فهرست مطالب

عنوان

مقدمه

فصل اول

کشت د رآزمایشگاههای حد واسط

مقدمه

- الویت های ضرورت انجام کشت

فصل دوم

امکانات لازم برای کشت در آزمایشگاههای تشخیص سل استان

۱. هود ایمنی
   محل قرارگرفتن هود
   نکات ایمنی مربوط به هود
۲. سانتریفوژ
   نکات ایمنی مربوط به سانتریفوژ
۳. گرمخانه یا انکوباتور ۳۵–۳۷ درجه سانتی گراد
۴. دستگاه منعقد کننده (کواگولاتور)
۵. اتوکلاو
۶. شعله برنر
۷. سایروسایل

فصل سوم

جمع آوری نمونه های مختلف

خلط

مایعات استریل بدن

بافتهای استریل بدن

جلوگیری از ایجاد لخته

نمونه های مشکوک به آلودگی

ادرار

شستشوی معده

سواپ حلق

بافت

چرک

فصل چهارم

نگهداری و انتقال نمونه ها

فصل پنجم

دریافت نمونه در آزمایشگاههای حد واسط

باز کردن نمونه در داخل هود

طرز استفاده از اتوکلاو

فصل ششم

هضم و آلوده زدایی نمونه ها

استفاده از هیدروکسید سدیم برای هضم و آلودگی زدایی

تهیه مواد

طرز تهیه محلول اسید کلریدریک

اسید اکسالیک و اسید سولفوریک

آلوده زدایی و کشت خلط

فصل هفتم

محیطهای کشت سل

الف) مزایا و معایب محیطهای تخم مرغدار

ب) معایب محیطهای تخم مرغ دار

مزایای محیطهای آگاردار

معایب محیطهای آگاردار

متغیرهایی که در کیفیت محیط به هنگام تهیه آن تاثیر دارند

محیط لوین اشتاین جنسن یا (L J)

الف) محلو ل نمکهای معدنی

ب) محلول مالشیت گرین ۲٪

ج) هموژنیزه کامل تخم مرغ

د) تهیه محیط کامل

انعقاد محیط

فصل هشتم

کشت و شناسایی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

نگهداری کشت در گرمخانه

برنامه زمان بندی برای مطالعه کشت

بررسی محیطهای کشت

فصل نهم

کنترل کیفی محیط کشت مایکوباکتریوم ها

کنترل کیفی در بخش محیط سازی سل

کنترل کیفی ، اطمینان از کیفیت ، و تست کنترل کیفی خارجی

بهبود کیفیت یا Quality improvement

کنترل کیفی را در موارد زیر به کار می برند

نظم آزمایشگاه و اداره آن

وسایل آزمایشگاهی

کنترل وسایل

معرف ها و محلول های رنگ آمیزی

هضم و آلوده زدایی

محیطهای کشت

روش کشت

کنترل کیفی آب

فصل دهم

ایمنی در آزمایشگاه

راههای جلوگیری از ایجاد آئروسل

وسایل

لامپ UV

مواد ضدعفونی کننده

فنل

هیپوکلریت سدیم

گلوتارالدئید

الکلها

لباسهای حفاظت کننده

نظارت بهداشتی پرسنل آزمایشگاه سل

حوادث

حادثه با کشت مایع

طرز ضدعفونی کردن آزمایشگاه با فرمالدئید

احتیاط

تذکر

نکاتی که در حین کار باید رعایت شوند

مقدمه

سل یکی از بیماریها عفونی دیرینه انسان است و با وجود روشهای نوین مبارزه با آن دارای انتشار گسترده ای است . از سالیان دور سل یکی از علل مهم مرگ و میر در کشورهای درحال توسعه بوده و اکنون این خطر متوجه کشورهای توسعه یافته جهان نیز شده است . آنچه که مشکلات و عوارض بیماری ناشی از سل را افزون می کند ، روشهای درمان نادرست ، ایجاد باسیل های مقاوم به داروهای موجود و نقش پاندمی عفونت HIV به عنوان عامل مهمی در گسترش سل است . به همین دلیل در سال ۱۳۹۳ سازمان جهانی بهداشت بیماری سل را به عنوان یک فوریت جهانی اعلام نمود.

سل شایعترین بیماری با عامل میکروبی کشنده بالغین در تمام جهان می باشد 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 بر آورد سازمان جهانی بهداشت بیش از تعداد ۳۰۰ میلیون نفر در ۱۰ سال آینده توسط میکروب سل آلوده شده که از این تعداد ۹۰ میلیون نفر مبتلا به بیماری سل خواهند گردید.

کشور ما در منطقه ای قرار دارد که همسایگان آن کشورهایی دارای درصد قابل توجه بیمار مبتلا به سل هستند ، که این امر می تواند مشکلات و عوارض بیماری را افزایش دهد . با توجه به اینکه موثرترین روش پیشگیری از بیماری سل ، تشخیص درست و درمان موثر بیماران می باشد ، بنابراین اهمیت درمان بیماران ریوی خلط مثبت ، مخصوصا تشخیص صحیح آنها به وضوح مشخص می گردد.

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

امید است که با تهیه و توزع دو کتاب اشاره شده و دوره های 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 موثر در جهت مبارزه با بیماری سل برداشته شود.

دکتر علی اکبر سیاری

معاون بهداشتی ، وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی

فصل اول

کشت در آزمایشگاههای حد واسط

پیش گفتار

بیماری سل در حال حاضر یکی از بزرگترین مشکلات بهداشتی جهان است . به طور تخمینی یک سوم جمعیت جهان به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس آلوده اند و سالانه حدود ۹ میلیون مورد جدید بیماری رخ می دهد . همه گیری بیماری ایدز در جمعیتهایی که قبلا به باسیل سل آلوده شده اند ، نیز سیر پیشرفت بیماری سل را شدت می بخشد . به طور کلی نزدیک به سه میلیون نفر به علت ابتلا به این بیماری در سراسر جهان از بین می روند (آمار سال ۱۹۹۵) ، و این تعداد مرگ و میر بیشتر از هر بیماری عفونی دیگر از قبیل ایدز و مالاریا است . بیماری از شخص مبتلا به سل ریوی فعال از طریق آئروسل حاوی قطرات عفونی (که ضمن سرفه و عطسه منتشر می شوند) به اشخاص دیگر انتقال می یابد.

سل ریوی معمولا در قله ریه ها بوجود می آید . در ریه این دسته از بیماران حفره هایی حاوی تعداد بسیاری زیادی باسیل ایجاد می شود . این باسیل ها را در مشاهده میکروسکپی لام مستقیم می توان بوضوح دید. نشانه های بالینی سل ریوی شامل کاهش وزن ، عرق شبانه ، درد سینه و سرفه های مزمن در ۳ هفته یا بیشتر می باشند . با وجود این نشانه ها نمی توان سایر علل احتمالی ضایعات ریوی و غیر ریوی را رد کرد . تشخیص قطعی سل براساس کشف عامل عفون در نمونه خلط یا ترشحات بیمار با مشاهده میکروسکپی و یا انجام کشت در آزمایشگاه امکان پذیر است . در واقع ، اولین و مهمترین قدم برای تشخیص سل ، آزمایش لام مستقیم خلط است . با این روش می توان خیلی سریع آن دسته از بیمارانی را که ریه آنها حاوی تعداد زیادی باسیل است و معمولا عامل انتقال و عفونت به حساب می آیند شناسایی کرد.

برای مشاهده باسیل اسید فست در لام ، باید در یک میلی لیتر 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 می شود که این آزمایش روی تمام موارد مشکوک به سل انجام گیرد . با این روش ، فقط موارد سل ریوی با خلط مثبت را می توان شناسایی کرد و انجام کشت میزان کشف موارد ابتلا به سل را معمولا ۳۰ تا ۵۰٪ افزایش می دهد (قبل ازآنکه به حالت عفونی در آیند). با توجه به روش هضم و آلوده زدایی و نوع محیط کشت مورد استفاده وجود حتی ۱۰ عدد باسیل زنده در نمونه مورد آزمایش می تواند 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 نمونه های بالینی به مراتب گرانتر از آزمایش مستقیم بوده و به وسایل ، مواد و افراد کاملا آموزش دیده و با تجربه در این زمینه نیاز دارد؛ ولی تشخیص قطعی بیماری سل بر آن مبنا استوار است . در مقایسه با سایر باکتری ها که عموما ظرف چند دقیق تقسیم می شوند ، مایکو باکتریوم توبرکلوزیس خیلی آهسته تقسیم می شود (۲۴–۱۸ ساعت) این ویژگی مانعی برای جداسازی باکتری های کند رشد است . از ویژگی های مهمتر مایکو باکتریوم توبرکلوزیس ضرورت وجود محیطهای اختصاصی جهت رشد این باکتری است .

سل، آزمایشات دیگری هم صورت می گیرد یا نه ممکن است نوع تقسیم بندی فضای آزمایشگاه در مراکز مختلف متفاوت باشد . در عین حال مهمترین عامل در طراحی و گسترش آزمایشگاه تشخیص سل استان ، تعداد نمونه های ارجاعی از آزمایشگاههای شهرستانها برای انجام بررسیهای بیشتر از نظر کشت بوده که با افزایش جمعیت استان و فراوانی شیوع سل ، به کارگیری پرسنل ، فشا و نیروی انسانی در ارتباط است .

در آزمایشگاه مایکو باکتریولوژی 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 می شود . در این قسمت اطلاعات بیماران ، گزارش آزمایشها ، مواد شیمیایی و معرف های مورد استفاده نگهداری می شود.
(ورود کارکنان به آزمایشگاه از طریق آن دفتر صورت می گیرد).

۲- قسمت دریافت نمونه (Reception) که مستقل از دفتر آزمایشگاه است و می تواند با آزمایشگاه مرتبط باشد بنحوی 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 می دهد.

کنترل نمونه از نظر مشخصات اهمیت خاصی دارد و از خطاهای بعدی جلوگیری می کند ؛ بنابراین پس از انجام کنترل ، نمونه برای آزمایش به واحد اصلی فرستاده می شود .

۳- محوطه اصلی آزمایشگاه ، که نمونه های بیماران پس از دریافت و کنترل به این محل منتقل می شوند . دراین قسمت تمام تجهیزات لازم برای تهیه گسترده ، آلوده زدایی و هضم نمونه بالینی ، کشت و گرمخانه ، همچنین وسایل مربوطه از جمله میزکار ، یخچال ، دستشویی با شیر مخصوص (که با آرنج کار می کند) و قفسه های مخصوص نگهداری و .... قرار دارد.

از آنجایی که کار با مواد عفونی ، در اتاق کشت انجام می شود ؛ باید از نظر فیزیکی از سایر قسمتها مجزا باشد . قسمت جداسازی باکتری (Isolation) در منتهی الیه آزمایشگاه که هود در آنجا تعبیه شده است قرار دارد.

در واقع هدف اصلی از این تقسیم بندی 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 می کنند نیز می شود . اتاق کشت نباید انباشته از وسایل و دستگاههای گوناگون باشدو نکته مهم این است که در طول ساعت کاری ، هوا به طور مداوم از طریق هودهای بیولوژیک و یا بوسیله هواکشهای ساده از محیط داخل به بیرون آزمایشگاه فرستاده شود. انباشتن وسایل اضافی در اتاق کشت ، موجب اختلال جریان هوا در آزمایشگاه و هودها می گردد. تصفیه هوا و فشار داخل اتاق برمبنای تعدا کل نمونه های دریافتی به نسبت درصد نمونه های مثبت شده در عرض سال باید محاسبه شود . بکارگیری روش ها و تکنیکهای باکتریولوژی بر اساس استانداردهای تعیین شده ، ریسک بالای تولید ذرات آئروسل را به حداقل می رساند .

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 منتطقه 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 (شبیه به آن که توسط هواساز تولید می شود) 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 تحلیه شود .

۴- اتاقی نیز در آزمایشگاه برای مشاهده میکروسکپی لامهای تهیه شده از نمونه های و کلینی های رشد یافته بیماران در نظر گرفته می شود (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 می شود.

۵- اتاق شستشو محلی است که در آنجا میزکار ، دستشویی بزرگ با دو لگن استیل و اتوکلاو قرار دارد و محل نگهداری وسایل مصرف شده اتو کلاو و شستشو شده و استریلیزاسیون ظروف می باشد.

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

به منظورافزایش ایمنی کار ، قبل از اینکه نمونه ها وارد مرحله کشت شوند ، باید وسایل و مواد مورد نیاز آزمایش آماده شده و با نظم و ترتیب در داخل هود قرار بگیرند.

ب) وسایل مورد نیاز

جدول ضمیمه شماره ۱ لیست وسایل و مواد مورد نیاز برای آزمایشگاه کشت را که از هیدروکسید سدیم برای آلوده زدایی و از محیط لوین اشتاین برای کشت استفاده می شود ، نشان می دهد. قبل از خرید وسایل جدید و مواد مورد نیاز با افراد با تجربه در آزمایشگاههای مرجع مشورت کنید و نباید به آگهی های تجارتی ، کاتالوگها و ادعای نمایندگان فروش شرکتها توجه داشت.

۱- هود ایمنی

مهمترین وسیله مورد نیاز در آزمایشگاه سل حد واسط که باید کارش را صحیح انجام داده و به خوبی نگهداری شود هود ایمنی است (Biological Safety Cabinet) ای هودها برای حفاظت کارکنان ، محیط و محصول مورد آزمایش طراحی شده اند . در هود ، ذرات هوا در موقع ورود و خروج از داخل فیلتر های هپا (HEPA Filter) عبور می کنند . فیلترهای هپا ذراتی را که برابر یا بزرگتر از ۰/۳ میکرون باشند (تمام باکتری ها ، اسپورها و ویروس ها) با دقت و کارایی ۹۹-۰/۹۶ در خود نگهداری و از عبور آنها جلوگیری نموده و در نتیجه هوای تصفیه شده را به داخل سیستم وارد می کنند.

خطرات ناشی از عفونتهای میکروبی را در ۴ دسته طبقه بندی می کنند. مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جزء دسته سوم این میکروب ها طبقه بندی می شود . این گروه شامل میکروارگا نیسم هایی است که از طریق استنشاق هوا ایجاد عفونت می کنند . بنابراین باید برای کاهش تولید و پخش اجرام آئروسل در هوای آزمایشگاه اقدامات احتیاطی به عمل آید ، ت مانع از استنشاق این اجرام توسط کارکنان آزمایشگاه شود . ضمنا از ایجاد حوادثی که منجر به ایجاد آلودگی از طریق بلع (Ingestion) و تلقیح (انتقال از طریق اجسام نوک تیز مانند سوزن سرنگ) می شود 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 نمی گردد. هوای فیلتر شده اتاق از تمام سطوح کار به داخل هود کشیده می شود و تا زمانی که هوا با فشار ۲۲/۸ متر در ثانیه از مدخل جلوی هود به داخل آن کشیده شود ، حفاظت کارکنان تامین می گردد. هود های کلاس II قادر به محافظت از پرسنل و محیط کار بوده و نمونه مورد آزمایش را از آلودگی حفظ می کنند. هوا از قسمت جلوی هود (Front Grill) به داخل کشیده می شود ، که در نتیجه شخصی که جلوی هود ایستاده است در امان است ، به علوه هوا از فیلتر هپا عبور کرده و داخل هود در چرخش است (Laminar Flow). بنابراین خطر انتقال آلودگی از نمونه ای به نمونه دیگر (Cross Contamination) در حین کار در داخل هود به حداقل خود می رسد . چون هوا در مسیر خود از فیلتر هپا عبور می کند ، تصفیه شده و ۳۰٪ از هوای تصفیه شده و عاری از آلودگی توسط هود کلاس II به داخل آزمایشگاه و همین مقدار توسط هود کلاس I به خارج از آزمایشگاه منتقل می گردد.

محل قرار دادن هود

مکان مناسب برای هود ، محلی است که از ورودی آزمایشگاه به دور باشد (مثلا قسمت انتهای آزمایشگاه که رفت و آمد کم است). قدم زدن و راه رفتن افراد در نزدیکی هود می تواند جریان هوا را مختل سازد . پنجره های باز یا وسایل آزمایشگاه مانند سانتریفوژ که سبب اختلال چرخش هوا می شوند نباید در نزدیکی هود باشند.

نکات ایمنی مربوط به هود

قبل ار خارج کردن وسایل از زیر هود ، سطوح خارج آنها باید با فنل ۵٪ ضد عفونی شوند و در پایان روز کاری باید سطح داخلی پنجره هود و سطوح کار در داخل هود با یک ماده ضد عفونی کننده (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 کرده ایم جمع کرده و آن را در داخل کیسه قابل اتوکلاو می گذاریم . اگر نشت و تراوش در سطح اجسام داخل هود باشد ، به وسیله یک حوله کاغذی آغشته به فنل ۵٪ آن را پاک می کنیم . اگر نشت زیاد باشد به طوری که به دریجه های هوا در قسمت جلو و عقب نفوذ کرده باشد . باید آلوده زدایی را به صورت گسترده تری انجام داد. بدین منظور، ابتدا سطوح کار را ضد عفونی کرده و اجسام را از داخل هود بر می داریم ؛ سپس شیر خروجی کف هود را که مربوط به شستشو و تمیز کردن است ، می بندیم و به مقدار کافی از ماده ضد عفونی کننده (فنل ۵٪) در سطح هود می ریزیم تا از طریق مجاری هوا نفوذ کرده و به قسمت جمع کننده مایعات در داخل هود هدایت شود . مدت ۳۰ دقیقه صبر کرده تا عمل ضد عفونی کامل شود ، سپس یک شیلنگ به شیر مخصوص جمع آوری مایعات داخل هود وصل کرده و مایعات را به داخل یک ظرف خاوی مواد ضد عفونی کننده هدایت می کنیم . ضمنا انتهای شیلنگ باید در داخل ظرف ضد عفونی کننده باشد تا مواد جمع آوری شده ایجاد آئروسل نکند. پس از آلوده زدایی ، قسمت مربوط به جمع آوری را با آب شستشو داده و شیلنگ مربوطه را جمع می کنیم .

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 مدت زمان استفاده از فیلترها دارد و توسط فرد فنی و با تجربه صورت می گیرد[1].

۲- 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 (Great Mass) رو تورهای از نوع با زاویه ثابت (Fixed Angle) برای سانتریفوژ کردن لوله های با وزن سبک مناسب بوده و از لرزش (Vibration) و شکستن احتمالی لوله ها جلوگیری می کند . نمونه ها نباید با دور بیشتر از g x ۳۰۰۰ سانتریفوژ شوند. ضمنا اگر در حین سانتریفوژ دما بالا برود از قدرت زیست (Viability) باکتری کاسته می شود . سانتریفوژ باید مجهز به سیستم قفل اتوماتیک در حین کار باشد ، تا اجازه باز شدن درب آن را در حال چرخش رورتو ندهد.

در بسیاری از گزارش ها و دستورالعمل ها برای آماده کردن نمونه ، سرعت سانتریفوژ با (Revolution Per Minute) rpm بیان می شود. در حالیکه rpm معیاری برای سرعت هد (Head) سانتریفوژ می باشد و قابلیت رسوب دهی (Sedimenting Efficiency) یا قدرت نسبی سانتریفوژ (Relative Centrifuge Force = RCF) را بیان نمی کند . مقدار (g) را ، بر مبنای میزان چرخش (spin) یا فاصله از مرکز چرخش تا دورترین نقطه (انتهای جا لوله ای) مشخص می کنند ، نیروی نسبی سانتریفوژ (Relative Centrifuge Force = RCF) با افزایش تعداد چرخش (Spin) یا فاصله از مرکز بالا می رود و یا علامت g x ۳۰۰۰ مشخص می شود. مقدار RCF از فرمول زیر محاسبه می شود :

$$RCF = ۱/۱۲ \; R\,max\,(rpm/1000)2$$

[1] لازم است مشخصات فني و عمر مفيد هپا فيلتر به صورت كتبي توسط سازنده هود به مراكز كنترل كيفي آزمايشگاههاي كشور اعلام شود.

Rmax عبارتست از فاصله دورترین نقطه چرخش از مرکز چرخش سانتریفوژ ، اگر میزان RCF به اندازه کافی بالا نباشد ، بسیاری از مایکوباکتری ها در هنگام سانتریفوژ شدن در داخل رسوب نکرده و همراه با لایه رویی (Supernatant)دور ریخته می شوند . رسوب مایکو باکتری ها در سدیمان باید ۹۵٪ باشد تا بتوان باکتری را به خوبی در کشت جدا کرد . این مستلزم داشتن ۳۰۰۰ x g در سانتریفوژ است . بسیاری از سانتریفوژها موجود در آزمایشگاههای قدیمی سل با قدرت ۱۵۰۰–۲۰۰۰RCF کار می کنند . اگر از این سانتریفوژها به مدت ۱۵ دقیقه استفاده شود میزان رسوب دهی ۸۴–۷۵٪ 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 سانتی گراد افزایش یابد . لوله هایی که درون روتورهای با زاویه ملایم می چرخند حتی پس از چند بار استفاده ، درجه حرارت آنها خیلی بالا نمی رود ، در حالیکه لوله هایی که در روتورهای با حالت افقی در چرخشند ، درجه حرارت نمونه ممکن است از ۴۰ درجه سانتی گراد 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 ارگانیسم هایی که کشته می شوند به ترتیب از ۱۳ به ۲۲ و در نهایت به ۳۰ درصد افزایش می یابد .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 X g ۱۴۰۰۰ سانتریفوژ کنند ، ۷۳٪ باسیل های زنده تلف و در کشت از بین می روند.

نکات ایمنی مربوط به سانتریفوژ

لوله های شیشه ای تحت فشار سانتریفوژ می شکنند . 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 بهصورت آئروسل در آید . بنابراین ، لوله های سانتریفوژ درب پیچ دار (Screw Top) ار جنس پلی اتیلن 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. درصورت عدم رعایت تعادل ، جا لوله ای های سانتریفوژ آسیب جدی می بینند . توصیه شده است در مواقعی که لوله ای را به عووان تعادل در روتور قرار می دهند محتوی الکل ۷۰٪ باشد تا در صورت نست مواد از لوله نمونه ، الکل نیز با خاصیت ضد عفونی کنند گی نشت کند . در حال چرخش نباید هد سانتریفوژ را لمس کرد ، ای کار علاوه بر صدمه به دست ، سبب توقف ناصحیح سانتریفوژ و غوطه ور شدن مجدد رسوب تشکیل شده در درون لوله می شود.

۳- گرمخانه یا انکوباور ۳۵-۳۷ درجه سانتی گراد

کشت تهیه شده ار نمونه های مکشوک به سل حداکثر هشت هفته در حرارت ۳۵–۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری می شوند . انکوباتورها در اندازه های مختلف در دسترس می باشند . بهترین کار انتخاب گرمخانه ای 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 . سین های مورد استفاد در گرمخانه باید دارای منافذ باشند تا چرخش هوا در داخل گرمخانه دچار اشکال نگردد. هم چنین از باز کردن غیر ضروری درب گرمخانه باید پرهیز شود.

معمولا گرمخانه خیلی کم دچار نقص فنی می شود، ولی توصیه می گردد قبل از خرید از سرویس و نگهداری پس از فروش آن مطمئن شوید.

در آزمایشگاهی که حجم کارش زیاد است ، بهتراست گرمخانه ایجاد گردد . ایجاد گرمخانه در گوشه ای از آزمایشگاه یا در یک اتاق کوچک در آزمایشگاه کار مشکلی نیست (چنین اتاقی را با بستن پنجره ها و عایق بندی و زدن سقف کاذب می توان ایجاد کرد).

٤- دستگاه منعقد کننده (کواگولاتور)

دسگاه منعقد کننده برای انعقاد محیطهای کشت تخم مرغ مورد استفاده قرار می گیرد. این دستگاه باید قادر به تامین حرارت ۸۵ درجه سانتی گراد بوده و این حرارت (۸۵-۸۰ درجه) را به مدت ۴۵ دقیقه به طور ثابت نگهداری کند . در صورت عدم دسترسی به دستگاه کواگولاتور ، درجه حرارت مطلوب را می توان توسط انکوباتور و یا فور مرطوب ایجاد کرده و از آن استفاده کرد.

٥- اتوکلاو

باسیل سل در حرارت مرطوب (Saturated Steam) پروتئین هایش تغییر ماهیت داده و نسبت به حرارت خشک سریعتر از بین می رود. بهتر است وسایل که مجدداً مورد استفاده قرار می گیرند. با اتوکلاوی که مخصوص بخش ماینکوباکتریولوژی است به همراه کلیه وسایل (قبل از ارسال آنها به بخش شستشو) اتوکلاو شوند .همچنین کنترل اتوکلاو براساس استاندارد های آزمایشگاهی لازم است .[۲]

٦- شعله برنر

در موارد کار با مواد بسیار عفونت زا مانند کلین باکتری سل ، باید از شعله برنر در داخل هود استفاده کرد . ضمناً برای ثابت کردن لامها می توان از آن استفاده نمود.

۷- سایر وسایل

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

۷-۱ رک فلزی (Rack) برای چیدن لامهای میکروسکپی قبل از رنگ آمیزی

۷-۲ دستگاه شیکر (Shaker) که قبل از سانتریفوژ لوله های حاوی نمونه و ماده آلوده زدا مورد استفاده قرار می گیرد.

۷-۳ دستگاه ورتکس که درون هود مورد استفاده قرار می گیرد.

۷-۴ کوره (Incinerator) برای از بین بردن مواد عفونی

۷-۵ ارلن مایر مدرج در اندازه های ۲ لیتری و ۱ لیتری

۷-۶ مزور مدرج ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی لیتری

۷-۷ قیف بزرگ شیشه ا ی

۷-۸ سرنگ اتوماتیک تقسیم محیط

۷-۹ کپسول چینی متوسط

۷-۱۰ لوله های مک کارتنی یا لوله های در پیچ دار به قطر ۱cm به تعداد کافی

تمام این وسایل باید در موقع استفاده تمیز و استریل باشند. وسایل شیشه ای با مواد شوینده شسته شده و به خوب با آب شیر آبکشی، و سپس با آب مقطز آب کشیده و خشک شوند .وسایل شیشه ای نباید هیچگونه لکه ای داشته باشند . باید وسایل شیشه ای پس از بسته بندی به مدت ۲۰ دقیقه در فشار ۱۱۵ پوند اتوکلاو و یا به وسیله حرارت خشک به مدت نیم ساعت در دمای ۱۸۰ درجه سانتی گراد استریل شوند.

---

[2] فشارهوا ، دما ، رطوبت داخل اتوکلاو و زمان انجام اتوکلاو باید در حد استانداردهاي تعيين شده رعايت شود

فصل سوم

جمع آور نمونه های مختلف

وجود باسل های اسید فست در نمونه ها ی بالین به وسیله آزمایش میکروسکپی و یا انجام کشت مشخص می شود . گونه های مختلف مایکوباکتریوم ها را با مشاهده میکروسکپی گسترده نمی توان مشخص نمود؛ بنابراین تشخیص قطعی توبرکلوزیس فقط با کشت و جداسازی آن از نمونه های 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 جمع آوری شده باشد نتیجه یک آزمایش اطمینان بخش خواهد بود.

یکی از ارزان ترین راههای بیماریابی ، آزمایش مستقیم خلط با میکروسکپ 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 آلودگی هیا جدید در اجتماع باشد ؛ که از نظر اقتصادی ، اجتماعی و بهداشتی زیان های جبران ناپذیری به دنبال خواهد داشت . مایکوباکتریوم ها و به خصوص انواع کند رشد آنها قادرند در همه جای بدن نفوذ کرده و باعث ایجاد بیماری شوند ؛ از این رو نمونه های مورد آزمایش بسیار متنوع می باشند . این نمونه ها عبارتند از : خلط بیماران مشکوک به سل ریوی ، محتویات معده بیماران مشکوک به سل ریوی که قادز به دفع خلط نیستند ، سواپ لارنکس (در بیماران مشکوک به سل ریوی ، بویژه کودکان) ، مایع پلور در بیماران مشکوک به پلورزی سلی ، مایع آسیت در بیماران مشکوک به پریتونیت سلی ، مایع پریکارد ، ترشحات آبسه ریوی ، ترشحات غدد لنفاوی ، مدفوع بیماران مشکوک به سل گوارشی و سل ریوی ، ادرار بیماران مشکوک به سل دستگاه ادراری ، چرک های استخوان در بیماران مشکوک به سل استخوان ، مایع نخاع در مننژیت سلی ، ضایعات پوستی بیماران مشکوک به سل پوستی و عفونت های مایکو باکتریایی و خون بیاران مشکوک به سپتی سمی .

جمع آوری نمونه های مختلف

خلط :

سل ریوی یکی از شایعترین و مهمترین انواع بیماری سل است . به همین دلیل ، خلط یکی از با ارزشترین نمونه های آزمایشی برای تشخیص بیماری به شمار می رود و لازم است که دقت کافی برای جمع آوری آن بعمل آید . بنابراین ، قبل از مراحل هضم ، آلوده زدایی و کشت باید به کیفیت نمونه ، نحوه دریافت و انتقال صحیح و به موقع آن به آزمایشگاه توجه کرد.

از بیمارانی که قادر به دفع خلط می باشند ، نمونه مناسبی می توان به دست آورد . ولی در مواردی که فرد قادر به دفع خلط نیست (افراد مسن ، کودکان و .....) از روشهای دیگر برای جمع آوری ترشحات استفاده می شود . برای مثال با تحریک سرفه در اثر استنشاق محلول آب نمک ولزم ۱۰٪ ، می توان نمونه مناسبی به دست آورد. این عمل سبب تحریک بیمار و ایجاد سرفه و دفع خلی می شود . اگر چه این خلط آبکی می باشد ولی از نمونه تهیه شده با روش سواپ و نمونه شیره معده مطمئن تر است . باید توجه داشت که روی ظرف نمونه حتما 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 نمی باشند ، شست و شوی برونش ها و نمونه برداری از حلق به وسیله سواپ از دیگر روشهای پیشنهادی برای جمع آوری نمونه می باشند . در مقایسه با روش شست وشوی برونش و جمع آوری شیره معده که بسیار مشکل و برای بسیاری از بیماران غیر قابل تحمل است ، روش نمونه برداری از حلق به وسیله سواپ بسیار ساده است . برای تهیه نمونه باید از سواپ های استریل ، مورد استفاده در میکروبشناسی ، استفاده شود . سواپ را در آب مقطر استریل کمی خیس می کنیم ، این کار مانع از نفوذ مواد مترشحه به داخل پنبه می شود . کارمند فنی آزمایشگاه که ماسک به صورت دارد ، سر بیمار را در حالت نشسته ، کمی به عقب می برد و بای گاز استریل زبان بیمار را بیرون آورده و سواپ را داخل لارنکس می کند و از وی می خواهد که سرفه کند ؛ سپس سواپ را

چرخانده و مواد مترشحه را جمع آوری کند . از هر بیمار باید دو سواپ تهیه شده را در یک لوله آزمایش استریک که اسم و مشخصات بیمار بر روی آن ثبت شده ، می گذارند.

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

غالب نمونه های ارسالی به آزمایشگاه مایکوباکتریولوژی نمونه های خلط می باشند ، ولی چون مایکوباکتریوم توبرکلوزیس قادر به ایجاد عفونت در تمامی اعضای بدن است ، نمونه های دیگر (غیراز خلط) هم به آزمایشگاه فرستاده می شود، که مربوط به بیماران مشکوک به سل خارج ریوی می باشند . این نمونه ها مانند مایعات بدن ، بافتها ، ادرار ، فیستول و یا هر نوع ترشح دیگر ، به طور کلی به دو دسته تقسیم بندی می شوند:

الف) مایعاتی که استریل هستند و در شرایط استریل جمع آوری می شوند . مانند مایع مغزی نخاعی

ب) مایعاتی که غیر استریل بوده و حاوی فلور میکروبی می باشند و به طور معمولی جمع آوری نمی شوند . مانند نمونه برداری از ترشحات جلدی.

مایعات استریل بدن

مایعات استریل بدن از قبیل مایع نخاع ، پریکارد ، مفاصل ، پلور ، مغز استخوان و چرک از ضایعات بسته ، که در شرایط استریل جمع آوری می شوند . جمع آوی این نمونه ها به عهده پزشک و با استفاده از روشها و تکنیکهای جراحی انجام می شود.

برای جلوگیری از لخته شدن مایعات استریل بدن از محلولهای ضد انعقاد استفاده می شود . برای این منظور ، از محلول ده درصد اگزالات پتاسیم خنثی به میزان ۰/۰۱ تا ۰/۰۲ میلی لیتر برای هر میلی لیتر نمونه و یا از هپارین ۰/۲ میلی گرم به ازای هر میلی لیتر استفاده می شود. اینگونه نمونه ها باید خیلی سریع به آزمایشگاه ارسال شوند.

بافتهای استریل بدن

بافتهایی که در شرایط استریل نمونه برداری می شوند ، باید در داخل یک ظرف استریل بدون هیچگونه ماده شیمیایی ثابت کننده و نگهدارنده قرار داده شوند . اگر نمونه به آزمایشگاهی فرستاده می شود که مسیرآن 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 می دهند تا درجه حرارت آن بین ۱۵-۴ درجه سانتی گراد ثابت تبماند و سپس سریعاً نمونه به آزمایشگاه اصلی انتقال داده شود.

بعد از دریافت نمونه های استریل به موارد زیر توجه شود:

پس از سانتریفوژ از رسوب مایع نخاع برای کشت استفاده شود. جهت تسهیل در اینجاد رسوب چند قطره از سرم استریل خرگوش و یا محلول آلبومین را به مایع نخاع بیافزاید.(برای ۱۰ میلی لیتر مایع نخاع، ۰/۱ میلی لیتر آلبومین) ، بعد آن راخوب تکان داده و با دور g x ۳۰۰۰ برای ۱۵ دقیقه سانتریفوژ کنید.

درصورتی که بعد از سانتریفوژ رسوبی در لوله مشاهده نشد محلول سولفوسالیسیلیک اسید ۲۰٪ را قطره قطره به لوله اضافه کرده تا کدورت کامل ایجاد شود و بعد آن را دوباره سانتریفوژ کنید . در صورت احتمال غیراستریل بودن نمونه ارسالی به آزمایشگاه ، به سدیمان بدست آمده ۲ میلی لیتر از محلول اسید سولفوریک ۴٪ افزوده و پس از ۱۵ دقیقه به آن ۱۵ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل اضافه کرده و با دور g x ۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ نمایید. رسوب حاصله را به لوله های محیط کشت تلقیح کنید .

جلوگیری از ایجاد لخته

برای جلوگیری از انعقاد آن دسته از مایعات بدن که منعقد می شوند می توان از محلول سیترات سدیم در زمان جمع آوری نمونه استفاده کرد . اضافه کردن دو قطرهاز محلول ۲۰٪ سیترات سدیم به ۱۰ میلی لیتر از مایع جمع آوری شده از انعقاد آن جلوگیری می کند.

نمونه های مشکوک به آلودگی

ادرار

ادرار نمونه ای است که حتما عمل هضم و آلوده زدایی قبل از تلقیح و کشت ، باید روی آن انجام شود. برای کاهش تعداد میکروارگانیسم ها قبل از جمع آوری 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 نمون ادرار ، باید آن را سریعاً به آزمایشگاه رساند . نمونه جمع آوری شده باید بلافاصله مورد آزمایش قرار گیرد و در غیر این صورت حتما 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 جمع آوری مورد آزمایش قرار گیرد ، چون محید اسیدی ادرار به باسیل سل آسیب می رساند .

برای دستیابی به نتیجه صحیحی مراحل ذیل را انجام دهید :

۱. نمونه به دست آمده را به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ کنید.
۲. مایع رویی را دور ریخته (پس از سانتریفوژ) ، دو میلی لیتر اسید سولفوریک ۴٪ را به ته نشین ادرار اضافه کنید .
۳. پانزده دقیق صبر کرده و سپس ۱۵ میلی لیتر محلول نمکی استریل به آن اضافه کنید.
۴. مخلوط را در دور g x ۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ 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 نمونه گیری شود ، احتیاجی به آلوده زدایی ندارد. حجم کلی نمونه را در دور g x ۳۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ کنید.

در صورت آلودگی رسوب ، مقدار ۲ میلی لیتر از اسید سولفوریک ۴٪ به آن اضافه کرده و به مدت ۱۵ دقیقه آن را آلوده زدایی می کند . سپس ۱۵ میلی لیتر از محلول نمکی استریل به آن اضافه نموده و بعد مخلوط حاصله را در دور g x ۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ کنید ، رسوب حاصل را با سود ۴٪ در برابر فنل رد خنث کرده ، و نهایتاً رسوب حاصله را به محیط کشت تلقیح کنند .

سواپ حلق

۱. در لوله اصلی حاوی سواپ مقدار کافی اسید اگزالیک ۵٪ اضافه کرده طوری که سطح آن را بپوشاند.
۲. ۱۵ دقیقه صبر کرده تا اسید با سواپ تماس کافی داشته باشد.
۳. سواپ را به لوله دیگری که حاوی سرم فیزولوژی استریل است منتقل کرده تا اسید جذب شده با آن رقیق گردد.
۴. پس از چند دقیق سواپ 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 فیریولوژی استریل شستشو داده مجددا محلول حاصله را با دور g x ۳۰۰۰به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ نموده و رسوب آن را به محیط کشت تلقیح کنید .

بافت

غدد لنفاوی ، نمونه های بیوپس و سایر بافتهایی که با جراحی برداشته می شوند باید به وسیله قیچی یا اسکالپل استریل به قطعات کوچکتر خرد شوند ، سپس نمونه ها 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 می توان مستقیما در محیط مناسب کشت داد. در غیر اینصورت باید با اسید سولفوریک 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 کدرن و یکنواخت نمودن بافتها به کار می روند کاملا ً تمیز و استریل باشند ، در غیر این صورت موجب نتایج مثبت کاذب خواهند شد.

چرک

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

فصل چهارم

نگهداری و انتقال نمونه ها

برای گرفتن نتیجه مطلوب و صحیح از انجام کشت ، باید زمان بین جمع آوری نمونه تا انجام آزمایش را به حداقل رساند. بنابراین ، نمونه ها باید بعد از جمع آوری خیلی سریع به آزمایشگاه ارسال شوند . در صورت وجود یخچال ، نمونه های خلط را می توان تا یک هفته نگهداری کرد و در پایان هفته ، تمامی آنها را به آزمایشگاه فرستاد . اما باید نمونه های خارج ریوی هرچه سریعتر به آزمایشگاه ارسال شوند [۳]

اگر نمونه ها در شرایط بدون یخچا ل ambient حمل می شوند ، باید از مواد شیمیایی به عنوان نگاهدارنده (preservation) استفاده کرد . معمولا برای جلوگیری از آلودگی نمونه ها موارد زیر توصیه می شود:

[3] در صورتي كه نمونه مورد آزمايش مايع نخاع باشد ، فورا به آزمايشگاه ارسال نموده و به هيچ وجه نبايد آن را به داخل يخچال نگهداري كرد.

۱. نمونه هایی که تازه جمع آوری شده اند با هم حجم ۱ درصد cetyl pyridinium chloride در ۲ درصد sodium-chloride مخلوط شوند . بدین وسیله باسیل سل تا ۷ روز در نمونه زنده می ماند ، و از رشد سایر میکروارگانیسم ها جلوگیری می شود.

۲. معادل ۵۰ میلی گرم از پودر بی کربنات سدیم بدون آب به دو میلی لیتر نمونه اضافه شود .

۳. اگر قرار است آزمایش روی نمونه ها بعد از ۲۴ ساعت انجام شود ، نمونه ها را با حجم خود با محلول ۲۳٪ trisodium phosphate مخلوط کنید.

در هر صورت اگر نمونه ها را سریعا به آزمایشگاه ارسال کنید ، مناسب ترین و مطلوبتری کاررا انجام داده اید (نیاز به محلولهای نگاهدارنده نیست).

دستورالعمل و نکات مهم برای حمل مطمئن نمونه های پاتولوژیک معمولا در کتاب های مختلف در سطح داخلی و بین المللی شرح داده شده است . همچنین مسئولین اداره پست و حمل و نقل در اکثر دنیا (انجمی بین المللی حمل ونقل هوایی International Air Transport Association) مقررات ویژه ای برای حمل و نقل این نمونه ها دارند . به طور کلی نمونه ها باید طوری بسته بندی 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 نمونه های سل نمونه های خلط می باشد ، برای انتقال نمونه های خلط از جعبه های مخصوصی که معمولا از جنس فلزی (الومینوم) یا چوب هستند ، با ظرفیت بین ۱۰ تا ۱۵ ظرف نمونه که به طور عمودی در کنار هم قرار می گیرند استفاده می شود.

هر بسته پستی باید با پارچه و یا کاغذ خیلی ضخیم بسته بندی شود و بر روی آن برچسب مواد بیماری زا همراه با اسم و نشانی گیرنده و فرستنده به طور دقیق مشخص شود.

جعبه های ارسالی باید از نظر حفظ نمونه ها دارای شرایط مناسب باشند ، و در زمان حمل و نقل در جای خنک و دورازتابش مستقیم آفتاب باشند .قبل از ارسال جعبه حاوی ظروف خلط به موارد زیر توجه کنید .

۱. مطابقت نمونه های ارسال شده با فهرست همراه آن اعم از تعداد و مشخصات .

۲. کد نمونه با شماره کد آن نمونه در چک لیست همخوانی داشته باشد.

۳. تاریخ ارسال نمونه ها روی چک لیست نوشته شود.

فصل پنجم

دریافت نمونه در آزمایشگاههای حد واسط

نمونه ها باید معمولا به قسمت مخصوص دریافت نمونه در آزمایشگاه آورده می شوند و سپس جعبه ارسالی به شرحی که گفته شد به اتاق کشت منتقل و با رعایت نکات زیر ، درب جعبه در زیر هود باز می شود

۱. هنکام کار با مواد عفونی حتما از دستکش مرغوب استفاده شود

۲. جعبه ارسالی از نظر نشت نمونه ها مورد بازرسی قرار دهید ، در صورت که تعداد زیادی از نمونه ها نشت کرده باشند، کل جعبه را اتوکالو کرده یا بسوزانید .

۳. سطح خارجی جعبه ارسالی را با پنبه آغشته به فنل ۵٪ پاک کنید

۴. جفه را به دقت باز کنید ، توجه داشته باشید که ظرف حاوی نمونه ترک یا شکستگی نداشته باشد.

۵. در صورتی که ظرف نمونه دچار نشت یا شکستگی شده باشد جعبه را با محتویا آن اتوکلاو کنید .

۶. هر نمونه باید با کد مخصوص آن در چک لیست کنترل شود.

۷. داخل جعبه را با مواد ضدعفونی کننده مثل فنل ۵٪ ضد عفونی کنید.
۸. نمونه ها را برای انجام آزمایش ، به ترتیب در داخل هود قرار دهید.
۹. پس از اتمار کار دستها را با صابون شسته و دستکشها و ظروف نمونه را داخل یک سطل استیل درب دار گذاشته و پس از بستن دب سطل ، آن را به قسمت اتوکلاو یا برای سوزاند ارسال کنید

باز کردن نمونه در داخل هود

به منظور کاهش خطر تولید آئروسل درحین 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 نمونه ها در داخل آن ، ۶۰ ثانیه در حالی که دستها داخل هود می باشند ، صبر کنید . بدین طریق ، دستگاه قادر به تثبیت (stabilities) و زدودن احتمالی میکروارگانیسم های داخل دستگاه می شود.

دقت شود که سوراخهای ورود هوا در قسمت ورودی هود (Front –grille) توسط اجسام خارجی مسدود نباشد.

سعی شود که در موقع کار حداقل ۱۰ سانتی متر 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 می گیرند) در داخل هود قرار داده و سپس وسایل را داخل هود بگذارید.

بمنظور جلوگیری از تردد یا حرکات اضافی در آزمایشگاه (مانند جستجوی ابزارها و یا مواد مورد نیاز در حین کار) ، لازم است که ابتدا لیستی از اقلام مورد نیاز تهیه کرده 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 می کاهد.

در داخل هود فقط مواد و وسایل مورد نیاز 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 می گردد).

مواد و وسایل که ایجاد آئروسل می کنند ، مانند ورتکس ، باید در قسمت انتهای هود قرار گ یرند (درعقب). مشروط بر اینکه ، دریچه های هوا را در قسمت عقب هود مسدود نشوند . اجسام حجیم مانند ظروف مخصوص ، پیپت و ظرفهای جمع آوری کننده را دریک طرف هود قرا دهید.

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

لوله ها را بدون درپوش در داخل هود قرار نداده و حتما در پوش آنها را بگذارید (این مسئله از انتقال آلودگی به نمونه جلوگیری می کند)

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 می کند.

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

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

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 می شود.

طرزاستفاده 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 می آید ، بخاراز شیر تخلیه خارج شده و هوا را از درون اتوکلاو با خود به بیرون می برد. 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 می شود . در این حالت شیر تخلیه بخار هوا باید بسته شود . برای کنترل خروج هوا از داخل اتوکلاو ، یک شیلنگ لاستیکی را به سر شیر تخلیه وصل کرده و سر دیگر آن را در داخل سطل حاوی آب می گذارند تا تشکیل حبا و قطع آن را مشاهده نمائید . از این مرحله به بعد فشار بخار بالا رفته تا به میزان مطلوب برسد . معمولا فشار ۱۵پوند بر اینچ مربع لازم است و پس از آن بخار اضافی تخلیه می شود.

وقتی حرارت داخل اتوکلاو به دمای موردنیاز (۱۲۱ درجه سانتی گراد) رسید ، فشار دستگاه به مدت ۳۰ دقیقه ثابت نگهداشته می شود.

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 هنگامیکه اتوکلاو فشار زیادی دارد باز کنید ، تمام مایعات داخل به شدت جوشیده و بطری ها ممکن است بترکد.

فصل ششم

هضم و آلوده زدایی نمونه ها

تکنیکهای رایج در میکروبیولوژی مانند کشت در پلیت با استفاد از محیطهای انتخابی یا غنی کننده و تجدید کشت برای بدست آوردن کلنی خالص و تک را نمی توان در عملیات باکتریولوژی سل مورد استفاده قرارداد. اغلب مایکو باکتری های پاتوژن به کندی رشد کرده و رشد آن به مدت ۳-۲ هفته به طول می انجامد تا کلنی های قابل رویت از آنها تشکیل شود . برای جداسازی میکروب سل ، روشها و محیطهای خاصی وجود دارد که در مورد سایر باکتریها کاربرد ندارد . کشت ها معمولا در لوله انجام می گیرد که در حقیقت جایگرین پلیت شده است . علت استفاد از این لوله ها این است که اولاً مایکو باکتری ها و به خصوص باسیل های سل غالبا به تعداد اندک در نمونه تهیه شده از بیمار وجود داشته و این مسئله استفاده از مقدار زیاد ماده مورد کشت (Inoculum) را الزامی می سازد که در این صورت سوسپانسیون قابل کشت باید به صورت یکنواخت در سطح لوله گسترده شود. درب لوله ها باید به طور محکم بسته شده تا از خشک شدن محیط جلوگیری شود . خشک شدن محیط در پلیت بیشتر اتفاق می افتد . همچنین باز کردن درب پلیت ها اغلب موجب آزاد شدن مقادیر زیادی آئروسل می شود ، در حالی که این مسئله در مورد لوله کمتر اتفاق می افتد. همچنین استفاده از لوله میزان آلودگی محیط کشت را کاهش می دهد .

اغلب نمونه های بالینی که برای کشت از نظر سل به آزمایشگاه ارسال می شوند به درجات مختلفی با میکروارگانیسم هایی که به صورت فلور میکروبی ظبیع در مواد بیولوژیک بدن وجود دارند ، آلوده می باشند . وجود فلور میکروبی سبب رشد سریع آنها در سطح محیط کشت شده و محیط را قبل از اینکه باسیل سل اجازه رشد یابد ، هضم می کنند. بنابراین ، باید با روشهایی که برای سایر میکروارگانیسم ها دارای قدرت آلوده زدایی بیشتری باشد استفاده کرد.

در مرحله هضم و آلوده زدایی نمونه های غلیظ و لزج مانند خلط به کشل مایع در می آیند و فلور میکروبی عادی نمونه نیز از بین می رود . تمام عوامل هضم کننده 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. به منظور زنده نگهداشتن باسیل سل برای مدت زمان بیشتری ، که بتواند تاییدی بر تشخیص بیماری سل باشد ، آلودگی محیطهای کشت به وسیل سایر ارگانیسم ها اجتناب ناپذیر است . برای ان منظور قاعده ای کلی وجود دارد به این ترتیب که در آزمایشگاههایی که نمونه تازه برای کشت دریافت می کنند ، میزان ۲تا ۳٪ آلودگی قابل قبول است . اگر نمونه (به خصوص خلط) در طی رسیدن به آزمایشگاه چندین روز در راه باشد ، میزان آلودگی به ۵ تا ۱۰ ٪ افایش می یابد. همچنین به انی نکته مهم نیز باید توجه داشت که اگر در یک آزمایشگاه مطلقاً آلودگی وجود نداشته باشد، مفهومش این است که روش آلوده زدایی به حدی شدید بوده که بسیاری از باسیل های سل را نیز از بین برده است .

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

۱. نمونه باید هموژنیزه و یکنواخت شود تا باسیل ها از موکوس سلولها یا بافتی که آن را احاطه کرده است آزاد شوند . هر چه هموژنیزه ملایمتر باشد نتایج بهتری گرفته می شود.
۲. هموژنیزه و آلوده زدایی به گونه ای نباشد که موجب از بین رفتن بیش از حد باسیل های 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 نمونه ها و کشت آن وجود دارد ، ولی روشی که به صورت جهانی قابل قبول همگان بوده و به عنوان 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 حدواسط 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 .

استفاده از هیدرکسید سدیم برای هضم و آلودگی زدایی

این روش به طور گسترده در کشورهای در حال توسعه استفاده می شود زیرا انجام آن و دسترسی به مواد مورد نیاز نسبتا به سادگی امکان پذیر است..

هیدروکسید سدیم هم برای مایکوباکتریوم و هم برای سایر میکروب ها سمی است . بنابراین ، رعایت زمان آلوده زدایی و زمان سانتریفوژ حائز اهمیت است.

تهیه مواد

تهیه هیدروکسید سدیم ۴٪ Analytical Grade:

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 گردا 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 نمونه های بالینی ، در برخی از بیماران خاص ، یا مناطق به خصوص و یا در مقطع خاصی از زمان به وجود می آید ؛ که در این صورت برای حل مشکل از اسید اکسالیک ۵٪ یا اسید سولفوریک ۴٪ برای آلوده زدایی می توان استفاده کرد. اگر آلودگی نمونه به علت گونه های پزودوموناس باشد از اسید اکسالیک استفاده می شود. هم چنین از اسید سولفوریک ۴٪ نیز برای آلوده زدایی ادرار و مایعات آبکی بدن در مواردی که مواد قلیایی ضد عفونی کننده ، مشکل را حل نکند ، استفاده می شود.

آلوده زدایی و کشت خلط

تمام مراحل آلوده زدایی زیر هود انجام می شود:

۱. ظروف نمونه را در زیر هود و لوله های استریل را با شماره های مترادف نمونه ها در جا لوله ای دیگر قرار دهید. توصیه می شود از لوله های در پیچ دار (فالکون) باحجم مناسب استفاده شود؛
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 بصورت 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 (۲۵-۲۰ 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 g x ۳۰۰۰ تا ۳۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ کنید؛
۵. مایع روبی 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 g x ۳۰۰۰ 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 ۲/۵ x ۱/۵ سانتی متر گسترده تهیه کنید .

نکته :

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

معرف ها:

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).

روش:

۱. حدود ۱۰ میلی لیتر از نمونه خلط را داخل لوله مخصوص (فالکون) ریخته و هم حجم آن سود ۴ درصد اضافه نمائید.

۲. درب لوله را محکم بسته و با استفاده از شیکر به مدت ۱۵ دقیق آن را به خوبی تکان دهید.

۳. لوله را به مدت ۱۵ دقیقه و دور g x ۳۰۰۰ تا ۳۵۰۰ سانتریفوژ نمایید.

۴. 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.

۵. از رسوب حاصله برای کشت و تهیه گسترش استفاده می شود.

فصل هفتم

محیطهای کشت سل

همانگونه که قبلا 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. محیطهای منتوعی برای کشت مایکوباکتری ها در دسترس می باشند ولی محیط ایده آل برای کشت مایکوباکتریوم ها باید شرایط زیر را داشته باشد.

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 مایکوباکتریومها را از نظر ایجاد رنگدانه و مورفولوژی آنها تسهیل کند

۴. امکان تهیه اجرای محیط میسر بوده و از نظر اقتصادی مقرون به صرفه باشد.

۵. انجام تشت های حساسیت دارویی با استفاده از این محیطها امکان پذیر باشد. عملاً محیط کشتی که واجد تمامی پنج شرط مذکورباشد 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 پایه سرم) برای جداسازی اولیه باکتری از نمونه های بالینی به کار رود. استفاده از محیطهای با دو نوع پایه مختلف شانس جداسازی باکتری بیماری زا را افزایش می دهد.

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

الف) مزایای محیطهای تخم مرغ دار

۱. این نوع محیطها را می توان در یخچال تا چندین ماه نگهداری کرد(بهترین زمان نگهداری ۴۵ تا ۶۰ روز است)
۲. احتمال آلودگی محیط در مرحله تهیه کمتر بوده ، زیرا پس از تقسیم محیط در لوله ، آنها را در حرارت ۸۵–۸۰ درجه سانتی گراد منعقد می کنند.
۳. رشد اغلب مایکوباکتری ها را تقویت می کند.

ب) معایب محیطهای تخم مرغ دار

۱. وقتی که آلودگی رخ دهد معمولا تمام سطح لوله را فرا می گیرد.

۲. 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 تخم مرغ ،(مانند فسفو لیپیدها) دارو را خنثی می کند.

مزایای محیطهای آگاردار

مزایای محیطهای آگاردار عبارتنداز:

۱. چون ترکیب آن از نظر مواد شیمیایی ساده تر است به باکتریه های مزاحم کمتر اجازه رشد می دهد.
۲. معمولا رنگ محیط واضح بوده (Clear) و می توان شکل کلنی را با سهولت بیشتری رویت کرد. زیرا برخلاف محیطهای تخم مرغ دار در این نوع محیطها می توان از میکروسکپ Dissecuting) (60-30) برای دیدن کلنی ها استفاده کرد.
۳. چون ترکیب این محیط ساده تر از محیط تخم مرغ دار است ، لذا، تست حساسیت دارویی با غلظت های رقیق تری از دارو میسر است.
۴. اگر محیط ها را در شرایط ۱۰٪ CO2 و ۹۰ ٪ هوا ، در گرمخانه بگذارند در ۹۹٪ از موارد ، جوابهای مثبت کشت ، در مدت ۴–۳ هفته مشخص می شود.

معایب محیطهای آگاردار

معایت محیطهای آگاردار عبارتند از :

۱. احتمال خشک شدن پلیت محیطهای آگاردار در مرحله ذخیره سازی و انکوباسیون زیاد سات ، مگر اینکه پلیت ها را درون کیسه نایلونی گذاشته و آن را ببندند.

۲. اگر محیط در معرض نور (Day Light) قرار گیرد ، گاز فرمالدئید از آن متصاعد شده و در نتیجه از رشد مایکوباکتری ها جلوگیری می شود.

۳. اگر اسید اسپارتیک با غلظت ۰/۱ درصد (L- Aspartic) اضافه شود (به منظور تولید نیاسین توسط M.Tuberculosis) فعالیت داروهای خاصی تغییر می کند.

۴. در مرحله تهیه و تقسیم محیط درون پلیت ، برای جلوگیری از آلودگی باید دقت زیادی اعمال شود

بیشتر محیطهای مورد مصرف در آزمایشگاههای مایکوباکتریولوژی به طریق تجاری و آماده در دسترس بوده و یا اینکه به صورت محیط پایه (Base) عرضه شده و باید فقط به آن مکمل (Supplement) اضافه کرد . هر سری محیط ساخته شده را باید با یک سویه از باسیل سل که صفات رشد آن شناخته شده است ، از نظر توانایی محیط در تامین رشد مایکوباکتری کنترل کرد.

متغیرهایی که در کیفیت محیط به هنگام تهیه آن تاثیر دارند به شرح زیر می باشند :

۱. میزان خلوص مواد شیمیایی مورد استفاده ؛
۲. دقت در هنگام تهیه و استریل نمودن محیط کشت و ظروف شیشه ای ؛
۳. PH نهایی محیط ؛
۴. در معرض قرار گرفتن محیط نسبت به اشعه خورشید یا حرارت زیاد ؛
۵. روش ذخیره نمودن محیط و طول مدت نگهداری آن ،چ

محیط لوین اشتاین جانسون یا (L-J)

محیط (L-J) به شکل گسترده ای برای کشت باسیل سل استفاده می شود. محیط**(L-J)** حاوی گلیسرین ، شرایط مطلوب برای رشد باسیل سل انسانی را تامین کرده ، در حالی که **(L-J)** حاوی پیروات ، رشد باسیل سل گاوی را تامین می کند. در کشورهایی که احتمال عفونت بیماران با هر دو میکروب می رود ، باید از هر دو نوع محیط استفاده شود .

محیط**(L-J)** که فرمول آن ، توسط اتحادیه بین المللی مبارزه با سل و بیماریهای ریوی (IUALTD) اصلاح شده ، به شرح زیر است .

الف) محلول نمکهای معدنی

KH2PO4	**2.4 gr**
Magnesium Sulphate(MgSO4.7H20)	**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 سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه اتوکلاو کنید تا استریل شود . محلول تهیه شده را پس از سرد شدن درحرارت اتاق ، می توان به مدت طولانی در یخچال نگهداری کرد.

ب) محلول مالاشیت گرین ۲٪

پودر سبز مالاشیت	۲ گرم
آب مقطراستریل	۱۰۰ میلی لیتر

پودر سبز مالاشیت را در شرایط استریل در آب مقطر حل کرده و برای انی 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) هموژنیزه کامل تخم مرغ

تخم مرغها ی 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 (ملایم) 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 غوطه ور کنید . قبل از جابجا کردن تخم مرغها باید دستها را برس کشیده و به خوبی شستشو داد.

تخم مرغها را بایک چاقوی استریل ، شکسته و محتویات آن را درون ظرف استریل ریخته و با وسیله ای استریل (Egg Blender) به هم زده و یکنواخت کنید (می توان به جای به هم زدن از پرل شیشه ای استفاده کرد).

د) تهیه محیط کامل

اجزای زیر را تحت شرایط استریل در یک ظرف استریل بزرگ ریخته و آنها را به خوبی هم می زنیم

محلول املاح معدنی (محلول الف)	۶۰۰ میلی لیتر
مالاشیت سبز(محلول آب)	۲۰ میلی لیتر
هموژنیزه تخم مرغ (محلول ج)	۱۰۰۰ میلی لیتر
(۲۵–۲۰ تخم مرغ)	

محلول تهیه شده فوق را به میزان ۶–۸ میلی لیتر در لوله های مک کارتنی (Mc Cartney) استریل یا درون لوله های آزمایش در پیچ دار می ریزیم . برای جلوگیری از رسوب املاح سنگین محیط ، باید حداکثر ۱۵ دقیق پس از توزیع آن را منعقد کرد.

انعقاد محیط

قبل از قرار دادن لوله های محیط در دستگاه کواگولاتور درجه حرارت آن باید به ۸۰ درجه سانتی گراد رسیده باشد . سپس لوله ها را در حرارت ۸۵–۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ دقیقه منعقد می کنند . 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 می رساند . 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 ۳۷–۳۵ درجه سانتی گراد گذارده تا ازنظر 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 می توان آنها را نگهداری کرد.

برای کشت M. bovis محیط **(L-J)** را با ۰/۵ درصد پیروات سدیم غنی می کنند و. در این صورت گلیسرول از محیط حذف شده و ۸ گرم پیروات به املاح محیط افزوده می شود.

توصیه : برای کشت نمونه هایی که قابل تکرار نبوده ، یا نمونه گیری مجدد مستلزم حذف هزینه برای بیماری می باشد ، مانند بیوپسی کبد یا مایع مغزی نخاعی ، می توان از محیط 7H9 که در آزمایشگاه مرکز موجود است ، به میزان نیاز درخواست کنید .

فصل هشتم

کشت و شناسایی مایکوباکتریم توبرکلوزیس

اغلب اوقات مقداری مایع درون لوله های حاوی محیط کشت جمع می شود . باید توجه داشت که قبل از انجام کشت این مایع حذف شود. ضمناً در صورتی که برای کشت از نمونه کافی استفاد ه نشود امکان خطا افزایش می یابد و متاسفانه در اکثر آزمایشگاهها به این موضوع توجه نمی شود.

نگهداری کشت در گرمخانه:

کشتهیا تهیه شده را درگرمخانه (۳۷–۳۵ درجه سانتی گراد) نگهداری می کنند تا رشد باکتری ظاهر شود . درصورت عدم ظهور (پرگنه) باید به مدت هشت هفته محیط های کشت را در گرمخانه نگهداری کرده و پس از این مدت می توان نتیجه کشت را منفی تلقی کرد.

توصیه می شود پس از تلقیح نمونه در محیطهای کشت ، لوله ها را به مدت ۲– ۳ ساعت به طور افقی طوری قرار داده تا مایع تلقیح به صورت یکنواخت در سطح محیط قرار گیرد ؛ سپس لوله ها را در گرمخانه به حالت عمودی نگهداری کنید .

برنامه زمان بندی برای مطالعه کشت

تمام کشتها باید پس از ۷۲ ساعت تلقیح ، بررسی شده تا زمانی که مایعات درون آن کاملا تبخیر شود و پس از آن درب لوله ها را کاملا پیچانده تا از خشک شدن محیط جلوگیری شود . ضمناً آلودگی احتمالی را در آن باید جستجو کرد.

پس از گذشت ۷۲ ساعت کشتها به طور هفتگی کنترل می شوند . اگر بررسی هفتگی عملی نباشد ، حداقل در سه موقعیت زمانی کشت را بررسی می کنیم .

یک هفته پس از کشت در صورت وجود احتمالی مایکوباکترم های سریع الرشد در نمونه بیمار ، می توان رشد آنها را در سطح محیط رویت کرد که ممکن است با مایکو باکتریو توبرکلوزیس اشتباه شود

باید توجه داشت:

۱. 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 مایکوباکتریم توبرکلوزیس و سایر مایکوباکتری هایی با رشد کند بود ، در غیر اینصورت ممکن است کلنی های رشد کرده ، مایکوباکتریوم های ساپروفیت بی ضرر و یا از انواع مایکوباکتریوم پاتوژن و تند رشد باشند.

۲. بعضی از سویه های مایکوباکتریوم ها از جمله توبرکلوزیس بسیار دیر رشد بوده و ظهور کلنی تا هشت هفته طول می کشد . بنابراین کلیه لوله های محیط کشت را باید تا هشت هفته نگهداری کرد .

درصورت مشاهده آلودگی در تمام سطح لوله های کشت شده ، آنها را از گرمخانه جمع آوری کرده و پس از استریلیزاسیون حذف می کنیم . 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 نمی شود و توصیه شده است که از سطح غیر آلوده محیط، گسترده تهیه و رنگ آمیزی شود . اگر در آزمایش میکروسکپی باسیل اسید فست مشاهده شد، باید اقدام به آلوده زدایی محیط کشت نموده و مجددا آن را کشت داد.

بعضی از ارگانیسم های آلوده کننده ، به علت تجزیه مواد موجود در محیط، سبب کاهش PH محیط شده و باعث شکستن اتصال بین رنگ سبز مالاشیت و تخم مرغ موجود در محیط گردیده و رنگ محیط به سبز تیره تغییر می یابد . باسیل سل در چنین شرایطی رشد نکرده و اینگونه محیطها را باید حذف کرد.

بررسی محیطهای کشت

کلنی های تیپیک باسیل سل سخت ، شکننده ، مومی ، بدون رنگ ، (رنگ خامه ای) و با رشد کم بوده و معمولا ۳ تا ۴ هفته پس از کشت ظاهر می شوند ، که باید از آنها گسترده تهیه و مشاهده شود.

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

۱. باسیل سل در کشت اولیه در مدت هفت روز قادر به رشد نبوده و معمولا ۳ تا ۴ هفته طول می کشد که کلنی ظاهر شود
۲. کلنی ها به رنگ کرم کمرنگ (نخودی) بوده و هرگز به رنگ زرد دیده نمی شود.
۳. ظاهر کلین خشن و به کشل خرده نان است .
۴. هنگام تهیه امولوسیو برای گسترده ، ایجاد سوسپانسیون غیر یکنواخت می نماید (دانه های درشت متشکل از باسیل شناور در مایع)
۵. در گستره تهیه شده سویه های باسیل توبرکلوزیس به صورت کورد یا طناب دیده می شود

فصل نهم

کنترل کیفی محیط کشت مایکوباکتریوها

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 عبارتست از :

۱. قابلیت اطمینان ، باید مطمئن بود که نتیجه کار صحیح است.
۲. قابلیت تکرار پذیری ، وقتی که تستی تکرار می شود باید نتایج مشابهی به دست آید . موارد ذکر شده تحت عوامل زیر تاثیر پذیر است :

الف) خطای فردی : منظور تحوه عمل کارمند یا کارد فنی آزمایشگاه ،
ب) عوامل محیطی : شامل نور ، حرارت نامناسب . تهویه نامطبوع ،
ج)نوع نمونه ها از نظر آلودگی و غیره
د) مواد و وسایل آزمایشگاهی مورد استفاده در تهیه محیط کشت ،

ه) روش انجام کار،

بنابراین Quality assurance یا اطمینا ن از کیفیت ، مجموعه فعالیتهایی است که برای حصول به آن ، آزمایشگاه در تهیه محیط کشت اعمال می کند.

کنترل کیفی در بخش محیط سازی سل

برای این منظور در هر بخش باکتریولوژی سل ، باید دفترچه ای که تمام اطلاعات اعم از نحوه کار، مواد و وسایل مورد نیاز نگهداری و حذف محیط های نامناسب ، درج کارهای روزانه را در بر می گیرد، وجود داشته باشد.

کنترل کیف 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 :

۱. زمانی که نتایج کشت خارج از کنترل شود ، چه رشد غیرقابل انتظار یا عدم رشد نمونه در هر دو صورت یابد:
   - موضوع به سرپرست بخش اطلاع داده شود
   - در صورت در دسترس بودن نمونه ، کشت تکرار شود.
   - اگر کشت با زهم غیر قابل اعتماد باشد ، باید محیط کشت با وسایل ، مواد و معرفهای تازه مجدد کنترل شود و یا از سری محیط های تهیه شده دیگر استفاده شود.

برای این منظور سوسپانسیونی میکروبی ، که برابر است با نیم ماک 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 ۰/۲ ۶/۹ = PH باشد) و برای مدت ۸-۴ هفته نگهداری می کنیم .

برای تلقیح می توان از سویه های M.tuberculosis و M.intracellular و.kansansii و M. scrofulaceurn استفاده کرد.

در بعضی موارد ممکن است به دلیل عدم جدا شدن کلنی ها از رقت های مختلف میکروبی استفاده کرد.

الف) در مورد تلقیح مایکوباکتریوم ها ، تغییرات آنها را ابتدا در محلولی که حاوی سه گرم در لیتر سرم آلبومین گاوی و ۰/۲ml توین ۸۰ بوده و به همراه ۱۲-۸ عدد پرل شیشه ای سوسپانسیون را تهیه کرد و به مدت ۱۰ دقیقه با دستگاه vortex به هم می زنیم 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 ماک فارلند تنظیم کرده و آن را در فریزر قرار دهید (این سوسپانسیون را می توان تا ۶ ماه در فریزر نگهداری کرد).

ب) محیط L J همان طوری که در بالا شاره شد باید دارای ۶/۹ = PH بوده به علاوه برای کنترل کیفی از سویه های ذکر شده استفاده کرد.

ج) تمامی کشت ها را تحت شرایط مناسب که برای آن محیط پیشنهاد شده انکوبه می کنیم .

د) نتایج حاصله را در دفتر O.C یادداشت می کنیم .

دستورالعملی برای تاریخ انقضای محیط های کشت که چندان مطلوب نبوده تهیه می کنیم ، 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 لوله های کشت ؛
- نگهداری محیط در جای نامناسب.

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 وطور مستمر مورد تجزیه و تحلیل قرار گیرند تا از نظر قابل اعتماد بودن اجزا (Reliability) و افزایش بازدهی کار (Efficiency) و استفاده مطلوب تر ارتقاء کیفیت یابند. بهترین و موثرترین راه برای منظور فوق ، پیش بینی مشکلات و پیشگیری از وقوع آنهاست . بنابراین نباید اجازه داد تا مشکلات به وقوع پیوسته و سپس درصد رفع آن برآیند.

جمع آوری اطلاعات ، آنالیز آنها و پیدا کردن راه حل برای مشکلات ، اجزای اصلی در بالا بردن کیفیت کار یا Quality improvement می باشند.

نظارت (supervision) باید به وسیله با تجربه ترین کارکنان فنی آزمایشگاه انجام شود . فعالیت هایی که سوپروایزر باید انجام دهد عبارتند 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 سرویس های لازم به موقع صورت گرفته باشد .
- ارزشیابی نمونه های نامطلوب از جمله ظروفی که نشت داده و یا شکسته شده اند . اگر مرکز به خصوصی از نظر ارسال نمونه مشکل داشته باشد باید به آنها تذکر داد.
- بررسی رنگه و معرفها و محیطهای کشت از نظر مشخص بودن اطلاعات مربوط به تاریخ تهیه و انقضای آنها و اینکه تاریخ مصرف مواد نگذشته باشتد.
- بررسی برای حصول اطمینان از مصرف کنترل های مثبت و منفی در آزمایشهای میکروسکپ ، کشت و روشهای شناسایی.

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

الف) جمع آوی و انتخاب اسلایدهای مثبت و منفی برای بررسی مجدد.

ب) روش جمع آوری لام ها به این ترتیب است که :

- از ۱۰۰ نمونه لام ، تمام مثبتها به ترتیبی که تشخیص داده شده ، انتخاب می گردد. در مرحله بعدی ۱۰٪ اسلایدهای منفی را به صورت ۱۰ درمیان (دهمین اسلاید منفی) انتخاب می کنند .

- تمام اسلایدها را به مدت دوماه نگهداری می کنند 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 درحین بازدید آنها تعیین می گدرد . نکته خیلی مهم ، نگهداری اسلایدهای مربوط به بررسی های follow up است . زیرا موارد منفی کاذب در مورد آنها ممکن است اتفاق بیفتد.

ج) ارزشیابی نسبت آلودگی نمونه های کشت شده در ماه.

کنترل کیفی را در موارد زیر به کار می برند:

- نظم و ترتیب آزمایشگاه،
- وسایل،
- جمع آوری و ارسال نمونه ها ،
- جابجایی نمونه ها 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 ، علاقمند و مسئولیت پذیر ،
- اشتیاق به قبول و تصدیق اشتباهات
- ارتباط موثر در بین پرسنل (effective Communication)

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 هم چنین فضای کار باید عاری از غبار باشد .

میزکار حداقل یک بار در روز باید به وسیله ماده ضدعفونی کننده موثر پاک شود .

هر روشی که در آزمایشگاه مورد استفاده قرار می گیرد باید دقیقا نوشته شود و در آزمایشگاه به عنوان 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 به طور منظم تحت نظارت قرار داشته باشند تا از دقیق بودن آنها اطمینان حاصل شود.

کنترل وسایل

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

گرمخانه ۳۵-۳۷ درجه سانتی گراد: درجه حرارت به صورت 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 محیط سازی درون آن را تمیز کنید .

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

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

نمونه ها و فرم تقاضای آزمایش : آزمایش را فقط براساس تقاضای کتبی فرد صلاحیت دار 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 فرم های تقاضای آزمایش تاکید کنید . ضمناً مشخصات و شماره باید به صورت دقیق در روی ظروف نمونه ثبت شود. نمون هایی 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 نمونه ای منفی باشد ، باید در گزارش ذکر شود که نمونه شبیه به بزاق بوده است.

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

معرف ها و محلول های رنگ آمیزی

تمام ظروف رنگها و معرف ها از تاریخ ورود به آزمایشاه باید وضعیت آنها مشخص باشد .

اگر ماده ای نامرغوب بوده و جواب نمی دهد باید مشکل ذکر شده و آن را فورا از دسترس خارج کرد. ذخیره مواد باید به ۶ ماه محدود گردد تا از انقضای مهلت مصرف جلوگیری شود.

هضم و آلوده زدایی

نمونه های خلط را براساس ظرفیت لوله های سانتریفوژ آلوده زدایی کنید.

یک رکورد ماهانه از درصد نمونه های بالینی تهیه کنید . محدوده قابل قبول ۵-۲ درصد است . آلودگی کمتر از ۲٪ نشانه شدید بودن ماده آلوده زدا بوده و به این مفهوم است که باسیل های سل هم به مقدار زیادی کشته شده اند. اگر نمونه ها دیر به آزمایشگاه برسند ، میزان آلودگی بیشتر از ۵٪ می شود. 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 می شود 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.

محیطهای کشت

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

محیط های تهیه شده را به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه بگذارید تا از استریل بودن انها مطمئن شوید .

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

روش کشت

از وقوع آلودگیهای به صورت متقاطع (Cross Contamination) 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 ، ۲۰۰-۲۵۰ 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 **(filter Membrane)** که اندازه منافذ آن ۰/۲۲ میکرومتر است عبور داده و سپس فسلتر را به قطعات کوچک خرد نموده و آن را در سطح محیط (L J) بگذارید.

فصل دهم

ایمنی در آزمایشگاه

عفونت هایی که در حین انجام آزمایش ، افراد آزمایشگاهی را گرفتار می سازند ، از دیرباز شناخته شده اند . مطالعات نشان داده شات ، خطر ابتلا به سل در کارکنان آزمایشگاه سل ، ۳-۵ برابر بیشتر از سایر کارکنان امور دفتری و اجرایی در همان موسسه است . مایکو

باکتریوم توبرکلوزیس بیماری مزمنی را تولید کرده که طول درمان آن ۱۸-۶ ماه است . سایر مایکو باکتریومهای بالقوه بیماری زا نیز نسبت به مواد ضد میکروبی از جمله داروهای ضد سل مقاومت بسیار بالایی نشان داده اند و اقدامات درمانی را با مشکل مواجه ساخته اند . 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 ویژه ای برخوردار است

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

۱. کارکنان بخش سل باید از نظر اصول بهداشتی تحت مراقبت پزشی 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 تامین امکانات لازم .
۵. در اختیار گذاشتن وسایل ایمنی برای کارکنان آزمایشگاه.

فرد شاغل در آزمایشگاه در قبال استفاده صحیح از وسایل ایمنی و سایر وظایف محوله باید مسئولیت مشخص شده در آزمایشگاه را بپذیرد.

بیشتر عفونتها در آزمایشگاه مایکوباکتریولوژی مربوط به ایجاد آئروسل حاوی باسیل اسید فست است که اغلب از نظر دور مانده و نا شناخته باقی می ماند . مطالعات نشاد داده است که فعالیتهای زیر منجر به ایجاد آئروسل می شود:

۱. انتقال کشت مایع و یا مایع رویی پس از انجام سانتریفوژ 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 (Belender)؛
۵. افتادن لوله یا ظروف حاوی محیط کشت بر روی زمین ؛
۶. شکستن لوله ها در حین سانتریفوژ؛
۷. چکیدن سوسپانسیون میکروبی از پیپت در روی سطح میز کار یا سطوح سخت .

اگرچه ریه ها راه عمده ابتلا به عفونت سل می باشند ولی طرق غیر معمول نیز مانند سر سوزن ، اجرام نوک تیز مانند : تکه شیشه های خرد شده ، و یا نفوذ میکروب از طریق خراشها یا برش های جلدی نیز می توانند سبب ابتلا شوند . تمام سطوح و وسایل کار در اتاق کشت (Isolation room) از جمله هود ایمنی باید بالقوه عفونت زا تلقی گردیده و باید به طور مرتب با وسیله مناسب تمیز شوند . برای این منظور می توان از یک ماده ضد عفونی کنند ، اتوکلاو و یا اشعه UV بسته به نوع وسیله استفاده کرد.

راههای جلوگیری از ایجاد آئروسل

در مورد استفاده از هود ایمنی برای جلوجگیری از ایجاد آئروسل و محل نصب آن در آزمایشگاه قبلاً صحبت شده است (بخش دوم) باید مسیر جریان هوا در آزمایشگاه به گونه ای باشد که سیستم تهویه به صورت یک طرفه عمل کرده ؛ به طوری 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 نمی گردد.

وسایل

نگهداری و تعمیرات عادی وسایل آزمایشگاه سل باید با نظارت دقیق انجام شود . بازرسی وسایل اتاق کشت ، رسویس نمودن و تمیز کردن آنها باید با نظارت فرد با تجربه ای انجام شود . اگر در نظر است که وسیله ای برای تعمیر یا نگهداری از اتاق کشت به خارج ازآزمایشگاه منتقل شود باید سطوح آن را با ماده ای مناسب ضد عفونی کرد.

لامپ UV

لامپهای UV اشعه ای با طول موج ۲۵۴ نانومتر از خود ساطع می کنند که برای آلود زدایی سطوح (پس از اتمام کار در درون هود ایمنی) و یا وجود میکرو ارگانیسم های موجود در هوا موثر است . پس از خاتمه کار ، لامپ UV داخل هود را حداقل به مدت یک ساعت روشن بگذارید . قدرت نفوذ لامپ UV تاچیز بوده و اگر سطح آن به وسیله موادی همچون غبار و مواد روغی پوشیده شده باشد اثر میکروب کشی آن از بین می رود. حداقل هر ماه یک بار باید سطح لامپ به وسیله پارچه آغشته به الکل تمیز شود.

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 ، الکل ها ، فرمالدئید ، یدوفور، و یا گلوتارآلدئید 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 موثر می باشند ، ممکن است تاثیری بر باسیل سل نداشته باشند . مثلاً ترکیبات آمونیم چهارتایی با غلظت های توصیه شده بر روی باسیل سل ، بی تاثیر می باشند.

محلولهای 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 آئروسل جلوگیری می کند.

هیپو کلریت

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

گلوتارالدئید

گلوتاراالدئید نیازی به رقیق کردن ندارد ولی به فعال کننده نیاز دارد و معمولا شرکت سازنده ، آن را همراه محلول عرضه می نماید . گلوتارالدئید به صورت محلول ۲٪ عرضه می شود ؛ در حالی که فعال کنند ه آن یک تریب بی کربناتی است . گلوتارالدئید 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

الکلها

معمولا اتانول ۷۰٪ یا پراپانول را در مخلوط با شن (برای پاک کردن لوپ) و یا آلوده زدایی سطوح کار مورد استفاده قرار می دهند . ضمناً برای ایجاد تعادل لوله در سانتریفوژ نیز از یک لوله حاوی اتانول استفاده می شود . وقتی که دستها آلوده می شوند ، ابتدا آنها را با الکل ۷۰٪ می شویند و سپس با صابون تمیز می کنند ؛ که روش بسیار موثری است.

لباسهای حفاظت کننده

چون هود ایمنی صددرصد موثر نبوده و نقایص فیزیکی و مکانیکی در آن ممکن است ، روی دهد ، پوششها ی حفاظت کننده به خصوص ماسک به حفاظت بیشتر پرسنل کمک می کند. 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 پوشش های 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 سالم باشند . کلیه پرسنل جدید باید از نظر PPD و رادیگرافی 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 تجاربی 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 . درسیستم عبور یک طرفه ، هوای تازه ار محل غیر آلوده به سمت هود جریان یافته و در نهایت از طریق فیلتر هپا تصفیه می شود . حوادث که در اینگونه آزمایشگاههای اتفاق می افتد به دو دسته تقسیم می شوند : ۱) ایجاد آئروسل کم ۲) ایجاد انبوه ذرات آئروسل .

از حوادثی که در طی آن آئروسل به میزان کم تولید می شود می توان به افتادن یک لوله حاوی کشت محیط جامد ، افتادن یک پلیت حاوی کشت و یا نشت محتویات نمونه خلط اشاره کرد. در چنین مواردی محیط جامد یا موکوس غلیظ نمونه خلط در ایجاد ذرات آئروسل محدودیت ایجاد می کنند . دراینگونه موارد باید اقدامات زیر را به ترتیب رعایت کرد:

۱- فورا سطح منطقه آلوده شده را بپوشانید تا از ایجاد آئروسل بیشتر جلوگیری شود . برای این کار می توان از حوله کاغذی و یا حتی از روپوش آزمایشگاه استفاده کرد.
۲- منطقه پوشانده شده را با یک ماده ضد عفونی کننده مناسب خیس و مرطوب کنید.
۳- اتاق را به مدت ۲ ساعت ترک کنید ت جریا هوا فرصت کافی برای تخلیه بخش عمده آئروسل را داشته باشد.
۴- لباس حفاظت کننده را پوشیده ، به اتاق وارد شده و منطقه آلوده را به کلی پاک کنید .
۵- آنجه را که پس از تمیز کردن منطقه آلوده برداشته می شود (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 ضد عفونی کننده ، تمیز کنید.

حادثه با کشت مایع

د رصورت شکستن یک لوله یا یک ظرف حاوی کشت مایع مقادیر بسیار زیادی آئروسل ایجاد می شود . درانی حالت ممکن است تا ۸ ۱۰ باسیل در هر میلی متر مکعب در محیط آزاد شوند . درصورت وقوع چنین حادثه ای باید اقدامات زیر انجام شود:

۱. بلافاصله اتاق را ترک کنید ، زیرا خطر آئروسل های ایجاد شده به مراتب بیشتر از آن است که فقط سطح محیط را بپوشاند
۲. 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 می کند . همچنین عبور هوای آلوده از مسیر فیلتر هود مانع از سرایت آلودگی به مناطق خارج از آزمایشگاه می شود.
۳. در صورت امکان ، پس از سپری شدن ۴ ساعت ، اتاق حادثه دیده و یا اتاقها را با گاز فرمالدئید ضد عفونی کنید . این کار را نمی توان در مکانهایی که امکان نشت گاز فرمالین وجود دارد انجام داد.

طرز ضد عفونی کردن آزمایشگاه با فرمالدئید

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

۱. تمام منافذ خروجی اتاق را مسدود کنید . این کار را می توان با چسباندن کیسه های زباله در 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 ت از میزان تاثیر فرمالدئید اطمینان حاصل کرد.
۲. مقدار فرمالین مورد نیاز آزمایشگاه را محاسبه کرده ، روی اجاق برقی بگذارید تا بجوشد. به ازای هر فوت مکعب فضای اتاق یک میلی لیتر فرمالین لازم است (هر متر مکعب برابر اسب با ۳۵/۳ فوت مکعب) . مثلا یک اتاق با فضای ۱۰ x ۱۲x ۱۰ فوت که حجم آن ۱۲۰۰ فوت مکعب می گردد به ۱۲۰۰ میلی لیتر فرمالین نیاز دارد . برای ایجاد رطوبت ۷۰٪ در این اتاق باید ۴۳۹ میلی لیتر آب نیر همزمان با فرمالین تبخیر شود (۱۸/۴ میلی لیتر آب به ازای هر مترمکعب فضای اتاق)

احتیاط

هرکز 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 . پی 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 لوله های محیط کشت شود . بنابراین ؛ درمحلی که انکوباتورهای محیط کشت وجود دارد بایستی دقت شود ، کشت ها زا تاثیر 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 در آورده ،سپس دستها را بلافاصله شسته و ازیک 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 آئروسل می شوند (حتی در داخل هود) باید اکیدا خودداری کنید .
۳. بلافاصله پس از پایان کار و هم چنین قبل از ترک آزمایشگاه حتما دستها را بشویید.
۴. برای کشیدن مایعات از پیپت های مکانیکی استفاده کیند و هرکز از دهان برای این منظور استفاده نشود.
۵. خوردن ، آشامیدن ، سیگار کشیدن در آزمایشگاه ممنوع است
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 استفاد 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 بویژه 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 ا ز دور ریختن کشت ها و سایر مواد زاید آلوده ، آنها را اتوکلاو کنید .