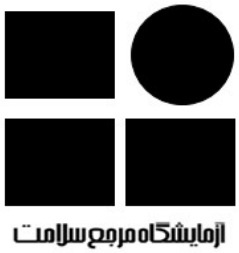
دستورالعمل تشخیص آزمایشگاهی باسیل‌های اسید فست (مایکوباکتریوم‌های توبرکلوزیس و غیر توبرکلوزیس) به روش بررسی میکروسکوپی گستره مستقیم

نسخه اول – مهرماه ۱۴۰۴

آزمایشگاه مرجع سلامت
وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی



نویسندگان به ترتیب حروف الفبا:

کارگروه تشخیص آزمایشگاهی سل، آزمایشگاه مرجع سلامت، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی

خانم دکتر کتایون خداوردیان

آقای دکتر هادی رضائی یزدی

آقای دکتر محمد رهبر

خانم رقیه صبوریان

آقای مصطفی قلمی نوبر

خانم دکتر لیلا گنجی

آقای دکتر سینا مباشری‌زاده

آقای دکتر بابک ولی‌زاده

با تشکر از :

خانم دکتر شهلا فارسی، معاون راهبردی و مسئول ایمنی زیستی آزمایشگاه مرجع سلامت

آقای سیروس امینی، کارشناس پیشکسوت شبکه آزمایشگاهی سل کشوری

خانم نرگس زندی، کارشناس ارشد آزمایشگاه مرجع منطقه ای سل دانشگاه تهران

فهرست مطالب

مقدمه ۱
فصل اول. ایمنی ۳
الزامات ایمنی نمونه‌گیری ۷
الزامات ایمنی تهیه گستره خلط ۸
امکانات آزمایشگاهی ۹
الزامات ایمنی هنگام کار با مواد شیمیایی (اسید، فنل و غیره) ۱۰
روش‌ها ۱۱
پوشش و وسایل حفاظت فردی (PPE) ۱۴
کارکنان ۱۵
وظایف آزمایشگاهی خاص مرتبط با خطرات ۱۶
فصل دوم. جمع‌آوری نمونه ۱۸
جمع‌آوری و انتقال نمونه ۱۹
معیارهای رد و پذیرش نمونه ۲۱
فصل سوم. تهیه گستره ۲۲
تجهیزات ۲۴
روش تهیه گستره ۲۴
تهیه گستره پس از هضم و آلودگی‌زدایی ۲۵
هضم و آلودگی‌زدایی نمونه‌ها با استفاده از هیدروکسید سدیم- روش پتروف اصلاح شده (روش پیشنهادی) ۲۶
هضم و آلودگی‌زدایی نمونه ها با استفاده از روش پتروف (روش رایج) ۲۸
هضم و آلودگی‌زدایی نمونه‌ها با استفاده از روش N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide (NALC-NaOH) ۲۸
فیکس کردن گستره ۲۹
فصل چهارم. تشخیص و گزارش‌دهی گستره میکروسکوپی با روش رنگ‌آمیزی زیل‌نلسن (میکروسکوپ نوری) ۳۱
رنگ‌آمیزی زیل‌نلسن ۳۲
خوانش گستره رنگ‌آمیزی شده با روش زیل‌نلسن ۳۴
میکروسکوپ نوری و روش کار ۳۴
بررسی گستره رنگ‌آمیزی شده به روش زیل‌نلسن و گزارش‌دهی ۳۵
انواع اشکال باسیل ۳۹
تهیه محلول‌های مورد نیاز برای رنگ‌آمیزی زیل‌نلسن ۴۰
الف. روش تهیه محلول رنگ کربول‌فوشین ۴۱
ب. روش تهیه محلول رنگ‌بر ۴۴
ت. روش تهیه محلول رنگ زمینه ۴۴
نگهداری محلول‌ها و معرف‌ها ۴۴
کنترل کیفیت محلول‌های رنگ‌آمیزی تهیه شده ۴۵

اقدامات ایمنی ۴۵
فصل پنجم. تشخیص و گزارش‌دهی میکروسکوپی گستره با روش رنگ‌آمیزی فلوروکروم ۴۶
مزایای روش فلوروکروم ۴۷
روش رنگ‌آمیزی فلوروکروم ۴۷
بررسی گستره رنگ‌آمیزی شده به روش فلوروکروم و گزارش‌دهی ۴۹
تهیه محلول‌های مورد نیاز برای رنگ‌آمیزی فلوروکروم ۵۰
الف. روش تهیه محلول فلوروکروم ۵۰
ب. روش تهیه محلول رنگ بر ۵۰
ت. روش تهیه محلول رنگ زمینه ۵۱
فصل ششم. تضمین کیفیت ۵۲
کنترل کیفیت داخلی ۵۴
۱- جمع‌آوری و انتقال نمونه ۵۴
۲-تهیه گستره ۵۴
۳-رنگ‌آمیزی ۵۴
۴-خوانش ۵۴
۵-گزارش نتایج و نگهداری لام‌ها ۵۵
۶-کنترل کیفیت تجهیزات ۵۵
کنترل کیفیت میکروسکوپ ۵۵
کنترل کیفیت کابینت ایمنی بیولوژیک ۵۵
کنترل کیفیت خارجی ۵۶
منابع ۵۷

مقدمه.

توبرکلوزیس (Tuberculosis)، از قدیمی‌ترین بیماری‌های شناخته شده در تاریخ است که با وجود استفاده از واکسن زنده ضعیف شده و داروهای ضد سل، از بزرگترین عوامل مرگ و میر بیماری‌های عفونی است. علی‌رغم پیشرفت‌هایی که در تشخیص مایکوباکتریوم‌ها بوجود آمده است، همچنان بررسی میکروسکوپی گستره‌های خلط رنگ‌آمیزی شده به ویژه در کشورهای با منابع مالی محدود بهترین انتخاب است.

اساس رنگ‌آمیزی بر پایه حضور لیپیدهای پیچیده در دیواره سلولی گونه‌های مایکوباکتریوم است که مانع ورود رنگ‌های آنیلین می‌شوند. زمانی‌که مایکوباکتریوم‌ها تحت شرایط خاص با کربول فوشین یا فلوروکروم‌ها رنگ‌آمیزی می‌شوند، با رنگ بر اسید الکلی نیز رنگ خود را از دست نمی‌دهند. به دلیل این ویژگی، نه تنها *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*[1] بلکه همه اعضای مایکوباکتریوم‌ها به عنوان باسیل‌های اسید فست کامل[2] شناخته می‌شوند. در حال حاضر از دو روش رنگ‌آمیزی اسیدفست برای تشخیص مایکوباکتریوم‌ها در انواع نمونه‌های بالینی استفاده می‌شود که شامل:

- **روش اول رنگ‌آمیزی کربول‌فوشین**:

۱. زیل‌نلسن[3] (رنگ‌آمیزی با حرارت)

۲ . کاینیون[4] (رنگ‌آمیزی سرد/ بدون حرارت)

با روش زیل‌نلسن و کاینیون، مایکوباکتریوم‌ها به شکل باسیل‌های قرمز رنگ در زمینه آبی در میدان میکروسکوپی قابل مشاهده هستند. رنگ‌آمیزی کاینیون، فرم تغییر یافته‌ای از رنگ‌آمیزی زیل‌نلسن کلاسیک است که مرحله حرارت دهی در طول رنگ‌آمیزی حذف شده است و همچنین از غلظت بالاتری از کربول‌فوشین استفاده می‌شود. **از آنجا که کارایی و تاثیر رنگ‌آمیزی کاینیون کمتر از روش زیل‌نلسن است، استفاده از این روش توصیه نمی‌شود.**

- **روش دوم رنگ‌آمیزی فلوروکروم (اورامین، اورامین -رودامین)**

طی سال‌های متمادی از روش فلوروکروم برای رنگ‌آمیزی باکتری‌های اسیدفست استفاده شده است. با استفاده از این روش، مایکوباکتریوم‌ها به صورت باسیل‌های فلورسنت روشن در پس زمینه تیره مشاهده و شناسایی می‌شوند. در مقایسه با رنگ‌آمیزی زیل‌نلسن و یا کاینیون، رنگ‌آمیزی فلوروکروم حساسیت بیشتری دارد و زمان کمتری برای خوانش گستره‌ها نیاز است. این مزیت به علت مشاهده گستره‌ها با بزرگ‌نمایی کمتر است.

روش بررسی میکروسکوپی گستره روشی ساده، ارزان و کارآمد در تشخیص سل ریوی است، بنابراین کیفیت گستره‌های تهیه شده برای بررسی میکروسکوپی نقش بسیار مهمی، به ویژه در مراکز درمانی با امکانات محدود، در کنترل و پیشگیری از عفونت *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* دارد.

مهمترین محدودیت روش بررسی میکروسکوپی گستره با این دو روش، حساسیت کم آن (۷۵-۲۵٪) در مقایسه با روش کشت می‌باشد. همچنین حداقل تعداد ۱۰۰۰۰-۵۰۰۰ باسیل در هر میلی‌لیتر از نمونه برای نتیجه مثبت، ضروری است. نکته مهم آن که حساسیت و ارزش

[1] *M. tuberculosis*
[2] Complete Acid–fast bacilli versus partially acid fast bacteria such as *Nocardia* spp.
[3] Ziehl-Neelsen
[4] Kinyoun cold staining

پیشگویی مثبت[5] میکروسکوپی گستره تحت تأثیر عوامل متعددی، مانند شیوع و شدت بیماری، نوع و کیفیت نمونه، تعداد مایکوباکتریوم‌های موجود در نمونه و همچنین کیفیت آماده‌سازی، رنگ‌آمیزی و نحوه مشاهده گستره‌ها، قرار می‌گیرد. این نکته حائز اهمیت است که شناسایی گونه‌های مایکوباکتریوم و همچنین تشخیص زنده بودن آنها با استفاده از روش بررسی گستره مستقیم امکان پذیر نیست. در بیمارانی که همزمان به HIV و سل مبتلا هستند، ممکن است پدیده پائوسی باسیلاری توبرکلوزیس (Paucibacillary Tuberculosis) مشاهده شود. در این حالت تعداد باسیل‌های اسید فست در نمونه یا بافت بیمار بسیار کم است و در اغلب موارد میکروسکوپی گستره منفی می‌شود (۱).

این دستورالعمل در شش بخش به شرح زیر تشکیل شده است:

۱- ایمنی

۲- جمع‌آوری نمونه

۳- تهیه گستره

۴- بررسی میکروسکوپی گستره با روش رنگ‌آمیزی زیل نلسن (میکروسکوپ نوری)

۵- بررسی میکروسکوپی گستره با روش رنگ‌آمیزی فلوروکروم (میکروسکوپ فلورسنت)

۶- کنترل کیفیت

[5] Positive Predictive Value (PPV)

فصل اول

ایمنی

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جزو ۱۰ عامل اصلی عفونت‌های کسب شده از آزمایشگاه است و در برخی منابع، به عنوان شایع‌ترین عامل عفونت‌های اکتسابی در آزمایشگاه می‌باشد. دوز عفونی (ID50) این باکتری ۱۰-۱ باسیل است.

اساس تقسیم بندی آزمایشگاه‌های سل از نظر الزامات ایمنی زیستی مبتنی بر ارزیابی ریسک شامل غلظت باکتری، میزان تولید آئروسل در حین فرآیندهای آزمایشگاهی است. آزمایشگاه‌های سل از این نظر به آزمایشگاه‌های با ریسک کم، ریسک متوسط و ریسک زیاد تقسیم بندی می‌شوند (جدول شماره ۱). رعایت کلیه الزامات اصلی یا پایه [۶] و روش‌ها و عملیات صحیح میکروب شناسی[۷]، "به ویژه الزامات سطح ۳ ایمنی زیستی" در آزمایشگاه‌هایی که بررسی میکروسکوپی گستره خلط را انجام می‌دهند، می‌تواند باعث کاهش ریسک شود.

جدول شماره ۱. ارزیابی سطح ریسک (۲)

سطح ریسک در آزمایشگاه سل	فعالیت آزمایشگاهی	ارزیابی ریسک	کابینت ایمنی بیولوژیک[۸]	سطح ایمنی زیستی[۹]
ریسک کم	تهیه و بررسی میکروسکوپی گستره خلط به روش مستقیم؛ آماده‌سازی نمونه‌ها برای استفاده در کارتریج‌های سیستم خودکار استخراج اسید نوکلئیک (مانند سنجش Xpert MTB/RIF)	ریسک کم تولید آئروسل‌های عفونی از نمونه‌ها، غلظت کم ذرات عفونی	استفاده از کابینت ایمنی بیولوژیک کلاسII نوع A2 *	BSL2
ریسک متوسط	پردازش و تغلیظ نمونه‌ها برای تهیه گستره و همچنین تلقیح بر روی محیط کشت اولیه، تست‌های تعیین حساسیت ضد میکروبی مستقیم[۱۰](به عنوان مثال، Line-Probe Assays بر روی نمونه خلط پردازش شده)، تست MGIT	ریسک متوسط تولید آئروسل‌های عفونی از نمونه-ها، غلظت متوسط ذرات عفونی	استفاده از کابینت ایمنی بیولوژیک کلاسII نوع A2 یا کلاسII نوع B2	BSL3**
ریسک زیاد (آزمایشگاه‌های تخصصی سل)	کار کردن بر روی کشت به منظور شناسایی جنس و گونه، تست‌های تعیین حساسیت ضد میکروبی مستقیم یا ارزیابی لاین پروب بر روی ایزوله‌های کشت داده شده	ریسک زیاد تولید آئروسل-های عفونی از نمونه‌ها؛ غلظت بالای ذرات عفونی	استفاده از کابینت ایمنی بیولوژیک کلاسII نوع B2	BSL3

6 Core Requirement
7 Good Microbiological Practices and Procedures (GMPP)
8 Biological Safety Cabinet
9 Biosafety Level
10 DST, Drug-Susceptibility Testing

* سازمان جهانی بهداشت کابینت ایمنی بیولوژیک کلاس I را نیز، فقط برای فعالیت آزمایشگاهی با ریسک کم توصیه کرده است. از آنجا که استفاده از این کابینت ایمنی بیولوژیک کلاس I در ایران معمول نیست، در حال حاضر کارگروه تشخیص آزمایشگاهی سل، آزمایشگاه مرجع سلامت وزارت بهداشت -درمان و آموزش پزشکی، استفاده از این کابینت را توصیه نمی کند.

** از آنجا که در حال حاضر استقرار برخی از الزامات BSL3 (مانند اتاق با فشار منفی) برای همه آزمایشگاه ها امکان پذیر نمی باشد، در این موارد پیشنهاد آزمایشگاه مرجع سلامت استفاده از BSL2 ارتقا یافته می باشد که در آن از الزامات قابل اجرای BSL3 نیز استفاده شود (الزامات BSL3- منبع شماره ۱).

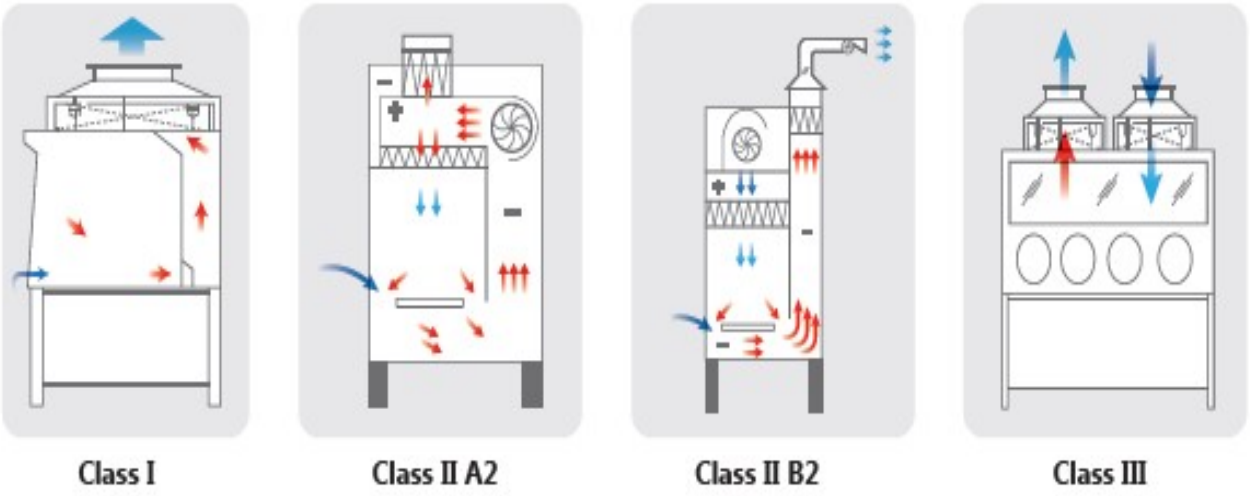
نکته: ویسکوزیته خلط باعث گیر افتادن و محدود شدن انتشار باسیل سل می‌شود، بنابراین ریسک آماده‌سازی گستره مستقیم، کمتر از کار بر روی کلنی‌های محیط کشت جامد و همچنین کار با محیط کشت مایع است.

توجه: سایر روش‌های استخراج اسید نوکلئیک به روش خودکار و یا دستی جزو **ریسک متوسط** دسته بندی می شوند.

جدول شماره ۲.الزامات نصب کابینت ایمنی بیولوژیکی کلاس II نوع A2 و کلاس II نوع B2

کابینت ایمنی بیولوژیک کلاس II نوع A2	کابینت ایمنی بیولوژیک کلاس II نوع B2
• **نصب آسان‌تر**	• **نیاز به سیستم خروج هوا است (Hard-ducted exhaust).** کابینت ایمنی بیولوژیک نوع B2 نیازمند اتصال دائمی و دقیق به لوله خروج هوای اختصاصی با امکانات فنی است. قطع شدن جریان هوا یا فشار منفی باعث اشکال در عملکرد و افزایش خطر نشت آئروسل‌ها می شود. در بسیاری از کشورها یا آزمایشگاه ها، تامین تهویه قابل اعتماد و پایدار امکان پذیر نیست.
• **نیازمند لوله خروج هوا (Exhaust) به فضای بیرون از اتاق**	• **نحوه طراحی پیچیده‌تر و پرهزینه‌تر.** نصب و راه‌اندازی کابینت ایمنی بیولوژیک کلاس II نوع B2 گران‌تر و پیچیده‌تر از نوع A2 است. همچنین به تجهیزات مانیتورینگ دائمی جریان هوا و فشار نیازمند است. تعمیر و نگهداری آن مشکل است و خطای حین کار بیشتری دارد.
• **نیازمند جریان یک طرفه**	• **پایداری عملیاتی پایین‌تر:** هرگونه قطعی برق، کاهش در عملکرد سیستم تهویه یا فشار معکوس می‌تواند ایمنی را مختل کند. همچنین این کابینت‌ها در مقایسه با نوع A2 مقاومت کمتری در برابر شرایط محیطی یا اپراتور دارند.
	• **دسترسی‌پذیری و ایمنی برای کشورهای کم درآمد.** استانداردهای ایمنی باید در عین عملی بودن، برای کشورهای با منابع مالی محدود، قابل اجرا باشند.

توجه: توضیحات و تصاویر تکمیلی درباره نصب و راه‌اندازی کابینت ایمنی بیولوژیک در منابع شماره (۲-۴) ذکر شده است.



شکل شماره۱. تصویر شماتیک انواع کابینت های ایمنی بیولوژیک، (NSF, 2002).

جدول شماره ۳. مشخصات کابینت های ایمنی بیولوژیک (NSF,2002).

Type of Biological Safety Cabinet		Airflow	Protection	Biosafety Level
Class I		100% Exhausted	Personnel, Environment	BSL 1
Class II	**A2**	30% Exhausted 70% Recirculated	Personnel, Environment Product	BSL 1~3
	B2	100% Exhausted		BSL 1~3
Class III		100% Exhausted Glove Box		BSL 3

کابینت با دریچه متحرک (Moveable sash): در کابینت ایمنی بیولوژیک، یک پنجره شفاف و متحرک که به آن سش (sash) گفته می شود، در جلو کابینت وجود دارد. این دریچه متحرک است و کاربردهای زیر را دارد:

- **حفاظت از اپراتور:** این سش بسته به نوع کابینت ایمنی بیولوژیک باید در ارتفاع بین ۳۰-۲۰ سانتی‌متر تنظیم شود تا فضای ورودی هوا دراین شرایط سد هوایی ایجاد نماید و در نتیجه ازکاربر حفاظت شود (۵, ۶).
- **حفاظت محیط داخل کابینت:** جریان هوا قبل از ورود به فضای کاری به فیلتر هپا هدایت می‌شود و ۹۹/۹۷ درصد ذرات بزرگتر از ۰/۳ میکرون حذف می‌شوند و سپس وارد فضای کاری می‌شود (۶).
- **کنترل سرعت جریان هوا (Face Velocity):** میزان باز بودن sash تعین کننده سرعت مناسب ورود هوا (بیش از ۰/۳۸ m/s) به داخل کابینت برای حفظ شرایط کاری ایمن است. اگر sash باز یا بسته شود جریان هوا تغییر می‌کند و باید طبق استاندارد تنظیم شود.
- **هشدار ایمنی (Sash alarm):** بسیاری ازکابینت‌ها دارای آلارم هستند که اگر sash به موقعیت نامناسب (مثلا بیش از حد بالا یا پایین) قرار گیرد، به اپراتور هشدار می‌دهد تا به موقعیت امن بازگردد، در غیر اینصورت جریان هوا ممکن است به شدت مختل شود.

هشدار: باز بودن سش در اندازه استاندارد (بین۳۰-۲۰ سانتی‌متر) الزامی است (۵, ۶) زیرا مقادیر بیشتر یا کمتر از این استاندارد، منجر به اختلال جدی در کارکرد کابینت ایمنی بیولوژیک خواهد شد و در نتیجه سد حفاظت هوایی از بین خواهد رفت و کاربر آلوده خواهد شد.

الزامات ایمنی نمونه‌گیری

توجه: نمونه‌گیری باید در فضای باز و خارج از محیط آزمایشگاه انجام شود، در غیر اینصورت از اتاق‌های اختصاص یافته برای نمونه‌گیری سل باید استفاده شود که مجهز به سیستم هواکش بسیار قوی باشد.

- نمونه‌گیری نباید در محیط‌های بسته مانند سرویس‌های بهداشتی، اتاق‌های انتظار و پذیرش، محل‌های پرتردد و مکان‌های فاقد تهویه انجام شود، زیرا آئروسل‌های عفونی تولید شده، می‌تواند موجب انتقال باکتری به سایر افراد گردد.
- اگر کادر درمان در تهیه نمونه به بیمار کمک می‌کند، باید از پوشش و وسایل حفاظت فردی مناسب شامل ماسک N95 ، شیلد، گان و دستکش استفاده نماید و در طول نمونه‌گیری روبروی فرد بیمار **نایستد** یا در فضای باز، فاصله ایمن بیش از ۳ متر را رعایت نماید (شکل شماره۲). در صورتیکه همراه بیمار به وی در نمونه‌گیری کمک کند، حداقل باید از ماسک N95 استفاده نماید.

شکل شماره ۲. رعایت فاصله و پوشش مناسب حین نمونه‌گیری

- نمونه باید در ظرف دهان گشاد درپیچ دار (با قطر دهانه ۵ سانتی‌متر) و با حجم مناسب (۸۰- ۵۰ میلی‌لیتر)، شفاف، مقاوم و غیر قابل نشت جمع‌آوری شود. جنس ظرف از پلاستیکی باشد که در اتوکلاو تخریب شود (مانند ظرف های استریل کشت ادرار).

توجه: پسماندهای بخش سل را در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد به **مدت ۴۵-۳۰ دقیقه** اتوکلاو نمایید (۷).

- **برای جلوگیری از آلودگی جدار ظرف، نباید ظروفی با قطر دهانه کمتر از ۳/۵ سانتی‌متر بکار رود. به هیچ وجه از لوله‌های فالکون برای جمع‌آوری نمونه استفاده نشود،** زیرا جمع‌آوری خلط درآن دشوار است و باعث آلوده شدن قسمت بیرونی و درِ ظرف با نمونه خواهد شد.
- توصیه می‌شود بیمار برای انتقال امن و ایمن نمونه به آزمایشگاه، از جعبه‌های مخصوص حمل نمونه یا موارد مشابه استفاده نماید.
- باید در هنگام حمل نمونه، محفظه و ظروف حاوی نمونه در وضعیت عمودی قرار گیرند و کج نشوند تا درِ ظرف به نمونه آغشته نشود یا نمونه از ظرف نشت نکند.

الزامات ایمنی تهیه گستره خلط

- باید تولید آئروسل طی تمام مراحل کار به حداقل برسد.
- برای کاهش تولید آئروسل و به منظور جلوگیری از عفونت سل کسب شده از آزمایشگاه، باید همیشه نمونه‌ها با احتیاط کامل و رعایت اصول ایمنی حمل شده و در داخل کابینت ایمنی بیولوژیک کلاس II باز شوند.

تمام آزمایشگاه‌ها برای بررسی میکروسکوپی گستره مستقیم باید از کابینت ایمنی بیولوژیک کلاس II (A2 یا B2) با لوله خروجی هوا (Exhaust) استفاده کنند. کابینت‌های ایمنی بیولوژیک باید دارای تائیدیه کیفیت عملکرد از شرکت سازنده باشند. همچنین کابینت‌های ایمنی بیولوژیک باید دارای گواهی کالیبراسیون از شرکت‌های دارای تاییدیه از مرکز ملی تایید صلاحیت ایران[11] باشند. توصیه می‌شود گواهی کالیبراسیون با توجه به کارکرد دستگاه ترجیحا هر ۶ ماه یک‌بار یا حداقل سالیانه تمدید شود.

- کارکنان باید در ارتباط با تمامی فعالیت‌های آزمایشگاهی که باعث تولید آئروسل می‌گردد، آموزش‌های لازم را ببینند.
- فعالیت‌هایی که باعث تولید آئروسل می‌شوند شامل موارد زیر است:

بازکردن درِ ظرف حاوی نمونه، تهیه گستره مستقیم، سوزاندن لوپ فلزی، کار بر روی ظروف حاوی نمونه نشت کرده و یا آسیب دیده، مخلوط-کردن و هم زدن نمونه، برداشت مایعات با پی‌پت و سمپلر، داخل کردن لوپ فلزی یا لام **مرطوب** به درون شعله، ریختن و پاشیدن مواد آلوده.

- در صورت استفاده از سرنگ، باید سرنگ و سر سوزن با رعایت نکات ایمنی در **سیفتی باکس** انداخته شود.
- توصیه می‌شود تهیه گستره در داخل کابینت ایمنی بیولوژیک کلاس II بر روی سینی فلزی انجام شود. همچنین سطح سینی با کاغذ جاذب آغشته به الکل ۷۰ درصد پوشانده شود. اجازه دهید گستره‌های تهیه شده در داخل کابینت ایمنی بیولوژیک به طور کامل خشک شوند. برای خشک کردن از نور مستقیم خورشید یا شعله استفاده نکنید. **پس از خشک شدن کامل، گستره‌ها بلافاصله فیکس شوند تا از آزاد شدن باسیل‌ها از سطح گستره جلوگیری شود.**

[11] National Accreditation Center of Iran

برای تهیه گستره باید از اپلیکاتور چوبی یا لوپ یک‌بار مصرف استفاده نمود. پس از استفاده، آنها را در سیفتی باکس حاوی محلول سفید کننده خانگی رقیق شده با آب به نسبت ۱ به ۱ (یک حجم سفید کننده خانگی به اضافه یک حجم آب، معادل 25000 ppm) غوطه ور نمایید. درِ سیفتی باکس را قبل از خروج از کابینت ایمنی بیولوژیک ببندید. محلول سفید کننده خانگی را در شرایط ایمن تخلیه نمایید.

منظور از شرایط ایمن، الزامی بودن استفاده کاربر آزمایشگاه از وسایل و پوشش های حفاظت فردی کامل (شامل ماسک N95، گان، دستکش، عینک /شیلد) در هنگام تخلیه محلول سفید کننده است. همچنین قبل از تخلیه اطمینان حاصل کنید که تمامی وسایل در محلول سفید کننده خانگی غوطه ور باشند، درغیر اینصورت محلول سفید کننده خانگی رقیق شده با آب به نسبت ۱ به ۱ را در سیفتی باکس برای حداقل زمان ۳۰ دقیقه بریزید. قسمت تخلیه مجهز به هواکش قوی باشد. سپس سیفتی باکس را داخل کیسه مخصوص اتوکلاو قرار داده و در پایان هر شیفت‌کاری طبق دستورالعمل امحاء پسماندهای عفونی اتوکلاو کنید[۱۲] .

توجه:

- سیفتی باکس با میزانی از سفید کننده خانگی پر شود که قسمت آلوده سواب و لام در آن غوطه‌ور شوند. قبل از تخلیه سیفتی باکس از غوطه ور شدن مواد داخل آن اطمینان حاصل شود.
- مواد شیمیایی سمی، مواد خورنده[۱۳] (مانند اسیدها، بازها، فنل‌ها)، حلال‌ها یا بخارات فرار (مانند اتانول، متانول، استون، کلروفرم)، موجود در پسماند **نباید اتوکلاو شوند**.
- مواد شیمیایی بسیار فرار می‌توانند در اثر حرارت تبخیر، منتشر و مشتعل شوند.
- قبل از اتوکلاو سیفتی باکس، محلول سفید کننده خانگی در شرایط ایمن به آرامی تخلیه شود. سفیده کننده‌ها می‌توانند موجب آتش-سوزی، انفجار و تخریب اتوکلاو شوند.
- پسماندهای بخش سل در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت **۴۵-۳۰ دقیقه** اتوکلاو شوند (۷).

امکانات آزمایشگاهی

- اتاق/ بخش سل باید جدا باشد یا ترجیحاً در یک ساختمان جداگانه قرار داشته باشد. در داخل بخش سل مناطق آلوده (کابینت ایمنی بیولوژیک) و غیر آلوده (میکروسکوپ) با پارتیشن‌بندی تا سقف از یکدیگر تفکیک شوند.
- کابینت‌های ایمنی بیولوژیک باید دور از مناطق رفت و آمد تعبیه شوند.

توجه: جریان هوای در، پنجره، کولر و سیستم‌های تهویه از جمله جریان‌های هوایی مختل کننده عملکرد کابینت‌های ایمنی بیولوژیک هستند.

- می توان سیستم سرمایشی را بالای درِ ورودی نصب نمود تا در عملکرد کابینت ایمنی بیولوژیک اختلال ایجاد نکند.
- حجم هوای ورودی به اتاق/ بخش سل با حجم هوای خروجی متناسب باشد بطوریکه هیچ هوایی از اتاق خارج نشود.
- بخش سل باید به گونه‌ای طراحی شده باشد تا از نشت آئروسل‌های عفونی به اتاق‌های مجاور جلوگیری شود.
- در زمان رنگ‌آمیزی زیل نلسن به دلیل ایجاد بخار فنل در زمان حرارت دادن لام، باید هواکش مستقلی وجود داشته باشد که در حین رنگ-آمیزی روشن شود.

توجه: در زمان روشن بودن کابینت ایمنی بیولوژیک هواکش اتاق باید خاموش باشد تا در جریان هوای اتاق اختلال ایجاد نکند.

---

[۱۲] دستورالعمل نحوه مدیریت پسماندهای عفونی درآزمایشگاه پزشکی. دکتر شهلا فارسی. وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، آزمایشگاه مرجع سلامت

13 Corrosives

- اطراف تجهیزات باید فضای کافی برای نظافت و نگهداشت باشد.
- جنس کف، دیوارها و سطوح اتاق‌ها باید مناسب و قابل تمیز کردن باشد و در برابر مایعات نفوذناپذیر و به مواد شیمیایی و ضدعفونی‌کننده‌ها مقاوم باشد.
- رویه صندلی‌ها باید در برابر آب نفوذ ناپذیر و در برابر مواد ضدعفونی کننده، اسیدها، بازها و حلال‌های آلی مقاوم باشند.
- روشنایی اتاق‌ها باید کافی باشد. همچنین از تابش و انعکاس خیره کننده نور اجتناب شود.
- سینک مجهز به شیر آب پدالی یا کنترلی (بدون دخالت دست) برای شستشوی دست‌ها، نزدیک به درِ خروجی تعبیه شده باشد. **این سینک جدا از سینک رنگ‌آمیزی است.**
- اتوکلاو برای رفع آلودگی مواد عفونی باید در آزمایشگاه موجود باشد.
- سیستم‌های ایمنی مدیریت خطرات آتش‌سوزی و حوادث الکتریکی وکمک‌های اولیه باید در آزمایشگاه موجود باشد.
- توصیه می‌شود کابینت‌های ایمنی بیولوژیک مجهز به سیستم برق پشتیبان باشند تا در صورت قطع ناگهانی برق هنگام کار در داخل کابینت ایمنی بیولوژیک، هوای داخل کابینت به سمت کاربر پس نزند. بعضی از انواع کابینت های ایمنی بیولوژیک کلاس II نوع B2 بسته به قدرت و تعداد موتور به برق سه فاز خانگی نیازمند است، در این موارد باید سیستم برق پشتیبان متصل به برق سه فاز تهیه شود.

الزامات ایمنی در هنگام کار با مواد شیمیایی (اسید، فنل و غیره):

- کارکنان آزمایشگاه سل به موازات خطرات زیستی، در معرض خطرات شیمیایی نیز می‌باشند.
- باید بر اساس برنامه ارزیابی ریسک، شناسایی، برچسب گذاری و طبقه بندی مواد شیمیایی موجود در آزمایشگاه شامل سود، اسید، فنل و سایر مواد انجام شده باشد و اقدامات کنترلی، حفاظتی، پیشگیرانه و اصلاحی تدوین و اجرا گردد.
- قبل از استفاده از هر ماده شیمیایی باید برگه اطلاعات ایمنی (MSDS[۱۴] or SDS[۱۵]) آن ماده مطالعه شود و خطرات و نکات ایمنی در نظر گرفته شده و اجرا گردد. برگه اطلاعات ایمنی مواد شیمیایی را می توان از وب‌سایت شرکت تولیدکننده یا تأمین‌کننده، مسئول HSE آزمایشگاه و یا از طریق جستجوی اینترنتی در پایگاه های داده عمومی بدست آورد.
- درصورت تهیه مواد شیمیایی ترکیبی و یا انتقال این مواد از ظرف اصلی به ظرف ثانویه، اطلاعات شامل نام فرد سازنده، نام ماده، تاریخ ساخت، تاریخ انقضاء و شماره ارجاع اطلاعات ایمنی (SDS or MSDS)، روی ظرف ثانویه درج شود.
- برای کاهش خطرات مواجهه با بخارات سمی فنل و محلول‌های رنگ‌آمیزی حاوی فنل، باید این مواد در مکانی با تهویه مناسب و یا داخل کابینت شیمیایی (Fume Hood) تهیه شوند.
- در هنگام کار با اسید و یا سایر مواد شیمیایی خطرناک باید از پوشش‌ها و وسایل حفاظت فردی مانند دستکش مقاوم، عینک ایمنی یا محافظ صورت و گان مقاوم به نفوذ مایعات استفاده نمود.
- برای توزین پودرهای شیمیایی، باید از پوشش و وسایل حفاظت فردی مناسب استفاده شود. ترجیحاً از ترازوهای اتاقک‌دار استفاده نمود. همچنین توصیه می‌شود ترازو در هنگام توزین **داخل کابینت شیمیایی قرار گیرد** و پس از پایان توزین، کابینت روشن تا مواد آلوده خارج شود.
- بعد از اتمام کار باید، تمام سطوح کاری تمیز شود.

[14] Material Safety Data Sheet
[15] Safety Data Sheet

توجه: در صورت ریخته شدن اسید، لباس و پوشش‌های آلوده را درآورید و سریعاً نواحی آلوده را برای رقیق کردن ماده شیمیایی و پاک کردن آن، به مدت طولانی با آب فراوان شستشو دهید (حداقل ۱۵ دقیقه). در صورت آسیب دیدگی به مرکز درمانی مراجعه نمایید.

روش‌ها

بر اساس ارزیابی ریسک آزمایشگاه، باید مجموعه‌ای از دستورالعمل‌های استاندارد (SOP) برای استقرار و اجرای الزامات ایمنی تدوین گردد. همچنین به عنوان یک قاعده موارد زیر رعایت شود:

- پیپت‌کردن از راه دهان اکیداً ممنوع است.
- تمام مراحل فنی باید به گونه‌ای انجام شود که ایجاد آئروسل‌ها و قطرات معلق در هوا را به حداقل برساند. باید از استفاده از هر گونه اجسام تیز و برنده مانند سوزن اجتناب شود.
- هرگونه حادثه مانند پاشیدن و قرار گرفتن در معرض مواد عفونی قطعی یا محتمل باید ثبت و به مسئولین (افسر ایمنی، سوپروایزر،...) گزارش شود. سوابق کتبی این گونه حوادث و اقدامات انجام شده (شامل اقدامات اصلاحی که برای جلوگیری از وقوع حوادث مشابه در آینده انجام خواهد شد) باید در آزمایشگاه نگهداری شود.
- در صورت پاشیدن تصادفی مواد عفونی و احتمال در معرض قرارگرفتن کارکنان با مایکوباکتریوم، اقدامات ضروری بر اساس دستورالعمل‌های ایمنی انجام شود. ارجاع فرد به متخصص عفونی صورت گیرد تا اقدامات پیشگیرانه و در صورت نیاز پروفیلاکسی دارویی آغاز شود. ثبت و نگهداری کلیه سوابق پزشکی فرد در آزمایشگاه الزامی است.
- دستورالعمل مکتوب برای گندزدایی هرگونه مواد عفونی پاشیده شده در دسترس باشد[۱۶]. کلیه کارکنان باید به طور منظم آموزش ببینند و دانش و آگاهی لازم را براساس تمام دستورالعمل‌های ایمنی بیولوژیک داشته باشند.
- جعبه اضطراری پاشیدن (Spill Emergency Kit) با تمام مواد مورد نیاز برای انجام اقدامات فوری در صورت پاشیدن مواد بالقوه عفونی، در آزمایشگاه تهیه شود و یا در صورت امکان به صورت تجاری خریداری گردد. این جعبه باید حداقل شامل پارچه تنظیف یا حوله جاذب رطوبت مانند حوله کاغذی، دستکش، مواد ضدعفونی‌کننده (سفید کننده خانگی یا هیپوکلریت ۵ درصد)، کیسه مخصوص پسماند عفونی و سیفتی باکس باشد (شکل شماره ۳). ضروری است که محلول سفید کننده خانگی بر اساس دستورالعمل و به صورت هفتگی تهیه شود.
- حاشیه پاشیده شدن مواد عفونی تا چند برابر شعاع قابل مشاهده، توسط پارچه تنظیف و محلول ضدعفونی‌کننده پوشانده شود. برای جلوگیری از ایجاد آئروسل، محلول ضدعفونی‌کننده به آرامی از کناره‌ها بصورت دایره‌وار از سمت خارج به سمت داخل (مارپیچی) ریخته تا تمام منطقه آلوده پوشانده شود. با این روش حداقل آئروسل ایجاد می‌شود. حداقل زمان ضدعفونی نیم ساعت است که بسته به نوع ماده ضدعفونی‌کننده زمان آن می‌تواند بیشتر باشد.
- کارکنان بخش سل باید همیشه ماسک دومی به عنوان جایگزین به همراه داشته باشند تا در صورت لزوم از آن استفاده نمایند.
- مایعات بالقوه آلوده باید قبل از تخلیه در سیستم فاضلاب عمومی، در اتوکلاو گندزدایی شوند.

۱۶ دستورالعمل مدیریت رویداد ریختن و پاشیدن مواد آلوده عفونی (Spill Management) .دکتر شهلا فارسی. وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، آزمایشگاه مرجع سلامت

همچنین آزمایشگاه می تواند از مواد ضدعفونی کننده ضد سل[17] مورد تایید اداره کل غذا و داروی کشور به جای هیپوکلریت سدیم استفاده کند (فهرست مواد ضدعفونی کننده مورد تائید سازمان غذا و داروی کشور را می توان از طریق مسیر زیر در هر زمان تهیه کرد:

مراجعه به سایت سازمان غذا و داروی کشور fda.gov.ir، اداره کل امور دارو و مواد تحت کنترل، آمار و اطلاعات اداره کل امور دارو و مواد تحت کنترل، سپس به آمارنامه ملزومات دارویی مراجعه و آخرین ویرایش آن را دانلود کرده و فهرست مواد ضد عفونی به همراه کد IRC[18] هر یک از مواد ضدعفونی کننده را مشاهده کرد).

شکل شماره ۳. نمونه‌ای از جعبه اضطراری پاشیدن مواد عفونی

17 TB cidal (Tuberculocidal)
18 Iran Registration Code

سفید کننده خانگی یا همان هیپوکلریت سدیم (که برند وایتکس معروف‌ترین آن است)، یک مایع سفید کننده و ضدعفونی کننده قوی است که برای از بین بردن باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها به‌کار می‌رود. این ماده بیشترین کاربرد را در مصارف خانگی و صنعتی دارد و معمولاً برای ضدعفونی سطوح، سفید کردن لباس‌ها، از بین بردن بوهای نامطبوع و پاکسازی محیط استفاده می‌شود. سفید کننده خاصیت میکروبکشی گسترده‌ای دارد و برای ضدعفونی مراکز درمانی، آزمایشگاه‌ها و اماکن عمومی نیزکاربرد دارد. برای استفاده ایمن، معمولاً سفید کننده خانگی را با آب سرد رقیق می‌کنند؛ به عنوان مثال نسبت یک به ۹۹ (یک واحد سفید کننده خانگی به ۹۹ واحد آب) برای ضدعفونی عمومی سطوح توصیه می‌شود.

استفاده از این محلول باید با رعایت نکات ایمنی و در محیط دارای تهویه مناسب باشد، زیرا گازهای آزاد شده می‌توانند مضر باشند. همچنین تولیدکنندگان توصیه می‌کنند هنگام رقیق‌سازی ابتدا آب را داخل ظرف بریزید و سپس سفید کننده خانگی را اضافه کنید. وجود مواد آلی (مانند خون، پروتئین‌ها و سایر ترکیبات آلی) می‌تواند قدرت ضدعفونی سفید کننده خانگی را کاهش دهد. این مواد با یون‌های کلر فعال واکنش می دهند و باعث کاهش کلر آزاد مؤثر، در محلول می‌شوند که برای غیر فعال‌سازی میکروارگانیسم‌ها ضروری است. مواد معدنی موجود در آب، به ویژه سختی آب که شامل کلسیم و منیزیم است، معمولا تأثیر قابل توجهی بر قدرت ضدعفونی سفید کننده خانگی ندارند.

مقدار کلر موجود در محلول‌های سفید کننده خانگی معمولاً بین **۵** تا **۶/۱۵** درصد هیپوکلریت سدیم است. این مقدار برابر با

ppm ۶۱۵۰۰ -۵۰۰۰۰ کلر فعال است.

برای استفاده معمول از ضدعفونی کننده، معمولاً محلول سفیدکننده را رقیق می‌کنند تا غلظت کلر مطلوب، برای میکروب‌کشی حاصل شود. برای تهیه غلظت‌های کم‌تر، باید آن را بر اساس روش زیر رقیق نماییم:

- **تهیه محلول سفید کننده ppm ۱۰۰۰ (٪۲ از سفید کننده خانگی)**

  ۲۰ میلی‌لیتر سفید کننده خانگی ۵٪ + ۹۸۰ میلی‌لیتر آب = یک لیتر محلول ۲٪ از سفید کننده خانگی
- **تهیه محلول سفید کننده ppm ۵۰۰ (٪۱ از سفید کننده خانگی)**

  ۱۰ میلی‌لیتر سفید کننده خانگی ۵٪ + ۹۹۰ میلی‌لیتر آب = یک لیتر محلول ۱٪ از سفید کننده خانگی

نکات مهم:

- غلظت سفید کننده خانگی برای کشتن *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* بر روی سطوح باید حداقل ppm ۱۰۰۰ (٪۲ از محلول سفید کننده خانگی) باشد.
- محلول‌های هیپوکلریت سدیم رقیق شده اگر در ظروف دربسته، مات و در محیطی خنک و دور از نور نگهداری شوند، می‌توانند سه تا هفت روز پایداری داشته باشند و اثربخشی ضد میکروبی خود را حفظ کنند، اما توصیه می شود طی۲۴ ساعت از آن استفاده کنید، چون کلر فعال با گذشت زمان کاهش می‌یابد.
- همیشه سفید کننده خانگی را به آب اضافه کنید و نه برعکس. همچنین از آب سرد استفاده کنید.
- محلول را در ظرف تیره و دردار نگه دارید.
- از دستکش و تهویه مناسب استفاده کنید.

پوشش‌ها و وسایل حفاظت فردی(PPE)

هنگام کار در کابینت ایمنی بیولوژیک استفاده از ماسک N95، گان، کاور کفش، دستکش و کاور آستین ضروری است.

روپوش آزمایشگاهی به تنهایی کافی نیست و حتما باید از گان یک‌بار مصرف با آستین کش‌دار یا آستین دو سرکش‌دار استفاده شود. دستکش باید روی آستین را بپوشاند.

توجه: روپوش آزمایشگاهی بخش سل مخصوص همان بخش است و نباید از بخش سل خارج شود. وظیفه شستشوی روپوش‌های آزمایشگاهی بخش‌های میکروب شناسی و سل به عهده آزمایشگاه/مراکز درمانی می‌باشد. روپوش‌های بخش میکروب شناسی و سل باید بر اساس بارکاری نیز به طور منظم شسته شوند. در صورت آلوده شدن به هنگام کار، تعویض و بلافاصله شسته شوند.

- از دستکش‌های یک‌بار مصرف نوع لاتکس، وینیل یا نیتریل مناسب برای کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی استفاده شود. برای موارد کم خطر می توان از دستکش وینیل استفاده کرد.
- برای جلوگیری از آلودگی لباس‌ها از گان‌های ضد آب استفاده شود.
- برای جلوگیری از پاشیدن مواد عفونی بر روی کفش از کاور کفش استفاده شود.
- از محافظ صورت برای پوشش تمام صورت در برابر پاشیدن مواد عفونی استفاده شود. محافظ صورت هنگام حادثه به راحتی از روی صورت برداشته می شود.
- عینک‌های Goggles دارای لنز مقاوم به ضربه می‌باشند. این عینک‌ها روی عینک‌های طبی را می‌پوشانند و دارای محافظ‌های جانبی هستند. این نوع عینک از ورود آئروسل‌ها به درون چشم نیز جلوگیری می‌کند. استفاده از آنها در حین کشت باکتری ضروری است.
- عینک ایمنی (Safety Spectacles) دارای لنز مقاوم به ضربه می‌باشد. این نوع عینک روی عینک‌های طبی را می‌پوشاند و فاقد محافظ جانبی است.

در جدول شماره ۳، اقتباس شده از راهنمای ایمنی زیستی آزمایشگاهی سازمان جهانی بهداشت (W.H.O)، نمونه‌هایی از لباس و تجهیزات حفاظت فردی برای پرسنل آزمایشگاه سل فهرست شده است (۲).

جدول شماره۳. وسایل/ تجهیزات حفاظت فردی مورد نیاز

وسایل (تجهیزات)	مخاطره اصلاح شده	ویژگی‌های تجهیز ایمنی
روپوش‌های آزمایشگاهی،گان‌ها، کاورها،	آلودگی لباس	کاملا جلو بسته هستند و از پشت باز می‌شوند. بر روی لباس‌های معمول پوشیده می-شود.
پیش‌بندهای پلاستیکی	آلودگی لباس	ضد آب هستند.
پوشش‌های کفش	تماس و پاشیدن	جلو بسته هستند.
Goggles	تماس و پاشیدن	دارای لنز مقاوم به ضربه می‌باشند. این عینک‌ها روی عینک‌های طبی را می‌پوشانند و دارای محافظ‌های جانبی هستند. این نوع عینک از ورود آئروسل‌ها به درون چشم نیز جلوگیری می‌کند. استفاده از آنها در حین کشت باکتری ضروری است.
عینک‌های ایمنی (Safety Spectacles)	تماس	دارای لنز مقاوم به ضربه می‌باشد. این نوع عینک روی عینک‌های طبی را می‌پوشانند و فاقد محافظ جانبی است.
محافظ‌های صورت	تماس و پاشیدن	محافظت از تمام قسمت‌های صورت، این محافظ‌ها در صورت وقوع حادثه به راحتی قابل جا به جا شدن است.
رسپیراتورها (محافظ تنفسی مانند ماسک N95)	استنشاق آئروسل	مدل‌های موجود شامل : ماسک‌های فردی یک بار مصرف N95 بدون سوپاپ ماسک‌های پیشرفته دارای فیلتر هپا از نوع (PAPR)[۱۹]
دستکش‌ها	تماس مستقیم با میکروارگانیسم، بریدگی‌ها	از دستکش‌های یک‌بار مصرف نوع لاتکس، وینیل یا نیتریل مناسب برای کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی استفاده شود. برای موارد کم خطر می‌توان از دستکش وینیل استفاده کرد. دستکش‌های محافظ در برابر سرما، گرما و اجسام تیز (Mesh Gloves)

کارکنان

حفظ محیط کاری ایمن بر عهده همه کارکنان است. اگر کارکنان آزمایشگاه اصول ایمنی زیستی را نادیده بگیرند، حتی پیشرفته‌ترین تجهیزات ایمنی زیستی در اجرا با شکست مواجهه می‌شود. توصیه می‌شود کارکنان فنی و با تجربه در برنامه‌ریزی، آموزش و اجرای برنامه ایمنی زیستی آزمایشگاه مشارکت داشته باشند.

برنامه آموزشی ایمنی زیستی باید به صورت سالانه به همه کارکنان ارائه شود تا باعث ارتقای دانش کارکنان در برنامه‌های کنترل عفونت گردد. کارکنان جدید و همچنین دانشجویان و/ یا پژوهشگران بازدید کننده باید از کلیه قوانین و الزامات ایمنی قبل از شروع به کار در آزمایشگاه مطلع شوند. کارکنان تازه کار، هرگز نباید به طور مستقل در آزمایشگاه فعالیت کنند و باید توسط کارکنان مجرب راهنمایی شوند. توصیه می-

[19] Hooded Powered Air Purifying

شودکارشناس مسئول بخش سل آنها را از کلیه قوانین و مقررات حاکم بر آزمایشگاه آگاه کند و قبل از شروع کار آزمایشگاهی با عامل بیماری زا، دانش آنها را ارزیابی نماید. دستورالعمل‌های مرتبط با فوریت‌های پزشکی و مواجهه تصادفی با عوامل عفونی باید در آزمایشگاه وجود داشته باشد (۸). تمام حوادث گزارش شده باید به طور کامل مورد پیگیری قرار گیرند. این کار باید با همکاری مناسب انجام شود تا کارکنان جزئیات را پنهان نکرده و انگیزه بیشتری به گزارش تصادف[۲۰] و حادثه[۲۱] در آینده داشته باشند. اقدامات اصلاحی و پیشگیرانه باید مستند گردد و در دسترس باشد.

دستیابی و نگهداری یک محیط کار ایمن بر عهده تمام کارکنان است. قوانین باید به گونه‌ای تطبیق داده شوند که همه کارکنان به مقررات بومی ملی و بین‌المللی پایبند باشند.

وظایف خاص آزمایشگاهی مرتبط با مخاطرات

همانطور که در بالا ذکر شد، خطر عفونت‌های آزمایشگاهی ناشی از *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* به غلظت باکتری و ایجاد احتمالی آئروسل‌های عفونی مرتبط است.

اقدامات ایمنی زیستی همیشه باید بر اساس ارزیابی ریسک باشد. در اینجا چند نمونه ذکر شده است:

- **جابجایی ظروف حاوی نمونه‌های بالینی.** با توجه به احتمال زیاد آلودگی ظرف حاوی نمونه هنگام نمونه‌گیری، باید این ظروف با شرایط ایمن به آزمایشگاه انتقال یابندکه شامل این موارد است: قرار دادن در جعبه‌های مخصوص حمل نمونه خلط یا ترجیحاً ظروف سه لایه یا در صورت عدم دسترسی به موارد قبلی داخل زیپ کیپ ضخیم همراه با دستمال جاذب (مانند دستمال کاغذی).
- **سانتریفیوژ.** ممکن است محتویات لوله‌های فالکون پلاستیکی از باکت سانتریفیوژ بیرون بریزد و آئروسل‌ها آزاد شوند. به همین منظور فقط باید از سانتریفیوژهای دارای باکت‌های درپوش‌دار (دارای کاپ) و لوله‌های سانتریفیوژ مناسب و ایمن استفاده نمود. همچنین کاپ‌های سانتریفیوژ را فقط درکابینت ایمنی بیولوژیک باز نمود.
- **پیپت کردن.** پیپت‌ها و پیپت‌های پاستور یک‌بار مصرف پلاستیکی به‌طور خاص حباب‌هایی تولید می‌کنند که می‌ترکند و آئروسل‌ها را تشکیل می‌دهند. بنابراین پیپت کردن باید همیشه در کابینت‌های ایمنی بیولوژیک و با استفاده از پیپت‌های یک‌بار مصرف پلاستیکی انجام شود. پیپت کردن از طریق دهان اکیدا ممنوع است.
- **هموژن سازی مکانیکی (ورتکس کردن، آسیاب کردن[۲۲]، مخلوط کردن[۲۳]).** روش‌های مناسب برای جلوگیری از ایجاد آئروسل‌ها باید وجود داشته باشد. همگن سازی مکانیکی باید همیشه در داخل کابینت ایمنی بیولوژیک انجام شود، با این وجود خطر ایجاد آئروسل وجود دارد.

---

[۲۰] حادثه (Incidence): رویدادی است که پتانسیل قرار گرفتن کارکنان آزمایشگاه در معرض عوامل بیولوژیکی و/یا انتشار آنها در محیط را دارد یا منجر به آن می‌شود، که ممکن است به آسیب واقعی منجر شود یا نشود. مانند عدم استفاده از دستکش در هنگام جابجایی نمونه‌های عفونی.

[۲۱] تصادف (Accident): یک رویداد غیرعمدی است که منجر به آسیب واقعی مانند عفونت، بیماری، جراحت در انسان یا آلودگی محیط زیست می‌شود. مانند نیدل استیک شدن یا پاشیدن مواد عفونی.

[22] Grinding
[23] Blending

توجه. از روش های سونیکاسیون، حرارت دادن، یا جوشاندن نمونه‌ها به عنوان مثال برای استخراج اسیدهای نوکلئیک نباید استفاده شود و می‌توان از کیت‌های تجاری و روش‌های شیمیایی استفاده نمود.

• **استفاده از لوپ‌های باکتریولوژی**. لوپ های فلزی آلوده شده با مواد عفونی به دلیل خطر پاشیده شدن و ایجاد آئروسل‌ها نباید مستقیماً در شعله چراغ Bunsen وارد شوند. شعله نباید در کابینت‌های ایمنی بیولوژیک استفاده شوند زیرا شعله جریان هوای داخل کابینت را مختل می-کند و باعث سوختن فیلتر هپا می‌شود. باید از لوپ‌های پلاستیکی یک‌بار مصرف یا لوپ فلزی همراه با لوپ سوز الکتریکی استفاده نمود.

فصل دوم

جمع آوری نمونه

جمع‌آوری و انتقال نمونه.

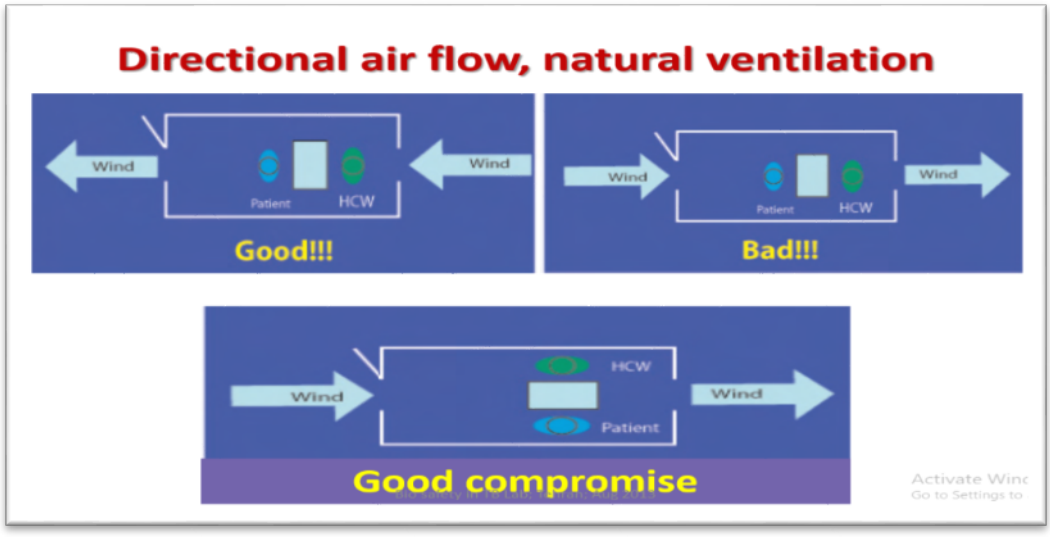
برای تشخیص گونه‌های مایکوباکتریوم بر اساس بررسی میکروسکوپی گستره، می‌توان طیف وسیعی از نمونه‌های زیستی را استفاده نمـود. خلـط رایج‌ترین نمونه مورد استفاده برای تشخیص سل ریوی است دستورالعمل‌های کتبی نمونه‌گیری صـحیح خلـط بـرای تشـخیص سـل را بایـد در اختیار بیماران قرار داد.

- برای یافتن مناسب باسیل‌های سل در نمونه خلط، باید حداقل دو نمونه خلط را برای تهیه گستره و بررسی میکروسکوپی جمع‌آوری نمود.
- نمونه‌های ابتدای صبح حاوی بیشترین تعداد باسیل‌های اسید فست هستند. با این وجود، ثابت شده است که نمونه‌های تشخیصی خوب را می‌توان در هر زمان جمع‌آوری کرد.
- نمونه خون برای بررسی باسیل اسید فاست مناسب نیست.

توجه: در صورت وجود خون در نمونه در زمان رنگ آمیزی گستره، این خون با رنگ متیلن بلو ایجاد زمینه قهوه ای رنگ می کند که در اینصورت پیدا کردن باسیل اسید فست دشوار می شود هرچند که رگه های خون می تواند حاوی باسیل سل بیشتری باشد.

- به دلیل تشخیص مکرر مایکوباکتریوم‌های ساپروفیت کلونیزه شده در مجاری ادراری -تناسلی، انجام روتین آزمایش میکروسکوپی گستره برای نمونه‌های ادرار توصیه **نمی‌شود.**
- نمونه‌گیری باید در فضای باز، خارج از آزمایشگاه و دور از دیگر افراد انجام شود.
- در هنگام نمونه‌گیری برای بیماران بستری، روبروی بیمار قرار نگیرید و نمونه‌گیری در فضای دارای تهویه مناسب انجام شود.

توجه. جمع‌آوری خلط هرگز نباید در داخل آزمایشگاه و یا محیط‌های بسته (سرویس‌های بهداشتی، اتاق‌های انتظار، اتاق پذیرش، مکان‌های فاقد تهویه مطلوب) انجام شود. زیرا آئروسل‌های عفونی تولید شده موجب انتقال بیماری به سایرین خواهد شد (شکل شماره ۴).



شکل شماره ۴. مسیر جریان هوا در بخش نمونه‌گیری (HCW= Healthcare Worker)

- بیمار در حین نمونه‌گیری راحت و آرام باشد و ۲ تا ۳ مرتبه نفس عمیق بکشد.
- بیمار با تنفس عمیق، خلط را از عمق ریه‌ها خارج نماید.

- نمونه باید در ظرف تمیز، دهان گشاد درپیچ‌دار (با قطر دهانه ۵ سانتی‌متر) و با حجم مناسب (۸۰-۵۰ میلی‌لیتر)، شفاف، مقاوم و غیر قابل نشت جمع‌آوری شود (شکل شماره ۵). جنس ظرف از پلاستیکی باشد که در اتوکلاو تخریب شود (مانند ظرف‌های استریل کشت ادرار).
- **برای جلوگیری از آلودگی جدار ظرف، نباید ظروفی با قطر دهانه کمتر از ۳/۵ سانتی‌متر بکار رود. به هیچ وجه از لوله‌های فالکون برای جمع‌آوری نمونه استفاده نشود،** زیرا جمع‌آوری خلط درآن دشوار است و باعث آلوده شدن قسمت بیرونی و درِ ظرف با نمونه خواهد شد.

شکل شماره ۵. ظرف استاندارد جمع‌آوری نمونه خلط

- بیمار پس از جمع‌آوری نمونه، درِظرف نمونه را محکم ببندد.
- برای بیماران تحت درمان، نمونه‌ها باید در فواصل زمانی مشخص شده مطابق با الگوریتم تشخیص سل ریوی بدین صورت که یک نمونه در هنگام اولین مراجعه بیمار به آزمایشگاه و نمونه دوم ابتدای صبح روز بعد، جمع‌آوری و تحویل داده شود.

شکل شماره ۶. نمونه‌گیری در فضای بسته آزمایشگاه امکان انتقال بیماری از طریق تولید و انتشار آئروسل را بیشتر می کند

- نمونه خوب باید تقریباً ۵-۳ میلی‌لیتر حجم داشته باشد.
- نمونه‌های خلط باید غلیظ و مخاطی یا شفاف ولی با دانه‌های چرکی باشند. رنگ نمونه از سفید مات تا سبز متغیر است. نمونه‌های خونی ظاهری قرمز یا قهوه ای دارند (شکل شماره ۷).

شکل شماره ۷ . مقایسه نمونه خلط و آب دهان (نمونه اول از سمت راست مناسب نمی باشد)

توجه: بزاق شفاف (آب دهان) یا ترشحات بینی، نمونه مناسب برای بررسی سل نیستند.

انتقال نمونه در جعبه‌های انتقال نمونه و بصورت امن و ایمن و در شرایط مناسب (دور از نور مستقیم آفتاب و تا حد امکان شرایط خنک) به آزمایشگاه ارسال شود (شکل شماره ۸).

شکل شماره ۸. شرایط قابل قبول انتقال نمونه

معیارهای رد و پذیرش نمونه

نمونه خلط ممکن است دارای رگه‌های خون یا کاملا خونی باشد.کیفیت نمونه‌های خلط ارسالی به آزمایشگاه، باید ارزیابی و در فرم ارجاع گزارش شود.

- اگر ظرف‌های خلط بدون برچسب مشخصات بیمار باشد و یا مشخصات برچسب محتوی نمونه با مشخصات فرم بیماریابی یا نسخه پزشک همخوانی نداشته باشد، نمونه‌گیری تکرار شود.
- در مواقعی که بیمار در گرفتن نمونه خلط مشکل دارد و مقدار نمونه کم است (کمتر از ۳ میلی لیتر)، نمونه خلط توسط آزمایشگاه انجام شده و حجم نمونه با توصیه به تکرار به پزشک اعلام شود.
- امکان یافتن باسیل اسید فست در نمونه بزاق وجود دارد. نمونه مایع شفاف (آب دهان) توسط آزمایشگاه بررسی و نتیجه گزارش شود. همچنین کیفیت پایین نمونه و حجم کم آن نیز در فرم گزارش اعلام گردد.

فصل سوم

تهیه گستره

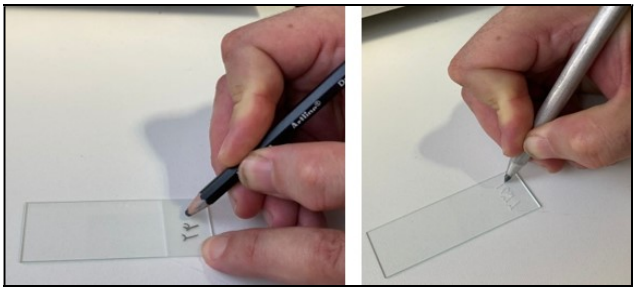
تجهیزات. لیست کامل تجهیزات مورد نیاز برای تهیه گستره و رنگ‌آمیزی در جدول شماره ۴ ذکر شده است.

جدول شماره ۴. تجهیزات مورد نیاز برای تهیه گستره و رنگ‌آمیزی

تجهیزات مورد نیاز برای تهیه گستره و رنگ‌آمیزی
ظرف نمونه‌گیری
چوب سواب پنبه‌داری که سر پنبه‌ای آن شکسته شده باشد، لوپ یک‌بار مصرف برای قرار دادن و پخش نمونه روی لام
لام میکروسکوپی رده‌دار یا ساده (نو، بدون چربی و بدون خش)
مداد نرم یا قلم الماس برای شماره‌گذاری روی لام میکروسکوپی رده‌دار و ساده
پنس بلند برای نگه داشتن لام
چراغ Bunsen یا چراغ الکلی برای فیکس کردن گستره بر روی لام
پنس بلند با سر پنبه‌ای یا فندک با لوله فلزی بلند برای ایجاد شعله متناوب زیر لام
رک (Rack) برای قراردادن لام‌ها و خشک شدن آنها در مجاورت هوا
سیفتی باکس حاوی وایتکس رقیق شده با آب به نسبت ۱ به ۱ (یک حجم سفید کننده خانگی به اضافه یک حجم آب، معادل 25000 ppm)

روش تهیه گستره

- **گستره نمونه‌ها فقط در داخل کابینت ایمنی بیولوژیک کلاس II تهیه شوند.**
- **تمام مراحل کشت، آزمایش تعیین حساسیت ضد میکروبی، تغلیظ و هضم نمونه، فقط باید درکابینت ایمنی بیولوژیک کلاس II انجام شود.**
- با استفاده از مداد یا قلم الماس، مشخصات نمونه را در انتهای لام بنویسید (شکل شماره۹).

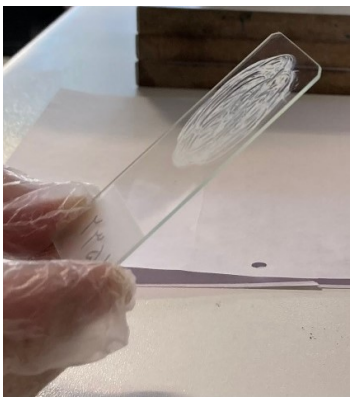


شکل شماره ۹. استفاده از مداد یا قلم الماس برای درج مشخصات نمونه بر روی لام

- برای برداشتن نمونه، ازچوب سواب پنبه داری که سر پنبه‌ای آن شکسته شده باشد برای قراردادن و پخش نمونه روی لام استفاده نمایید.

- با توجه به اینکه بیشترین تعداد باسیل‌های اسید فست در قسمت‌های چرکی زرد رنگ یا خونی خلط مشاهده می‌شوند، از این قسمت‌ها در هنگام تهیه گستره مستقیم (نمونه تغلیظ نشده) استفاده نمایید.

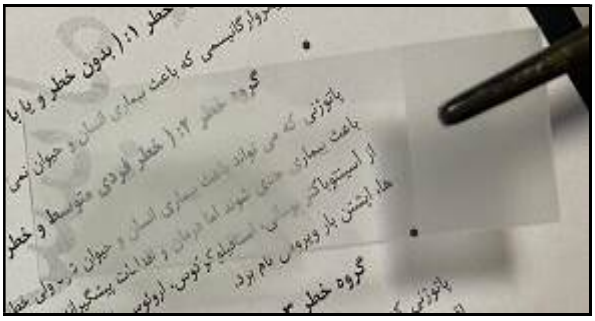
- برای تهیه گستره مناسب از خلط، با قسمت شکسته شده چوب سواب، نمونه خلط را برداشته و به خوبی به صورت بیضی روی لام پخش کنید تا گستره‌ای یکنواخت و با ضخامت مناسب بدست آید. توجه نمایید اگر مقدار نمونه بر روی لام زیاد باشد بلافاصله با یک چوب سواب دیگر ضخامت گستره را تنظیم نمایید
- گستره را به شکل بیضی و در مرکز لام تهیه کنید. این گستره باید بین ۳- ۲سانتی‌متر طول و ۲- ۱سانتی‌متر عرض داشته باشد که به شما امکان شمارش ۱۵۰-۱۰۰ میدان میکروسکوپی در یک طول شمارش از لام را می‌دهد (شکل شماره ۱۰).



شکل شماره ۱۰. اندازه مناسب گستره

توجه: گستره‌های ضخیم به علت اختلال حین مرحله رنگ‌بری در رنگ‌آمیزی، ممکن است منجر به نتایج مثبت کاذب و گستره‌های نازک منجر به نتایج منفی کاذب می شود. همچنین گستره‌های ضخیم ممکن است از روی لام کنده شوند.

- ضخامت گستره در نمونه‌های غلیظ یا چرکی بسیار مهم است وگستره نباید خیلی ضخیم یا خیلی نازک باشد. اگر قبل از رنگ‌آمیزی، گستره را به فاصله ۴ تا ۵ سانتی‌متر از یک متن چاپی نگه دارید باید حروف دیده شود اما به راحتی خوانده نشود (شکل شماره ۱۱).



شکل شماره ۱۱. ضخامت مناسب گستره

- سواب، لام و لوپ‌های پلاستیکی یک‌بار مصرف استفاده شده را در سیفتی باکس حاوی محلول سفید کننده خانگی رقیق شده با آب به نسبت ۱ به ۱ (یک حجم سفید کننده خانگی به اضافه یک حجم آب، معادل25000ppm) امحا کنید (ارجاع به صفحه ۱۳).
- برای هر نمونه از چوب سواب یا لوپ جداگانه استفاده کنید.
- **اجازه دهید گستره به طور کامل در دمای اتاق و در داخل کابین ایمنی بیولوژیک خشک شود.**

توجه: گستره مرطوب را در معرض نور مستقیم خورشید یا روی شعله خشک نکنید.

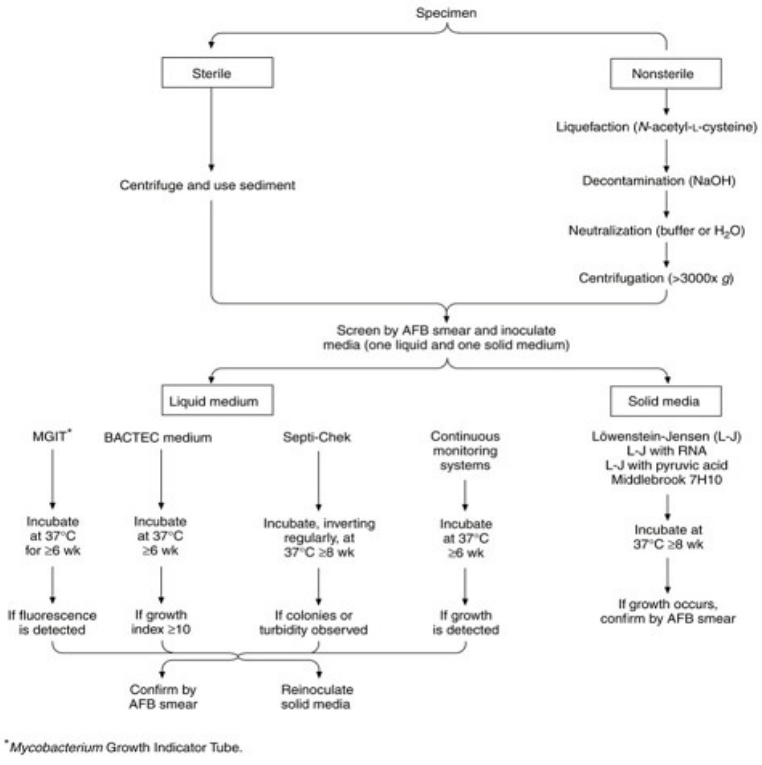
توجه: با توجه به بررسی و مشاهدات میدانی انجام شده در آزمایشگاه‌های سل کشوری، آماده‌سازی نمونه با روش هیپوکلریت سدیم ۵٪ منجر به نتایج منفی کاذب در نمونه‌های اسمیر کمتر از ۲ مثبت و عدم شناسایی بیماران می‌شود، از این رو کارگروه سل آزمایشگاه مرجع سلامت این روش را به هیچ وجه توصیه نمی کند.

تهیه گستره پس از هضم و آلودگی‌زدایی.

نمونه‌های بالینی ارسالی به بخش سل شامل دو دسته هستند: نمونه‌های استریل و غیر استریل.

نمونه‌های دستگاه تنفسی تحتانی غیر استریل شامل خلط، لاواژ برونکوآلوئولار [۲۴] (BAL) و Endotracheal Aspirate [۲۵]است که بوسیله میکروبیوتای (فلورا) تنفسی آلوده می‌شوند. نمونه‌های استریل شامل مایع سینوویال[۲۶]، CSF، نمونه‌های چرک گرفته شده از آبسه سرد[۲۷]، نمونه-های بیوپسی جراحی و مایعات حفرات داخلی بدن می‌باشند.

به علت موکوییدی بودن و میزان بالای آلودگی نمونه‌های تنفسی از جمله خلط، توصیه می‌شود نمونه‌ها همگن شوند تا در صورت وجود باسیل اسید فست در نمونه از موکوس آزاد شوند. برای آلودگی‌زدایی، هضم و تغلیظ نمونه‌ها از روش‌های پتروف، پتروف اصلاح شده و روش ان استیل ال سیستئین می‌توان استفاده کرد (۸).



فلوچارت شماره ۱. پردازش نمونه‌ها به منظور هضم، آلودگی‌زدایی و تغلیظ

۲۴ Bronchoalveolar lavage (BAL)
۲۵ Endotracheal Aspirate (ETA)
۲۶ Synovial
۲۷ Cold abscess

- **هضم و آلودگی‌زدایی نمونه‌ها با استفاده از هیدروکسید سدیم -روش پتروف اصلاح‌شده (روش پیشنهادی).**

هیدروکسید سدیم برای باسیل‌های اسید فست و میکروبیوتای (میکروفلورا) همراه نمونه، سمی است. بنابراین دقت در رعایت زمان‌های مشخص‌شده ضروری می‌باشد. این روش هضم و آلودگی‌زدایی می‌تواند فقط برای نمونه‌هایی که بر روی محیط‌های کشت جامد تلقیح می‌شوند، استفاده گردد.

معرف ها شامل:

محلول هیدروکسید سدیم(NaOH) ، ۴٪؛

بافر فسفات ۰/۰۶۷ مول/ لیتر، pH= 6.8

- **محلول هیدروکسید سدیم ۴٪ (NaOH) :**

هیدروکسید سدیم: ۴ گرم؛

آب مقطر: ۱۰۰ میلی‌لیتر.

هیدروکسید سدیم را در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل نمایید. سپس آن را در ظروف شیشه‌ای در دار قابل اتوکلاو ریخته، در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو نمایید.

- **بافر فسفات ۰/۰۶۷ مول/ لیتر، pH= 6.8**

محلول ذخیره A: دی سدیم فسفات (Na_2HPO_4) ، ۰/۰۶۷ مول/ لیتر

۹/۴۷ گرم Na_2HPO_4 بدون آب را در ۱ لیتر آب مقطر حل کنید.

محلول ذخیره B: مونو فسفات پتاسیم (KH_2PO_4)، ۰/۰۶۷ مول/ لیتر

۹/۰۷ گرم KH_2PO_4 را در ۱ لیتر آب مقطر حل نمایید.

سپس بسته به نیاز حجم مساوی از محلول ذخیره A و محلول ذخیره B را با یکدیگر مخلوط کنید. به عنوان مثال ۵۰ میلی‌لیتر از محلول ذخیره A و ۵۰ میلی‌لیتر از محلول ذخیره B را مخلوط کنید. با استفاده از دستگاه pH متر یا (در صورت عدم دسترسی) استفاده از کاغذ تورنسل، اطمینان حاصل کنید که pH=6.8 می‌باشد. در صورت تنظیم نبودن pH مراحل ساخت را بازنگری کنید. همچنین در صورت در دسترس بودن اسید فسفریک۱۰٪ و هیدروکسید سدیم ۱۰٪ ، می‌توانید از آنها برای تنظیم pH استفاده نمایید. محلول را به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو کنید.

توجه: حجم مخلوط محلول A و B را باید تازه و با توجه به نیاز تهیه نمود.

روش انجام :

۱. نمونه خلط را در **لوله‌های سانتریفیوژ پلاستیکی مدرج** (فالکون) استریل در پیچ‌دار (یک لوله برای هر نمونه) بریزید.

۲. شماره نمونه را بر روی بدنه لوله فالکون بنویسید (بر روی درِ لوله ننویسید).

۳. حجم خلط را بر روی لوله فالکون علامت بزنید (حداقل ۲ میلی‌لیتر و حداکثر ۵ میلی‌لیتر) و به حجم مساوی از نمونه به آن سود ۴٪ را اضافه کنید و در لوله را محکم ببندید.

۴. لوله را ورتکس کنید تا فرایند هضم صورت گیرد.

۵. اجازه دهید نمونه برای مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق بماند تا عمل هضم کامل شود.

۶. لوله را تا ۲ سانتی‌متر بالای آن با بافر فسفات پر کنید تا اثر سود کاملا خنثی شود.

۷. لوله را به مدت ۱۵ دقیقه با دور g ۳۰۰۰ سانتریفیوژ کنید.

۸. با دقت و یک‌باره مایع رویی را در یک در سیفتی باکس حاوی محلول سفید کننده خانگی رقیق شده با آب به نسبت ۱ به ۱ (یک حجم سفید کننده خانگی به اضافه یک حجم آب، معادلppm 25000) بریزید.

۹. مجددا رسوب را با حدود ۰/۵-۰/۳ میلی‌لیتر بافر فسفات حل کنید.

۱۰. یک قطره از رسوب را با پی‌پت پاستور پلاستیکی یک‌بار مصرف برداشته و بر روی لام شماره گذاری شده قرار داده و گستره را به شکل بیضی و در مرکز لام تهیه نمایید.

توجه: در مراحل هضم و آلودگی‌زدایی نمونه که با سانتریفیوژ و شیکر انجام می شود آئروسل تولید می‌گردد بنابراین فقط آزمایشگاه‌هایی مجاز به تغلیظ و آلودگی‌زدایی نمونه هستند که دارای کابینت ایمنی بیولوژیک کلاس II باشند. همچنین باید از سانتریفیوژهای با باگت درپوش‌دار و ورتکس داخل کابینت ایمنی بیولوژیک استفاده نمود (شکل شماره ۱۲). حفاظت فردی باید کامل و مطابق الزامات ایمنی این راهنما باشد.

شکل شماره ۱۲. سانتریفیوژ ایمن (باکت‌های درپوش‌دار)

- **هضم وآلودگی‌زدایی نمونه ها با استفاده از روش پتروف (روش رایج).**

مواد مورد نیاز: محلول سود ۴٪، محلول نرمال اسید هیدروکلریدریک - اندیکاتور فنل فتالئین یا فنل رد

روش انجام :

۱. حدود ۵ میلی‌لیتر خلط را در فالکون با حجم ۵۰ میلی‌لیتر می‌ریزیم و ۱۰ میلی‌لیتر معادل دو برابر حجم نمونه به آن سود ۴ ٪ اضافه می کنیم. در صورتیکه حجم نمونه کمتر از ۵ میلی‌لیتر بود به میزان دو برابر آن سود اضافه می‌نماییم. به عنوان مثال ۴ میلی‌لیتر نمونه و ۸ میلی لیتر سود ۴ ٪.

توجه: برای انجام صحیح عمل هضم و باز شدن نمونه و مخلوط کردن مناسب توصیه می‌شود در حجم‌های بیش از ۳ میلی‌لیتر از فالکون با حجم ۵۰ میلی‌لیتر و در حجم‌های زیر ۳ میلی‌لیتر از فالکون با حجم ۱۵ میلی‌لیتر استفاده شود.

۲. نمونه را به خوبی ورتکس نمایید تا همگن و هموژن شود و موکوس و فلور طبیعی آن از بین برود.

۳. اجازه دهید نمونه به مدت ۱۵ دقیقه در مجاورت سود در دمای اتاق بماند.

۴. نمونه برای مدت ۱۵ دقیقه با دور g ۳۵۰۰ -۳۰۰۰ سانتریفوژ کنید. مایع رویی (supernatant) را در سیفتی باکس حاوی محلول سفید کننده خانگی بریزید.

۵. بر روی رسوب یک قطره فنل فتالئین ۰/۱ ٪ بریزید تا رنگ رسوب به ارغوانی تغییر کند.

۶. به منظور خنثی شدن، قطره قطره اسید کلریدریک ۷٪ بر روی رسوب بریزید تا رسوب بی رنگ شود (pH=7). به محض بی رنگ شدن رسوب، اضافه کردن اسید را متوقف کنید. از آنجا که از این رسوب برای کشت استفاده می‌شود و رسوب باید خنثی باشد، بنابراین انجام تیتراسیون ضروری است.

۷. رسوب را با پیپت پاستور پلاستیکی برداشته و بر روی لام گستره‌ای به اندازه ۲×۱ سانتی‌متر تهیه نمایید.

هضم و آلودگی‌زدایی نمونه ها با استفاده از روش N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide (NALC-NaOH)

بهترین و موثرترین روش برای هضم و از بین بردن آلودگی نمونه‌های آلوده، روش N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide -NaOH است روش آلودگی‌زدایی با NALC-NaOH بر اساس خاصیت موکولیتیک ان-استیل ال-سیستئین است که به عامل هضم‌کننده (هیدروکسید-سدیم) این امکان را می‌دهد که با غلظت نهایی کم[۲۸] (۰/۵ درصد) موثر باشد. **نتایج کشت‌های مثبت در روش NALC بیش از سایر روش‌ها می باشد زیرا فقط** حدود ۳۰ درصد از باسیل‌های سل نمونه‌های بالینی در این روش از بین می‌روند. بدلیل پایین بودن غلظت NaOH در این روش میزان آلودگی بیشتر از سایر روش‌های آلودگی‌زدایی می باشد. انجام این روش نسبت به دو روش دیگر هضم و آلودگی‌زدایی به زمان کمتری نیاز دارد.

توجه: از آنجا که عملکرد NALC ناپایدار است، باید آن را روزانه تهیه کرد. همچنین می‌توان از کیت‌های تجاری استفاده نمود.

پس از هضم، سانتریفیوژ و خالی نمودن مایع رویی، لازم است رسوب را در بافر ۱:۱۰ رقیق شده یا آب حل نمود تا غلظت هرگونه ترکیب سمی که می‌تواند رشد باکتری سل را مهار کند، کاهش یابد. برای احتیاط رسوب را به مدت یک هفته در یخچال نگهداری کنید تا در صورت مشاهده آلودگی در کشت‌های تلقیح شده، رسوب مجددا آلودگی‌زدایی شود. در صورت وجود فریزر ۲۰ - درجه سانتی‌گراد، می‌توان رسوب را در ویال‌های استریل در پیچ‌دار ۲- ۱/۵ میلی‌لیتری فریز کرد.

[28] Low, final concentration

محلول‌های شیمیایی برای روش (N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide (NALC-NaOH:

محلول هیدروکسید سدیم-سیترات

- **محلول A:** هیدروکسید سدیم ۴ درصد

هیدروکسید سدیم (Analytical grade): ۴۰ گرم

آب مقطر: ۱۰۰۰ میلی‌لیتر

۴۰ گرم هیدروکسید سدیم را در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کنید.

توجه: کیفیت هیدروکسید سدیم بسیار مهم است زیرا هیدروکسید سدیم نامناسب می‌تواند منجر به نتایج منفی کاذب در کشت شود.

- **محلول B :** $Trisodium\ citrate\ 3H_2O$: ۲/۹۴ درصد

$Trisodium\ citrate\ 3H_2O$: ۲۹/۴ گرم

آب مقطر: ۱۰۰۰ میلی‌لیتر

۲۹/۴ گرم پودر $Trisodium\ citrate\ 3H_2O$ را در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کنید محلول‌های A و B را مخلوط کنید و در حجم‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری تقسیم بندی کنید. در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو نموده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری کنید.

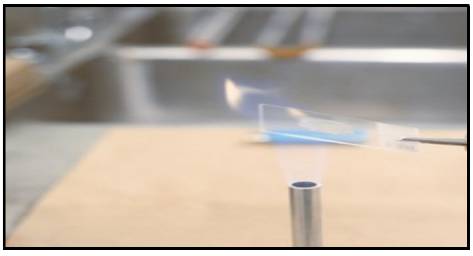
N-acetyl-L-cysteine (NALC): محلول NALC-NaOH باید تازه (روزانه) تهیه شود.

دقیقا هنگام استفاده، مقدار ۰/۵ گرم NALC را به ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول هیدروکسید سدیم-سیترات اضافه کنید و در حجم‌های ۴ میلی‌لیتری تقسیم بندی نمایید.

بافر فسفات ۰/۰۶۷ مول/ لیتر، pH=۶/۸ (به جدول بالا مراجعه شود).

فیکس کردن لام:

ارتفاع شعله باید حدود ۵ سانتی‌متر باشد. لام را با یک پنس گرفته و با زاویه ۴۵ درجه ۲ تا ۳ بار به مدت ۲ تا ۳ ثانیه به آرامی از روی شعله عبور دهید (شکل شماره۱۳). همچنین این عمل را می‌توان با استفاده از کناره لوپ سوز الکتریکی انجام داد.



شکل شماره ۱۳.فیکس کردن گستره با استفاده از شعله

شکل شماره ۱۴. لوپ سوز الکتریکی

شکل شماره ۱۵. هات پلیت

توجه: لام را برای مدت طولانی گرم نکنید یا آن را روی شعله ثابت نگه ندارید، زیرا در این صورت سطح گستره شما خواهد سوخت و منجر به نتایج منفی کاذب یا نتایج کمتر از مقدار واقعی خواهد شد. همچنین می‌توان، لام‌ها را به مدت دو ساعت روی Hot plate (۶۵ تا ۷۵ درجه سانتی‌گراد) فیکس نمود (شکل شماره ۱۵).

فصل چهارم

تشخیص و گزارش‌دهی میکروسکوپی گستره با روش رنگ‌آمیزی زیل نلسن (میکروسکوپ نوری)

توجه: در صورتیکه تعداد نمونه‌ها برای رنگ‌آمیزی زیاد یا تهویه اتاق نامناسب باشد، توصیه می‌شود از کابینت شیمیایی استفاده شود یا مراحل رنگ‌آمیزی در کنار یک هواکش قوی انجام گردد.

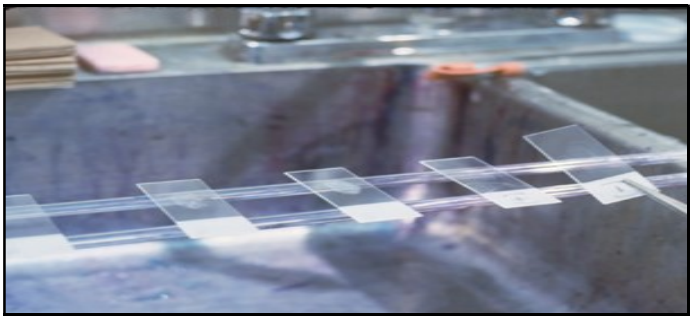
روش رنگ‌آمیزی زیل نلسن

۱- با استفاده از پنس بلند لام‌ها را بر روی رک رنگ‌آمیزی قرار دهید و توجه کنید سطح گستره رو به بالا باشد.

۲- به منظور جلوگیری از انتقال آلودگی، لام‌ها نباید به یکدیگر بچسبند و بر روی رک رنگ‌آمیزی با فاصله حداقل ۲ سانتی‌متر از هم قرار گیرند (شکل شماره ۱۶).

۳- توجه نمایید که محل قرارگیری لام‌ها (رک رنگ‌آمیزی) دارای یک سطح صاف و تراز باشند تا رنگ فوشین در حین گرمادهی از روی لام بیرون نریزد.

۴- به منظور کنترل کیفیت، باید در هر ران کاری از لام‌های کنترل مثبت و منفی استفاده نمایید.



شکل شماره ۱۶. رعایت فاصله مناسب بین لام‌ها

۵- تمام سطح لام فیکس شده را با حدود **۵ میلی لیتر** کربول فوشین بپوشانید.

۶- با استفاده از حرکت رفت و برگشتی شعله (پنس سر پنبه دار/ فندک لوله بلند فلزی) که در فاصله حدود **۵ سانتی متری** زیر لام‌ها قرار دارد، لام ها را به آرامی حرارت دهید تا بخاری از تمام سطح لام (به شکلی مشابه دم روباه) ساطع شود ولی اجازه ندهید که رنگ به جوش آید (شکل شماره ۱۷). **در این مرحله حرارت‌دهی را قطع نمایید. توجه نمایید که رنگ کربول فوشین سطح لام طی فرایند حرارت‌دهی خشک نشود.**

شکل شماره ۱۷. حرارت دادن لام‌ها به وسیله‌ی شعله

توجه: در صورتیکه مرحله حرارت‌دهی به درستی انجام نشود و یا حذف گردد منجر به نتایج منفی کاذب خواهد شد. همچنین اضافه کردن مکرر رنگ کربول فوشین پس از شروع حرارت دهی منجر به عدم رنگ پذیری مناسب باسیل ها می شود.

۷- اجازه دهید رنگ فوشین به مدت ده دقیقه روی لام باقی بماند. این زمان برای نفوذ کربول فوشین به سلول‌ها و رنگ‌آمیزی مایکوباکتری‌ها ضروری می‌باشد.

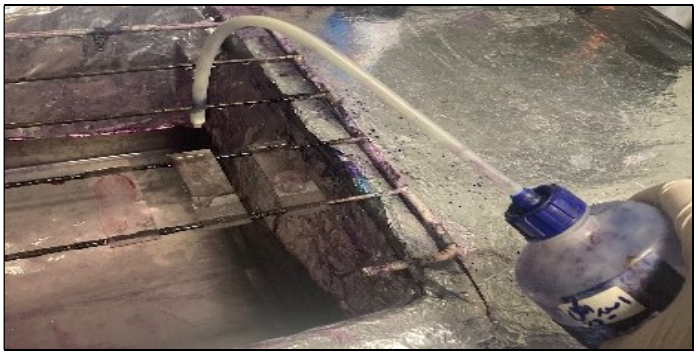
۸- پس از پایان زمان رنگ‌آمیزی با کربول فوشین، رنگ را به آرامی با آب سرد بشویید.

۹- تمام سطح لام را در دو مرحله با اسید الکل۳ درصد (هر بار یک و نیم دقیقه) رنگ‌بری کنید. بدین صورت :

الف. برای یک و نیم دقیقه اول تمام سطح لام را به آرامی با رنگ‌بر بپوشانید (در این مرحله رنگ اضافی از روی لام خارج می‌شود (شکل شماره ۱۸). سپس رنگ بر را از روی لام خارج کرده و لام را با آب بشویید.

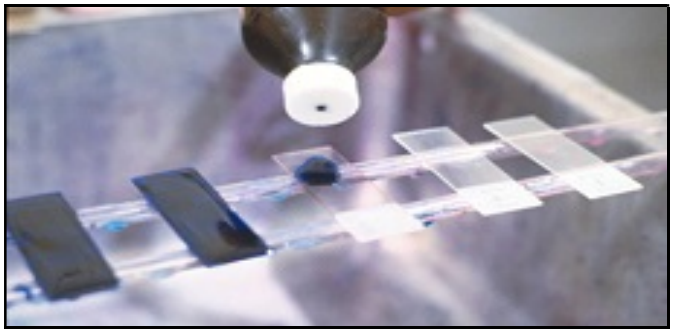
ب. برای یک و نیم دقیقه دوم تمام سطح لام را مجدد و به آرامی با رنگ‌بر بپوشانید (در مرحله دوم، رنگ‌بری باکتری‌های غیر اسید فست انجام خواهد شد). سپس رنگ‌بر را از روی لام خارج کرده و لام را با آب بشویید. این روش رنگ‌بری دو مرحله‌ای برای جلوگیری از رسوب رنگ و نتایج مثبت کاذب انجام می‌شود.

توجه: برای جلوگیری از تبخیر الکل، اسید الکل را در ظروف کاملا در بسته نگهداری کنید.



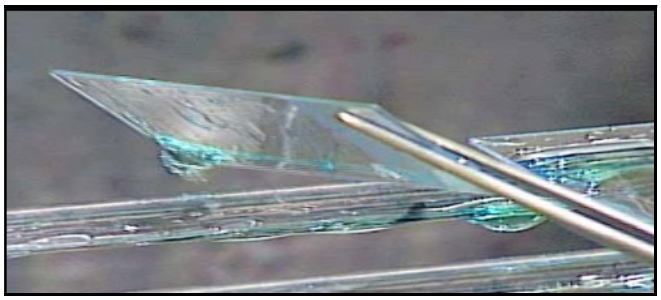
شکل شماره ۱۸. رنگ بری با اسید الکل

۱۰- تمام سطح لام را بطور کامل با رنگ متیلن بلو به مدت یک دقیقه بپوشانید (شکل شماره ۱۹).



شکل شماره ۱۹. افزودن متیلن بلو

۱۱- لام‌ها را دوباره و به آرامی با آب بشویید و در رک لام قرار دهید تا در مجاورت هوا خشک شود. پشت لام را قبل از خشک شدن با یک دستمال تمیز نمایید (شکل شماره ۲۰).



شکل شماره۲۰. شست و شوی لام

خوانش گستره رنگ‌آمیزی شده با روش زیل نلسن

الف. میکروسکوپ نوری و روش کار

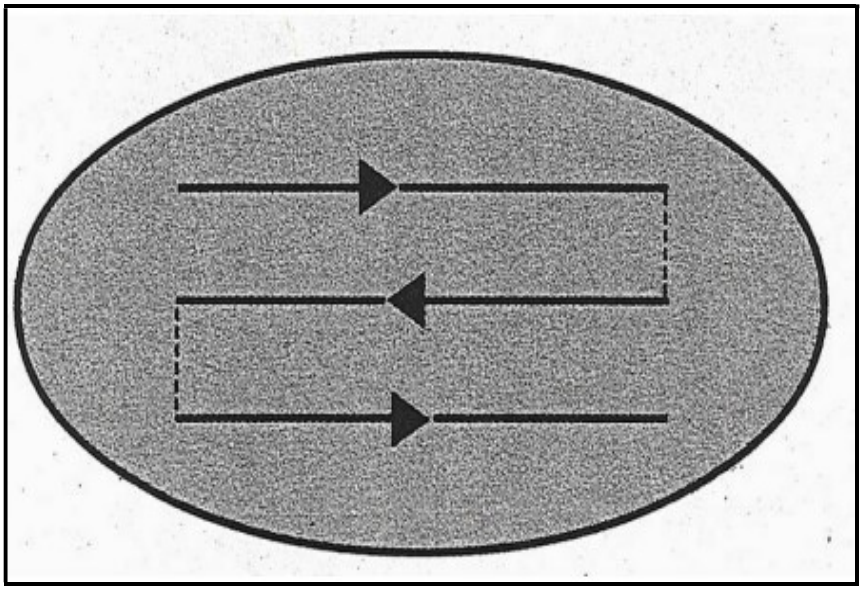
شکل شماره ۲۱ ساختار میکروسکوپ را برای بررسی گستره نشان می‌دهد. میکروسکوپ را روی یک سطح ثابت، صاف و هموار، دور از نور مستقیم خورشید، گرد و غبار، لرزش (مانند سانتریفیوژ)، آب (سینک، پاشیدن از شیر آب)، معرف‌های شیمیایی و یا رطوبت قرار دهید. ضروری است در زمانی که از میکروسکوپ استفاده نمی‌شود آن را با کاور بپوشانید. میکروسکوپ نوری نیاز به تعمیر و نگهداری روزانه خاصی ندارد، اما در استفاده از آن دقت قابل توجهی لازم است. می‌توانید اطلاعات بیشتر مربوط به مراقبت و نگهداری را از دفترچه راهنمای میکروسکوپ شرکت سازنده بدست آورید.

شکل شماره ۲۱. ساختار میکروسکوپ

ب. بررسی گستره رنگ‌آمیزی شده به روش زیل نلسن و گزارش‌دهی

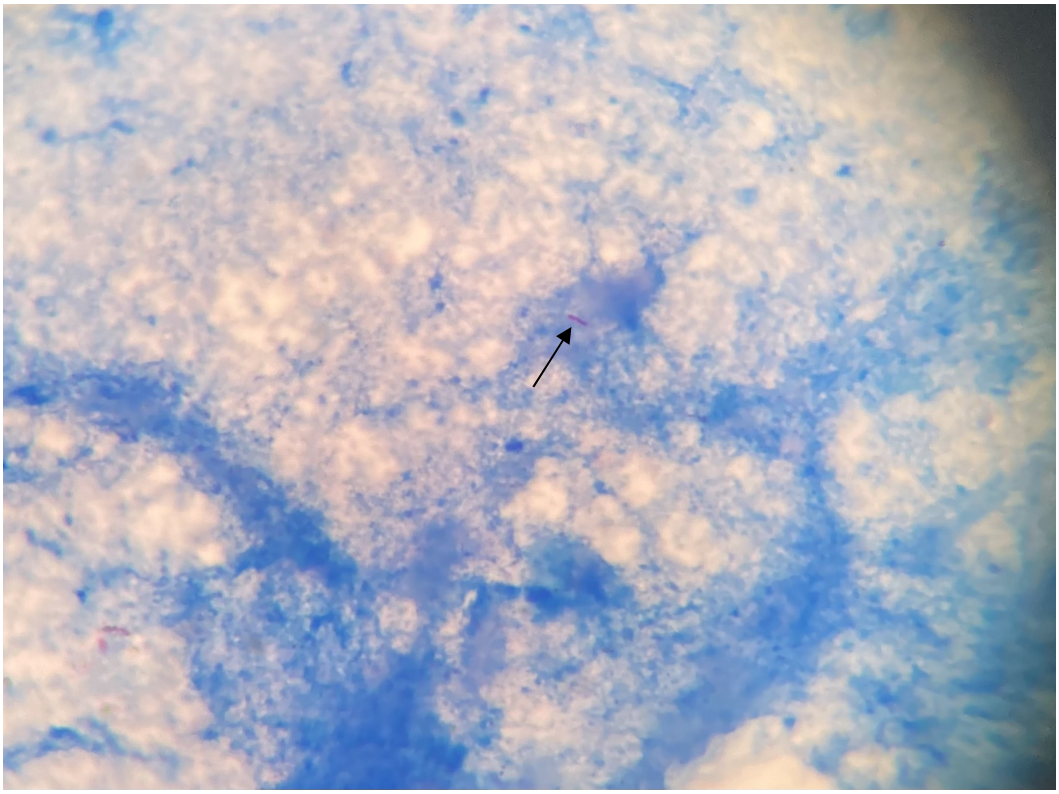
توجه: برای تنظیم میکروسکوپ در بررسی گستره، کندانسور باید در بالاترین وضعیت و دیافراگم کاملا باز باشد.

- در موارد منفی تمام طول گستره (بیش از ۳۰۰ میدان میکروسکوپی) بصورت طولی و عرضی مشاهده شود. بدین صورت: دو بار رفت و برگشت طولی و دو بار رفت و برگشت عرضی. یک طول گستره، معادل ۲ سانتی‌متر یا ۱۰۰ میدان میکروسکوپی با بزرگنمایی ۱۰۰۰x (عدسی ۱۰۰ روغنی) است (شکل شماره ۲۲).
-

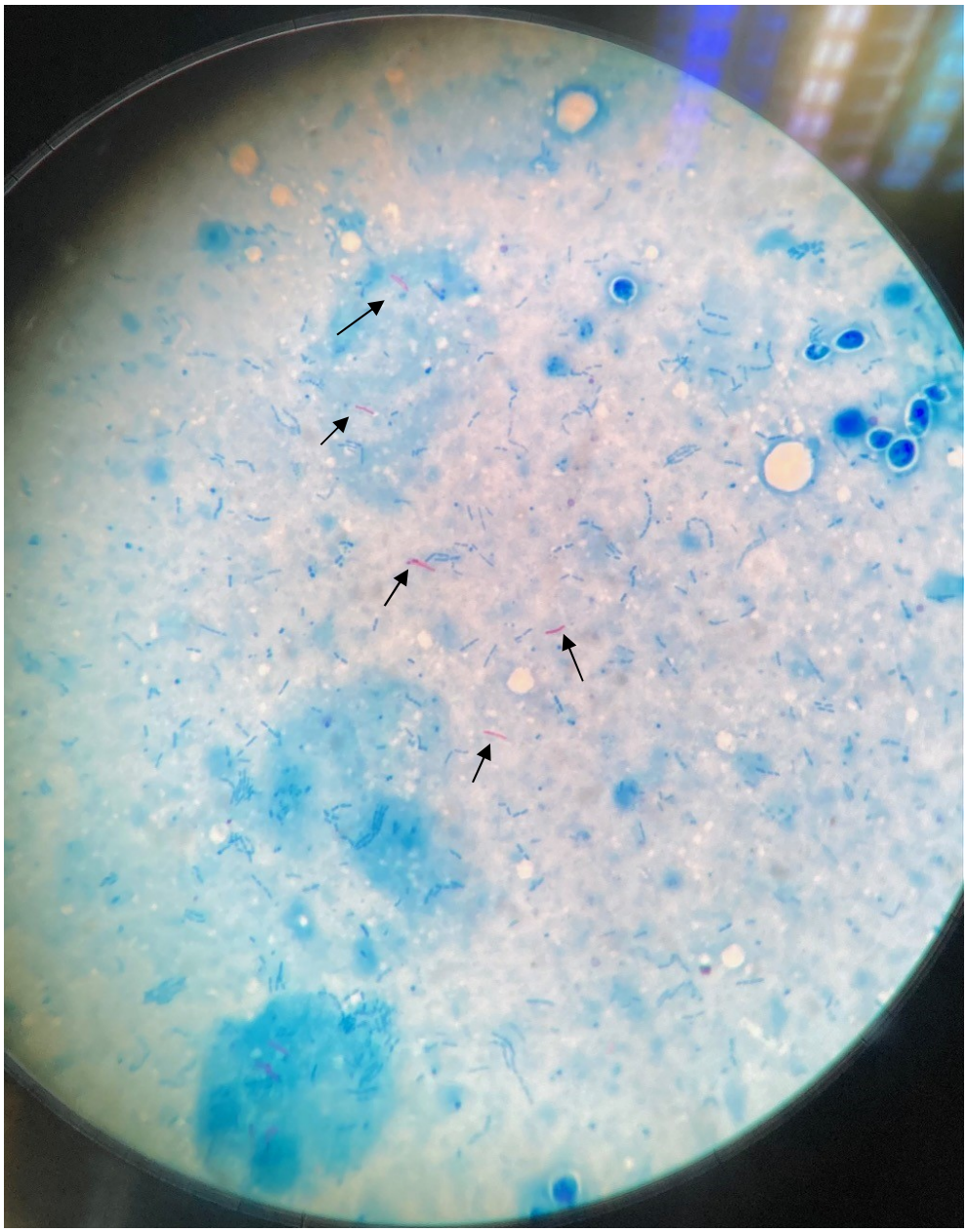


شکل شماره۲۲. نحوه خوانش گستره

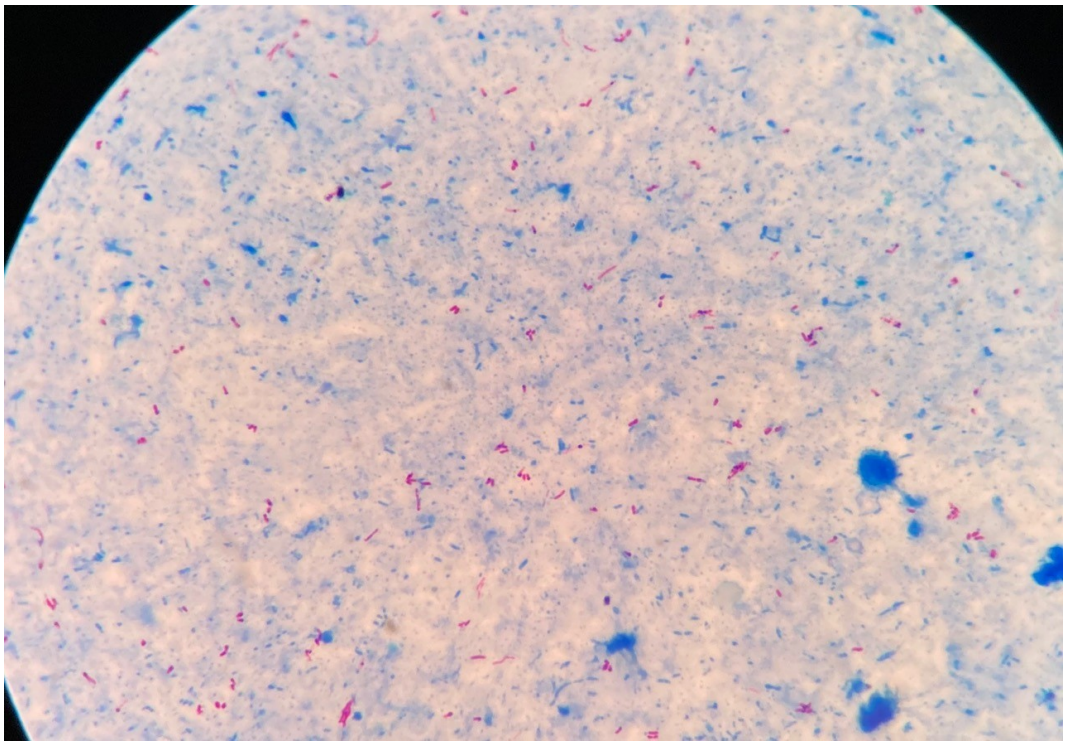
- در موارد بسیاراندک (Scanty) که کمتر از ۱۰ باسیل اسید فست در ۱۰۰ میدان مشاهده شود، باید تعداد باسیل های اسیدفست شمارش شده، گزارش گردد. در این موارد و در صورت وجود اندیکاسیون بالینی توصیه به تکرار نمونه‌گیری می شود.
- موارد **۱ مثبت** (۱۰تا ۹۹ باسیل اسید فست در ۱۰۰ میدان) **حداقل ۱۰۰ میدان** باید مشاهده شود (شکل شماره ۲۳).
- موارد **۲ مثبت** (۱ تا ۱۰ باسیل اسید فست در هر میدان) **حداقل ۵۰ میدان** باید مشاهده شود (شکل شماره ۲۴).
- موارد **۳ مثبت** (بیش از ۱۰ باسیل اسید فست در هر میدان) مشاهده **حداقل ۲۰ تا ۳۰ میدان** کفایت می کند (شکل شماره - ۲۵).
- به جدول شماره ۵ مراجعه شود.



شکل شماره ۲۳. نمونه ۱ +



شکل شماره ۲۴. نمونه +۲



شکل شماره ۲۵ . نمونه +۳

- پس از مشاهده و گزارش گستره مثبت (بیمار یا کنترل مثبت) برای مشاهده گستره بعدی، ابتدا روغن ایمرسیون روی لنز را با دستمال کاغذی/ گاز طبی برداشته سپس با استفاده از الکل اتیلیک ۷۰ درصد لنز را پاک نمایید. بلافصله با دستمال کاغذی/ گاز طبی لنز را خشک نمایید (شکل شماره ۲۶). این کار از انتقال باکتری و ایجاد نتایج مثبت کاذب جلوگیری می کند.
- از تماس نوک قطره چکان حاوی روغن ایمرسیون با گستره بیماران اجتناب شود.
- در انتهای کار لنز پاک شود. از پنبه برای تمیز کردن لنز استفاده نشود.

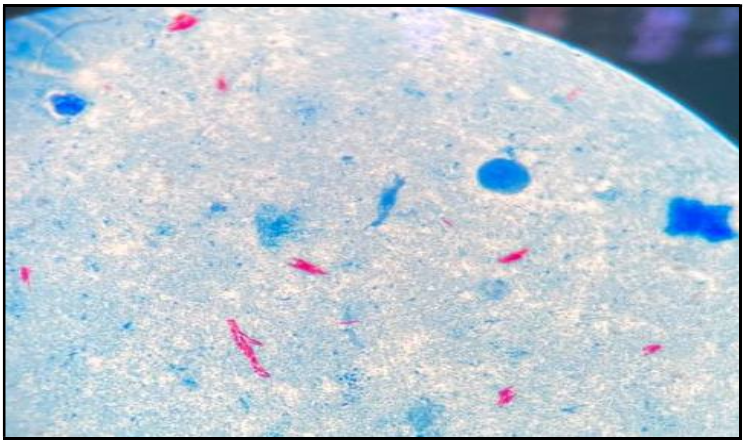
شکل شماره ۲۶. تمیز کردن لنز میکروسکوپ

هشدارها – توجه‌ها:

- از تماس دست با گستره خودداری نمایید. تمام نمونه‌های خلط را باید بالقوه عفونی در نظر گرفت.
- برای جلوگیری از مخدوش شدن گستره برای بررسی‌های بعدی، از تماس سطح روغنی گستره با برگه‌های کاغذ حاوی نوشته خودداری نمایید. برای بایگانی گستره‌ها، روغن اضافی آنها را با استفاده از برگه کاغذ سفید بردارید.
- گستره‌ها را پس از خشک شدن، به درستی در جعبه نگهداری لام قرار دهید. گستره‌های مثبت بیماران تا ۲ سال و گستره‌های منفی تا ۶ ماه نگهداری شوند.

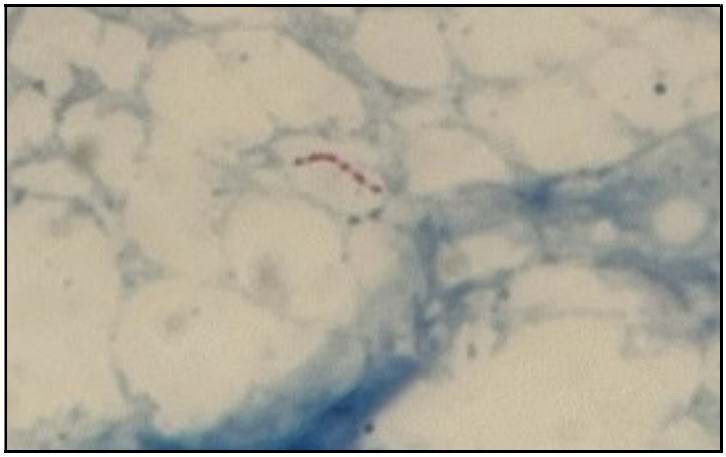
انواع اشکال باسیل:

- **باسیل‌های سالم:** این اشکال در گستره بیماران در مرحله **تشخیص و بدو درمان** مشاهده می‌شوند. در این حالت باسیل‌ها به شکل منفرد (Single)، رشته‌ای (Filamentouse) و یا تجمعی (Clumps) دیده می‌شوند. شکل باسیل‌ها در میدان میکروسکوپی به صورت سالم، پیوسته و دانه‌دار است (شکل شماره ۲۷).



شکل شماره ۲۷. اشکال مختلف باسیل

- **باسیل‌های غیر سالم**: که در گستره بیماران **حین درمان** مشاهده می شود. در این حالت به دلیل اثر داروهای ضد سل ممکن است باسیل‌ها به صورت قطعه قطعه شده (Fragmented bacilli) مشاهده شوند. شکل میکروسکوپی باسیل‌ها به صورت دانه‌های پیوسته به هم (شبیه کوکو باسیل‌های زنجیره‌ای) دیده می‌شوند. (شکل شماره ۲۸).



شکل شماره ۲۸. باسیل اسید فست قطعه قطعه شده (Fragmented bacilli)

- اولویت برای شمارش باسیل‌ها، **میدان‌های میکروسکوپی دارای لکوسیت، سلول‌های اپی‌تلیال و موکوس** است. میدان‌های میکروسکوپی بدون سلول کم ارزش می‌باشند.
- مطابق با استانداردهای بین المللی **نتایج مثبت با رنگ قرمز** در دفاتر و برگه‌های کار و فرم‌های بیماریابی ثبت شود.

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

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

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

تهیه محلول‌های مورد نیاز برای رنگ‌آمیزی زیل نلسن

آماده‌سازی محلول‌های با کیفیت برای رنگ‌آمیزی زیل نلسن از مهم‌ترین مراحل تشخیص باسیل‌های اسیدفست هستند. همچنین استفاده از آب مقطر تازه می‌تواند از آلودگی معرف‌ها توسط مایکوباکتریوم‌های محیطی جلوگیری نماید. محلول‌های لازم برای رنگ‌آمیزی زیل نلسن در جدول شماره ۷ ذکر شده است.

جدول شماره ۷. محلول‌های مورد نیاز رنگ‌آمیزی زیل نلسن

محلول های استاندارد شامل	
محلول کربول فوشین	• پودر فوشین بازیک • کریستال فنل (کریستال‌ها باید تقریبا بی‌رنگ باشند) ؛ • الکل اتانول ۹۶ درجه یا مطلق • آب مقطر
محلول رنگ‌زدایی	• اسید کلریدریک (۳۷ درصد)؛ • الکل اتانول ۹۶ درجه و یا • اسید سولفوریک غلیظ (≤۹۵٪)؛ • آب مقطر
محلول رنگ زمینه	• پودر متیلن بلو • آب مقطر

الف. روش تهیه محلول رنگ کربول فوشین

کیفیت فوشین بازیک در بین شرکت‌های تولید کننده مختلف با توجه به خلوص و حلالیت آن متفاوت است. بنابراین توصیه می‌شود که در انتخاب و خرید فوشین بازیک دقت لازم بعمل آورده شود تا پودر فوشین اصل تهیه شود. برای استفاده از پودرهای اصلی موارد زیر را می توان مورد توجه قرار داد:

۱- برچسب روی شیشه باید ثابت و در صورت کشیدن انگشت مرطوب روی نوشته‌ها، پخش نشود.

۲- رنگ پودر اصلی (فوشین و متیلن بلو) باید رنگ سبز یشمی باشد و در صورت مشاهده رنگ‌های دیگر، اصل بودن رنگ زیر سوال خواهد رفت (شکل های شماره ۳۰،۲۹).

۳- در صورت استفاده از رنگ‌های تجاری مانند برند کمپانی مرک Merck، دقت نمایید که در مشکی آن قبل از باز شدن پرچها در جا به مقدار ۵ درجه می‌پیچد و سپس پلمب در باز می‌شود. درِ شیشه‌های پودرهای تقلبی بدلیل پرس بودن، خلاصی فوق را نداشته و به محض پیچاندن پلمب، در باز می‌شود.

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

شکل شماره ۲۹. فوشین اصل

شکل شماره ۳۰. فوشین تقلبی

توجه: فوشین بازیک باید حداقل دارای خلوصی معادل ۸۵ تا ۸۸ درصد باشد. در صورتی که خلوص کربول فوشین مشخص باشد، باید از آن برای محاسبه غلظت نهایی ۰/۳ ٪ استفاده شود. برای محاسبه مقدار مورد نیاز فوشین بازیک، مقدار واقعی را بر محتوای رنگ تقسیم کنید. به عنوان مثال، اگر محتوای رنگ ۷۵٪ باشد، باید مقادیر را بر ۰/۷۵ تقسیم کنید. بنابراین ۴= ۰/۷۵ ÷ ۳ گرم خواهد شد. بنابراین برای تهیه رنگ ۰/۳ درصد، باید ۴ گرم از کربول فوشین بازیک را وزن و استفاده نمود. در صورت استفاده از پودر با مقدار رنگ بیش از ۸۵ درصد، نیازی به محاسبه ضریب تصحیح نیست. اگر خلوص رنگ ناشناخته باشد و یا اگر حلالیت فوشین بازیک کم باشد بطوریکه رسوبات پس از فیلتراسیون همچنان قابل مشاهده باشند، منطقی است که از غلظت بالاتر فوشین بازیک (۱٪) هنگام تهیه معرف رنگ‌آمیزی استفاده شود.

جدول شماره ۸. مواد مورد نیاز ساخت کربول فوشین

محلول کربول فوشین ۰/۳ درصد	
فوشین بازیک	۴ گرم بااحتساب ناخالصی
اتانول ۹۶ درصد	۱۰۰ میلی لیتر
کریستال فنل	۵۰ گرم
آب مقطر	۹۰۰ میلی لیتر

روش ساخت کربول فوشین ۰/۳ ٪ درصد (۱).

- ابتدا کریستال فنل را در بن ماری در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد ذوب نمایید.
- ۵۰ میلی لیتر از فنل مایع را در یک فلاسک شیشه‌ای ریخته به آن ۱۰۰ میلی‌لیتر الکل اتانول ۹۶ درجه (و یا مطلق) افزوده و در بن ماری قرار دهید تا کریستال‌های فنل حل شده و به صورت مایع درآید .
- ۴ گرم کربول فوشین را وزن نموده و به فلاسک حاوی فنل مایع بیفزایید. فلاسک را به خوبی هم‌زده تا پودر فوشین کاملا حل شود.
- وجود پودر یا کریستال‌های باقی مانده در قسمت پایین ظرف را بررسی کنید. در صورت وجود هرگونه رسوب، چرخش فلاسک را بر روی حرارت ملایم ادامه دهید. پس از حل شدن کامل کربول فوشین ، ۸۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه کنید و با چرخش مخلوط کنید.
- اگر رسوب مشاهده شد، رنگ کاربول فوشین باید فیلتر شود. بدین ترتیب که محلول را با استفاده از یک قیف و کاغذ صافی (یا با قرار دادن یک تکه کاغذ صافی به طور مستقیم بر روی لام) محلول را فیلتر نمود (شکل شماره ۳۱). سایر معرف‌های رنگ‌آمیزی نیازی به فیلتر شدن ندارند. اگر ذره‌ای در محلول کربول فوشین مشاهده شد، محلول باید دوباره فیلتر شود. رنگ‌ها در حجم کم ساخته شوند تا رسوب رنگ ایجاد نگردد.

شکل شماره ۳۱. فیلتر کردن محلول فوشین برای حذف رسوبات

روش تهیه محلول کربول فوشین بر اساس دستورالعمل W.H.O

(I, Kim SJ, Frieden TR, Laszlo A, Luelmo F, Norval P-Y, et al. Laboratory services in tuberculosis control. World Health Organization; 1998 Narvaiz de Kantor)

محلول شماره ۱ فوشین:

فوشین بازیک: ۳ گرم

اتانل ۹۵٪: ۱۰۰ میلی لیتر

۳/۳ گرم پودر فوشین بازیک را در یک بالن ته صاف با ۱۰۰ میلی لیتر الکل اتانول مطلق حل میکنیم. درِ بالن را با پارافیلم کاملا پوشانده و هم میزنیم تا پودر کاملا حل شود (محلول شماره ۱).

محلول شماره ۲ فنل:

ابتدا کریستال فنل را در انکوباتور با دمای ۵۰ درجه سانتی گراد ذوب نمایید.

میزان ۸۵۰ سی سی آب مقطر را در ارلن یک لیتری ریخته، سپس ۵۰ سی سی فنل مایع به آن اضافه کرده، درِ آن را کاملا بسته و روی هیتر گذاشته تا محلول گرم شود.

توجه: برای جلوگیری از اکسید شدن فنل آن را در یخچال در دمای ۲-۸ درجه سانتی گراد نگهداری نمایید.

محلول کار:

در زیر هود شیمیایی به آرامی محلول رنگ شماره ۱ را به محلول شماره ۲ اضافه کرده و هم زده تا یکدست شود.سپس درِ ارلن را بسته و آن را داخل ظرف آب سرد به مدت ۴۵ دقیقه قرار داده تا به آرامی سرد شود. رنگ را با کمک قیف و کاغذ صافی در شیشه قهوه ای رنگ نگهداری نمایید. این محلول را می‌توان برای مدت ۶ تا ۱۲ ماه در دمای اتاق نگهداری نمود. قبل از استفاده محلول باید فیلتر شود.

ب. روش تهیه محلول رنگ‌بر[29]

جدول شماره ۹. مواد مورد نیاز ساخت اسید الکل

اسید الکل ۳ درصد (3 % HCl ethanol)	
اسید کلریدریک غلیظ	۳۰ میلی لیتر
اتانل ۹۶ درجه	۹۷۰ میلی لیتر

- ۹۷۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درجه را به یک فلاسک مخروطی دو لیتری اضافه کنید.
- ۳۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک غلیظ را با مزور اندازه گیری کنید.
- آن را به آرامی داخل فلاسک حاوی الکل بریزید و جریان اسید را به آرامی در امتداد قسمت داخلی آن هدایت کنید.
- فلاسک را به آرامی تکان دهید تا کاملا مخلوط شوند.

توجه: همیشه به آرامی اسید را به الکل اضافه کنید نه برعکس.

ت. روش تهیه محلول رنگ زمینه[30]

جدول شماره ۱۰. مواد مورد نیاز ساخت رنگ زمینه

محلول رنگ زمینه	
متیلن بلو	۳ گرم
آب مقطر استریل	۱۰۰۰ میلی لیتر

- ۳ گرم پودر متیلن بلو را وزن کنید.
- پودر را به ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر در یک فلاسک اضافه کنید.
- محتویات فلاسک را بچرخانید تا رنگ در آب مقطر حل شود.
- ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر باقیمانده را اضافه کنید و دوباره مخلوط کنید.

نگهداری محلول‌ها و معرف‌ها

- محلول‌های تازه آماده شده تا زمان انجام مراحل کنترل کیفیت و ارزیابی نتایج آن، مورد استفاده قرار نگیرد.
- باید محلول‌ها را در بطری‌های قهوه‌ای تمیز و با برچسب نگهداری نمود.
- برچسب باید حاوی اطلاعات شامل: نام معرف، غلظت و تاریخ آماده‌سازی باشد.
- بطری‌ها باید دور از نور مستقیم خورشید نگهداری شوند. اگر از بطری‌های شفاف استفاده می شود، بطری ذخایر معرف‌ها باید در فویل پیچانده و سپس در یک کابینت دربسته نگهداری شوند.

[29] Decolourising solution
[30] Counterstain

کنترل کیفیت محلول‌های رنگ‌آمیزی تازه تهیه شده

- باید پس از تهیه محلو ل‌های رنگ‌آمیزی، بررسی‌های کنترل کیفیت برای هر سری ساخت از معرف‌ها انجام شود.
- انجام کنترل کیفیت برای اطمینان از اثربخشی محلول‌های رنگ‌آمیزی و مشاهده باسیل‌های اسید فست در لام کنترلی ضروری است.
- کنترل کیفیت محلول‌های رنگ‌آمیزی تازه تهیه شده، انجام شود. لام کنترل مثبت از نمونه خلط فرد سالم که واکسن BCG به آن اضافه شده، تهیه می‌شود.
- لازم است نتایج کنترل کیفیت در یک دفتر ثبت شود و برای هر سری ساخت، نام محلول و تاریخ آماده‌سازی آن روی برچسب شیشه‌ها نوشته شود.
- با رنگ‌آمیزی و بررسی لام کنترل، عملکرد کربول فوشین و روش رنگ‌آمیزی زیل نلسن کنترل می‌گردد.

اقدامات ایمنی

- **هرگز آب را به اسید اضافه نکنید!**
- برای کاهش قرار گرفتن در معرض بخارات سمی فنل، معرف‌ها و محلول رنگ‌آمیزی حاوی فنل باید در مکانی با تهویه مناسب یا در کابینت ایمنی شیمیایی تهیه شوند.
- همیشه در آزمایشگاه و هنگام کار با اسید از وسایل حفاظت فردی مانند دستکش، عینک ایمنی و گان استفاده نمایید.
- در صورت ریخته شدن اسید، بلافاصله قسمتی از بدن که اسید ریخته شده است را با آب فراوان بشویید.

فصل پنجم

تشخیص و گزارش‌دهی میکروسکوپی گستره با روش رنگ‌آمیزی فلوروکروم

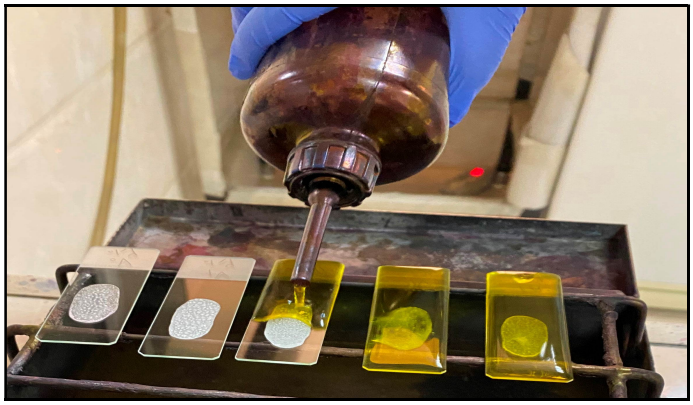
مزایای روش فلوروکروم:

- تصاویر فلورسنت به دلیل کنتراست بالا، تشخیص باکتری‌های اسید فست را آسان‌تر و سریع‌تر می کند.
- استفاده از لنزهای با توان کم تا متوسط (معمولاً 40x, 20x, 10x) میدان دید بزرگتری را در مقایسه با میکروسکوپ نوری که درآن از لنز 100x استفاده می شود، فراهم می سازد.
- روش رنگ‌آمیزی فلوروکروم ساده‌تر از روش زیل نلسن است.

روش رنگ‌آمیزی فلوروکروم

۱- گستره را تهیه و با حرارت فیکس کنید (به صفحه ۲۹ مراجعه شود).

۲- گستره را با رنگ اورامین O بپوشانید و اجازه دهید به مدت ۱۵ دقیقه رنگ شود (شکل شماره ۳۲). مطمئن شوید که رنگ روی گستره باقی بماند. **افزایش زمان رنگ‌آمیزی می‌تواند باعث ایجاد نتایج مثبت کاذب شود.**

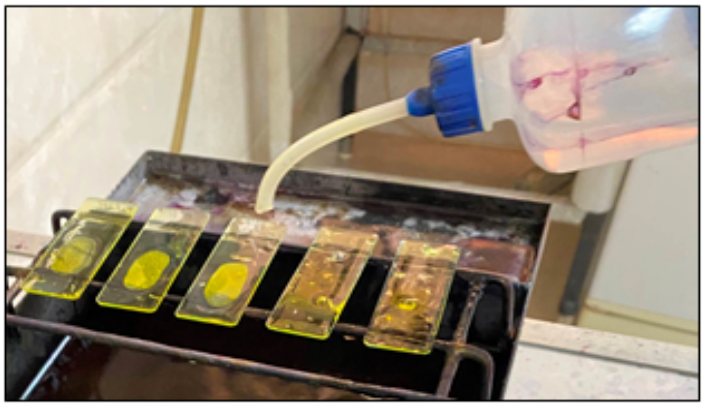


شکل شماره ۳۲. افزودن اورامین O

توجه: گستره را حرارت **ندهید**.

۳- گستره را با آب بشویید به گونه‌ای که آب به آرامی از لبه لام بر روی گستره جریان یابد.

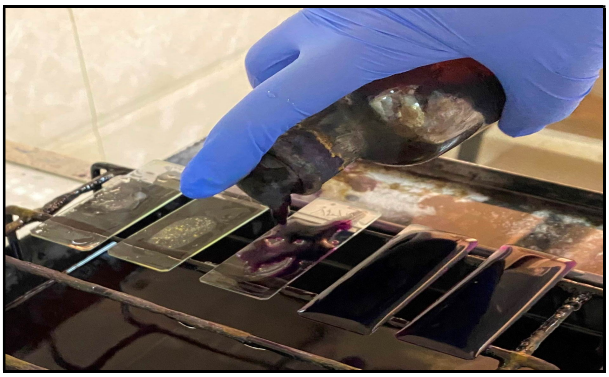
۴- گستره را با اسید الکل ۰/۵ درصد به مدت سه دقیقه بپوشانید و اجازه دهید رنگ‌بری شود (شکل شماره ۳۳). مطمئن شوید که لام‌ها کاملاً با محلول رنگ بر پوشیده شده باشد.



شکل شماره ۳۳. رنگ بری گستره‌ها با اسید الکل

۵- اسید الکل ۰/۵ درصد را با آب بشویید، آب اضافی را از لام خالی کنید.

۶- گستره را با پرمنگنات پتاسیم و به مدت دو دقیقه بپوشانید (شکل شماره ۳۴).

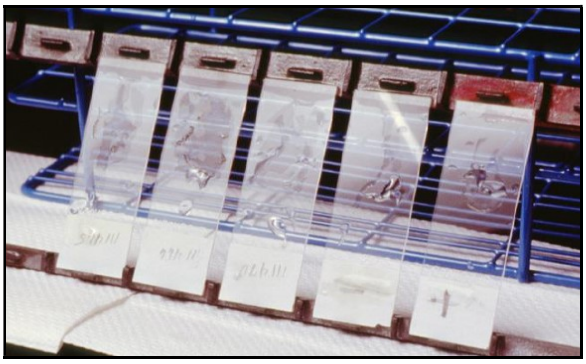


شکل شماره ۳۴. افزودن پرمنگنات پتاسیم

نکته بسیار مهم: پرمنگنات پتاسیم نباید بیش از دو دقیقه روی لام‌ها باقی بماند، زیرا باعث جذب فلورسنت ماده فلوروکروم [۳۱] و ایجاد نتایج منفی کاذب می شود.

۷- پرمنگنات پتاسیم را با آب بشویید. آب اضافی را از روی لام خالی کنید.

۸- اجازه دهید گستره در معرض هوا خشک شود. برای خشک کردن گستره از کاغذ خشک‌کن یا موارد مشابه استفاده نکنید (شکل شماره ۳۵).



شکل شماره ۳۵. نحوه قرار گیری صحیح گستره‌ها و خشک شدن آنها

۹- گستره پس از رنگ‌آمیزی در اسرع وقت مشاهده و گزارش شود (شکل شماره ۳۶)

توجه:

- گستره های رنگ آمیزی شده باید دور از نور (نورخوشید/ لامپ UV و لامپ معمولی)، داخل جعبه اسلاید تیره رنگ قرار داده شوند.
- تمام گستره های رنگ آمیزی شده باید حداکثر طی مدت ۲۴ ساعت پس از رنگ آمیزی خوانده شوند.
- گستره های رنگ آمیزی شده به مدت طولانی در زیر میکروسکوپ فلورسنت باقی نمانند زیرا موجب کاهش درخشندگی می شود.
- گستره ها را پس از بررسی و خوانش می توان در جعبه اسلاید تیره رنگ بمدت ۷ روز در دمای ۸-۲ درجه سانتی گراد در یخچال نگهداری نمود.
- **نتایج مثبت رنگ‌آمیزی روش فلوروکروم قطعا باید با روش زیل‌نلسن تایید شود.**

[31] Over-quenching of fluorescence

بررسی گستره رنگ‌آمیزی شده به روش فلوروکروم و گزارش‌دهی

نحوه ی ثبت و گزارش نتایج با میکروسکوپ فلورسنت در جدول شماره ۱۱ خلاصه شده است.

جدول شماره ۱۱.گزارش‌دهی میکروسکوپی گستره‌ها با روش رنگ‌آمیزی اورامین (فلوروکروم)

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

*UATLD: International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, WHO: World Health Organization

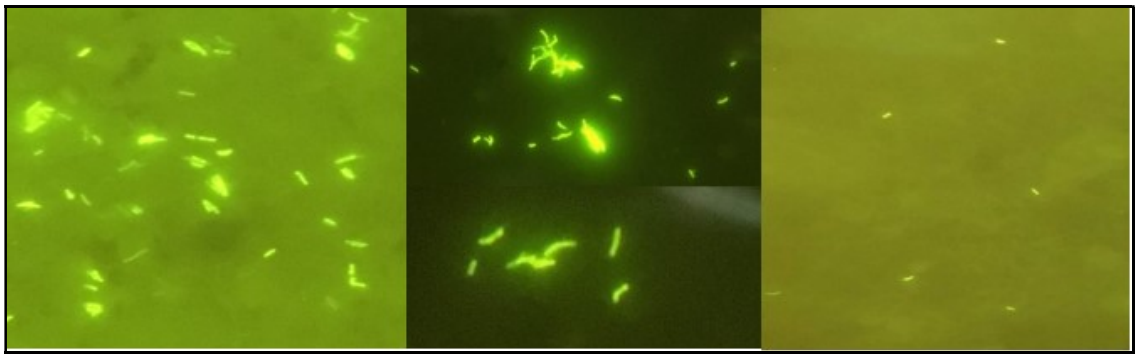
در صورت استفاده از بزرگنمایی X ۲۰۰-۲۵۰ باید ۳۰ میدان و در صورت استفاده از بزرگنمایی X۴۰۰ باید ۴۰ میدان میکروسکوپی را مشاهده و بررسی کرد.

توجه. یک طول با بزرگنمایی ۲۵۰-۲۰۰ معادل ۳۰ میدان یا ۳۰۰ میدان با بزرگنمایی X ۱۰۰۰ است و در بزرگنمایی X۴۰۰، یک طول معادل ۴۰ میدان یا ۲۰۰ میدان با بزرگنمایی X۱۰۰۰ می باشد.

گزارش منفی: برای لام‌هایی که هیچ باسیلی در یک طول **مشاهده نشد، منفی گزارش می شود**.

گزارش مثبت: نتایج مثبت باسیل اسید فست بصورت نیمه کمی گزارش شود (بر اساس جدول شماره ۱۰). تمام نتایج گستره‌های مثبت این روش لازم است با روش رنگ‌آمیزی زیل نلسن تایید شود.

باید نتایج در دفتر آزمایشگاه سل و همچنین در فرم درخواست انجام آزمایش ثبت گردد.



شکل شماره۳۶ ۲. گستره رنگ‌آمیزی شده مثبت به روش فلوروکروم

روش تهیه محلول‌های مورد نیاز برای رنگ‌آمیزی فلوروکروم:

محلول‌های مورد نیاز برای رنگ‌آمیزی فلوروکروم به شرح زیر آماده می شوند:

الف. روش تهیه محلول فلوروکروم

جدول شماره۱۲. موارد مورد نیاز ساخت اورامین O

Auramine O(محلول شماره ۱)	
اورامین	۰/۱ گرم
اتانل ۹۵ درصد	۱۰ میلی‌لیتر

جدول شماره۱۳. مواد مورد نیاز ساخت فنل

فنل (محلول شماره ۲)	
کریستال فنل	۳ گرم
آب مقطر	۸۷ میلی‌لیتر

- کریستال‌های فنل در بن ماری ذوب نموده سپس آن را در آب حل کنید.
- محلول‌های ۱ و ۲ را در یک بطری تیره رنگ ریخته و مخلوط نمایید و محلول را دور از حرارت و نور نگهداری کنید. بطری‌ها را با نام معرف، تاریخ آماده‌سازی و تاریخ انقضا برچسب بزنید.
- محلول را می توان به مدت سه ماه در دمای اتاق نگهداری کرد. در زمان باقی ماندن در دمای اتاق ممکن است در محلول کدورت ایجاد شود اما این مسئله بر روی واکنش رنگ‌آمیزی تأثیری ندارد.

ب. روش تهیه محلول رنگ‌بر

جدول شماره ۱۴. موارد مورد نیاز ساخت اسید الکل

اسید الکل ۰/۵ درصد (HCl ethanol %0.5)	
اسید کلریدریک غلیظ	۰/۵ میلی‌لیتر
اتانل ۷۰ درصد	۱۰۰ میلی‌لیتر

- اسید هیدروکلریک غلیظ را با احتیاط به اتانل اضافه کنید. همیشه اسید را به آرامی به الکل اضافه کنید نه برعکس.
- محلول آماده‌شده را در یک بطری تیره رنگ نگهداری کنید.
- بطری‌ها را با نام معرف، تاریخ آماده‌سازی و تاریخ انقضا برچسب بزنید.
- محلول را می‌توان به مدت سه ماه در دمای اتاق نگهداری کرد. برای هر حجم رنگ‌آمیزی، دو تا سه حجم محلول رنگ‌زدایی مورد نیاز است.

ت. روش تهیه محلول رنگ زمینه

جدول شماره۱۵. مواد مورد نیاز ساخت پرمنگنات پتاسیم

پرمنگنات پتاسیم	
پرمنگنات پتاسیم ($KMnO_4$)	۰/۵ گرم
آب مقطر	۱۰۰ میلی‌لیتر

- پرمنگنات پتاسیم را با استفاده از آب مقطر در یک بطری تیره رنگ با درِ محکم حل کنید.
- بطری‌ها را با نام معرف، تاریخ آماده‌سازی و تاریخ انقضا برچسب بزنید.
- محلول را می توان به مدت سه ماه در دمای اتاق نگهداری کرد.

فصل ششم

تضمین کیفیت

کنترل کیفیت در آزمایش میکروسکوپی گستره، فرآیندی برای نظارت داخلی بر عملکرد کار در آزمایشگاه است. این مرحله شامل یک فرآیند مؤثر و سیستماتیک است که از کار آزمایشگاهی دقیق، قابل اعتماد و قابل تکرار اطمینان حاصل می کند. این کار با ارزیابی کیفیت نمونه‌ها، معرف‌ها و تجهیزات، نظارت بر عملکرد روش میکروسکوپی، بررسی نتایج میکروسکوپی و مستندات اعتبارسنجی روش میکروسکوپی انجام می شود. در فرایند کنترل کیفیت رعایت و انجام مراحل زیر الزامی است.

- برای تصدیق نمودن عملکرد صحیح روش و همچنین کیفیت رنگ‌پذیری باسیل‌های اسید فست، باید از یک گستره کنترل مثبت و یک گستره کنترل منفی در هر ران رنگ‌آمیزی استفاده شود.
- در جدول شماره ۱۶ شایع‌ترین علل خطا در روش میکروسکوپی گستره ذکر شده است. قبل از مشاهده گستره بیماران، ابتدا باید گستره‌های کنترل ارزیابی شوند. اگر گستره‌های کنترل از کیفیت قابل قبول برخوردار بودند، می‌توان گستره بیماران را قرائت و گزارش نمود. اگر گستره های کنترل غیرقابل قبول باشند، پس از شناسایی و اقدام اصلاحی، باید گستره‌های کنترل جدید به همراه گستره‌های بیماران (گستره ذخیره) رنگ‌آمیزی، قرائت و در نهایت گزارش شوند. اگر گستره ذخیره (لام اضافی) از نمونه بیمار در دسترس نباشد می‌توان گستره‌های رنگ‌آمیزی شده را با اسید الکل مجدد رنگ‌بری و دوباره از ابتدا رنگ‌آمیزی نمود. نتایج کنترل کیفیت محلول‌ها باید در دفتر کار، گزارش و ثبت شوند.

جدول شماره۱۶. علل شایع خطا در میکروسکوپی گستره

خطا	علت	اقدامی که باید انجام شود
منفی کاذب	گستره خیلی ضخیم، در حین رنگ-آمیزی از روی لام کنده می شود	مقدار کمتری از نمونه بر روی لام گذاشته شود. گستره به صورت یکنواخت تهیه گردد.
	گستره خیلی نازک	از مقدار نمونه بیشتری برای تهیه گستره استفاده شود یا یک گستره فقط به طول ۲×۱سانتی‌متر تهیه شود.
	رنگ‌آمیزی ضعیف(گستره به درستی رنگ نگرفته نشده است)	کنترل کیفیت معرف‌ها بررسی شود. معرف‌های جدید تهیه شود. رقت معرف‌ها بررسی شود.
مثبت کاذب	آلودگی متقاطع	از تماس گستره‌ها با یکدیگر هنگام رنگ‌آمیزی اجتناب شود. از جارهای رنگ‌آمیزی استفاده نشود. پس از مشاهده هر گستره، لنز شیئی تمیز شود. از تماس قطره چکان حاوی روغن ایمرسیون با سطح گستره‌ها اجتناب شود آب/ محلول‌ها از نظر آلودگی محیطی بررسی شود.
	رسوبات قرمز	محلول جدید آماده شود. محلول‌ها قبل از استفاده با کاغذ صافی دو لایه فیلتر شوند. از جوشیدن رنگ کربول فوشین در هنگام حرارت‌دهی جلوگیری شود.

تضمین کیفیت در آزمایشگاه میکروسکوپی سل شامل فرایندهای کنترل کیفیت داخلی (Pre analytical, Analytical, Post Analytical) و کنترل کیفیت خارجی می‌باشد

- **کنترل کیفیت داخلی:**

۱. **جمع‌آوری و انتقال نمونه‌ها** (Sample Collection & Transportion). پذیرش آزمایش‌ها بنا به درخواست پزشک در فرم پذیرش نمونه‌ها (فرم بیماریابی) انجام می‌شود. فرم‌ها باید جدا از نمونه‌ها ارسال شود. همچنین لازم است اطلاعات بیمار بطور کامل در فرم ذکر گردد. تاریخ نمونه‌گیری باید بر روی نمونه‌های ارسالی به آزمایشگاه درج شود. در صورت آلوده شدن فرم‌ها، مشخصات بیمار به فرم دیگری منتقل و سپس فرم آلوده با مواد گندزدا آغشته شده و همراه با سایر مواد عفونی اتوکلاو شود.

۲. **تهیه گستره** (Slide Preparation). شماره لام با شماره نمونه مطابقت داده شود. گستره طبق استانداردهای تعریف شده (صفحات۲۱-۲۰) تهیه شود. برای خشک‌شدن لام‌ها نباید از شعله استفاده شود. کیفیت نمونه‌ها لازم است از لحاظ چرکی، مخاطی (موکوییدی)، خونی و یا آب دهان بررسی و در فرم بیماریابی ذکر گردد. نمونه‌های آب دهان حتماً به واحد بیماری‌ها و یا پزشک معالج و بیمار گزارش شود و در صورت امکان، نمونه مجدد درخواست گردد. در صورتی که امکان نمونه‌گیری مجدد وجود نداشت نمونه توسط آزمایشگاه بررسی و نتیجه گزارش می شود. همچنین کیفیت پایین نمونه در فرم گزارش اعلام می گردد.

۳. **رنگ‌آمیزی** (Slide Staining). رنگ‌ها و معرف‌ها باید در آزمایشگاه ساخته شوند. در صورتیکه این امکان وجود نداشته باشد فقط باید از کیت‌های تجاری استفاده نمود که برای هر سری ساخت تاییدیه معتبر داشته باشد، زیرا کیفیت رنگ‌آمیزی در کیت‌های تجاری می‌تواند در سری ساخت‌های مختلف متفاوت باشد و معمولا در صورتیکه کیت کیفیت مناسبی نداشته باشد نمونه‌های حاوی تعداد کم باسیل اسید فست (+۱ و کمتر از آن) قابل تشخیص نمی‌باشد.

قبل از مشاهده لام بیمار، باید کیفیت رنگ‌آمیزی تایید شود. اگرلام کنترل از کیفیت قابل قبول برخوردار بود، می توان گستره بیماران را رنگ‌آمیزی و مشاهده کرد. اگر لام کنترل غیرقابل قبول باشد، باید محلول‌های رنگ‌آمیزی مجدد ساخته شوند. پس از شناسایی و اصلاح مشکل، باید لام کنترل جدید رنگ‌آمیزی، مشاهده و در نهایت تایید شود.

۴. **خوانش گستره.** گستره کنترل مثبت و منفی باید در هر ران رنگ‌آمیزی قرار گیرد تا عملکرد صحیح روش و کیفیت رنگ‌آمیزی باسیل‌های اسید فست تأیید شود. در جدول شماره ۱۷ انواع کنترل‌های مثبت و منفی ذکر شده است.

- استفاده ازکنترل‌های مثبت و منفی در تمام ران‌های رنگ‌آمیزی الزامی است. اگر در یک روز بیش از یک ران رنگ‌آمیزی انجام شود، باید نام فرد انجام دهنده، تاریخ ، ساعت رنگ‌آمیزی و نتیجه گستره کنترل مثبت و منفی ثبت شود.
- در زمان مشاهده میکروسکوپی گستره، باید ابتدا کنترل مثبت مشاهده شده سپس لنز به خوبی تمیز شود. پس از آن کنترل منفی مشاهده شده و در صورت بدست آمدن نتایج مورد انتظار مشاهده گستره‌های بیمار شروع شود.

توجه: پس از مشاهده هر نمونه مثبتی باید لنز میکروسکوپ به خوبی تمیز شود و توصیه می‌گردد یک‌بار دیگر کنترل منفی مشاهده تا از عدم انتقال باسیل‌های اسید فست به گستره بعدی اطمینان حاصل شود.

توجه: گستره‌های مثبت بر روی برگه کاغذی جداگانه، تمیز و خشک شوند. پس از اتمام کار برگه‌ها جزء پسماندهای عفونی اتوکلاو شوند.

جدول ۱۷. روش تهیه گسترههای کنترل مثبت و منفی برای رنگآمیزی اسید فست

کنترل مثبت	کنترل منفی
مخلوط واکسنBCG با نمونه خلطی که از نظر باسیل اسید فست منفی است: برای تهیه گستره کنترل مثبت به ازای هر ۵ میلی لیتر خلط، ۱/. میلی لیتر از واکسن BCG به خلط اضافه شود تا کنترلی معادل ۱+ تا ۲+ باسیل اسید فست بدست آید. این مرحله در داخل کابینت ایمنی بیولوژیک انجام شود. بدین ترتیب که از نمونه مخلوط شده با واکسن به تعداد زیاد گستره تهیه شده و سپس آنها را فیکس و در دمای اتاق و در جعبه لام نگهداری نمایید.	به تعداد زیاد گسترههایی از نمونههای خلط که از نظر باسیل اسید فست منفی هستند تهیه نموده و و سپس آنها را فیکس و در دمای اتاق و در جعبه لام نگهداری نمایید. **توجه:** برای روش رنگآمیزی فلوروکروم علاوه بر کنترل منفی خلط باید از مخلوط دو باکتری *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* نیز به عنوان کنترل منفی استفاده کرد.
باید در هر ران رنگآمیزی، از این گسترهها به عنوان کنترل مثبت استفاده شود.	باید در هر ران رنگآمیزی از این گسترهها به عنوان کنترل منفی استفاده شود.

۵. **گزارش نتایج و نگهداری لامها** (Reporting and Storage of Slides). تمام نتایج گزارش شده باید با مشخصات کامل و ذکر ران رنگآمیزی ثبت شوند. گسترههای مثبت و منفی ابتدا تمیز و سپس جداگانه در جعبهٔ نگهداری لام بایگانی گردد. گسترههای مثبت بیماران تا ۲ سال و گسترههای منفی تا ۶ ماه نگهداری شوند.

در آزمایشگاههای مراکز بهداشتی تمام گسترههای مثبت و ۱۰٪ از گسترههای منفی برای کنترل کیفیت به آزمایشگاه مرکزی دانشگاه/دانشکده ارسال گردد.

۶. **کنترل کیفیت تجهیزات** (Instrument Calibration). شامل کنترل کیفیت میکروسکوپ و کنترل کیفیت کابینت ایمنی بیولوژیک است.

- **کنترل کیفیت میکروسکوپ**. به صورت روزانه و ماهانه است:

روزانه: در پایان کار روزانه برای تمیز کردن عدسی میکروسکوپ از روغن، در ابتدا با استفاده از کاغذ مخصوص لنز یا دستمال کاغذی روغن اضافی را از روی لنز برداشته، سپس با الکل اتیلیک ۷۰٪ لنز را تمیز نمایید و در انتها الکل اضافی را کاملا خشک کنید تا رسوب آب الکل ۷۰٪ منجر به کدر شدن لنز نگردد. همچنین قسمتهای رو و زیرگیره نگهدارنده لام با الکل اتیلیک ۷۰٪ تمیز شوند. پس از اتمام کار روکش میکروسکوپ را بر روی آن قرار دهید.

ماهانه: برای تمیز کردن عدسیهای چشمی و کندانسور از گاز آغشته به الکل اتیلیک ۷۰٪ استفاده نمایید. بلافاصله الکل اضافی را با دستمال کاغذی/ گاز طبی لنز خشک نمایید.

- **کنترل کیفیت ماهانه کابینت ایمنی بیولوژیک.** کاربر میتواند از تست دود (Smoke Test) برای کنترل کیفیت ماهانه کابینت ایمنی بیولوژیک استفاده کند. در ابتدا کابینت ایمنی بیولوژیک را روشن و شیشه کابینت ایمنی بیولوژیک را در سطح استاندارد و محافظتی ۳۰-۲۰ سانتیمتر از پایه سطح کاری کابینت ایمنی بیولوژیک باز نمایید. در حین کار این اندازه باید همیشه رعایت شود. ۵

دقیقه زمان دهید تا چرخش هوای داخلی کابینت ایمنی بیولوژیک برقرار گردد. دقت کنید که فن اتاق خاموش و پنجره و در اتاق بسته باشد. چند سواب چوبی پنبه‌ای را در کنار هم بدون آغشته کردن به الکل مشتعل و پس از چند لحظه خاموش کنید تا دود کند. سپس سواب‌ها را در داخل کابینت ایمنی بیولوژیک ، بالای قسمت مشبک ابتدای کابینت ایمنی بیولوژیک و در تمام طول پنجره کابینت ایمنی بیولوژیک حرکت دهید تا اطمینان حاصل کنید که هیچ دودی از کابینت ایمنی بیولوژیک خارج نمی‌شود. در صورت نشت دود، عملکرد کابینت ایمنی بیولوژیک مورد تایید نمی باشد و باید توسط شرکت سازنده ارزیابی فنی انجام شود.

نکته: دقت کنید وسایل اضافی در داخل کابینت ایمنی بیولوژیک قرار داده نشود زیرا مکش دود مختل می شود.

❖ **کنترل کیفیت خارجی**: شامل شرکت در برنامه سالانه مهارت‌آزمایی سل است. ارزیابی خارجی بخش سل شامل موارد زیر می باشد:

- **الزامی:** شامل شرکت در برنامه سالانه مهارت‌آزمایی سل است. در این برنامه نمونه‌های مجهول (Panel Testing) حداقل دو بار در سال برای برنامه مهارت‌آزمایی آزمایشگاه‌های تشخیص سل ارسال می‌گردد.
- **تکمیلی:**که شامل پایش و ارزیابی فنی میدانی و بازبینی گستره‌ها است.
- **پایش و ارزیابی فنی میدانی (On Site Evaluation)**: عملکرد بخش سل آزمایشگاه توسط ارزیابان و ممیزین دوره دیده و دارای صلاحیت ارزیابی و پایش می‌شود. موارد عدم انطباق به صورت کتبی گزارش می‌گردد و در صورت صلاحدید ممیزین، آموزش در محل داده می‌شود و درگزارش بازدید ذکر می‌گردد.
- **بازبینی گستره‌ها (Rechecking)**: آزمایشگاه‌های تشخیص سل مراکز بهداشتی شهرستان، گستره‌ها را به آزمایشگاه مرکزی بهداشت دانشگاه/ دانشکده برای بازبینی ارسال می نمایند. در حال حاضر در نظام مراقبت آزمایشگاهی، در آزمایشگاه‌های تشخیص سل مراکز بهداشتی تمام گستره‌های مثبت و ۱۰٪ از گستره‌های منفی بصورت تصادفی ماهیانه بازبینی می شوند.

منابع:

1. Prevention ECD, Control. Handbook on Tuberculosis Laboratory Diagnostic Methods in the European Union—Updated 2022. Stockholm.
2. Biological Safety Cabinets and other Primary Containment Devices 4th Edition,2020.
3. Manual B. Tuberculosis Laboratory Biosafety Manual.World Health Organization, 2013.
4. Roush MH, Williams SC. NSF/ANSI Standard 49 certification testing of biosafety cabinets. JALA: Journal of the Association for Laboratory Automation. 2009;14(3):171-3.
5. En B. Biotechnology: performance criteria for microbiological safety cabinets: Bsi; 2000.
6. Leber AL, Burnham C-AD. Clinical microbiology procedures handbook, multi-volume: John Wiley & Sons; 2024.
7. Hall GS. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 16th edn. American Society for Clinical Pathology; 2025.

مشخصات کامل کابینت های ایمنی بیولوژیک

Pawar SD, Khare AB, Keng SS, Kode SS, Tare DS, Singh DK, et al. Selection and application of biological safety cabinets in diagnostic and research laboratories with special emphasis on COVID-19. Review of Scientific Instruments. 2021.(۸)۹۲;

Parameters	Class I	Class II				Class III
		A1	A2	B1	B2	
Type of protection	Personnel and environment	Personnel, product, and environment				Personnel, product, and environment
Risk group	Risk groups 1, 2, 3, and 4 (if handled in suit laboratory)	Risk groups 1, 2, 3, and 4 (if positive pressure suit used)				Risk groups 1, 2, 3, and 4
Volatile radionuclide/ chemical protection	Yes	No	No	Yes (in small quantity)	Yes	Yes
Supply air	Not HEPA-filtered	HEPA-filtered				HEPA-filtered
Exhaust air	HEPA-filtered	HEPA-filtered				HEPA-filtered
Face velocity (m/s)	0.36	0.38	0.51	0.51	0.51	Not applicable
Airflow % exhausted	100	30	30	>50	100	100
Airflow % recirculated	0	70	70	<50	0	0
Exhaust system	Hard duct	Room or thimble connection	Room or thimble connection	Hard duct	Hard duct	Hard duct

چک لیست BSL 3(۱)

Checklist for BSL3 laboratories	
1.	The BSL3 laboratory should be housed in a solid building, ideally separated from other disciplines.
2	The BSL3 laboratory should be separated from other (BSL2) laboratories.
3.	The BSL3 laboratory can only be entered via an anteroom.
4.	Floors, walls, doors and working surfaces should be non-absorbing, resistant to acids, bases and decontaminants, easy-to-clean, and without sections that are hard to access. Seams, gaps and cracks should be completely caulked/grouted to seal them.
5.	The floor should be liquid-tight (higher skirting, welded seams).
6.	Doors should be self-closing.
7.	Windows should be sealed so they cannot be opened and are airtight.
8.	The entrance door should have a window to monitor the BSL3 laboratory.
Airflow	
9.	Negative pressure must be kept in the anteroom and the laboratory (minimum pressure difference of 15 Pa, e.g. -15 Pa in the anteroom and -30 Pa in the laboratory).
10.	The negative pressure needs to be monitored constantly and displayed outside the laboratory, preferable next to the entrance.
11.	If the negative pressure goes out of range, an audio-visual alert should be triggered in the anteroom and the laboratory.
12.	Air from the laboratory and the anteroom should be extracted via an independent air duct with a HEPA filter. The air intake duct does not need to contain a HEPA filter, but should have a one-way valve to prevent any backflow in case the negative pressure is not maintained.
13.	The ventilating system must have an emergency off-switch to prevent a build-up of positive pressure in the laboratory if the extraction system fails.
14.	The ventilating system for a BSL3 laboratory should be completely independent and separate from other ventilation systems to prevent cross-contamination.
15.	There should be a minimum of six to 12 complete air exchanges per hour in a BSL3 laboratory.
16.	The air intake duct should be separate from the exhaust duct to prevent airflow contamination between the two ducts.
Entrance and access	
17.	The entrance to the BSL3 laboratory should be marked with a biohazard sign, information on the containment level, details of responsible staff members and biosafety office (including telephone numbers).
18.	Access to a BSL3 laboratory should be restricted to authorised staff members and controlled by key cards/electronic passes.
19.	An uninterruptible power supply should provide emergency power.
20.	If staff technicians are allowed access, they should use personal protective equipment and be supervised by regular laboratory staff. Work should be carried out in the early morning when no viable cultures are being processed and the laboratory is relatively safe after multiple air exchanges during the night and UV treatment. Equipment touched by staff technicians has to be disinfected with 80% ethanol. Maintenance personal should be subject to regular occupational health checks.
21.	Depending on the size of the working space, there should be a sealed emergency exit.
Anteroom	
22.	A door interlock system should be used to prevent the simultaneous opening of doors, thus preventing leakage of potentially contaminated air from the BSL3 lab to the corridor. It should be possible to overrule this system.

23.	The anteroom is normally considered a part of the BSL3 area because the anteroom and the laboratory have the same ventilating system, but in fact the anteroom is a transition zone between uncontaminated and potentially contaminated areas. It is therefore recommended that the anteroom is split into two parts: an unclean and a clean zone. The two zones should be clearly marked, e.g. by a laboratory bench.
24.	Some laboratories only have a small anteroom that is too small to be divided into two zones. If this is the case, laboratory coats should be left in the BSL laboratory.
25.	The anteroom should have a soap dispenser, an alcohol dispenser, a sink and a disposable hand towel dispenser. The dispensers as well as the faucet/tap should be hands-free.

Checklist for BSL3 laboratories	
26.	The waste container and the container for worn lab coats should be sealable. Coats have to autoclaved before being laundered. Towels are considered relatively harmless and do not need to be autoclaved.
27.	An emergency eyewash facility should be installed near the sink.

Checklist for BSL3 laboratories	
Biological safety cabinets	
28.	Class I and II biological safety cabinets are acceptable. For maximum containment at the source, the installation of a Class III biological safety cabinet may be considered, although this would result in ergonomic disadvantages.
29.	The biological safety cabinet should be positioned in the laboratory so that airflow would not be disturbed by personnel or open doors. A Class III biological safety cabinet is not affected by this.
30.	Air extracted from a biological safety cabinet can be discharged in three ways: 1. Air can be recirculated to the room, which is not advisable because of possible biological safety cabinet filter leaks which then would introduce contaminated air to the laboratory. This is not just a hypothetical risk, especially when biological safety cabinets are not well-maintained. 2. The biological safety cabinet features a continuous airflow connection with a bypass for air treatment. 3. With a 'thimble' or 'canopy hood', extracted air can be recirculated to the room or discharged to the outside of the building via a dedicated duct or through the main extraction system. When a biological safety cabinet is switched on, it also contributes to the negative pressure in the laboratory. However, only options 2 and 3 ensure that the negative pressure is still maintained when the safety cabinet is off.
31.	Biological safety cabinets have to be tested and certified at least once a year. Between maintenance intervals safety cabinets are decontaminated by being fumigated with formaldehydegas.
Digitalisation of information	
32.	Any paper-based communication between the BSL3 laboratory and the area outside the laboratory should be avoided. Instead, a computer-based laboratory management information system should be used.
Waste	
33.	Containers for BSL3 waste should be solid, unbreakable, closable and autoclavable.
34.	A BSL3 laboratory should be equipped with an autoclave to decontaminate BSL3 waste. An autoclave with openings toward the laboratory and the hallway is ideal, as loading of BSL3 occurs directly from the BSL3 containment area. A stand-alone autoclave inside the BSL3 laboratory is also acceptable, provided there is an adequate solution to deal with the contaminated steam/condensate. If both options are not possible, an autoclave in the vicinity of the BSL3 laboratory (same building) is acceptable, but containers need to be leak-proof and should only be moved under the supervision of the BSL3 laboratory, without any intermediate storage.
Wastewater	
35.	If the BSL3 laboratory has no sink, liquid waste has to be inactivated in an autoclave.
36.	If a sink is to be installed in a BSL3 laboratory, care should be taken that wastewater is not discharged in the public sewer system. Instead, wastewater should be collected in a dunk tank and inactivated (heat, chemicals) before it is discharged.
37.	Although the anteroom is officially considered part of the BSL3 laboratory, the risk of contamination by BSL3 microorganisms is considered to be so low that wastewater does not have to be decontaminated.