شده، ریسک بالای تولید ذرات آئروسول را به حداقل می‌رساند.

دستگاه‌های کمکی Air Supply و تخلیه هوا (Exhaust) باید در جهت مقابل هم قرار داشته باشند، تا هوای کمکی از منطقه تمیز و هوای خروجی از منطقه کمتر تمیز و یا آلوده گرفته شود. هوای کمکی Air Supply در حدود ۵۰ واحد فوت مکعب در دقیقه و یا به عبارتی حدود ۲۲.۶ لیتر در هر ثانیه و با فشار منفی (شبهه به آن که توسط هواساز تولید می‌شود) برای یک آزمایشگاه مایکوباکتریولوژی مناسب است.

هوای آلوده باید از منطقه کمتر تمیز و یا آلوده و در حدود ۳ متر بالاتر از سطح به بیرون تخلیه شود.

۴- اتاقی نیز در آزمایشگاه برای مشاهده میکروسکوپی لامهای تهیه شده از نمونه‌های و کلنی‌های رشد یافته بیماران در نظر گرفته می‌شود Reading Room در این اتاق میز کار، میکروسکپ و دستشویی قرار دارد. گزارش آزمایشگاهی در همین اتاق تکمیل شده و سپس برای ثبت به دفتر آزمایشگاه ارسال می‌شود.

۵- اتاق شستشو محلی است که در آنجا میز کار، دستشویی بزرگ با دو لگن استیل و اتوکلاو قرار دارد و محل نگهداری وسایل مصرف‌شده اتوکلاو و شستشو شده و استریلیزاسیون ظروف می‌باشد.

۶- در بسیار از کشورها تهیه محیط کشت فقط در سطح آزمایشگاه‌های مرکزی انجام می‌شود ولی اگر ساخت محیط نیز از وظایف آزمایشگاه حد واسط باشد، محل جداگانه‌ای برای این منظور توصیه می‌شود. در این صورت اتاقی برای ساخت محیط کشت وسایل موردنیاز (میز کار، دستگاه منعقد کننده، یخچال و دستشویی) در نظر می‌گیرند.

به‌منظور افزایش ایمنی کار، قبل از اینکه نمونه‌ها وارد مرحله کشت شوند، باید وسایل و مواد موردنیاز آزمایش آماده شده و با نظم و ترتیب در داخل هود قرار بگیرند.

آزمایشگاه مرجع بهداشت

وسایل موردنیاز

وسایل و مواد موردنیاز برای آزمایشگاه کشت را که از هیدروکسید سدیم برای آلوده زدایی و از محیط لوین اشتاین جانسون برای کشت استفاده می‌شود، در پایان مطب اشاره شده است. قبل از خرید وسایل جدید و مواد موردنیاز با افراد باتجربه در آزمایشگاه‌های مرجع مشورت کنید و نباید به آگهی‌های تجارتي، کاتالوگ‌ها و ادعای نمایندگان فروش شرکتها توجه داشت.

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷ شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۱۰ از ۵۱
محدوده توزیع: تضمین کیفیت	بخش: سل و جذام استان	

هود ایمنی

مهم‌ترین وسیله موردنیاز در آزمایشگاه سل حد واسط که باید کارش را صحیح انجام داده و به‌خوبی نگهداری شود هود ایمنی است. Biological Safety Cabinet این هودها برای حفاظت کارکنان، محیط و محصول مورد آزمایش طراحی شده‌اند. در هود، ذرات هوا در موقع ورود و خروج از داخل فیلترهای هپا HEPA Filter عبور می‌کنند. فیلترهای هپا ذراتی را که برابر یا بزرگ‌تر از ۰.۳ میکرون باشند (تمام باکتری‌ها، اسپورها و ویروس‌ها) با دقت و کارایی ۹۶-۹۹٪ در خود نگهداری و از عبور آنها جلوگیری نموده و در نتیجه هوای تصفیه شده را به داخل سیستم وارد می‌کنند.

خطرات ناشی از عفونت‌های میکروبی را در ۴ دسته طبقه‌بندی می‌کنند. مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جزء دسته سوم این میکروبوها طبقه‌بندی می‌شود. این گروه شامل میکروارگانیسم‌هایی است که از طریق استنشاق هوا ایجاد عفونت می‌کنند. بنابراین باید برای کاهش تولید و پخش اجرام آئروسول در هوای آزمایشگاه اقدامات احتیاطی به عمل آید، و مانع از استنشاق این اجرام توسط کارکنان آزمایشگاه شود. ضمناً از ایجاد حوادثی که منجر به ایجاد آلودگی از طریق بلع (Ingestion) و تلقیح (انتقال از طریق اجسام نوک‌تیز مانند سوزن سرنگ) می‌شود باید جلوگیری کرد.

برای آزمایش‌های باکتریولوژی سل، هودهای کلاس I و II مناسب است. هود کلاس I سبب حفاظت کارکنان شده ولی مانع از آلوده شدن مواد مورد آزمایش در حین کار نمی‌گردد. هوای فیلتر شده اتاق از تمام سطوح کار به داخل هود کشیده می‌شود و تا زمانی که هوا با فشار ۲۲.۸ متر در ثانیه از مدخل جلوی هود به داخل آن کشیده شود، حفاظت کارکنان تأمین می‌گردد. هودهای کلاس II قادر به محافظت از پرسنل و محیط کار بوده و نمونه مورد آزمایش را از آلودگی حفظ می‌کنند. هوا از قسمت جلوی هود (Front Grill) به داخل کشیده می‌شود، که در نتیجه شخصی که جلوی هود ایستاده است در امان است، به‌علاوه هوا از فیلتر هپا عبور کرده و داخل هود در چرخش است Laminar Flow بنابراین خطر انتقال آلودگی از نمونه‌ای به نمونه دیگر (Cross Contamination) در حین کار در داخل هود به حداقل خود می‌رسد. چون هوا در مسیر خود از فیلتر هپا عبور می‌کند، تصفیه شده و ۳۰٪ از هوای تصفیه‌شده و عاری از آلودگی توسط هود کلاس II به داخل آزمایشگاه و همین مقدار توسط هود کلاس I به خارج از آزمایشگاه منتقل می‌گردد.

محل قرار دادن هود

مکان مناسب برای هود، محلی است که از ورودی آزمایشگاه به دور باشد (مثال قسمت انتهایی آزمایشگاه که رفت و آمد کم است). قدم زدن و راه رفتن افراد در نزدیکی هود می‌تواند جریان هوا را مختل سازد. پنجره‌های باز یا وسایل آزمایشگاه مانند سانتریفوژ که سبب اختلال چرخش هوا می‌شوند نباید در نزدیکی هود باشند.

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷ شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۱۱ از ۵۱
محدوده توزیع: تضمین کیفیت	بخش: سل و جذام استان	

نکات ایمنی مربوط به هود

قبل از خارج کردن وسایل از زیر هود، سطوح خارج آن‌ها باید با فنل ۵٪ ضدعفونی شوند و در پایان روز کاری باید سطح داخلی پنجره هود و سطوح کار در داخل هود با یک ماده ضدعفونی‌کننده (فنل) ۵٪ تمیز شود و سپس سطوح مورد را با آب مقطر استریل، پاک نمود.

اگر در داخل هود مواد آلوده تراوش کرد، بلافاصله کاغذ کار یا کاغذ جاذبی را که در کف هود پهن کرده‌ایم جمع کرده و آن را در داخل کیسه قابل اتوکلاو می‌گذاریم. اگر نشست و تراوش در سطح اجسام داخل هود باشد، به‌وسیله یک حوله کاغذی آغشته به فنل ۵٪ آن را پاک می‌کنیم. اگر نشست زیاد باشد به‌طوری‌که به درچه‌های هوا در قسمت جلو و عقب نفوذ کرده باشد. باید آلوده زدایی را به‌صورت گسترده‌تری انجام داد. بدین منظور، ابتدا سطوح کار را ضدعفونی کرده و اجسام را از داخل هود برمی‌داریم؛ سپس شیر خروجی کف هود را که مربوط به شستشو و تمیز کردن است، می‌بندیم و به مقدار کافی از ماده ضدعفونی‌کننده (فنل) ۵٪ در سطح هود می‌ریزیم تا از طریق مجاری هوا نفوذ کرده و به قسمت جمع‌کننده مایعات در داخل هود هدایت شود. مدت ۳۰ دقیقه صبر کرده تا عمل ضدعفونی کامل شود، سپس یک شیلنگ به شیر مخصوص جمع‌آوری مایعات داخل هود وصل کرده و مایعات را به داخل یک ظرف حاوی مواد ضدعفونی‌کننده هدایت می‌کنیم. ضمناً انتهای شیلنگ باید در داخل ظرف ضدعفونی‌کننده باشد تا مواد جمع‌آوری شده ایجاد آئروسول نکند. پس از آلوده زدایی، قسمت مربوط به جمع‌آوری را با آب شستشو داده و شیلنگ مربوطه را جمع می‌کنیم.

همیشه قبل از تعویض فیلتر هوا و یا هرگونه اقدام تعمیری در داخل هود، باید آن را آلوده زدایی کرد. روش معمول برای این منظور استفاده از فرمالدئید است، زمان تعویض فیلترهای هود بستگی به مدت‌زمان استفاده از فیلترها دارد و توسط فرد فنی و با تجربه صورت می‌گیرد.^۱

آزمایشگاه مرجع بهداشت

سانتریفوژ

وجود یک دستگاه سانتریفوژ در آزمایشگاه‌های سل حد واسط، برای انجام کشت ضروری است. سانتریفوژ باید از مدلی باشد که در روی سطح زمین قرار بگیرد Floor Model و دارای درب محافظ اضافی باشد. چون میزان مواد برای سانتریفوژ زیاد است Mass Great روتورهای از نوع با زاویه ثابت Fixed Angle برای سانتریفوژ کردن لوله‌های با وزن سبک مناسب بوده و از لرزش (Vibration) و شکستن احتمالی لوله‌ها جلوگیری می‌کند. نمونه‌ها نباید با دور بیشتر از $3000 \times g$ سانتریفوژ شوند. ضمناً اگر در

^۱ لازم است مشخصات فنی و عمر مفید هپا فیلتر به‌صورت کتبی توسط سازنده هود به مراکز کنترل کیفی آزمایشگاه‌های کشور اعلام شود.

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۱۲ از ۵۱
شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01		بخش: سل و جذام استان
محدوده توزیع: تضمین کیفیت		

حین سانتریفوژ دما بالا برود از قدرت زیست (Viability) باکتری کاسته می‌شود. سانتریفوژ باید مجهز به سیستم قفل اتوماتیک در حین کار باشد، تا اجازه باز شدن درب آن را در حال چرخش روتور ندهد.

در بسیاری از گزارش‌ها و دستورالعمل‌ها برای آماده کردن نمونه، سرعت سانتریفوژ با rpm (Revolution Per Minute) بیان می‌شود. در حالیکه rpm معیاری برای سرعت هد (Head) سانتریفوژ می‌باشد و قابلیت رسوب دهی Efficiency Sedimenting یا قدرت نسبی سانتریفوژ RCF = Relative Centrifuge Force را بیان نمی‌کند. مقدار (g) را، بر مبنای میزان چرخش (spin) یا فاصله از مرکز چرخش تا دورترین نقطه (انتهای جا لوله‌ای) مشخص می‌کنند، نیروی نسبی سانتریفوژ RCF با افزایش تعداد چرخش (Spin) یا فاصله از مرکز بالا می‌رود و یا علامت $3000 \times g$ مشخص می‌شود. مقدار RCF از فرمول زیر محاسبه می‌شود:

$$RCF = 12/1R \max (rpm/1000)^2$$

R max عبارت است از فاصله دورترین نقطه چرخش از مرکز چرخش سانتریفوژ، اگر میزان RCF به اندازه کافی بالا نباشد، بسیاری از میکوباکتریوم‌ها در هنگام سانتریفوژ شدن در داخل رسوب نکرده و همراه با لایه رویی (Supernatant) دور ریخته می‌شوند. رسوب میکوباکتریوم‌ها در سدیمان باید ۹۵٪ باشد تا بتوان باکتری را به خوبی در کشت جدا کرد. این مستلزم داشتن $3000 \times g$ در سانتریفوژ است. بسیاری از سانتریفوژها موجود در آزمایشگاه‌های قدیمی سل با قدرت ۱۵۰۰-۲۰۰۰ RCF کار می‌کنند. اگر از این سانتریفوژها به مدت ۱۵ دقیقه استفاده شود میزان رسوب دهی ۷۵-۸۴٪ یا کمتر خواهد بود.

با توجه نوع روتور مورد استفاده در یک سانتریفوژ بدون یخچال و تعداد دور آن، درجه حرارت نمونه در داخل لوله ممکن است از ۱۸ تا ۴۱ درجه سانتی‌گراد افزایش یابد. لوله‌هایی که درون روتورهای با زاویه ملایم می‌چرخند حتی پس از چند بار استفاده، درجه حرارت آن‌ها خیلی بالا نمی‌رود، در حالیکه لوله‌هایی که در روتورهای با حالت افقی در چرخشند، درجه حرارت نمونه ممکن است از ۴۰ درجه سانتی‌گراد تجاوز نماید. اگر درجه حرارت نمونه در حین سانتریفوژ از ۲۰ به ۳۰ و از ۳۰ به ۴۰ درجه افزایش یابد (مدت سانتریفوژ ۱۵ دقیقه)، درصد ارگانیسم‌هایی که کشته می‌شوند به ترتیب از ۱۳ به ۲۲ و در نهایت به ۳۰ درصد افزایش می‌یابد. بنابراین، مسئله مهم این است که اولاً زمان (چرخش) پایین باشد (۱۵ دقیقه) و ثانیاً RCF بالا (۳۰۰۰) باشد. تا بتوان میزان (رسوب) Sedimentation را به ۹۵٪ رساند.

مواد هضم کننده خلط روی حیات باکتری اثر توکسیک دارند؛ بطوریکه اگر خلط با سود ۴٪ هضم و دکانتامینه شود و آن را در $1400 \times g$ سانتریفوژ کنند، ۷۳٪ باسیل‌های زنده تلف و در کشت از بین می‌روند.

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷ شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۱۳ از ۵۱
محدوده توزیع: تضمین کیفیت	بخش: سل و جذام استان	

نکات ایمنی مربوط به سانتریفوژ

لوله‌های شیشه‌ای تحت فشار سانتریفوژ می‌شکنند. اگر یک لوله سانتریفوژ در حین کار شکسته شود، محتویات آن ترشح کرده (Splash) و ممکن است از محیط سانتریفوژ بیرون زده Blow out و به صورت آئروسول در آید. بنابراین، لوله‌های سانتریفوژ درب پیچ‌دار Screw Top آر جنس پلی‌اتیلن برای سانتریفوژ کردن مواد عفونی مناسب است. سانتریفوژ در حال چرخش باید در تعادل باشد. یک Head بدون تعادل، دچار ارتعاش (Vibration) شده و ممکن است بشکند. در صورت عدم رعایت تعادل، جا لوله‌ای‌های سانتریفوژ آسیب جدی می‌بینند. توصیه شده است در مواقعی که لوله‌ای را به‌عنوان تعادل در روتور قرار می‌دهند محتوی الکل ۷۰٪ باشد تا در صورت نشت مواد از لوله نمونه، الکل نیز با خاصیت ضدعفونی‌کنندگی نشت کند. در حال چرخش نباید هد سانتریفوژ را لمس کرد، این کار علاوه بر صدمه به دست، سبب توقف ناصحیح سانتریفوژ و غوطه‌ور شدن مجدد رسوب تشکیل شده در درون لوله می‌شود.

گرمخانه یا انکوباتور ۳۷-۳۵ درجه سانتی‌گراد

کشت تهیه شده آر نمونه‌های مشکوک به سل حداکثر هشت هفته در حرارت ۳۷-۳۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شوند. انکوباتورها در اندازه‌های مختلف در دسترس می‌باشند. بهترین کار انتخاب گرمخانه‌ای است که از فضای کافی و مناسب برخوردار باشد. اشکال انکوباتورهای کوچک، نوسانات زیاد درجه حرارت به هنگام باز کردن درب آن‌هاست. با توجه به ضرورت برقراری جریان هوا در داخل گرمخانه، از انباشته نمودن بیش از ظرفیت انکوباتور باید اجتناب شود. سینی‌های مورد استفاده در گرمخانه باید دارای منافذ باشند تا چرخش هوا در داخل گرمخانه دچار اشکال نگردد. هم چنین از باز کردن غیرضروری درب گرمخانه باید پرهیز شود. معمولاً گرمخانه خیلی کم دچار نقص فنی می‌شود، ولی توصیه می‌گردد قبل از خرید از سرویس و نگهداری پس از فروش آن مطمئن شوید.

معاونت بهداشت

در آزمایشگاهی که حجم کارش زیاد است، بهتر است گرمخانه ایجاد گردد. ایجاد گرمخانه در گوشه‌ای از آزمایشگاه یا در یک اتاق کوچک در آزمایشگاه کار مشکلی نیست (چنین اتاقی را با بستن پنجره‌ها و عایق‌بندی و زدن سقف کاذب می‌توان ایجاد کرد).

دستگاه منعقد کننده (کواگولاتور)

دستگاه منعقد کننده برای انعقاد محیط‌های کشت تخم‌مرغ مورد استفاده قرار می‌گیرد. این دستگاه باید قادر به تأمین حرارت ۸۵ درجه سانتی‌گراد بوده و این حرارت (۸۰-۸۵ درجه) را به مدت ۴۵ دقیقه به‌طور ثابت نگهداری کند. در صورت عدم دسترسی به دستگاه کواگولاتور، درجه حرارت مطلوب را می‌توان توسط انکوباتور و یا فور مرطوب ایجاد کرده و از آن استفاده کرد.

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۱۴ از ۵۱
شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01		بخش: سل و جذام استان
محدوده توزیع: تضمین کیفیت		

اتوکلاو

باسیل سل در حرارت مرطوب Steam Saturated پروتئین‌هایش تغییر ماهیت داده و نسبت به حرارت خشک سریع‌تر از بین می‌رود. بهتر است وسایل که مجدداً مورد استفاده قرار می‌گیرند. با اتوکلاوی که مخصوص بخش مایکوباکتریولوژی است به همراه کلیه وسایل (قبل از ارسال آن‌ها به بخش شستشو) اتوکلاو شوند. همچنین کنترل اتوکلاو بر اساس استانداردهای آزمایشگاهی لازم است.

شعله برنر

در موارد کار با مواد بسیار عفونت‌زا مانند کلنی باکتری سل، باید از شعله برنر در داخل هود استفاده کرد. ضمناً برای ثابت کردن لام‌ها می‌توان از آن استفاده نمود.

سایر وسایل

وسایل زیر به هنگام تهیه لام، کشت یا سوسپانسیون میکروبی برای آنتی بیوگرام لازم است

- رک فلزی (Rack) برای چیدن لامهای میکروسکوپی قبل از رنگ‌آمیزی
- دستگاه شیکر (Shaker) که قبل از سانتریفوژ لوله‌های حاوی نمونه و ماده آلوده زدا مورد استفاده قرار می‌گیرد.
- دستگاه ورتکس که درون هود مورد استفاده قرار می‌گیرد.
- ارلن مایر مدرج در اندازه‌های ۲ لیتری و ۱ لیتری
- کوره (Incinerator) برای از بین بردن مواد عفونی
- مزور مدرج ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌لیتری
- کپسول چینی متوسط
- سرنگ اتوماتیک تقسیم محیط
- قیف بزرگ شیشه‌ای
- لوله‌های مک کارتنی یا لوله‌های در پیچ‌دار به قطر ۱ cm به تعداد کافی

تمام این وسایل باید در موقع استفاده تمیز و استریل باشند. وسایل شیشه‌ای با مواد شوینده شسته شده و به خوب با آب شیر آبکشی، و سپس با آب مقطر آب کشیده و خشک شوند. وسایل شیشه‌ای نباید هیچ‌گونه لکه‌ای داشته باشند. باید وسایل شیشه‌ای پس از بسته‌بندی به مدت ۲۰ دقیقه در فشار ۱۱۵ پوند اتوکلاو و یا به وسیله حرارت خشک به مدت نیم ساعت در دمای ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد استریل شوند.

فشار هوا، دما، رطوبت داخل اتوکلاو و زمان انجام اتوکلاو باید در حد استانداردهای تعیین شده رعایت شود

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷ شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۱۵ از ۵۱
محدوده توزیع: تضمین کیفیت	بخش: سل و جذام استان	



معاونت بهداشت

آزمایشگاه مرجع بهداشت

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷ شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۱۶ از ۵۱
محدوده توزیع: تضمین کیفیت		بخش: سل و جذام استان

فصل سوم

جمع آوری نمونه‌های مختلف

وجود باسیل‌های اسید فست در نمونه‌های بالینی به وسیله آزمایش میکروسکوپی و یا انجام کشت مشخص می‌شود. گونه‌های مختلف مایکوباکتریوم‌ها را با مشاهده میکروسکوپی گسترده نمی‌توان مشخص نمود؛ بنابراین تشخیص قطعی توپرکلوزیس فقط با کشت و جداسازی آن از نمونه‌های بالینی میسر است. وجود یک نمونه کافی و مناسب برای دستیابی به نتایج صحیح یک اصل ضروری است و اگر نمونه آزمایشی به روش صحیح جمع‌آوری شده باشد نتیجه یک آزمایش اطمینان بخش خواهد بود.

یکی از ارزان‌ترین راه‌های بیماریابی، آزمایش مستقیم خلط با میکروسکوپ است. اگر نتوان در چنین افرادی یک نمونه صحیح تهیه و مورد آزمایش قرار داد، ممکن است احتمال دسترسی مجدد به آن‌ها از دست رفته و باعث آلودگی‌های جدید در اجتماع باشد؛ که از نظر اقتصادی، اجتماعی و بهداشتی زیان‌های جبران‌ناپذیری به دنبال خواهد داشت. مایکوباکتریوم‌ها و به خصوص انواع کند رشد آن‌ها قادرند در همه جای بدن نفوذ کرده و باعث ایجاد بیماری شوند؛ از این رو نمونه‌های مورد آزمایش بسیار متنوع می‌باشند. این نمونه‌ها عبارت‌اند از: خلط بیماران مشکوک به سل ریوی، محتویات معده بیماران مشکوک به سل ریوی که قادر به دفع خلط نیستند، سواپ لارنکس (در بیماران مشکوک به سل ریوی، به‌ویژه کودکان)، مایع پلور در بیماران مشکوک به پلورزی سلی، مایع آسیت در بیماران مشکوک به پریتونیت سلی، مایع پریکارد، ترشحات آسه ریوی، ترشحات غدد لنفاوی، مدفوع بیماران مشکوک به سل گوارشی و سل ریوی، ادرار بیماران مشکوک به سل دستگاه ادراری، چرک‌های استخوان در بیماران مشکوک به سل استخوان، مایع نخاع در مننژیت سلی، ضایعات پوستی بیماران مشکوک به سل پوستی و عفونت‌های مایکو باکتریایی و خون بیماران مشکوک به سپتی سمی.

معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت جمع آوری نمونه‌های مختلف

خلط:

سل ریوی یکی از شایع‌ترین و مهم‌ترین انواع بیماری سل است. به همین دلیل، خلط یکی از با ارزش‌ترین نمونه‌های آزمایشی برای تشخیص بیماری به شمار می‌رود و لازم است که دقت کافی برای جمع‌آوری آن به عمل آید. بنابراین، قبل از مراحل هضم، آلوده زدایی و کشت باید به کیفیت نمونه، نحوه دریافت و انتقال صحیح و به‌موقع آن به آزمایشگاه توجه کرد.

از بیمارانی که قادر به دفع خلط می‌باشند، نمونه مناسبی می‌توان به دست آورد. ولی در مواردی که فرد قادر به دفع خلط نیست (افراد مسن، کودکان و...) از روش‌های دیگر برای جمع‌آوری ترشحات استفاده می‌شود. برای مثال با تحریک سرفه در اثر استنشاق محلول آب‌نمک ولرم ۱۰٪، می‌توان نمونه مناسبی به دست آورد. این عمل سبب تحریک بیمار و ایجاد سرفه و دفع خلط می‌شود.

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷ شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۱۷ از ۵۱
محدوده توزیع: تضمین کیفیت	بخش: سل و جذام استان	

اگر چه این خلط آبکی می‌باشد ولی از نمونه تهیه شده با روش سواپ و نمونه شیره معده مطمئن تر است. باید توجه داشت که روی ظرف نمونه حتماً جمله " تهیه نمونه با روش القایی (Induced) قید شود تا در هنگام تحویل به آزمایشگاه تصور نشود که نمونه رقیق و آبکی بوده و باید تکرار شود.

در بیمارانی که قادر به دفع خلط نمی‌باشند، شست و شوی برونش‌ها و نمونه‌برداری از حلق به وسیله سواپ از دیگر روش‌های پیشنهادی برای جمع‌آوری نمونه می‌باشند. در مقایسه با روش شست‌وشوی برونش و جمع‌آوری شیره معده که بسیار مشکل و برای بسیاری از بیماران غیرقابل تحمل است، روش نمونه‌برداری از حلق به وسیله سواپ بسیار ساده است. برای تهیه نمونه باید از سواپ‌های استریل، مورد استفاده در میکروپشناسی، استفاده شود. سواپ را در آب مقطر استریل کمی خیس می‌کنیم، این کار مانع از نفوذ مواد مترشح به داخل پنبه می‌شود. کارمند فنی آزمایشگاه که ماسک به صورت دارد، سر بیمار را در حالت نشسته، کمی به عقب می‌برد و باید گاز استریل زبان بیمار را بیرون آورده و سواپ را داخل لارنکس می‌کند و از وی می‌خواهد که سرفه کند؛ سپس سواپ را چرخانده و مواد مترشح را جمع‌آوری کند. از هر بیمار باید دو سواپ تهیه شده را در یک لوله آزمایش استریل که اسم و مشخصات بیمار بر روی آن ثبت شده، می‌گذارند.

در رابطه با وجود میکروب سل در محتویات شیره معده، نظر بیشتر پژوهشگران این است که علاوه بر بلع خلط، علل دیگری مانند بلع مایکوباکتریوم‌های ساپروفیت محیط، وجود دارد. آزمایش شیره معده در مورد بیمارانی انجام می‌شود که دارای علائم رادیوگرافی مشکوک به سل باشند (بیمار قادر به دفع خلط نیست). برای جلوگیری از هرگونه اثر نامطلوب شیره معده بر میکروب سل، توصیه می‌شود که نمونه بلافاصله در یخچال قرار داده شود. در صورتی که از مان جمع‌آوری نمونه تا انجام آزمایش بیش از ۴ ساعت طول بکشد باید ۱۰۰ میلی‌گرم پودر بیکربنات سدیم را به آن اضافه کرد (تا اسیدیته شیره معده خنثی شود).

غالب نمونه‌های ارسالی به آزمایشگاه مایکوباکتریولوژی نمونه‌های خلط می‌باشند، ولی چون مایکوباکتریوم توبرکلوزیس قادر به ایجاد عفونت در تمامی اعضای بدن است، نمونه‌های دیگر (غیر از خلط) هم به آزمایشگاه فرستاده می‌شود، که مربوط به بیماران مشکوک به سل خارج ریوی می‌باشند. این نمونه‌ها مانند مایعات بدن، بافت‌ها، ادرار، فیستول و یا هر نوع ترشح دیگر، به‌طور کلی به دو دسته تقسیم‌بندی می‌شوند:

الف) مایعاتی که استریل هستند و در شرایط استریل جمع‌آوری می‌شوند. مانند مایع مغزی نخاعی

ب) مایعاتی که غیر استریل بوده و حاوی فلور میکروبی می‌باشند و به‌طور معمولی جمع‌آوری نمی‌شوند. مانند نمونه‌برداری از ترشحات جلدی.

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷ شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۱۸ از ۵۱
محدوده توزیع: تضمین کیفیت	بخش: سل و جذام استان	

مایعات استریل بدن

مایعات استریل بدن از قبیل مایع نخاع، پریکارد، مفاصل، پلور، مغز استخوان و چرک از ضایعات بسته، که در شرایط استریل جمع‌آوری

می‌شوند. جمع‌آوری این نمونه‌ها به عهده پزشک و با استفاده از روش‌ها و تکنیک‌های جراحی انجام می‌شود.

مایع مغزی نخاعی CSF بعنوان آزمایش اورژانسی در برنامه سل محسوب می‌شود. لذا در انجام آزمایش آن باید دقت نمود.

برای جلوگیری از لخته شدن مایعات استریل بدن از محلول‌های ضد انعقاد استفاده می‌شود. برای این منظور، از محلول ده درصد اگزالات پتاسیم خنثی به میزان ۰.۱ تا ۰.۲ میلی‌لیتر برای هر میلی‌لیتر نمونه و یا از هپارین ۰.۲ میلی‌گرم به ازای هر میلی‌لیتر استفاده می‌شود. این‌گونه نمونه‌ها باید خیلی سریع به آزمایشگاه ارسال شوند.

بافتهای استریل بدن

بافتهایی که در شرایط استریل نمونه‌برداری می‌شوند، باید در داخل یک ظرف استریل بدون هیچ‌گونه ماده شیمیایی ثابت‌کننده و نگهدارنده قرار داده شوند. اگر نمونه به آزمایشگاهی فرستاده می‌شود که مسیر آن خیلی طولانی است، برای جلوگیری از خشک شدن نمونه به آن سرم فیزیولوژی استریل افزوده و ظرف نمونه را در ظرف دیگری که حاوی یخ خشک است قرار می‌دهند تا درجه حرارت آن بین ۴-۱۵ درجه سانتی‌گراد ثابت بماند و سپس سریعاً نمونه به آزمایشگاه اصلی انتقال داده شود.

بعد از دریافت نمونه‌های استریل به موارد زیر توجه شود:

پس از سانتریفوژ از رسوب مایع نخاع برای کشت استفاده شود. جهت تسهیل در ایجاد رسوب چند قطره از سرم استریل خرگوش و یا محلول آلومین را به مایع نخاع بیافزائید (برای ۱۰ میلی‌لیتر مایع نخاع، ۰.۱ میلی‌لیتر آلومین)، بعد آن را خوب تکان داده و با دور ۳۰۰۰x g برای ۱۵ دقیقه سانتریفوژ کنید.

در صورتی که بعد از سانتریفوژ رسوبی در لوله مشاهده نشد محلول سولفوسالسیلیک اسید ۲۰٪ را قطره‌قطره به لوله اضافه کرده تا کدورت کامل ایجاد شود و بعد آن را دوباره سانتریفوژ کنید. در صورت احتمال غیر استریل بودن نمونه ارسالی به آزمایشگاه، به سدیمان به‌دست‌آمده ۲ میلی‌لیتر از محلول اسیدسولفوریک ۴٪ افزوده و پس از ۱۵ دقیقه به آن ۱۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل اضافه کرده و با دور ۳۰۰۰x g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ نمایید. رسوب حاصله را به لوله‌های محیط کشت تلقیح کنید.

جلوگیری از ایجاد لخته

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷ شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۱۹ از ۵۱
محدوده توزیع: تضمین کیفیت		بخش: سل و جذام استان

برای جلوگیری از انعقاد آن دسته از مایعات بدن که منعقد می‌شوند می‌توان از محلول سیترات سدیم در زمان جمع‌آوری نمونه استفاده کرد. اضافه کردن دو قطره از محلول ۲۰٪ سیترات سدیم به ۱۰ میلی‌لیتر از مایع جمع‌آوری شده از انعقاد آن جلوگیری می‌کند.

نمونه‌های مشکوک به آلودگی

ادرار

ادرار نمونه‌ای است که حتماً عمل هضم و آلوده زدایی قبل از تلقیح و کشت، باید روی آن انجام شود. برای کاهش تعداد میکروارگانیسم‌ها قبل از جمع‌آوری ادرار، ضدعفونی قسمت خارجی دستگاه تناسلی ضروری است. قسمت اول ادرار را دور ریخته، قسمت میانی (Mid-Stream) را در ظرفی استریل ریخته و درب پلاستیکی را روی آن قرار دهید. پس از اخذ نمونه ادرار، باید آن را سریعاً به آزمایشگاه رساند. نمونه جمع‌آوری شده باید بلافاصله مورد آزمایش قرار گیرد و در غیر این صورت حتماً باید در یخچال نگهداری شود.

برای آزمایش باید سه نوبت ادرار صبحگاهی را مورد آزمایش قرار داد. نمونه باید در مدت چهار ساعت پس از جمع‌آوری مورد آزمایش قرار گیرد، چون محیط اسیدی ادرار به باسیل سل آسیب می‌رساند.

برای دستیابی به نتیجه صحیح مراحل ذیل را انجام دهید:

- ۱) نمونه به دست آمده را به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ کنید
- ۲) مایع رویی را دور ریخته (پس از سانتریفیوژ)، دو میلی‌لیتر اسیدسولفوریک ۴٪ را به ته‌نشین ادرار اضافه کنید.
- ۳) پانزده دقیقه صبر کرده و سپس ۱۵ میلی‌لیتر محلول نمکی استریل به آن اضافه کنید
- ۴) مخلوط را در دور ۳۰۰۰X g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ کنید.
- ۵) سدیمان را با سود ۴٪ در مجاورت فنل رد خنثی کنید.
- ۶) از رسوب حاصله به محیط کشت تلقیح کنید.

شستشوی معده

در صورتی که شیره معده در شرایط استریل و در ظروف استریل نمونه‌گیری شود، احتیاجی به آلوده زدایی ندارد. حجم کلی نمونه را در دور ۳۰۰۰X g به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ کنید.

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷ شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۲۰ از ۵۱
محدوده توزیع: تضمین کیفیت	بخش: سل و جذام استان	

در صورت آلودگی رسوب، مقدار ۲ میلی‌لیتر از اسیدسولفوریک ۴٪ به آن اضافه کرده و به مدت ۱۵ دقیقه آن را آلوده زدایی می‌کند. سپس ۱۵ میلی‌لیتر از محلول نمکی استریل به آن اضافه نموده و بعد مخلوط حاصله، را در دور ۳۰۰۰ x g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ کنید، رسوب حاصل را با سود ۴٪ در برابر فنل رد خنثی کرده، و نهایتاً رسوب حاصله را به محیط کشت تلقیح کنید.

سواب حلق

- در لوله اصلی حاوی سواب مقدار کافی اسید اگزالیک ۵٪ اضافه کرده طوری که سطح آن را بپوشاند.
- ۱۵ دقیقه صبر کرده تا اسید با سواب تماس کافی داشته باشد.
- سواب را به لوله دیگری که حاوی سرم فیزیولوژی استریل است منتقل کرده تا اسید جذب شده با آن رقیق گردد.
- پس از چند دقیقه سواب را برداشته و پس از چکیدن قطرات اضافی آن، در محیط مناسب کشت دهید.

برای کسب نتیجه بهتر ترجیحاً لوله حاوی اسید اگزالیک را که ممکن است حاوی باسیل سل نیز باشد به لوله دیگری منتقل کرده و پس از سانتریفوژ، رسوب آن را با آب مقطر یا سرم فیزیولوژی استریل شستشو داده مجدداً محلول حاصله را با دور ۳۰۰۰ x g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ نموده و رسوب آن را به محیط کشت تلقیح کنید.

بافت

غدد لنفاوی، نمونه‌های بیوپسی و سایر بافت‌هایی که با جراحی برداشته می‌شوند باید به وسیله قیچی یا اسکالپل استریل به قطعات کوچک‌تر خرد شوند، سپس نمونه‌ها را در یک وسیله ساینده مناسب tissue grinder یا هاون چینی استریل، یکنواخت و هموژن کنید. ماده یکنواخت شده را پس از اطمینان از استریل بودن آن می‌توان مستقیماً در محیط مناسب کشت داد. در غیر این صورت باید با اسیدسولفوریک ۴٪ (به شرح ذکر شده در مبحث ادرار) اقدام به آلوده زدایی نموده و سپس کشت داد.

نکته: باید توجه داشت، وسایل که برای خرد کردن و یکنواخت نمودن بافت‌ها به کار می‌روند کاملاً تمیز و استریل باشند، در غیر این صورت موجب نتایج مثبت کاذب خواهند شد.

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷ شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۲۱ از ۵۱
محدوده توزیع: تضمین کیفیت	بخش: سل و جذام استان	

چرک

نمونه چرک را مثل مایعات آسپیره شده کشت دهید، و اگر چرک غلیظ بود یا با ارگانیسیم‌های غیر اسید فست آلوده شده بود؛ مشابه شرح ذکر شده در مبحث خلط عمل کنید.

فصل چهارم

نگهداری و انتقال نمونه‌ها

برای گرفتن نتیجه مطلوب و صحیح از انجام کشت، باید زمان بین جمع‌آوری نمونه تا انجام آزمایش را به حداقل رساند. بنابراین، نمونه‌ها باید بعد از جمع‌آوری خیلی سریع به آزمایشگاه ارسال شوند. در صورت وجود یخچال، نمونه‌های خلط را می‌توان تا یک هفته نگهداری کرد و در پایان هفته، تمامی آن‌ها را به آزمایشگاه فرستاد. اما باید نمونه‌های خارج ریوی هرچه سریع‌تر به آزمایشگاه ارسال شوند.^۲

اگر نمونه‌ها در شرایط بدون یخچال ambient حمل می‌شوند، باید از مواد شیمیایی به‌عنوان نگهدارنده (preservation) استفاده کرد. معمولاً برای جلوگیری از آلودگی نمونه‌ها موارد زیر توصیه می‌شود:

- نمونه‌هایی که تازه جمع‌آوری شده‌اند با هم‌حجم ۱ درصد sodium- chloride pyridinium cetyl در ۲ درصد sodium-chloride مخلوط شوند. بدین‌وسیله باسیل سل تا ۷ روز در نمونه زنده می‌ماند، و از رشد سایر میکروارگانیسیم‌ها جلوگیری می‌شود.
- معادل ۵۰ میلی‌گرم از پودر بی‌کربنات سدیم بدون آب به دو میلی‌لیتر نمونه اضافه شود.
- اگر قرار است آزمایش روی نمونه‌ها بعد از ۲۴ ساعت انجام شود، نمونه‌ها را با حجم خود با محلول ۲۳٪ trisodium phosphate مخلوط کنید.

در هر صورت اگر نمونه‌ها را سریعاً به آزمایشگاه ارسال کنید، مناسب‌ترین و مطلوب‌تری کار را انجام داده‌اید (نیاز به محلول‌های نگهدارنده نیست). دستورالعمل و نکات مهم برای حمل مطمئن نمونه‌های پاتولوژیک معمولاً در کتاب‌های مختلف در سطح داخلی و بین‌المللی شرح داده شده است. همچنین مسئولین اداره پست و حمل‌ونقل در اکثر دنیا (انجمن بین‌المللی حمل‌ونقل هوایی) International Air Transport Association مقررات ویژه‌ای برای حمل‌ونقل این نمونه‌ها دارند. به‌طور کلی نمونه‌ها باید طوری

^۲ در صورتی که نمونه مورد آزمایش مایع نخاع باشد، فوراً به آزمایشگاه ارسال نموده و به هیچ وجه نباید آن را به داخل یخچال نگهداری کرد.

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷ شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۲۲ از ۵۱
محدوده توزیع: تضمین کیفیت	بخش: سل و جذام استان	

بسته‌بندی شوند که در مقابل تغییر فشار یا صدمه و نشت مواد و یا هر حادثه دیگری که ممکن است در طول سفر رخ دهد، مقاومت بیشتری را از خود نشان دهند. چون اکثر نمونه‌های سل نمونه‌های خلط می‌باشد، برای انتقال نمونه‌های خلط از جعبه‌های مخصوصی که معمولاً از جنس فلزی (آلومینیوم) یا چوب هستند، با ظرفیت بین ۱۰ تا ۱۵ ظرف نمونه که به‌طور عمودی در کنار هم قرار می‌گیرند استفاده می‌شود. هر بسته پستی باید با پارچه و یا کاغذ خیلی ضخیم بسته‌بندی شود و بر روی آن برچسب مواد بیماری‌زا همراه با اسم و نشانی گیرنده و فرستنده به‌طور دقیق مشخص شود. جعبه‌های ارسالی باید از نظر حفظ نمونه‌ها دارای شرایط مناسب باشند، و در زمان حمل‌ونقل در جای خنک و دور از تابش مستقیم آفتاب باشند. قبل از ارسال جعبه حاوی ظروف خلط به موارد زیر توجه کنید.

- ❖ مطابقت نمونه‌های ارسال شده با فهرست همراه آن اعم از تعداد و مشخصات.
- ❖ کد نمونه با شماره کد آن نمونه در چک‌لیست همخوانی داشته باشد.
- ❖ تاریخ ارسال نمونه‌ها روی چک‌لیست نوشته شود.



معاونت بهداشت

آزمایشگاه مرجع بهداشت

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷ شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۲۳ از ۵۱
محدوده توزیع: تضمین کیفیت	بخش: سل و جذام استان	

فصل پنجم

دریافت نمونه در آزمایشگاه‌های حد واسط

نمونه‌ها باید معمولاً به قسمت مخصوص دریافت نمونه در آزمایشگاه آورده می‌شوند و سپس جعبه ارسالی به شرحی که گفته شد به اتاق کشت منتقل و با رعایت نکات زیر، درب جعبه در زیر هود باز می‌شود.

- هنگام کار با مواد عفونی حتماً از دستکش مرغوب استفاده شود
- جعبه ارسالی از نظر نشت نمونه‌ها مورد بازرسی قرار دهید، در صورت که تعداد زیادی از نمونه‌ها نشت کرده باشند، کل جعبه را اتوکلاو کرده یا بسوزانید.
- سطح خارجی جعبه ارسالی را با پنبه آغشته به فنل ۵٪ پاک کنید
- جعبه را به دقت باز کنید، توجه داشته باشید که ظرف حاوی نمونه ترک یا شکستگی نداشته باشد.
- در صورتی که ظرف نمونه دچار نشت یا شکستگی شده باشد جعبه را با محتویات آن اتوکلاو کنید.
- هر نمونه باید با کد مخصوص آن در چک‌لیست کنترل شود.
- داخل جعبه را با مواد ضد عفونی کننده مثل فنل ۵٪ ضد عفونی کنید.
- نمونه‌ها را برای انجام آزمایش، به ترتیب در داخل هود قرار دهید.
- پس از اتمام کار دست‌ها را با صابون شسته و دستکش‌ها و ظروف نمونه را داخل یک سطل استیل درب دار گذاشته و پس از بستن درب سطل، آن را به قسمت اتوکلاو یا برای سوزاندن ارسال کنید.

باز کردن نمونه در داخل هود

به منظور کاهش خطر تولید آئروسول در حین انجام مراحل کشت، دقت کنید تمامی مراحل در داخل هود انجام شود. در صورت قطع جریان برق و یا خاموش شدن هود، برای شروع مجدد کار، باید ابتدا هود را پنج دقیقه روشن گذاشته و بعد کار را شروع کرد. پس از روشن کردن هود و قرار دادن نمونه‌ها در داخل آن، ۶۰ ثانیه درحالی که دست‌ها داخل هود می‌باشند، صبر کنید. بدین طریق، دستگاه قادر به تثبیت (stabilities) و زدودن احتمالی میکروارگانیسم‌های داخل دستگاه می‌شود.

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷ شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۲۴ از ۵۱
محدوده توزیع: تضمین کیفیت	بخش: سل و جذام استان	

دقت شود که سوراخ‌های ورود هوا در قسمت ورودی هود grille –Front توسط اجسام خارجی مسدود نباشد. سعی شود که در موقع کار حداقل ۱۰ سانتی‌متر با قسمت ورودی هوا در هود فاصله داشته باشید تا جلوی ورود هوا به داخل آن گرفته نشود.

قبل از شروع کار، کاغذ صافی (یا کاغذ کار) آغشته به فنل ۵٪ را در کف سینی کار (یعنی محلی که مواد آلوده برای کشت روی آن قرار می‌گیرند) در داخل هود قرار داده و سپس وسایل را داخل هود بگذارید.

به‌منظور جلوگیری از تردد یا حرکات اضافی در آزمایشگاه (مانند جستجوی ابزارها و یا مواد موردنیاز در حین کار)، لازم است که ابتدا فهرستی از اقلام موردنیاز تهیه‌شده و پس از آماده کردن وسایل و در دسترس بودن آن‌ها شروع به کار کرد. حرکات و تردد اضافی در مقابل هود فعال در حین کار، به جریان هوا آسیب وارد کرده و از امنیت کار می‌کاهد.

در داخل هود فقط مواد و وسایل موردنیاز را قرار داده و از انبار کردن و نگهداری وسایل اضافی در هود پرهیز کنید (وجود وسایل اضافی در هود سبب اختلال در گردش هوا می‌گردد).

مواد و وسایل که ایجاد آئروسول می‌کنند، مانند ورتکس، باید در قسمت انتهایی هود قرار گیرند (در عقب). مشروط بر اینکه، دریچه‌های هوا را در قسمت عقب هود مسدود نشوند. اجسام حجیم مانند ظروف مخصوص، پیپت و ظرف‌های جمع‌آوری کننده را در یک طرف هود قرار دهید.

وسایل و مواد را طوری قرار دهید که کار از سمت منطقه تمیز به سمت منطقه آلوده جریان داشته باشد، یعنی به‌گونه‌ای باشد که وسایل کثیف و اجسام آلوده از روی وسایل پاک و تمیز عبور داده نشوند.

لوله‌ها را بدون درپوش در داخل هود قرار نداده و حتماً درپوش آن‌ها را بگذارید (این مسئله از انتقال آلودگی به نمونه جلوگیری می‌کند) در داخل هود از شعله با حجم زیاد استفاده نکنید، چون ایجاد موجی از گازهای در حال اشتعال را نموده و جریان عادی گردش هوا در داخل هود را مختل می‌کند.

پس از اتمام کار، کاغذ را همراه با مواد آلوده در اتوکلاو، و سینی مربوطه را در فور استریل کنید.

به هنگام کار در داخل هود باید بازوهای فرد آزمایش‌کننده مماس بر سطح هود نبوده و بالاتر از دریچه‌های ورود هوا باشد تا اشکالی در جریان هوا به وجود نیاید.

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷ شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۲۵ از ۵۱
محدوده توزیع: تضمین کیفیت	بخش: سل و جذام استان	

پس از اتمام کار، وسایل آلوده را در داخل کیسه مخصوص اتوکلاو گذاشته و در آن کمی آب ریخته و به قسمت اتوکلاو بفرستید، بدین طریق بخار مناسب در داخل کیسه نیز تولید می‌شود.

طرز استفاده از اتوکلاو

هنگام استفاده از اتوکلاو آب داخل آن باید کنترل شود. وسایلی را که باید استریل شوند داخل اتوکلاو گذاشته، درب آن را بسته و شیر تخلیه را باز کنید. دریچه اطمینان را سپس تنظیم کرده تا درجه مطلوب به دست آید.

وقتی که آب به جوش می‌آید، بخار از شیر تخلیه خارج شده و هوا را از درون اتوکلاو با خود به بیرون می‌برد. باید به هوا و بخار آب اجازه داد که آزادانه خارج شوند تا تمام هوا از درون دیگ خالی شود؛ بدین طریق، تشکیل حباب هوا در داخل اتوکلاو متوقف می‌شود. در این حالت شیر تخلیه بخار هوا باید بسته شود. برای کنترل خروج هوا از داخل اتوکلاو، یک شیلنگ لاستیکی را به سرشیر تخلیه وصل کرده و سر دیگر آن را در داخل سطل حاوی آب می‌گذارند تا تشکیل حباب و قطع آن را مشاهده نمایید. از این مرحله به بعد فشار بخار بالا رفته تا به میزان مطلوب برسد. معمولاً فشار ۱۵ پوند بر اینچ مربع لازم است و پس از آن بخار اضافی تخلیه می‌شود.

وقتی حرارت داخل اتوکلاو به دمای موردنیاز ۱۲۱ (درجه سانتی‌گراد) رسید، فشار دستگاه به مدت ۳۰ دقیقه ثابت نگه‌داشته می‌شود.

معاونت بهداشت

در پایان مرحله استریلیزاسیون دستگاه را خاموش کنید و به اتوکلاو فرصت دهید تا خنک شود. وقتی که عقربه فشار به صفر نزدیک شد (فشار اتمسفر) شیر تخلیه هوا و بخار را باز کنید. اگر شیر تخلیه را خیلی زود و هنگامی که اتوکلاو فشار زیادی دارد باز کنید، تمام مایعات داخل به شدت جوشیده و بطری‌ها ممکن است بترکد.

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷ شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۲۶ از ۵۱
محدوده توزیع: تضمین کیفیت	بخش: سل و جذام استان	

فصل ششم

هضم و آلوده زدایی نمونه‌ها

تکنیک‌های رایج در میکروبیولوژی مانند کشت در پلیت با استفاده از محیط‌های انتخابی یا غنی کننده و تجدید کشت برای به دست آوردن کلنی خالص و تک را نمی‌توان در عملیات باکتریولوژی سل مورد استفاده قرارداد. اغلب مایکوباکتری‌های به‌کندی رشد کرده و رشد آن به مدت ۲-۳ هفته به طول می‌انجامد تا کلنی‌های قابل رویت از آن‌ها تشکیل شود. برای جداسازی میکروب سل، روش‌ها و محیط‌های خاصی وجود دارد که در مورد سایر باکتری‌ها کاربرد ندارد. کشت‌ها معمولاً در لوله انجام می‌گیرد که در حقیقت جایگزین پلیت شده است. علت استفاده از این لوله‌ها این است که او لا مایکو باکتری‌ها و به‌خصوص باسیل‌های سل غالباً به تعداد اندک در نمونه تهیه شده از بیمار وجود داشته و این مسئله استفاده از مقدار زیاد ماده مورد کشت (Inoculum) را الزامی می‌سازد که در این صورت سوسپانسیون قابل کشت باید به‌صورت یکنواخت در سطح لوله گسترده شود. درب لوله‌ها باید به‌طور محکم بسته شده تا از خشک شدن محیط جلوگیری شود. خشک شدن محیط در پلیت بیشتر اتفاق می‌افتد. همچنین باز کردن درب پلیت‌ها اغلب موجب آزاد شدن مقادیر زیادی آئروسول می‌شود، درحالی‌که این مسئله در مورد لوله کمتر اتفاق می‌افتد. همچنین استفاده از لوله میزان آلودگی محیط کشت را کاهش می‌دهد.

اغلب نمونه‌های بالینی که برای کشت از نظر سل به آزمایشگاه ارسال می‌شوند به درجات مختلفی با میکروارگانیسم‌هایی که به‌صورت فلور میکروبی طبیعی در مواد بیولوژیک بدن وجود دارند، آلوده می‌باشند. وجود فلور میکروبی سبب رشد سریع آن‌ها در سطح محیط کشت شده و محیط را قبل از اینکه باسیل سل اجازه رشد یابد، هضم می‌کنند. بنابراین، باید با روش‌هایی که برای سایر میکروارگانیسم‌ها دارای قدرت آلوده زدایی بیشتری باشد استفاده کرد.

معاونت بهداشت

در مرحله هضم و آلوده زدایی نمونه‌های غلیظ و لزج مانند خلط به شکل مایع درمی‌آیند و فلور میکروبی عادی نمونه نیز از بین می‌رود. تمام عوامل هضم‌کننده و آلوده زدا Digesting /Decontaminating برای باسیل سل سمی هستند. بنابراین، باید شانس بیشتری را برای بقای هرچه بیشتر باسیل فراهم کرد و نکات لازم در روش هضم و آلوده زدایی باید دقیقاً رعایت شود. به‌منظور زنده نگه‌داشتن باسیل سل برای مدت‌زمان بیشتری، که بتواند تأییدی بر تشخیص بیماری سل باشد، آلودگی محیط‌های کشت به‌وسیله سایر ارگانیسم‌ها اجتناب‌ناپذیر است. براین منظور قاعده‌ای کلی وجود دارد به‌این ترتیب که در آزمایشگاه‌هایی که نمونه تازه برای کشت دریافت می‌کنند، میزان ۲ تا ۳٪ آلودگی قابل قبول است. اگر نمونه (به‌خصوص خلط) در طی رسیدن به آزمایشگاه چندین روز در راه باشد، میزان آلودگی به ۵ تا ۱۰٪ افزایش می‌یابد. همچنین به این نکته مهم نیز باید توجه داشت که اگر در یک آزمایشگاه مطلقاً آلودگی وجود نداشته باشد، مفهومی این است که روش آلوده زدایی به حدی شدید بوده که بسیاری از باسیل‌های سل را نیز از بین برده است.

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷ شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۲۷ از ۵۱
محدوده توزیع: تضمین کیفیت	بخش: سل و جذام استان	

در کشت از نمونه‌های بالینی برای جداسازی باسیل سل باید به سه نکته توجه داشت:

(۱) نمونه باید هموژنیزه و یکنواخت شود تا باسیل‌ها از موکوس سلول‌ها یا بافتی که آن را احاطه کرده است آزاد شوند. هر چه هموژنیزه ملایم‌تر باشد نتایج بهتری گرفته می‌شود.

(۲) هموژنیزه و آلوده زدایی به‌گونه‌ای نباشد که موجب از بین رفتن بیش از حد باسیل‌های سل شود.

(۳) هموژنیزه و آلوده زدایی نمونه از نظر کمیت به شرایط زیر بستگی دارد:

- باسیل سل در مقایسه با سایر باکتری‌ها نسبت به هضم با اسیدها و مواد قلیایی قوی مقاومت بیشتری دارد.

- مدت زمانی که نمونه در تماس با این مواد است، باید دقیقاً رعایت شود.

- کارایی سانتریفوژ به شرحی است که قبلاً اشاره گردید.

روش‌های زیادی برای هموژنیزه و آلوده زدایی نمونه‌ها و کشت آن وجود دارد، ولی روشی که به‌صورت جهانی قابل قبول همگان بوده و به‌عنوان یک روش واحد بکار گرفته شود، وجود ندارد. انتخاب یک روش مناسب تا حدود زیادی بستگی به امکانات و توانایی فنی پرسنل و همچنین کیفیت وسایل موجود در آزمایشگاه دارد. هر روشی محدودیت خاص خود را داشته و لازم است که آزمایشگاه‌های حد واسط از روش توصیه شده استفاده کنند.

برای اینکه روش مورد استفاده منجر به نتایج مطلوب در کشت شود باید:

- پرسنل از آموزش کافی برخوردار باشند.

- از وسایل و مواد قابل قبول استفاده شود

- وسایل کار صحیح نگهداری شده و از آن مراقبت به عمل آید.

هیدروکسید سدیم برای هضم و آلودگی زدایی

این روش به‌طور گسترده در کشورهای در حال توسعه استفاده می‌شود زیرا انجام آن و دسترسی به مواد مورد نیاز نسبتاً به‌سادگی امکان پذیر است.

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷ شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۲۸ از ۵۱
محدوده توزیع: تضمین کیفیت	بخش: سل و جذام استان	

هیدروکسید سدیم هم برای میکوباکتریوم و هم برای سایر میکروبها سمی است. بنابراین، رعایت زمان آلوده زدایی و زمان سانتریفوژ حائز اهمیت است.

تهیه مواد

تهیه هیدروکسید سدیم ۴٪

Grade: Analytical پلیت یا گرانول هیدروکسید سدیم ۴ گرم

آب مقطر ۱۰۰ میلی لیتر

هیدروکسید سدیم را در آب مقطر حل نموده و آن را در حرارت ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو نمایید.

طرز تهیه محلول اسید کلریدریک دو نرمال

باید ۳۳ میلی لیتر اسید کلریدریک غلیظ را در ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر رقیق کرد. برای این منظور، باید اسید را به آب اضافه کرد؛ این کار باید به آهستگی انجام شود. برای تهیه این محلول نیز باید ارلن مایر را خنک نگهداشت تا از حرارت ایجاد شده در اثر فعل و انفعال کاسته شود (سپس محلول را با استفاده از بالن ژوژه به حجم برسانید).

اسید اکسالیک و اسید سولفوریک

گاهی اوقات مشکل آلودگی زیاد در نمونه‌های بالینی، در برخی از بیماران خاص، یا مناطق به خصوص و یا در مقطع خاصی از زمان به وجود می‌آید؛ که در این صورت برای حل مشکل از اسید ۵٪ یا اسید سولفوریک ۴٪ برای آلوده زدایی می‌توان استفاده کرد. اگر آلودگی نمونه به علت گونه‌های پزودوموناس باشد از اسید اکسالیک استفاده می‌شود. هم‌چنین از اسید سولفوریک ۴٪ نیز برای آلوده زدایی ادرار و مایعات آبکی بدن در مواردی که مواد قلیایی ضد عفونی کننده، مشکل را حل نکنند، استفاده می‌شود.

آلودگی زدایی و کشت خلط

تمام مراحل آلودگی زدایی زیر هود انجام می‌شود:

(۱) ظروف نمونه را در زیر هود و لوله‌های استریل را با شماره‌های مترادف نمونه‌ها در جا لوله‌ای دیگر قرار دهید. توصیه

می‌شود از لوله‌های در پیچ‌دار (فالکون) با حجم مناسب استفاده شود.

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷ شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۲۹ از ۵۱
محدوده توزیع: تضمین کیفیت	بخش: سل و جذام استان	

- ۲) نمونه خلط بیمار را در فالکون با حجم ۵۰ میلی لیتری ریخته، سپس دو برابر هم حجم آن سود ۴٪ اضافه کنید.
- نکته:** برای هر نمونه خلط بیمار بنا به دستور پزشک لازم است به صورت جداگانه اسمیر و کشت انجام شود، در صورتی می توان نمونه های یک بیمار را با هم یکی نمود که مقدار نمونه ها از حداقل حجم مناسب ۲ (میلی لیتر) کمتر باشد.
- ۳) درب لوله را محکم بسته و نمونه را با استفاده از ورتکس با محلول سود مخلوط نمایید. مدت ۱۵ دقیقه لوله را در دمای اتاق ۲۰-۲۵ (درجه سانتی گراد) با استفاده از شیکر حرکت دورانی داده تا خلط به خوبی هضم و آلوده زدایی شود.
- ۴) لوله ها را در دور ۳۰۰۰ x g تا ۳۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ کنید.
- ۵) مایع رویی را برای جلوگیری از انتشار آلودگی در ظرف مناسب (Safety box) محتوی ماده ضد عفونی (آب ژاول) ۱۰٪ ریخته و سپس لبه لوله را با اتانول ۷۰٪ پاک کنید.
- ۶) مقدار ۱۵ میلی لیتر از محلول نمکی تهیه شده کلرید سدیم ۸.۵ در هزار را به رسوب حاصله اضافه کرده و آن را در آب نمک حل کنید.
- ۷) مجدداً محلول را با دور ۳۰۰۰ x g تا ۳۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ کنید.
- ۸) مایع رویی را دور ریخته و آن را به محیط کشت با استفاده از یک لوپ باکتریولوژیک ۳ میلی لیتری، با انتهای یک اپلیکاتور استریل چوب اضافه کنید، و سپس یک قسمت از ته نشین را برداشته، و روی یک لام نو، تمیز و بدون خراش در وسعتی برابر ۱.۵ x ۲.۵ سانتی متر گسترش تهیه کنید.

نکته:

روشی که در اغلب آزمایشگاه های کشور جهت خنثی سازی رسوب قلیایی حاصل از سانتریفوژ متداول است (روش پتروف) به شرح ذیل می باشد.

معرفها:

الف) اسید کلریدریک دو نرمال

ب) سود ۴ درصد

ج) معرف فنل رد (۸۰ میلی گرم پودر فنل رد را در ۲۰ میلی لیتر سود ۴ درصد حل کرده و حجم محلول را با آب مقطر به ۱

لیتر برسانید.)

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷ شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۳۰ از ۵۱
محدوده توزیع: تضمین کیفیت	بخش: سل و جذام استان	

روش:

- حدود ۱۰ میلی لیتر از نمونه خلط را داخل لوله مخصوص (فالكون) ریخته و هم حجم آن سود ۴ درصد اضافه نمایید.
- درب لوله را محکم بسته و با استفاده از شیکر به مدت ۱۵ دقیق آن را به خوبی تکان دهید.
- لوله را به مدت ۱۵ دقیقه و دور ۳۰۰۰x g تا ۳۵۰۰ سانتریفوژ نمایید.
- پس از سانتریفوژ مایع رویی را به آرامی در ظرف مناسب (Safety box) محتوی ماده ضد عفونی (آب ژاول) ۱۰٪ تخلیه نموده سپس یک قطره معرف فنل رد به رسوب اضافه کرده و آن را با افزودن قطره قطره اسید کلریدریک ۸٪ خنثی نمایید.
- از رسوب حاصله برای کشت و تهیه گسترش استفاده می شود.

فصل هفتم

محیط های کشت سل

همان گونه که قبلاً اشاره شد تشخیص قطعی بیماری سل نیاز به جداسازی باکتری عامل بیماری در محیط کشت و شناسایی آن با تعدادی از تست های تفریقی دارد. محیط های متنوعی برای کشت مایکوباکتری ها در دسترس می باشند ولی محیط ایده آل برای کشت مایکوباکتریوم ها باید شرایط زیر را داشته باشد.

آزمایشگاه مرجع بهداشت

- (۱) حتی اگر تعداد باکتری در نمونه خیلی کم باشد، سبب رشد، تکثیر و ازدیاد باکتری شود.
- (۲) از رشد باکتری های مزاحم جلوگیری کند.
- (۳) شناسایی اولیه مایکوباکتریوم ها را از نظر ایجاد رنگ دانه و مورفولوژی آن ها تسهیل کند.
- (۴) امکان تهیه اجرای محیط میسر بوده و از نظر اقتصادی مقرون به صرفه باشد.
- (۵) انجام تست های حساسیت دارویی با استفاده از این محیط ها امکان پذیر باشد.

عملاً محیط کشتی که واجد تمامی پنج شرط مذکور باشد وجود نداشته و تجربه نشان داده است که برخی از سویه ها در یک محیط رشد کرده و در محیطی دیگر رشد نمی کنند. بنابراین توصیه شده است که دو نوع محیط (محیط با پایه تخم مرغ و محیط با

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷ شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۳۱ از ۵۱
محدوده توزیع: تضمین کیفیت		بخش: سل و جذام استان

پایه سرم) برای جداسازی اولیه باکتری از نمونه‌های بالینی به کار رود. استفاده از محیط‌های با دو نوع پایه مختلف شانس جداسازی باکتری بیماری‌زا را افزایش می‌دهد.

در کشت خلط از محیط‌های با پایه تخم‌مرغ استفاده می‌شود ولی در مورد سایر نمونه‌های بالینی چون ممکن است با محیط‌های مایع نتایج بهتری گرفته شود، لذا از این نوع محیط‌ها نیز استفاده می‌شود. برای کشت نمونه مایع مغزی نخاعی، باید از هر دو نوع محیط (محیط تخم‌مرغ دار و محیط) 7H9 استفاده شود. در مورد نمونه‌هایی که قابل تکرار نیستند، مانند نمونه‌های بیوپسی نیز باید از هر دو نوع محیط استفاده کرد.

الف) مزایای محیط‌های تخم‌مرغ دار

- این نوع محیط‌ها را می‌توان در یخچال تا چندین ماه نگهداری کرد (بهترین زمان نگهداری ۴۵ تا ۶۰ روز است) ۸ درجه سانتی‌گراد
- احتمال آلودگی محیط در مرحله تهیه کمتر بوده، زیرا پس از تقسیم محیط در لوله، آن‌ها را در حرارت ۰-۸۵ منعقد می‌کنند.
- رشد اغلب مایکوباکتری‌ها را تقویت می‌کند.

ب) معایب محیط‌های تخم‌مرغ دار

- وقتی که آلودگی رخ دهد معمولاً تمام سطح لوله را فرا می‌گیرد.
- انجام تست حساسیت دارویی مشکل است و غلظت بعضی داروها در این محیط‌ها باید تنظیم شود، زیرا هنگام انعقاد در مرحله حرارت دهی، فعالیت دارو کم شده و یا اینکه اجزای به خصوصی از تخم‌مرغ، (مانند فسفو لیپیدها) دارو را خنثی می‌کند.

مزایای محیط‌های آگار دار

مزایای محیط‌های آگار دار عبارتند از:

- چون ترکیب آن از نظر مواد شیمیایی ساده‌تر است به باکتری‌های مزاحم کمتر اجازه رشد می‌دهد.

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷ شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۳۲ از ۵۱
محدوده توزیع: تضمین کیفیت	بخش: سل و جذام استان	

- معمولاً رنگ محیط واضح بوده (Clear) و می‌توان شکل کلنی را با سهولت بیشتری رویت کرد. زیرا برخلاف محیط‌های تخم مرغ دار در این نوع محیط‌ها می‌توان از میکروسکپ تشریح (Dissecting Microscope) برای دیدن کلنی‌ها استفاده کرد.
- چون ترکیب این محیط ساده‌تر از محیط تخم‌مرغ دار است، لذا تست حساسیت دارویی با غلظت‌های رقیق‌تری از دارو میسر است.
- اگر محیط‌ها را در شرایط ۱۰٪ CO₂ و ۹۰٪ هوا، در گرمخانه بگذارند در ۹۹٪ موارد، جواب‌های مثبت کشت، در مدت ۳-۴ هفته مشخص می‌شود.

معایب محیط‌های آگاردار

معایب محیط‌های آگاردار عبارت‌اند از:

- احتمال خشک شدن پلیت محیط‌های آگاردار در مرحله ذخیره‌سازی و انکوباسیون زیاد است، مگر اینکه پلیت‌ها را درون کیسه نایلونی گذاشته و آن را ببندید.
- اگر محیط در معرض نور Day Light قرار گیرد، گاز فرمالدئید از آن متصاعد شده و در نتیجه از رشد میکوباکتری‌ها جلوگیری می‌شود.
- اگر اسید اسپارتیک با غلظت ۰.۱ درصد L-Aspartic اضافه شود (به‌منظور تولید نیاسین توسط) *M. Tuberculosis* فعالیت داروهای خاصی تغییر می‌کند.
- در مرحله تهیه و تقسیم محیط درون پلیت، برای جلوگیری از آلودگی باید دقت زیادی اعمال شود. بیشتر محیط‌های مورد مصرف در آزمایشگاه‌های میکوباکتریولوژی به طریق تجاری و آماده در دسترس بوده و یا اینکه به‌صورت محیط پایه (Base) عرضه شده و باید فقط به آن مکمل (Supplement) اضافه کرد. هر سری محیط ساخته شده را باید با یک‌سویه از باسیل سل که صفات رشد آن شناخته شده است، از نظر توانایی محیط در تأمین رشد میکوباکتری کنترل کرد.

متغیرهایی که در کیفیت محیط به هنگام تهیه آن تأثیر دارند به شرح زیر می‌باشند:

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۳۳ از ۵۱
شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01		بخش: سل و جذام استان
محدوده توزیع: تضمین کیفیت		

❖ میزان خلوص مواد شیمیایی مورد استفاده.

❖ دقت در هنگام تهیه و استریل نمودن محیط کشت و ظروف شیشه‌ای.

❖ PH نهایی محیط

❖ در معرض قرار گرفتن محیط نسبت به اشعه خورشید یا حرارت زیاد

❖ روش ذخیره نمودن محیط و طول مدت نگهداری آن

محیط لوین اشتاین جانسون یا محیط (L-J) به شکل گسترده‌ای برای کشت باسیل سل استفاده می‌شود. محیط (L-J) حاوی گلیسرین، شرایط مطلوب برای رشد باسیل سل انسانی را تأمین کرده، در حالی که (L-J) حاوی پیروات، رشد باسیل سل گاوی را تأمین می‌کند. در کشورهایی که احتمال عفونت بیماران با هر دو میکروب می‌رود، باید از هر دو نوع محیط استفاده شود. محیط (L-J) که فرمول آن، توسط اتحادیه بین‌المللی مبارزه با سل و بیماری‌های ریوی (IUALTD) اصلاح شده، به شرح زیر است.

الف) محلول نمک‌های معدنی

KH₂PO₄	2.4 gr
Magnesium Sulphat (MgSO₄·7H₂O)	0.24gr
Magnesium Citrate (Mg)	0.6gr
L-Asparagine	3.6gr
Glycerol (Reagent Grade 87%)	12 ml
Distilled Water	600 ml

اجزا فوق را به ترتیب در آب حل نموده، سپس آن را در حرارت ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه اتوکلاو کنید تا استریل شود.

محلول تهیه شده را پس از سرد شدن در حرارت اتاق، می‌توان به مدت طولانی در یخچال نگهداری کرد.

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷ شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۳۴ از ۵۱
محدوده توزیع: تضمین کیفیت		بخش: سل و جذام استان

ب) محلول مالاشیت گرین ۲٪

پودر سبز مالاشیت ۲ گرم

آب مقطر استریل ۱۰۰ میلی لیتر

پودر سبز مالاشیت را در شرایط استریل در آب مقطر حل کرده و برای این منظور آن را به مدت ۱-۲ ساعت در گرمخانه بگذارید. این محلول را نباید به مدت طولانی نگهداری کرد. در صورت رسوب و تغییر رنگ باید آن را دور ریخته و مجدداً محلول تازه تهیه کرد.

ج) هموزنیزه کامل تخم مرغ

تخم مرغ‌های مورد استفاده برای تهیه محیط کشت (L-J) باید تازه بوده به طوری که بیش از یک هفته از تولید آن نگذشته باشد، ابتدا سطح پوسته تخم مرغ‌ها را با یک برس دستی کوچک و با استفاده از آب صابون (مالیم) تمیز کرده و سپس آن‌ها را به مدت نیم ساعت در آب صابون قرار دهید. بعد تخم مرغ‌ها را با آب جاری شسته و آن‌ها را در الکل ۷۰٪ به مدت ۱۵ دقیقه غوطه‌ور کنید. قبل از جابجا کردن تخم مرغ‌ها باید دست‌ها را برس کشیده و به خوبی شستشو داد.

تخم مرغ‌ها را با یک چاقوی استریل، شکسته و محتویات آن را درون ظرف استریل ریخته و با وسیله‌ای استریل (Egg Blender) به هم زده و یکنواخت کنید (می‌توان به جای به هم زدن از پرل شیشه‌ای استفاده کرد).

د) تهیه محیط کامل اجزای زیر را تحت شرایط استریل در یک ظرف استریل بزرگ ریخته و آن‌ها را به خوبی هم می‌زنیم محلول

املاح معدنی (محلول الف) ۶۰۰ میلی لیتر

مالاشیت سبز (محلول آب) ۲۰ میلی لیتر

هموزنیزه تخم مرغ (محلول ج) ۱۰۰۰ میلی لیتر

۲۰-۲۵ (تخم مرغ)

محلول تهیه شده فوق را به میزان ۸-۶ میلی لیتر در لوله‌های مک کارتنی Mc Cartney استریل یا درون لوله‌های آزمایش در پیچ‌دار می‌ریزیم. برای جلوگیری از رسوب املاح سنگین محیط، باید حداکثر ۱۵ دقیقه پس از توزیع آن را منعقد کرد.

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷ شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۳۵ از ۵۱
محدوده توزیع: تضمین کیفیت	بخش: سل و جذام استان	

انعقاد محیط قبل از قرار دادن لوله‌های محیط در دستگاه کواگولاتور درجه حرارت آن باید به ۸۰ درجه سانتی‌گراد رسیده باشد. سپس لوله‌ها را در حرارت ۸۰-۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰-۴۵ دقیقه منعقد می‌کنند. لازم به توضیح است که درجه حرارت کواگولاتور برای استریل نمودن محیط کافی نبوده و باید شرایط استریل در تهیه محیط، قبلاً رعایت شده باشد. حرارت دادن دوباره یا سه باره محیط، افزایش زمان انعقاد و یا افزایش درجه حرارت به کیفیت محیط آسیب می‌رساند. تغییر رنگ محیط منعقد شده و یا ظهور تعدادی حباب با تخلخل در سطح محیط به دلیل اشکال در انعقاد است. لذا، محیط‌های با کیفیت پایین باید حذف شود. برای کنترل محیط ساخته شده از نظر آلودگی، تمام محیط‌های تولید شده یا تعدادی از آن‌ها را که نماینده کل نمونه باشند، به مدت ۲۴ ساعت در حرارت ۳۵-۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده تا از نظر استریل بودن آن‌ها مطمئن شویم. تاریخ ساخت محیط (L-J) را ثبت کرده و سپس آن‌ها را در یخچال نگهداری کنید. در صورتی که درب آن محکم بسته شده باشد تا چند هفته می‌توان آن‌ها را نگهداری کرد.

برای کشت *M. bovis* محیط (L-J) را با ۰.۵ درصد پیرووات سدیم غنی می‌کنند و در این صورت گلیسرول از محیط حذف شده و ۸ گرم پیرووات به املاح محیط افزوده می‌شود. توصیه: برای کشت نمونه‌هایی که قابل تکرار نبوده، یا نمونه‌گیری مجدد مستلزم حذف هزینه برای بیماری می‌باشد، مانند بیوپسی کبد یا مایع مغزی نخاعی، می‌توان از محیط 7H9 که در آزمایشگاه مرکز موجود است، به میزان نیاز درخواست کنید.

فصل هشتم

کشت و شناسایی

کشت و شناسایی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس اغلب اوقات مقداری مایع درون لوله‌های حاوی محیط کشت جمع می‌شود. باید توجه داشت که قبل از انجام کشت این مایع حذف شود. ضمناً در صورتی که برای کشت از نمونه کافی استفاده نشود امکان خطا افزایش می‌یابد و متأسفانه در اکثر آزمایشگاه‌ها به این موضوع توجه نمی‌شود.

نگهداری کشت در گرمخانه: کشتهای تهیه شده را در گرمخانه ۳۵-۳۷ (درجه سانتی‌گراد) نگهداری می‌کنند تا رشد باکتری ظاهر شود. در صورت عدم ظهور (پرگنه) باید به مدت هشت هفته محیط‌های کشت را در گرمخانه نگهداری کرده و پس از این مدت می‌توان نتیجه کشت منفی تلقی کرد. توصیه می‌شود پس از تلقیح نمونه در محیط‌های کشت، لوله‌ها را به مدت ۲-۳ ساعت به‌طور افقی طوری قرار داده تا مایع تلقیح به‌صورت یکنواخت در سطح محیط قرار گیرد؛ سپس لوله‌ها را در گرمخانه به حالت عمودی نگهداری کنید. (بدلیل فضای کم گرمخانه).

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷ شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۳۶ از ۵۱
محدوده توزیع: تضمین کیفیت	بخش: سل و جذام استان	

برنامه زمان‌بندی برای مطالعه کشت

تمام کشت‌ها باید پس از ۷۲ ساعت تلقیح، بررسی شده تا زمانی که مایعات درون آن کاملاً تبخیر شود و پس از آن درب لوله‌ها را کاملاً پیچانده تا از خشک شدن محیط جلوگیری شود. ضمناً آلودگی احتمالی را در آن باید جستجو کرد. پس از گذشت ۷۲ ساعت کشت‌ها به‌طور هفتگی کنترل می‌شوند. اگر بررسی هفتگی عملی نباشد، حداقل در سه موقعیت زمانی کشت را بررسی می‌کنیم. یک هفته پس از کشت در صورت وجود احتمالی مایکوباکتریوم‌های سریع‌الرشد در نمونه بیمار، می‌توان رشد آن‌ها را در سطح محیط رویت کرد که ممکن است با مایکوباکتریوم توبرکلوزیس اشتباه شود.

باید توجه داشت:

رشد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در محیط (L-J) کند است، لذا پس از گذشت سه تا چهار هفته از نگهداری در گرمخانه باید به دنبال کشتهای مثبت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و سایر مایکوباکتریوم‌هایی با رشد کند بود، در غیر این صورت ممکن است کلنی‌های رشد کرده، مایکوباکتریوم‌های ساپروفیت بی‌ضرر و یا از انواع مایکوباکتریوم پائوژن و تند رشد باشند. بعضی از سویه‌های مایکوباکتریوم‌ها از جمله توبرکلوزیس بسیار دیر رشد بوده و ظهور کلنی تا هشت هفته طول می‌کشد. بنابراین کلیه لوله‌های محیط کشت را باید تا هشت هفته نگهداری کرد.

در صورت مشاهده آلودگی در تمام سطح لوله‌های کشت شده، آن‌ها را از گرمخانه جمع‌آوری کرده و پس از استریلیزاسیون حذف می‌کنیم. ولی اگر در قسمتی از محیط کشت، آلودگی مشاهده شود باید آن را در هشت هفته نگهداری کرد. این‌گونه آلودگی‌ها مانع از تشخیص باسیل توبرکلوزیس نمی‌شود و توصیه شده است که از سطح غیر آلوده محیط، گسترده تهیه و رنگ‌آمیزی شود. اگر در آزمایش میکروسکوپی باسیل اسید فست مشاهده شد، باید اقدام به آلوده زدایی محیط کشت نموده و مجدداً آن را کشت داد.

بعضی از ارگانیس‌های آلوده‌کننده، به علت تجزیه مواد موجود در محیط، سبب کاهش PH محیط شده و باعث شکستن اتصال بین رنگ سبز مالاشیت و تخم‌مرغ موجود در محیط گردیده و رنگ محیط به سبز تیره تغییر می‌یابد. باسیل سل در چنین شرایطی رشد نکرده و این‌گونه محیط‌ها را باید حذف کرد.

بررسی محیط‌های کشت

کلنی‌های تپیک باسیل سل سخت، شکننده، مومی، بدون رنگ، (رنگ خامه‌ای) و با رشد کم بوده و معمولاً ۳ تا ۴ هفته پس از کشت ظاهر می‌شوند، که باید از آن‌ها گسترده تهیه و مشاهده شود.

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷ شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01	 <p>معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت</p>	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۳۷ از ۵۱
محدوده توزیع: تضمین کیفیت		بخش: سل و جذام استان

برای بررسی و شناسایی اولیه باسیل سل، توجه به موارد زیر مفید خواهد بود:

- باسیل سل در کشت اولیه در مدت هفت روز قادر به رشد نبوده و معمولاً ۳ تا ۴ هفته طول می کشد که کلنی ظاهر شود
- کلنی ها به رنگ کرم کمرنگ (نخودی) بوده و هرگز به رنگ زرد دیده نمی شود.
- ظاهر کلنی خشن و به شکل خرده نان است.
- هنگام تهیه امولوسیون برای گسترده، ایجاد سوسپانسیون غیریکنواخت می نماید (دانه های درشت متشکل از باسیل شناور در مایع)

- در گستره تهیه شده سویه های باسیل توپر کلوزیس به صورت کورد یا طناب دیده می شود



معاونت بهداشت

آزمایشگاه مرجع بهداشت

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷ شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۳۸ از ۵۱
محدوده توزیع: تضمین کیفیت	بخش: سل و جذام استان	

فصل نهم

کنترل کیفی محیط کشت مایکوباکتریوم ها

برای اطمینان از کیفیت Quality assurance راه مناسبی در جهت اعمال روش‌های استاندارد در آزمایشگاه سل است.

کیفیت یک تست آزمایشگاهی با میزان اعتماد به نتیجه، صحت و قابلیت تکرارپذیری، دقت مترادف بوده و برای رسیدن به کیفیت مطلوب باید معیارهای کیفی را مد نظر قرار داد.

منظور از Quality assurance عبارت است از:

قابلیت اطمینان، باید مطمئن بود که نتیجه کار صحیح است. قابلیت تکرار پذیری، وقتی که تستی تکرار می‌شود باید نتایج مشابهی به دست آید. موارد ذکر شده تحت عوامل زیر تأثیرپذیر است:

الف) خطای فردی: منظور نحوه عمل کارمند یا کارد فنی آزمایشگاه،

ب) عوامل محیطی: شامل نور، حرارت نامناسب. تهویه نامطبوع،

ج) نوع نمونه‌ها از نظر آلودگی و غیره

د) مواد و وسایل آزمایشگاهی مورد استفاده در تهیه محیط کشت،

ه) روش انجام کار آزمایشگاه مرجع بهداشت

بنابراین Quality assurance یا اطمینان از کیفیت، مجموعه فعالیت‌هایی است که برای حصول به آن، آزمایشگاه در تهیه محیط کشت اعمال می‌کند.

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷ شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۳۹ از ۵۱
محدوده توزیع: تضمین کیفیت	بخش: سل و جذام استان	

کنترل کیفی در بخش محیط سازی سل

برای این منظور در هر بخش باکتریولوژی سل، باید دفترچه‌ای که تمام اطلاعات اعم از نحوه کار، مواد و وسایل مورد نیاز نگهداری و حذف محیط‌های نامناسب، درج کارهای روزانه را در برمی‌گیرد، وجود داشته باشد.

کنترل کیفی داخلی محیط‌های کشت مایکوباکتریوم، در هر سری ساخت آن ضرورت دارد و به علاوه باید در موارد زیر نیز کنترل کیفی لازم به عمل آید:

زمانی که نتایج کشت خارج از کنترل شود، چه رشد غیرقابل انتظار یا عدم رشد نمونه در هر دو صورت باید:

- موضوع به سرپرست بخش اطلاع داده شود
- در صورت در دسترس بودن نمونه، کشت تکرار شود.
- اگر کشت باز هم غیرقابل اعتماد باشد، باید محیط کشت با وسایل، مواد و معرف‌های تازه مجدد کنترل شود و یا از سری محیط‌های تهیه شده دیگر استفاده شود.

برای این منظور سوسپانسیون میکروبی، که برابر است با نیم مک فارلند در یک محیط آبگوشتی تهیه کرده و با استفاده از لوپ کالیبره با یک پی پت مدرج به مقدار ۱۰ میکرون از سوسپانسیون را به محیط تلقیح نموده (محیطی که دارای $PH = 6.9 \pm 0.2$ باشد) و برای مدت ۴-۸ هفته نگهداری می‌کنیم

برای تلقیح می‌توان از سویه‌های *M.tuberculosis* و *M.intracellular* و *M.kansasii* و *M. scrofulaceurn*. استفاده کرد.

در بعضی موارد ممکن است به دلیل عدم جدا شدن کلنی‌ها از رقت‌های مختلف میکروبی استفاده کرد.

الف) در مورد تلقیح مایکوباکتریوم‌ها، تغییرات آن‌ها را ابتدا در محلولی که حاوی سه گرم در لیتر سرم آلبومین گاوی و 0.2 ml توپین ۸۰ بوده و به همراه ۸-۱۲ عدد پرل شیشه‌ای سوسپانسیون را تهیه کرد و به مدت ۱۰ دقیقه با دستگاه vortex به هم

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷ شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۴۰ از ۵۱
محدوده توزیع: تضمین کیفیت		بخش: سل و جذام استان

می‌زنیم و سپس به مدت ۳ ساعت به حال خود رها کرده و بعد محلول رویی را به شیشه استریل منتقل کرده و کدورت مورد لزوم را با ۰.۵ مک فارلند تنظیم کرده و آن را در فریزر قرار دهید (این سوسپانسیون را می‌توان تا ۶ ماه در فریزر نگهداری کرد).

(ب) محیط L J همان طوری که در بالا اشاره شد باید $PH = 6.9$ بوده به علاوه برای کنترل کیفی از سویه‌های ذکر شده استفاده کرد.

(ج) تمامی کشت‌ها را تحت شرایط مناسب که برای آن محیط پیشنهاد شده انکوبه می‌کنیم.

(د) نتایج حاصله را در دفتر یادداشت می‌کنیم.

دستورالعملی برای تاریخ انقضای محیط‌های کشت که چندان مطلوب نبوده تهیه می‌کنیم، چرا که تاریخ انقضای محیط بستگی به فاکتورهای متعددی دارد:

- حرارت دادن نامناسب به محیط کشت
- قرار گرفتن محیط کشت در مقابل نور
- محکم نبودن درب لوله‌های کشت
- نگهداری محیط در جای نامناسب

معاونت بهداشت
 آزمایشگاه مرجع بهداشت

کنترل کیفی، اطمینان از کیفیت و تست کنترل کیفی خارجی

Quality control, quality assurance and Proficiency Testing

بهبود کیفیت یا Quality improvement

برای بهبود کیفیت باید اجزای یک آزمایشگاه سل به طور مستمر مورد تجزیه و تحلیل قرار گیرند تا از نظر قابل اعتماد بودن اجزا (Reliability) و افزایش بازدهی کار (Efficiency) و استفاده مطلوب‌تر ارتقاء کیفیت یابند. بهترین و مؤثرترین راه برای منظور

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷ شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۴۱ از ۵۱
محدوده توزیع: تضمین کیفیت	بخش: سل و جذام استان	

فوق، پیش‌بینی مشکلات و پیشگیری از وقوع آنهاست. بنابراین نباید اجازه داد تا مشکلات به وقوع پیوسته و سپس درصد رفع آن برآیند.

جمع‌آوری اطلاعات، آنالیز آن‌ها و پیدا کردن راه‌حل برای مشکلات، اجزای اصلی در بالا بردن کیفیت کار یا Quality improvement می‌باشند.

نظارت (supervision) باید به‌وسیله باتجربه‌ترین کارکنان فنی آزمایشگاه انجام شود. فعالیت‌هایی که سوپروایزر باید انجام دهد عبارت‌اند از:

- مشاهده بهداشت عمومی آزمایشگاه و حفاظت و ایمنی کارکنان در حین کار
- بررسی استانداردهای مورد استفاده در روش‌های آزمایشگاهی و وسایل کار
- بررسی ثبت گزارشات مربوط به مراقبت و نگهداری وسایل و اینکه سرویس‌های لازم به موقع صورت گرفته باشد
- ارزشیابی نمونه‌های نامطلوب از جمله ظروفی که نشسته داده و یا شکسته شده‌اند. اگر مرکز به خصوصی از نظر ارسال نمونه مشکل داشته باشد باید به آن‌ها تذکر داد.
- بررسی رنگ‌ها و معرف‌ها و محیط‌های کشت از نظر مشخص بودن اطلاعات مربوط به تاریخ تهیه و انقضای آن‌ها و اینکه تاریخ مصرف مواد نگذشته باشند
- بررسی برای حصول اطمینان از مصرف کنترل‌های مثبت و منفی در آزمایش‌های میکروسکوپ، کشت و روش‌های شناسایی.

آنالیز نمودن ماهانه نمونه‌های مثبت از نظر اسمیر، کشت و میزان انحراف آن‌ها از حد معمول به شرح زیر:

الف) جمع‌آوری و انتخاب اسلایدهای مثبت و منفی برای بررسی مجدد.

ب) روش جمع‌آوری لام‌ها به این ترتیب است که:

از ۱۰۰ نمونه لام، تمام مثبت‌ها به ترتیبی که تشخیص داده شده، انتخاب می‌گردد. در مرحله بعدی ۱۰٪ اسلایدهای منفی را به صورت ۱۰ در میان (دهمین اسلاید منفی) انتخاب می‌کنند.

تمام اسلایدها را به مدت دو ماه نگهداری می‌کنند در صورتی که آزمایشگاه ناظر (Supervising Laboratory) تقاضا نماید، باید تمامی اسلایدها را در اختیار آنان گذاشت. انتخاب تعداد لام برای بررسی، بستگی به آزمایشگاه داشته و در حین بازدید آن‌ها تعیین می‌گردد. نکته خیلی مهم، نگهداری اسلایدهای مربوط به بررسی‌های follow up است. زیرا موارد منفی کاذب در مورد آن‌ها ممکن است اتفاق بیفتد.

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷ شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۴۲ از ۵۱
محدوده توزیع: تضمین کیفیت	بخش: سل و جذام استان	

ج) ارزشیابی نسبت آلودگی نمونه‌های کشت شده در ماه.

کنترل کیفی را در موارد زیر به کار می‌برند:

- نظم و ترتیب آزمایشگاه،
- وسایل،
- جمع‌آوری و ارسال نمونه‌ها،
- جابجایی نمونه‌ها و کار با آن‌ها،
- معرف‌ها و محیط‌های کشت،
- روش‌های کشت،
- گزارش نتایج.

برای موفقیت در امر کنترل کیفی فاکتورهای زیر حائز اهمیت است:

- به کارگیری پرسنل آموزش دیده، علاقه‌مند و مسئولیت‌پذیر،
- اشتیاق به قبول و تصدیق اشتباهات
- ارتباط مؤثر در بین پرسنل (Communication effective)

آزمایشگاه مرجع بهداشت

نظم آزمایشگاه و اداره آن

باید از بسته بودن دائمی درهای آزمایشگاه اطمینان حاصل نمود. فضای کار، وسایل، مواد موردنیاز باید با نظم منطقی برای استفاده صحیح در حین کار چیده شوند و هم‌چنین فضای کار باید عاری از غبار باشد.

میز کار حداقل یک‌بار در روز باید به وسیله ماده ضدعفونی‌کننده مؤثر پاک شود.

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷ شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۴۳ از ۵۱
محدوده توزیع: تضمین کیفیت	بخش: سل و جذام استان	

هر روشی که در آزمایشگاه مورد استفاده قرار می‌گیرد باید دقیقاً نوشته شود و در آزمایشگاه به‌عنوان رفرانس در دسترسی کارکنان باشد. هر گونه تغییری در این خصوص باید توسط سوپروایزر با ذکر تاریخ درج شود (روش‌های آزمایشگاهی روتین باید از رفرانس معتبر استخراج گردیده باشد).

وسایل آزمایشگاهی

وسایل باید مطابق با مشخصات ذکر شده توسط سازنده بوده و کارایی لازم را طبق ادعای سازنده از خود نشان بدهند. راهنمای کتبی استفاده از وسایل باید در یک فایل نگهداری شود.

زمان سرویس و گزارش مربوطه به آن با ذکر تاریخ در مورد همه وسایل باید ثبت شود.

وسایل باید به‌طور منظم تحت نظارت قرار داشته باشند تا از دقیق بودن آن‌ها اطمینان حاصل شود.

کنترل وسایل

سانتریفیوژ: موتور و قطعات سانتریفیوژ باید هر ۶ ماه یک بار بررسی شود.

گرمخانه ۳۷-۳۵ درجه سانتی‌گراد: درجه حرارت به‌صورت روزانه و ترجیحاً صبح‌ها کنترل و ثبت شود. دما را در چندین نقطه انکوباتور کنترل کنید. این کار را با گذاشتن یا ترمومتر در درونی یک بشر حاوی آب انجام دهید. پس از مرحله محیط‌سازی درون آن را تمیز کنید.

یخچال: دمای دستگاه را روزانه کنترل کرده و ماهانه آن را تمیز کنید.

وسایل شیشه‌ای: وسایل ترک خورده و شکسته را دور بریزید. ظروف شیشه‌ای باید عاری از دترجنت باشند. ظروف شیشه‌ای استریل را بیش از سه هفته قبل از مصرف نگهداری نکنید.

نمونه‌ها و فرم تقاضای آزمایش: آزمایش را فقط براساس تقاضای کتبی فرد صلاحیت‌دار انجام داده و از پذیرش تقاضای شفاهی برای آزمایش خودداری کنید. فرم مربوط به نمونه باید جدای از ظرف نمونه باشد.

نسبت به پر کردن کامل فرم‌های تقاضای آزمایش تاکید کنید. ضمناً مشخصات و شماره باید به‌صورت دقیق در روی ظروف نمونه ثبت شود. نمونه‌هایی که صاحبان آن‌ها مشخص نیستند، قبول نکرده و آزمایش نکنید.

کیفیت خلط را بررسی کنید. اگر خلط شبیه به بزاق است موضوع را یادداشت کنید. در صورتیکه جواب چنین نمونه‌ای منفی باشد، باید در گزارش ذکر شود که نمونه شبیه به بزاق بوده است.

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷ شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۴۴ از ۵۱
محدوده توزیع: تضمین کیفیت		بخش: سل و جذام استان

تاریخ ورود نمونه را با آزمایشگاه درج کرده و اگر تأخیر در رسیدن نمونه به آزمایشگاه وجود داشت، آن را گزارش کنید. این موضوع در مواردی که جواب منفی می‌گردد، حائز اهمیت است.

معرفها و محلول‌های رنگ آمیزی

تمام ظروف رنگها و معرفها از تاریخ ورود به آزمایشگاه باید وضعیت آنها مشخص باشد.

اگر ماده‌ای نامرغوب بوده و جواب نمی‌دهد باید مشکل ذکر شده و آن را فوراً از دسترس خارج کرد. ذخیره مواد باید به ۶ ماه محدود گردد تا از انقضای مهلت مصرف جلوگیری شود.

هضم و آلوده زدایی

نمونه‌های خلط را براساس ظرفیت لوله‌های سانتریفوژ آلوده زدایی کنید.

یک رکورد ماهانه از درصد نمونه‌های بالینی تهیه کنید. محدوده قابل قبول ۲-۵ درصد است. آلودگی کمتر از ۲٪ نشانه شدید بودن ماده آلوده زدا بوده و به این مفهوم است که باسیل‌های سل هم به مقدار زیادی کشته شده‌اند. اگر نمونه‌ها دیر به آزمایشگاه برسند، میزان آلودگی بیشتر از ۵٪ می‌شود. اگر میزان آلودگی بیش از ۵٪ باشد، باید اطمینان حاصل کنید که میزان هضم خلط (Digestion) در حد قابل قبولی بوده است. هضم ناقص خلط سبب می‌شود که آلوده زدایی به صورت کامل انجام نشود. محتویات لوله سانتریفوژ را به خوبی مخلوط کنید تا از آلوده زدایی سطوح داخلی اطمینان حاصل شود.

آزمایشگاه مرجع بهداشت

محیط‌های کشت

از تخم مرع تازه استفاده کنید. درجه حرارت انعقاد را در محیط‌های حاوی تخم مرغ کنترل کنید. محیط‌هایی که تغییر رنگ داده‌اند یا داخل آنها حباب تشکیل شده است، دور بریزید.

محیط‌های تهیه شده را به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه بگذارید تا از استریل بودن آنها مطمئن شوید.

تمام محیط‌های تهیه شده را در تاریکی و در یخچال بگذارید مدت زمان نگهداری تا ۳ ماه قابل قبول است.

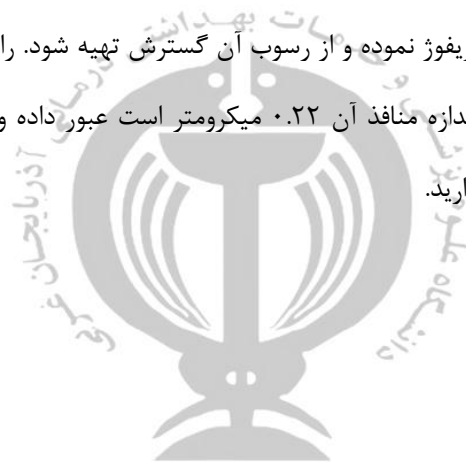
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷ شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۴۵ از ۵۱
محدوده توزیع: تضمین کیفیت	بخش: سل و جذام استان	

روش کشت

از وقوع آلودگیهای به صورت متقاطع (Contamination Cross) جلوگیری کنید. برای این منظور برای هر نمونه از پیپت های مجزا با لوپ جداگانه و از تکنیک های آسپتیک استفاده کنید.

کنترل کیفی آب

آب مقطر و آب شیر را از نظر آلوده بودن به باسیل های اسید فست در هر ماه کنترل کنید. اگر آب کدر یا کثیف به نظر رسید، ۲۵۰-۲۰۰ میلی لیتر را در چند لوله سانتریفوژ نموده و از رسوب آن گسترش تهیه شود. راه دیگری این است که یک لیتر آب را از فیلتر غشایی (Membrane filter) که اندازه منافذ آن ۰.۲۲ میکرومتر است عبور داده و سپس فیلتر را به قطعات کوچک خرد نموده و آن را در سطح محیط (L-J) بگذارید.



معاونت بهداشت

آزمایشگاه مرجع بهداشت

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷ شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۴۶ از ۵۱
محدوده توزیع: تضمین کیفیت	بخش: سل و جذام استان	

فصل دهم

ایمنی در آزمایشگاه

عفونت‌هایی که در حین انجام آزمایش، افراد آزمایشگاهی را گرفتار می‌سازند، از دیرباز شناخته شده‌اند. مطالعات نشان داده شدت خطر ابتلا به سل در کارکنان آزمایشگاه سل، ۵-۳ برابر بیشتر از سایر کارکنان امور دفتری و اجرایی در همان موسسه است. مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بیماری مزمنی را تولید کرده که طول درمان آن ۶-۱۸ ماه است. سایر مایکوباکتریوم‌های بالقوه بیماری‌زا نیز نسبت به مواد ضد میکروبی از جمله داروهای ضد سل مقاومت بسیار بالایی نشان داده‌اند و اقدامات درمانی را با مشکل مواجه ساخته‌اند. راه‌های انتقال سل به کارکنان آزمایشگاه از طریق استنشاق و نیز از طریق آسیب و جراحات، مانند بریدگی و یا سایر راهها است. با توجه به این خطرات، اقدامات مربوط به ایمنی در آزمایشگاه‌های سل از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است

اقدامات مربوط به ایمنی باید از سطح اجرایی (Administrative) شروع شود. اگر موسسه به قدر کافی بزرگ باشد باید فرآیندی در ارتباط با حفاظت و ایمنی وجود داشته و از حمایت مسئولین موسسه برخوردار باشد. مسئولیت کادر اجرایی موسسه در مقابل کارکنان از نظر ایمنی به شرح زیر است:

- ۱) کارکنان بخش سل باید از نظر اصول بهداشتی تحت مراقبت پزشکی قرار داشته باشند. (Monitoring)
- ۲) آموزش‌های صحیح آزمایشگاهی برای کارکنان فراهم شود.
- ۳) کارکنان باید از خطرات آزمایش با مواد عفونی مطلع شوند.
- ۴) آموزش کارکنان برای مقابله با حوادث در حین کار و تأمین امکانات لازم.
- ۵) در اختیار گذاشتن وسایل ایمنی برای کارکنان آزمایشگاه.

فرد شاغل در آزمایشگاه می‌بایست طرز استفاده صحیح از وسایل ایمنی را فرا گرفته باشد و باید مسئولیت سایر وظایف محوله مشخص شده در آزمایشگاه را بپذیرد. بیشتر عفونتها در آزمایشگاه مایکوباکتریولوژی مربوط به ایجاد آئروسول حاوی باسیل اسید فست است که اغلب از نظر دور مانده و ناشناخته باقی می‌ماند. مطالعات نشان داده است که فعالیتهای زیر منجر به ایجاد آئروسول می‌شود:

- ۱) انتقال کشت مایع و یا مایع رویی پس از انجام سانتریفیوژ به ظرف دیگر
- ۲) استفاده از پیپتورهای با حجم ثابت
- ۳) بهم زدن سوسپانسیون میکروبی با پیپت در زمان تلقیح
- ۴) استفاده از دستگاه مخلوط کن با سرعت زیاد (Blender)

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷ شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۴۷ از ۵۱
محدوده توزیع: تضمین کیفیت		بخش: سل و جذام استان

۵) افتادن لوله یا ظروف حاوی محیط کشت بر روی زمین

۶) شکستن لوله‌ها در حین سانتریفوژ

۷) چکیدن سوسپانسیون میکروبی از پمپ بر روی سطح میز کار یا سطوح سخت

اگرچه ریه‌ها راه عمده ابتلا به عفونت سل می‌باشند ولی طرق غیر معمول نیز مانند سر سوزن، اجرام نوک تیز مانند تکه شیشه‌های خرد شده، و یا نفوذ میکرووب از طریق خراشها یا برش‌های جلدی نیز می‌توانند سبب ابتلا شوند. تمام سطوح و وسایل کار در اتاق کشت (Isolation room) از جمله هود ایمنی باید بالقوه عفونت‌زا تلقی گردیده و باید به‌طور مرتب با وسیله مناسب تمیز شوند. برای این منظور می‌توان از یک ماده ضدعفونی کننده، اتوکلاو و یا اشعه UV بسته به نوع وسیله استفاده کرد.

راه‌های جلوگیری از ایجاد آئروسول

در مورد استفاده از هود ایمنی برای جلوگیری از ایجاد آئروسول و محل نصب آن در آزمایشگاه قبلاً صحبت شده است. باید مسیر جریان هوا در آزمایشگاه به گونه‌ای باشد که سیستم تهویه به‌صورت یک طرفه عمل کرده؛ به‌طوری که هوا در چرخش (Circulation) نبوده و از منطقه تمیز به طرف قسمت کمتر تمیز در حرکت باشد. به این ترتیب هوا از قسمت راهرو یا کریدور آزمایشگاه به طرف محوطه عمومی آن حرکت کرده و سپس از این ناحیه به طرف اتاق کشت رفته و در مسیر خود به هود ایمنی وارد شده و به اتاق باز نمی‌گردد.

معاونت بهداشت

وسایل

نگهداری و تعمیرات عادی وسایل آزمایشگاه سل باید با نظارت دقیق انجام شود. بازرسی وسایل اتاق کشت، سرویس نمودن و تمیز کردن آن‌ها باید با نظارت فرد باتجربه‌ای انجام شود. اگر در نظر است که وسیله‌ای برای تعمیر یا نگهداری از اتاق کشت به خارج از آزمایشگاه منتقل شود باید سطوح آن را با ماده‌ای مناسب ضدعفونی کرد. مستندات مربوطه هم تکمیل و نگهداری شود.

لامپ UV

لامپ‌های UV اشعه‌ای با طول موج ۲۵۴ نانومتر از خود ساطع می‌کنند که برای آلود زدایی سطوح (پس از اتمام کار در درون هود ایمنی) و یا وجود میکرو ارگانیسم‌های موجود در هوا مؤثر است. پس از خاتمه کار، لامپ UV داخل هود را حداقل به مدت یک ساعت روشن بگذارید. قدرت نفوذ لامپ UV ناچیز بوده و اگر سطح آن به وسیله موادی همچون غبار و مواد روغنی پوشیده شده باشد اثر میکرووب کشی آن از بین می‌رود. حداقل هر ماه یک بار باید سطح لامپ به وسیله پارچه آغشته به الکل تمیز شود.

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷ شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۴۸ از ۵۱
محدوده توزیع: تضمین کیفیت	بخش: سل و جذام استان	

مواد ضد عفونی کننده

قدرت کشندگی یک ماده ضد عفونی کننده به عواملی همچون جمعیت ارگانیسم مورد هدف، غلظت ماده مورد استفاده، مدت زمان تماس با جرم آلوده و حضور مواد آلی در آن بستگی دارد. برای از بین بردن باسیل سل مواد ضد عفونی کننده مناسب شامل ترکیبات حاوی فنل، هیپو کلرید، الکلها، فرمالدئید، یدوفور، و یا گلو تارالدئید می باشند. این ضد عفونی کننده ها را بر اساس نوع موادی که باید آلوده زدایی شوند، انتخاب می کنند. ترکیباتی که بر علیه سایر ارگانیسم ها مؤثر می باشند، ممکن است تأثیری بر باسیل سل نداشته باشند. بطور مثال ترکیبات آمونیم چهار تایی با غلظت های توصیه شده بر روی باسیل سل، بی تأثیر می باشند.

محلول های ضد عفونی کننده را باید همه روزه به صورت تازه تهیه کرد و پس از تهیه محلول رقیق شده نمی توان آن را ذخیره کرد، زیرا غیر فعال می شوند. ضد عفونی کننده های رایج در آزمایشگاه سل ذیلاً به اختصار ذکر می شوند:

فنل

فنل را باید با غلظت ۲٪ تا ۵٪ به کار برده و زمان تماس با اجرام آلوده را بسته به نوع و حجم اجرام آلوده باید ۱۵ تا ۳۰ دقیقه در نظر گرفت. کاغذ کار آغشته به فنل برای پوشاندن سطوح کاری مفید است. این مسئله از پخش آئروسول جلوگیری می کند.

هیپو کلریت

هیپو کلریت را باید با غلظت ۱٪ تا ۵٪ به مدت ۱۵ تا ۳۰ دقیقه به کاربرد؛ زمان و غلظت ماده بستگی به حجم اجرام آلوده دارد. محلول هیپو کلریت ۵٪ برای ضد عفونی کردن اجرام آغشته به ترکیبات آلی مفید است، زیرا از قدرت هضم کنندگی خوبی برخوردار است.

معاونت بهداشت

آزمایشگاه مرجع بهداشت

گلو تارالدئید

گلو تارالدئید نیازی به رقیق کردن ندارد ولی به فعال کننده نیاز دارد و معمولاً شرکت سازنده، آن را همراه محلول عرضه می نماید. گلو تارالدئید به صورت محلول ۲٪ عرضه می شود؛ در حالی که فعال کننده آن یک ترکیب بی کربناتی است. گلو تارالدئید برای ضد عفونی کردن سطوح میز کار و وسایل شیشه ای مناسب است. محلول فعال شده را باید ظرف دو هفته مصرف کرده و در صورت کدورت آن را حذف کرد

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷ شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۴۹ از ۵۱
محدوده توزیع: تضمین کیفیت	بخش: سل و جذام استان	

الکل‌ها

معمولاً اتانول ۷۰٪ یا پراپانول را در مخلوط با شن (برای پاک کردن لوپ) و یا آلوده زدایی سطوح کار مورد استفاده قرار می‌دهند. ضمناً برای ایجاد تعادل لوله در سانتریفوژ نیز از یک لوله حاوی اتانول استفاده می‌شود. وقتی که دستها آلوده می‌شوند، ابتدا آنها را با الکل ۷۰٪ می‌شویند و سپس با صابون تمیز می‌کنند؛ که روش بسیار موثری است.

لباس‌های حفاظت کننده

چون هود ایمنی صددرصد مؤثر نبوده و نقایص فیزیکی و مکانیکی در آن ممکن است، روی دهد، پوشش‌های حفاظت کننده به خصوص ماسک به حفاظت بیشتر پرسنل کمک می‌کند. در صورت استفاده از ماسک این پوشش باید قادر به فیلتر نمودن بیش از ۹۰٪ اجرام با قطر ۰.۵ تا ۱ میکرومتر باشد. هم چنین گانهای جراحی بیمارستان برای آزمایشگاه سل مفید است و تمام پوشش‌های محافظت کننده مانند گان را باید قبل از شستشو اتو کلاو کرد.

نظارت بهداشتی پرسنل آزمایشگاه سل

پرسنل آزمایشگاه باید به دقت انتخاب شوند. آنها باید از نظر فیزیک و ذهنی سلام باشند. کلیه پرسنل جدید باید از نظر PPD و رادیوگرافی سینه مورد آزمایش قرار گرفته و با در نظر گرفته مسائل ایمنی تحت آموزش قرار بگیرند.

حوادث

نکات مربوط به ایمنی در آزمایشگاه در اثر تجاری است که در حوادث مختلف به دست آمده است. حوادث حین کار اجتناب ناپذیرند ولی برای مقابله آن باید از میزان جدی بودن و چگونگی خنثی سازی آنها مطلع بود. نحوه مقابله با این حوادث بستگی به کیفیت جریان هوا در آزمایشگاه دارد. در سیستم عبور یک طرفه، هوای تازه از محل غیر آلوده به سمت هود جریان یافته و در نهایت از طریق فیلتر هپا تصفیه می‌شود. حوادث که در اینگونه آزمایشگاه‌های اتفاق می‌افتد به دو دسته تقسیم می‌شوند:

(۲) ایجاد انبوه ذرات آئروسول

(۱) ایجاد آئروسول کم

از حوادثی که در طی آن آئروسول به میزان کم تولید می‌شود می‌توان به افتادن یک لوله حاوی کشت محیط جامد، افتادن یک پلیت حاوی کشت و یا نشستن محتویات نمونه خلط اشاره کرد. در چنین مواردی محیط جامد یا موکوس غلیظ نمونه خلط در ایجاد ذرات آئروسول محدودیت ایجاد می‌کنند.

در اینگونه موارد باید اقدامات زیر را به ترتیب رعایت کرد:

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷ شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۵۰ از ۵۱
محدوده توزیع: تضمین کیفیت	بخش: سل و جذام استان	

۱. فوراً سطح منطقه آلوده شده را بپوشانید تا از ایجاد آئروسول بیشتر جلوگیری شود. برای این کار می‌توان از حوله کاغذی و یا حتی از روپوش آزمایشگاه استفاده کرد.
۲. منطقه پوشانده شده را با یک ماده ضدعفونی کننده مناسب خیس و مرطوب کنید.
۳. اتاق را به مدت ۲ ساعت ترک کنید تا جریان هوا فرصت کافی برای تخلیه بخش عمده آئروسول را داشته باشد.
۴. لباس حفاظت کننده را پوشیده، به اتاق وارد شده و منطقه آلوده را به کلی پاک کنید.
۵. آنچه را که پس از تمیز کردن منطقه آلوده برداشته می‌شود (مانند بقایای لوله شکسته، پلیت و یا پارچه) در ظرف مناسب گذارده و آن را اتوکلاو کنید
۶. سطح مربوطه (مانند کف آزمایشگاه) را با ماده مناسب ضدعفونی کننده، تمیز کنید.

حادثه با کشت مایع

در صورت شکستن یک لوله یا یک ظرف حاوی کشت مایع مقادیر بسیار زیادی آئروسول ایجاد می‌شود. در این حالت ممکن است تا 10^8 باسیل در هر میلی متر مکعب در محیط آزاد شوند. در صورت وقوع چنین حادثه‌ای باید اقدامات زیر انجام شود:

- بلافاصله اتاق را ترک کنید، زیرا خطر آئروسول‌های ایجاد شده به مراتب بیشتر از آن است که فقط سطح محیط را بپوشاند
- هود را روشن گذارده و برای حداقل ۴ ساعت به اتاق آلوده باز نگردید. این مسئله به دقیق شدن مقدار Droplet nuclei در اتاق کمک می‌کند. همچنین عبور هوای آلوده از مسیر فیلتر هود مانع از سرایت آلودگی به مناطق خارج از آزمایشگاه می‌شود.
- در صورت امکان، پس از سپری شدن ۴ ساعت، اتاق حادثه دیده و یا اتاق‌ها را با گاز فرمالدئید ضدعفونی کنید. این کار را نمی‌توان در مکان‌هایی که امکان نشت گاز فرمالین وجود دارد انجام داد.

طرز ضدعفونی کردن آزمایشگاه با فرمالدئید

چون فرمالدئید ۳۶ تا ۴۰٪ در اغلب آزمایشگاه‌ها در دسترس است روش زیر ذکر می‌شود:

۱. تمام منافذ خروجی اتاق را مسدود کنید. این کار را می‌توان با چسباندن کیسه‌های زباله بر روی شیارهای خروجی هوا انجام داد. همین طور اطراف چهار چوب درها و سایر منافذ را که امکان نشت فرمالین وجود دارد، مسدود کنید. رطوبت نسبی اتاق را باید تا ۷۰٪ بالا برد تا از میزان تأثیر فرمالدئید اطمینان حاصل کرد
۲. مقدار فرمالین موردنیاز آزمایشگاه را محاسبه کرده، روی اجاق برقی بگذارید تا بجوشد. به ازای هر فوت مکعب فضای اتاق یک میلی‌لیتر فرمالین لازم است (هر مترمکعب برابر است با ۳۵.۳ فوت مکعب). مثال یک اتاق با فضای ۱۰ x ۱۲ x ۱۰ فوت که حجم

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷ شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۵۱ از ۵۱
محدوده توزیع: تضمین کیفیت	بخش: سل و جذام استان	

آن ۱۲۰۰ فوت مکعب می‌گردد به ۱۲۰۰ میلی‌لیتر فرمالین نیاز دارد. برای ایجاد رطوبت ۷۰٪ در این اتاق باید ۴۳۹ میلی‌لیتر آب نیز هم‌زمان با فرمالین تبخیر شود (۱۸.۴ میلی‌لیتر آب به ازای هر مترمکعب فضای اتاق)

احتیاط: هرگز از مقادیر بیش از حد مجاز استفاده نکنید، زیرا غلظت بیش از ۸٪ خطر انفجار دارد. مقادیر ذکر شده در این مبحث از نظر ایمنی در حدود قابل قبول است

۳. پس از تبخیر فرمالدئید باید ۴ ساعت (ترجیحاً یک شب) صبر کرد تا فرمالین متصاعد شده در فضا باقی بماند. پس از آن ماسک زده، وارد اتاق شده و جلوی منافذ خروجی هوا را باز کنید. جریان هوا را برقرار کرده تا تمامی گاز فرمالدئید از محوطه خارج شود.

اگر بقایای پودر سفید رنگی در روی سطح باقی مانده بود با هیدروکسید آمونیوم ۱۰٪ آن را تمیز کنید.

تذکر: گاز فرمالین قادر است داخل لوله‌های محیط کشت شود. بنابراین؛ در محلی که انکوباتورهای محیط کشت وجود دارد بایستی دقت شود، کشت‌ها از تأثیر فرمالین محافظت شوند.

نکاتی که در حین کار باید رعایت شود

- ۱) علاوه بر استفاده از گانهای جراحی، همیشه از دستکش‌های محافظ استفاده کنید. اگر در حین کار دستکش‌ها سوراخ و یا آلوده شدند آن‌ها را با احتیاط از دست درآورده، سپس دست‌ها را بلافاصله شسته و از یک جفت دستکش جدید استفاده کنید
- ۲) هرگز در خارج از هود ایمنی کشت و یا کلیه آزمایشات مربوط به باسیل سل را انجام ندهید. از اقداماتی که منجر به ایجاد آئروسول می‌شوند (حتی در داخل هود) باید اکیداً خودداری کنید.
- ۳) بلافاصله پس از پایان کار و هم‌چنین قبل از ترک آزمایشگاه حتماً دست‌ها را بشویید.
- ۴) برای کشیدن مایعات از پیپت‌های مکانیکی استفاده کنید و هرگز از دهان برای این منظور استفاده نشود.
- ۵) خوردن، آشامیدن، سیگار کشیدن در آزمایشگاه ممنوع است.

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷ شماره سند: MNG/GUD/94/1402/01	 معاونت بهداشت آزمایشگاه مرجع بهداشت	مبانی تشخیص آزمایشگاهی سل صفحه: ۵۲ از ۵۱
محدوده توزیع: تضمین کیفیت	بخش: سل و جذام استان	

- ۶) آزمایشگاه باید همیشه تمیز نگهداری شده و سطوح کار را با ماده ضدعفونی کننده هر روز پاک کنید.
- ۷) از استفاده وسایل همچون سرنگ، سوزن، اسکالپل، و سایر وسایل مشابه حتی المقدور باید پرهیز کرد. در صورت ضروری بودن استفاده این وسایل، باید با احتیاط از آنها استفاده کرد تا منجر به حادثه نشود.
- ۸) اجسام نوک تیز و برنده مثل سوزن را باید درون ظرف مخصوص درب دار (با ذکر صفت لازم بر روی ظرف) انداخت تا منجر به آسیب در هنگام جابه جایی نشود.
- ۹) هنگام کار در آزمایشگاه به ویژه در اتاق کشت باید درها بسته باشند تا سیستم عبوردهی هوا دچار اختلال نشود.
- ۱۰) همیشه برای جمع آوری وسایل شکسته از پنس استفاده کنید و هرگز از دستان خود برای این منظور استفاده نکنید.
- ۱۱) قبل از دور ریختن کشت ها و سایر مواد زاید آلوده، آنها را اتوکلاو کنید.



معاونت بهداشت

آزمایشگاه مرجع بهداشت