بسم الله الرحمن الرحیم

بسته آموزشی

تشخیص آزمایشگاهی سل

تهیه و تنظیم :

نجمه طالبی زاده – زهرا خواجویی

با کشف میکروب سل توسط " روبرت کخ " در سال ۱۸۸۲ میلادی بشر امیدوار شد که عاقبت قادر خواهد بود بیماری سل را کنترل ونهایتا حذف نماید ، اما متاسفانه بیش از ۱۳۱ سال علیرغم همه کوششهایی که به کار برده شده و حتی با وجود کشف واستفاده داروهای موثر ضد سل ، این بیماری بیش از هر زمان دیگر موجب مرگ و میر درجهان می گردد ، ظهور میکروب سل مقاوم به چند دارو و افزایش روزافزون آن اکنون بر همه امیدهای گذشته یاس و نومیدی افکنده است ، ظهور بیماری ایدز مشکل گسترش سل را افزون ساخته است.

جمع آوری خلط و تعداد نمونه ها:

برای نتیجه گیری دقیق ازیک آزمایش ، نمونه مورد بررسی باید به روش صحیح جمع آوری شود .

نمونه خوب نمونه ای است که :

۱ – ازمحل ضایعه وبه مقدارکافی گرفته شده باشد .

۲ – درظرفی مناسب با ثبت مشخصات کامل بیمارقرارگیرد .

۳ – دروضعیت مناسب نگهداری شود ، وبه روش صحیح انتقال یابد .

" میکروب سل " را می توان ازخلط ، ادرار ، مایع مغزی نخاعی ، مایع آسیت وسایر مایعات بدن جداکرد . همچنین می توان آن رادرترشحات حفره های بازچرکی ونمونه های نسجی یا تکه های برداشته شده ازاعضای بدن نیز جستجو کرد . جهت تشخیص سل ریوی ، " خلط " بهترین نمونه است .

یک " نمونه خلط خوب " عبارت است از : موادترشحی حاصل از ریه ها پس ازسرفه عمیق . نمونه ای که ازحلق یا بینی ترشح می شود فقط آب دهان بوده ونمونه خوبی نیست . ازآنجا که تعداد باسیل ها درخلط های دفع شده درزمانهای مختلف متفاوت می باشد ، آزمایش تنها یک نمونه خلط ، برای تشخیص کافی نیست ، بنابراین باید حتما " سه نمونه خلط " مورد آزمایش قرار گیرد :

" نمونه اول " دراولین مراجعه بیمار به واحد بهداشتی دریافت می شود .

" نمونه دوم " خلط صبحگاهی است . برای جمع آوری این نمونه ، بیمار قبل ازبرخاستن ازجای خود ، وپس ازیک نفس عمیق ، باسرفه ، خلط خارج شده رادرظرف می ریزد .

" نمونه سوم " همزمان با مراجعه بیمار برای تحویل نمونه دوم (خلط صبحگاهی) به واحد بهداشتی ودرمانی ، دریافت می شود.

یادآوری نکات مهم به بیمار :

الف) همه مطالب با جملات ساده به بیمار آموزش داده شود تا وی بداندچرا باید به آن عمل کند .

ب) بیمار نفس عمیقی ازراه بینی کشیده وبرای لحظه ای نفس خودرا درسینه حبس کند و با سرفه عمیق ، خلط خودرا داخل ظرف تخلیه کند وازریختن خلط به جدار خارجی ظرف خودداری نماید .

د) گرفتن خلط از سوی بیمار در فضای باز (درمنزل یا واحد بهداشتی ودرمانی) انجام گیرد .

ه) درصورتی که بیمار نتواند با سرفه کردن برای انجام آزمایش ، نمونه خلط بدهد باید به او یاد داد که به روش زیر عمل کند :

۱ – بیمار روی تخت معاینه طوری بخوابد که صورت او رو به پایین بوده وسر او پایین تر از سینه قرار گیرد .

۲ - بیمار پس از یک دم عمیق ، نفس خودرا نگه داشته ، سپس با بازدمی محکم خلط را خارج کند ، این عمل باید تا دریافت نمونه کافی از خلط ادامه یابد

نکاتی که بهورز و یا تکنسین درزمان تحویل نمونه باید به آنها توجه کند :

الف) حجم نمونه باید کافی باشد (حداقل ۲ میلی لیتر)

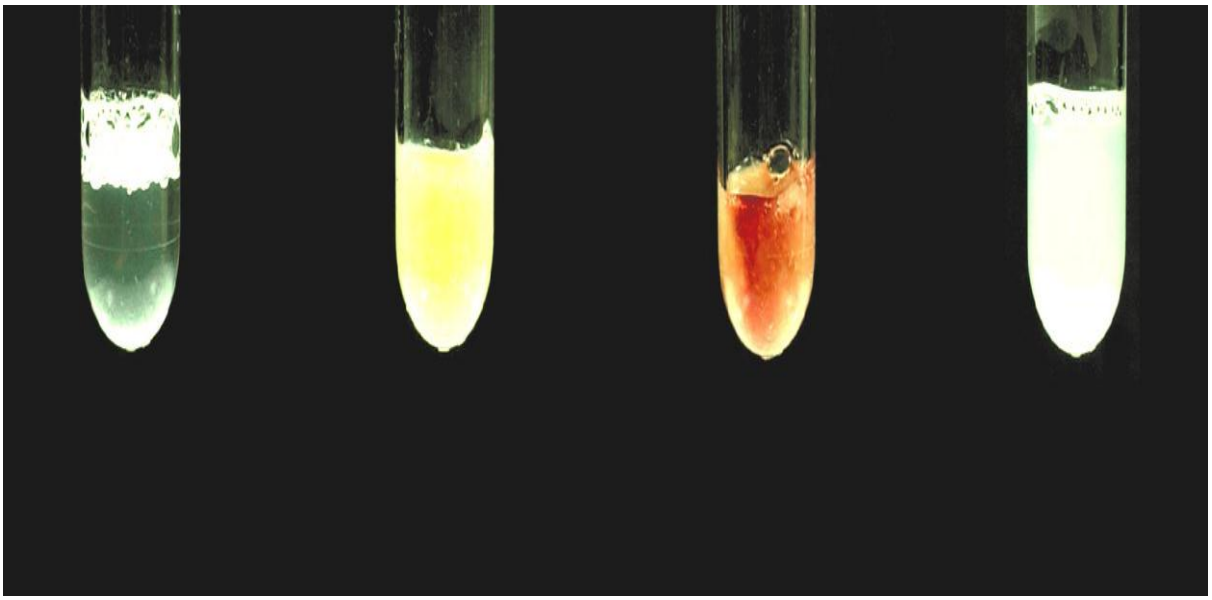
ب) نمونه دریافتی غلیظ واز ترشحاتی باشد که بیمار با سرفه عمیق ازسینه خود خارج می کند .

ج) نمونه دریافتی از آب دهان یا ترشحات حلق وبینی نباشد .

د) بهورز باید ضمن ثبت مشخصات بیمار دردفتر خود ، فرم مخصوص دریافت خلط را تکمیل و به آزمایشگاه ارسال کند.همچنیم تکنسین آزمایشگاه و یا بهورز مشخصات بیمار را مطابق موارد زیر ، روی بدنه ظرف با خط خوانا نوشته و یا می چسباند .

نام ونام خانوادگی بیمار _ نام پدر _ شماره مسلسل نمونه _ تاریخ دریافت نمونه _ خانه بهداشت روستایی (یاواحد اقدام کننده) _ مرکزبهداشتی ودرمانی _

انواع نمونه های ارسالی به آزمایشگاه سل تحت عنوان خلط:



انتقال نمونه به آزمایشگاه

هر قدرنمونه سریعتر به آزمایشگاه برسد ، احتمال یافتن باسیل سل درآن بیشتر است ، زیرا طولانی شدن زمان قبل از آزمایش ، باعث تکثیر باکتری های فلور دهان وصدمه به باسیل سل ودرنتیجه ، کاهش احتمال کشف آن می شود .

به طور کلی ، برای انجام گسترده مستقیم وکشت ، نمونه باید همان روز به محل آزمایش برسد . درصورت عدم ارسال ، لازم است نمونه درمحلی کاملا خشک (ترجیحا یخچال فاقد واکسن ومواد غذایی) نگهداری شود .(بهتراست به منظور گرفتن نمونه وارسال آن به آزمایشگاه ، هماهنگی های لازم را قبلا انجام داد) محافظت نمونه ازگرما و نورخورشید ، عمر باسیل را بیشتر می کند .

نمونه ها باید درظرفهای درپیچ دارغیر قابل نشت جمع آوری شوند . برای حمل نمونه ها از جعبه های مخصوص آن استفاده گردد. هنگام تحویل گرفتن نمونه ها در آزمایشگاه مقصد باید نمونه ها با فهرست موجود مقایسه شود تا از نظر مطابقت اطلاعات ، اطمینان حاصل گردد.

آزمایش میکروسکوپی مستقیم:

آزمایش گسترده مستقیم با میکروسکوپ ، روش پایه درآزمایشگاه میکروبیولوژی سل است وبرای تشخیص وپیگیری درمان به کار می رود . اگرچه آزمایش مستقیم حساسیت کمتری نسبت به کشت دارد ، اما سهولت انجام آن حتی درآزمایشگاههای کوچک و محیطی ، اولین آزمایشی است که روی نمونه های بیماران انجام می گیرد .اساس این آزمایش ، توانایی مایکوباکتری ها برای جذب رنگهای خاص به دیواره خودونگهداری آن رنگها درحضور اسید والکل است . بنابراین ، به آنها باسیل " اسید- فست " گفته می شود . دررنگ آمیزی با روش " زیل –نلسون " کلاسیک ، باسیل به رنگ قرمز در یک زمینه آبی (متیلن بلو) یا سبز (سبزمالاشیت) دیده می شود.

تهیه گسترش به روش مستقیم:

- ابتدا روی لام نو و تمیز کد مشخصی گذاشته شود.
- بوسیله آنس یا چوب سواپی که از وسط شکسته شده است، قسمت ضخیم و چرکهی خلط را برداشته و روی لام گستره ای به ابعاد ۱-۲ سانتی متر در عرض و ۲-۳ سانتی متر در طول ایجاد کنید.
- پس از تهیه گسترش باید حداقل ۳۰ دقیقه صبر کرد تا لامها کاملا خشک شوند.
- گسترش های خشک شده را با قرار دادن در انکوباتور (دمای ۶۵-۷۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ تا ۶۰ دقیقه) فیکس نمایید. همچنین میتوانید از چراغ الکلی استفاده کنید.

تهیه گسترش به روش غیر –مستقیم :

- ابتدا روی لام نو و تمیز کد مشخصی گذاشته شود.
- پس از هضم و آلودکی زدایی ، از ته نشین نمونه با استفاده از پیپت پاستور شیشه ای استریل روی سطح لام گسترشی به ابعاد ۱-۲ سانتی متر در عرص و ۲-۳ سانتی متر در طول تهیه نمایید.
- پس از تهیه گسترش باید حداقل ۳۰ دقیقه صبر کرد تا لانها کانل خشک گردد.

رنگ آمیزی

بهترین روش رنگ آمیزی ، رنگ آمیزی زیل –نلسون است که از ۳ مرحله تشکیل می شود:

مرحله اول : رنگ کردن (Staining)

- لام ها را روی یک پایه فلزی قرار دهید (حداکثر ۱۲ لام) .

- لام ها نبایستـــی در تماس با یکدیگـــر باشند.
- روی سطح گسترده رابامحلول کاربول فوشین صاف شده بپوشانید.
- لام را با آرامی حرارت داده تا هنگامی که از سطح لام بخار متصاعد شود .
- حرارت دادن را یک یا دو بار دیگر تکرار نمایید . زمانی که دودی شبیه به دود سیگار از فوشین متصاعد شد و یا بوی فوشین احساس شد، حرارت دادن را قطع کنید. (هیچ گاه نبایستـــی فوشین روی لام بجوشد و یا خشک شـــود.)
- لام را پس از خنک شدن به آرامی بشویید.

مرحله دوم : رنگ بری (Decolourisation)

- به لام اسید الکل اضافه کرده و ۱تا ۲ دقیقه صبر میکنیم.
- لام را به آرامی با آب بشویید.

مرحله سوم : رنگ آمیزی زمینه (Staining Counter)

- تمام سطح گسترده را با متیلن بلو بپوشانید ، و ۱تا ۲ دقیقه صبر کنید.
- لام را به آرامی شسته و در حرارت اتاق خشک کنید.
- هیچگاه از کاغذ جاذب برای خشک کردن لام استفاده نشود.

(هرچقدر گسترده نازک تر باشد زمان اسید الکل کمتر و زمان متیلن بلو بیشتر باشد ، و برعکس.)

آزمایش میکروسکوپی

آزمایش میکروسکوپی به دو منظور انجام می شود :

۱ – مشخص کردن اینکه آیا گسترده حاوی باسیل اسید- فست هست یا خیر ؟

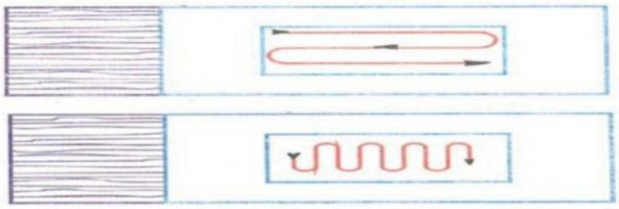
۲ – تعیین تقریبی تعداد احتمالی باسیل ها در گسترده.

روش خواندن گسترده

آزمایش میکروسکوپی باید مشخص کند که آیا باسیل اسید – فست در گسترده وجوددارد یا خیر ؟ واگر هست تعداد تقریبی آن درهر میدان میکروسکوپی مشاهده شده چقدر است ؟ باسیل ها به اشکال میله ای کوچک ونازک دیده می شوند که گاهی کمی خمیده اند . باسل ها رنگ قرمز را می گیرند و حاوی گرانول های داخلی پررنگ تری هستند که به صورت تنها ، دوتایی یا گروهی درزمینه آبی روشن لام کاملا جلب توجه

می کنند ، معمولا باسیل زمانی در گسترده مشاهده می شود که حداقل بین هزار تا ده هزار باکتری در هر میلی لیتر خلط وجودداشته باشد .

بهتر است یک روش واحد بررسی لام به کار برده شود ، به عنوان مثال ، از بالا به پایین و یا از چپ به راست ، تا



هنگامی که ۱۰۰ میدان میکروسکوپی دیده شود.

یک میدان میکروسکوپی زمانی مناسب است که در آن سلولهای با منشاء برونش (گلبول سفید ، موکوس و سلولهای مژکدار) وجود داشته باشد .

اگر میدان میکروسکوپی دارای این خصوصیات نباشد ، باید از میدان دیگری استفاده نمود . تعداد میدانهای مورد مشاهده به تعداد باسیل در نمونه بستگی دارد :

الف) در صورتی که کمتر از یک عدد در هر میدان باشد ، حداقل ۱۰۰ میدان میکروسکوپی را باید جستجو کرد .

ب) در صورتی که یک تا ۱۰ باسیل درهر میدان وجود داشته باشد ، دیدن ۵۰ میدان کافی است.

ج) در صورتی که بیش از ۱۰ عدد باسیل در هر میدان وجود داشته باشد ، دیدن ۲۰ میدان کافی است .

هنگامی که بررسی لام به پایان رسید ، لام ها را در محلول گزیلل فرو برده و برای خشک شدن لام آن را بطور عمودی روی کاغذ صافی قرار دهید ، سپس آنها را در جعبه مخصوص نگهداری لام بگذارید .

پس از خواندن لام ، عدسی میکروسکوپ را با استفاده از دستمال کاغذی یا گاز به آرامی پاک کنید.

(پس از خواندن لام وگزارش نتیجه لازم است کــه لام ها را برای انجام کنتــرل کیفی تا یک سال نگهداری نمایید .)

نحوه گزارش نتایج بررسی میکروسکوپی نمونه های سل:

۱. پس از بررسی تمام گسترده اگر هیچ باسیل اسید فستی در زمینه آبی مشاهده نشد نتیجه به صورت گزارش می شود.

۲. پس از بررسی ۱۰۰ شان ، اگر بین ۱-۹ عدد باسیل مشاهده شد نتیجه بررسی لام به صورت تعداد عددی باسیل مشاهده شده گزارش می شود.

۳. پس از بررسی ۱۰۰ شان ، اگر بین ۱۰-۹۹ عدد باسیل مشاهده شده نتیجه بررسی لام به صورت **P(+)** گزارش می شود.

٤. پس از بررسی ۱۰۰ شان ، اگر در هر شان ۱-۱۰ باسیل مشاهده شد، نتیجه بررسی لام به صورت **P(++)** گزارش می شود.

۵. پس از بررسی ۱۰۰ شان ، اگر در هر شان بیش از ۱۰ باسیل مشاهده شد، نتیجه بررسی لام به صورت **p(+++)** گزارش می شود.

دستور العمل کشت نمونه ها:

حداکثر نمونه های بالینی حاوی مایکوباکتریوم ها، دارای باکتری های دیگر نیز می باشند .این میکروارگانیسم ها باید قبل از کشت طبق دستورات حذف شوند تا از آلودگی زدایی محیط کشت جلوگیری شود.

هنگام کشت باسیل سل ،۲ جنبه مهم را مدنظر نگاه دارید: نمونه ها باید خوب هموژن شود تا باسیل را از موکوس ، سلولها و بافتهای که به آن چسبیده آزاد کند.هموژن کردن و آلوده زدایی نباید حیات مایکوباکتریوم را از بین ببرند.

هضم وآلوده زدایی به روش پتروف:

مواد: محلول سود ۴٪ ،محلول ۲ نرمال هیدروکلریدریک اسید ، اندیکاتور فنل رد.

روش:

- به هم حجم نمونه ها سود ۴٪ بیفزایید.
- پس از بستن در لوله ، نمونه را با استفاده از شیکر مخلوط نمایید.
- نمونه را بمدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگهدارید.
- نمونه را به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۳۰۰۰ سانتریفوژ کنید.

- محلول رویی را دور بریزید.
- به منظور خنثی نموندن، چند قطره اسید به ته نشین بیفزایید،تا تغیر رنگ مشاهده شود.
- رسوب را کمی مخلوط نمایید و به ۳ محیط (برای نمونه خارج ریوی) و یا ۲ محیط (برای نمونه خلط) لونشتاین-جانسون تلقیح نمایید.

تلقیح:

میتوان از پیپت پاستور شیشه ای یا پلاستیکی استفاده نمود.به هر محیط کشت باید ۲/.تا ۴/. میلی لیتر از رسوب نمونه (۲ تا ۴ قطره) به سطح محیط افزوده شود.

انکوباسیون:

محیطهارا پس از تلقیح به صورت مورب حداقل به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ تا ۳۷ درجه نگهدارید تا از پوشیده شدن سطح محیط با نمونه اطمینان حاصل گردد. محیطها برای مدت ۲ ماه در انکوباتور نگهداری شده و در صورت منفی بودن ، پس از استریل شدن دور انداخته شود.

خواندن کشت

جدول زمانی بررسی کشت:

تمامی کشت ها بایستی پس از ۷۲ ساعت از نظر جذب نمونه تلقیح شده و تبخیر آن کنترل شوند و سپس درب لوله ها باید محکم بسته شوند تا از خشک شدن محیط و آلوده شدن آن جلوگیری شود، پس از آن کشت ها هر هفته بررسی می شوند که به هنگام بررسی باید به موارد زیر توجه داشت:

- پس از یک هفته به منظور بررسی مایکوباکتریوم های سریع الرشد.
- به مدت هشت هفته کشتها به منظور بررسی رشد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس.

کلنی های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس خشن، مومی، فاقد رنگدانه(کرم رنگ) و کند رشد است، که ۸-۴ هفته پس از تلقیح ظاهر می شوند. در موارد مشکوک (اسمیر منفی /کشت مثبت) باید گسترش تهیه گردد و به روش زیل نلسون رنگ آمیزی گردد.

گزارش و ثبت نتایج کشت:

- عدم رشد منفی
- ۵۰>کلنی تعداد کلنی
- ۵۰_۱۰۰ کلنی مثبت(+۱)
- ۱۰۰_۲۰۰ کلنی مثبت(+۲)
- ۲۰۰_۵۰۰ کلنی مثبت(+۳)
- ۵۰۰< مثبت(+۴)
- آلوده آلوده

کنترل کیفی (Control Quality)

کنترل کیفی در آزمایشگاه مجموعه فعالیتهایی است که شخص آزمایش کننده برای اطمینان از کیفیت نتایج آزمایش انجام می دهد. این فعالیتها باید در برگیرنده همه مراحل آزمایش ، از جمع آوری نمونه تا ارسال گزارش به پزشک مربوط باشد.کنترل کیفی شامل دو مرحله کنترل کیفی داخلی و کنترل کیفی خارجی است. منظور از کنترل کیفی داخلی ، بررسی و نظارت کیفی توسط فرد مسئول (سوپروایزر علمی) در آزمایشگاه محیطی است. در کنترل کیفی خارجی ، این وظیفه را آزمایشگاههای مرکزی انجام می دهند.

کنترل کیفی داخلی (Control Quality Internal):

کنترل کیفی داخلی شامل بررسی هفتگی ، ماهیانه وسایل و همچنین کنترل کیفیت رنگها و محلولهای تهیه شده و بررسی مجدد لامهای دیده شده است. برای این منظورباید در هر آزمایشگاه دفترچه ای مربوط به نحوه کار و رعایت اصول ایمنی ، نگهداری لوازم ، بهداشت پرسنل ، جمع آوری و ثبت نمونه ها ، حذف نمونه های نامناسب و بالاخره گزارش دهی وجود داشته باشد.

مواردی که باید کنترل شوند :

۱- مطمئن شوید که درهای آزمایشگاه همیشه بسته باشد.

۲- وسایل و مواد را طوری قرار دهید که به آسانی در دسترستان باشد.

۳- محل میز کار باید عاری از گرد وغبار بوده و حداقل روزانه یک بار با محلول فنل ۵ ٪ضد عفونی شود.

۴- روش کار انجام آزمایش باید بر اساس دستورالعمل مباحث موجود در SOP آزمایشگاه مرجع سلامت باشد.

۵ - بررسی هفتگی کلیه ابزار و وسایلی که مورد استفاده قرار می گیرند.

۶ - کنترل لامپ UV : هر هفته با پنبه آغشته به اتانل ۷۰ ٪لامپ UV را تمیز کنید . ساعات کار با لامپ نیز ثبت شود.

میکروسکوپ:

- کنترل روزانه :

پاک کردن عدسی ها و کندانسور با کاغذ مخصوص ، خاموش کردن چراغ میکروسکوپ و پوشاندن میکروسکوپ با روکش مخصوص .

- کنترل ماهانه :

گردگیری قطعات میکروسکوپ ، تمیز کردن عدسی شیئی و عدسی چشمی ، تمیز کردن کندانسور با محلولهای پاک کننده لنز (گزیلول) و تمیز کردن جایگاه لام.

کنترل کیفی نمونه و فرمهای دریافتی:

۱- آزمایش میکروسکوپی فقط زمانی انجام می گیرد که نمونه همراه با فرم درخواست توسط پزشک ویا

فرد مسئولی فرستاده شود.هیچگاه نباید آزمایش با درخواست شفاهی صورت گیرد.

۲- توجه داشته باشید که فرم ، کامل و خوانا تکمیل شده باشد.

۳- باید دقت نمود که فرم مربوطه همراه با نمونه به محیط آلوده منتقل نشود.برای این منظور شماره آزمایش را روی ظرف نمونه و فرم مربوط ثبت کنید.

۴- کیفیت نمونه را قبل از دریافت بررسی کنید و توجه داشته باشید که نمونه آب دهان یا ترشحات حلق و بینی نباشد.

۵- هنگام دریافت نمونه بلافاصله اطلاعات را با تاریخ آن در دفتر آزمایشگاه ثبت کنید.

کنترل کیفی رنگها:

۱- تهیه محلولهای رنگ آمیزی با توجه به مقدار مورد نیاز یک ماهه.

۲ - نگهداری محلول فوشین پس از تهیه و صاف کردن (جهت جلوگیری از رسوب) در گرمخانه (اتو) ۳۷ درجه سانتیگراد .

۳- در هر مرحله رنگ آمیزی یک لام شاهد مثبت و منفی نیز تهیه و رنگ شود. چنانچه لام های شاهد از نظر کیفیت رنگ آمیزی مناسب تشخیص داده شد ، لامهای بیماران مشاهده و گزارش شود. در غیر این صورت ، روش کار مجددا بررسی و از محلول های تازه تهیه شده ، برای رنگ آمیزی استفاده شود.

برای تهیه لام مثبت شاهد می توان از واکسن G.C.B یا از خلط بیمار مسلول استفاده نمود. بهتر است حدود ۱۰ لام از نمونه را تهیه و پس از خشک و ثابت شدن ، آنها را به عنوان شاهد مثبت نگهداری کنند.برای تهیه شاهد منفی می توان از خلط شخص سالم و یا از کلنی استافیلوکک استفاده نمود.

هرگونه محلول رنگ جدید که جهت استفاده به واحد رنگ آمیزی برده می شود با یک گسترده مثبت و گسترده منفی کنترل می شود. در صورتی که موارد زیر مشاهده شود، رنگ آمیزی مورد قبول نمی باشد:

- در لامهای کنترل مثبت ، باسیل قرمز رنگ نگرفته باشد.
- لامهای کنترل منفی پس از رنگ زدایی همچنان قرمز باقی بماند.
- در لامهای کنترل منفی ، زمینه به درستی رنگ زدایی نشده باشد.
- در لامهای منفی ، باسیل دیده شود.

کنترل کیفی در مرحله نتایج و گزارش کشت :

کانی های رشد کرده در محیط لونشتاین_جانسون از نظر اسید _فاست بودن بررسی می شوندسابقه بیمار و همخوانی نتایج کشت و گسترده میکروسکوپی نیز بررسی می شود.

چنانچه باسیل اسید _فاست در گسترده میکروسکوپی مشاهده گردد ولی کشت منفی باشد، ممکن است :

- مایکوباکتریوم ها به علت شروع درمان دارویی از بین رفته باشند.
- آلوده زدایی به طور مناسب انجام نشده باشد (مدت زمان آلوده زدایی بسیار طولانی باشد)
- غلظت هیدروکسید سدیم از حد معمول بالاتر باشد.

- شرایط نامناسب انکوباسیون(دمای انکوباتور بالا یا بسیار پایین باشد)
- وجود مایکوباکتریوم غیر توبرکلوزیس

کنترل کیفی خارجی:

کنترل کیفی خارجی بر عهده آزمایشگاههای رفرانس کشوری (آزمایشگاه مرکزی) ، و شامل بررسی ابزار و وسایل ، روش کار و میزان دقت صحت مشاهده میکروسکوپی گسترش توسط آزمایشگر است.برای تعیین میزان دقت میکروسکوپی ، بسته حاوی شش عدد لام مثبت و منفی به همراه پرسشنامه های مخصوص برای آزمایشگاه محیطی فرستاده شده و نتایج دریافتی مورد ارزیابی قرار می گیرد.

ایمنی در آزمایشگاه محیطی

از آنجا که عامل بیماری سل در فضا سریعا به شکل آئروسول (Aer osol (در می آید که به شدت مسری است ، رعایت نکات ایمنی ذیل ضرورت دارد:

۱- قبل از شروع کار ، از گان و ماسک استفاده شود

۲- هنگامی که دستها با خلط یا مواد آلوده تماس پیدا می کند ، بلافاصله با آب و صابون باید شسته شود.

۳- قبل از دست زدن به ظروف خلط از دستکش جراحی یکبار مصرف استفاده شود.

۴- در صورت آلودگی لباس با خلط ، فرد دیگری ، قسمت آلوده را با فنل ۵ ٪آغشته نمایید و بعد لباس را درآورید. سپس لباس را در محلول ضد عفونی خیسانده و بعد اتوکلاو کنید.

۵- در صورت ریختن خلط روی میز کار و یا آلودگی محل کار نیز فنل ۵ ٪را در محیط آلوده (به شعاع یک متر) ریخته ، سپس کاغذ کاهی یا صفحه روزنامه روی آن قرار دهید و مجددا روی آن فنل بریزید و محل کار را به مدت نیم ساعت ترک کنید.

۶ - در صورت نشت خلط از ظرف نمونه در جعبه ارسالی ، نمونه های آلوده نشده را از جعبه خارج کرده و اطراف بدنه آنها را با فنل ۵ ٪تمیز کنید ، سپس ظرف نشت کرده را همراه با جعبه ارسالی اتوکلاو نمایید.

دریافت نمونه در آزمایشگاه:

نمونه ها معمولا به قسمت مخصوص دریافت نمونه در آزمایشگاه آورده می شوند و سپس جعبه ارسالی پس از بازدید اولیه از نظر ظاهر ، درب جعبه داخل هود با رعایت نکات زیر باز می شود.

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

۲ - جعبه ارسالی را از نظر نشت نمونه ها مورد بازرسی قرار دهید ، در صورتی که تعداد زیادی از نمونه ها نشت کرده باشد ، کل جعبه را اتوکلاو کرده یا بسوزانید.

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

۴ - جعبه را به دقت باز کنید ، توجه داشته باشیدکه ظرف حاوی نمونه ترک یا شکستگی نداشته باشد.

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

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

۷- داخل جعبه را با مواد ضد عفونی کننده مثل فنل ۵ ٪ضد عفونی کنید.

۸- نمونه ها را برای انجام آزمایش ، به ترتیب در داخل هود قرار دهید.

۹- پس از اتمام کار دستها را با آب صابون شسته و دستکشها و ظروف نمونه را داخل یک سطل استیل درب دار گذاشته و پس از بستن درب سطل ، آن را به قسمت اتوکلاو یا برای سوزاندن ارسال کنید.

بازکردن نمونه در داخل هود

- به منظور کاهش خطر تولید آئرسل در حین انجام مراحل کشت و دید مستقیم ، دقت کنید تمامی مراحل در داخل هود انجام شود.
- در صورت قطع جریان برق و یا خاموش شدن هود ، برای شروع مجدد کار ، باید ابتدا هود را پنج دقیقه روشن گذاشته و بعد کار را شروع کرد.
- پس از روشن کردن هود و قرار دادن نمونه ها در داخل آن ، شصت ثانیه در حالی که دستها داخل هود می باشد ، صبر کنید.
- بدین طریق ، دستگاه قادر به تثبیت (Stabilise)و زدودن احتمالی میکروارگانیسم های داخل دستگاه می شود.
- دقت شود که سوراخهای ورود هوا در قسمت ورودی هود (grille – Front)توسط اجسام خارجی مسدود نباشد.

- سعی شود که در موقع کار حداقل ۱۰ سانتی متر با قسمت ورودی هوا در هود فاصله داشته باشید تا جلوی ورودی هوا به داخل آن گرفته نشود.
- قبل از شروع کار ، کاغذ صافی (یا کاغذ کار) آغشته به فنل ۵ ٪را در کف سینی کار (یعنی محلی که مواد آلوده برای کشت و دید مستقسم روی آن قرار می گیرند) در داخل هود قرار داده و سپس وسایل را داخل هود بگذارید.
- به منظور جلوگیری از تردد یا حرکات اضافی در آزمایشگاه (ماند جستجوی ابزارها و یا مواد مورد نیاز در حین کار)، لازم است که ابتدا لیستی از اقلام مورد نیاز تهیه کرده و پس از آماده کردن وسایل و در دسترس بودن آنها شروع به کار کرد.
- حرکات و تردد اضافی در مقابل هود فعال در حین کار ، به جریان هوا آسیب وارد کرده و از امنیت کار می کاهد.
- در داخل هود فقط مواد و وسایل مورد نیاز قرار داده و از انبار کردن و نگهداری وسایل اضافی در هود پرهیز کنید (وجود وسایل اضافی در هود سبب اختلال در گردش هوا می گردد.) .
- مواد و وسایلی که ایجاد آئرسل می کنند ، مانند ورتکس ، باید در قسمت انتهای هود قرار گیرند(در عقب) . مشروط بر اینکه ، دریچه های هوا را در قسمت عقب هود مسدود نشوند.
- اجسام حجیم مانند ظروف مخصوص ، پیپت و ظرفهای جمع آوری کننده را در یک طرف هود قرار دهید.
- وسایل و مواد را طوری قرار دهید که کار از سمت منطقه تمیز به سمت منطقه آلوده جریان داشته باشد ، یعنی به گونه ای باشد که وسایل کثیف و اجسام آلوده از روی وسایل پاک و تمیز عبور داده نشوند.
- لوله ها را بدون درپوش در داخل هود قرار نداده و حتما درپوش آنها را بگذارید.(این مسئله از انتقال آلودگی به نمونه جلوگیری می کد.)
- در داخل هود از شعله با حجم زیاد استفاده نکنید ، چون ایجاد موجی از گازهای در حال اشتعال نموده و جریان عادی گردش هوا در داخل هود را مختل می کند.
- پس ازاتمام کار ، کاغذ را همراه با مواد آلوده در اتوکلاو ، و سینی مربوط را در فور استریل کنید.

- به هنگام کار در داخل هود باید بازوهای فرد آزمایش کننده مماس بر سطح هود نبوده و بالاتر از دریچه های ورود هوا باشد تا اشکالی در جریان هوا به وجود نیاید.
- پس از اتمام کار ، وسایل آلوده را در داخل کیسه مخصوص اتوکلاو گذاشته و در آن کمی آب ریخته و به قسمت اتوکلاو بفرستید.بدین طریق بخار مناسب در داخل کیسه نیز تولید می شود.

طرز استفاده از اتوکلاو

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

وقتی که آب به جوش می آید ، بخار از شیر تخلیه خارج شده و هوا را از درون اتوکلاو با خود به بیرون می برد.

باید به هوا و بخار آب اجازه داد که آزادانه خارج شوند تا تمام هوا از درون دیگ خالی شود.

بدین طریق ، تشکیل حباب هوا در داخل اتوکلاو متوقف می شود. در این حالت شیر تخلیه بخار هوا باید بسته شود.

برای کنترل خروج هوا از داخل اتوکلاو ، یک شیلنگ لاستیکی را به سر شیر تخلیه وصل کرده و سر دیگر آن را در داخل سطل حاوی آب می گذارند تا تشکیل حباب و قطع آن را مشاهده نمایند. از این مرحله به بعد فشار بخار بالا رفته تا به میزان مطلوب برسد. معمولا فشار ۱۵ پوند بر اینچ مربع لازم است و پس از آن بخار اضافی تخلیه می شود.

وقتی حرارت داخل اتوکلاو به دمای مورد نیاز (۱۲۱ درجه سانتیگراد) رسید ، فشار دستگاه به مدت ۳۰ دقیقه ثابت نگهداشته می شود

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

ایمنی در آزمایشگاه سل

عفونتهایی که در حین انجام آزمایش ، افراد آزمایشگاهی را گرفتار می سازند ، از دیرباز شاخته شده اند. مطالعات نشان داده است ، خطر ابتلا به سل در کارکنان آزمایشگاه سل ، ۳ تا ۵ برابر بیشتر از سایر کارکنان امور دفتری و اجرایی در هما موسسه است.

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بیماری مزمنی را تولید کرده که طول درمان آن ۱۸ – ۶ ماه است . سایر مایکوباکتریوم های بالقوه بیماری زا نیز نسبت به مواد ضد میکروبی از جمله دارو های ضد سل مقاومت بسیار بالایی نشان داده اند و اقدامات درمانی را با مشکل مواجه ساخته اند . راههای انتقال سل به کارکنان آزمایشگاه از طریق استنشاق و نیز از طریق آسیب و جراحات ، مانند بریدگی و یا سایر راهها است.

با توجه به این خطرات ، اقدامات مربوط به ایمنی در آزمایشگاه سل از اهمیت ویژه ای برخوردار است .

اقدامات مربوط به ایمنی باید از سطح اجرایی (Administrative) شروع شود.

اگر موسسه به قدر کافی بزرگ باشد باید دفتری در ارتباط با حفاظت و ایمنی وجود داشته و از حمایت مسئولین موسسه برخوردار باشد.

مسئولیت کادر اجرایی موسسه درمقابل کارکنان از نظر ایمنی به شرح زیر است :

۱- کارکنان بخش سل باید از نظر اصول بهداشتی تحت مراقبت پزشکی قرار داشته باشند(Monitoring).

۲ - آموزشهای صحیح آزمایشگاهی برای کارکنان فراهم شود .

۳- کارکنان باید از خطرات آزمایش با مواد عفونی مطلع شوند.

۴ - آموزش کارکنان برای مقابله با حوادث در حین کار و تامین امکانات لازم .

۵- در اختیار گذاشتن وسایل ایمنی برای کارکنان آزمایشگاه .

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

بیشتر عفونتها در آزمایشگاه مایکوباکتریولوژی مربوط به ایجاد آئرسل حاوی باسیل اسید فست است که اغلب از نظر دور مانده و ناشناخته باقی می ماند. مطالعات نشان داده است که فعالیت های زیر منجر به ایجاد آئرسل می شود :

۱- انتقال کشت مایع و یا مایع رویی پس از سانتریفوژ به ظرف دیگر

۲- استفاده از پیپتورهای با حجم ثابت

۳- به هم زدن سوسپانسیون میکروبی با پیپت در زمان تلقیح

۴- استفاده از دستگاه مخلوط کن با سرعت زیاد (Blender)

۵- افتادن لوله یا ظرف حاوی محیط کشت بر روی زمین

۶ - شکستن لوله ها در حین سانتریفیوژ

۷ - چکیدن سوسپانسیون میکروبی از پیپت در روی سطح میز کار یا سطوح سخت

اگرچه ریه ها راه عمده ابتلا به عفونت سل می باشند ولی طرق غیر معمول نیزمانند سرسوزن ،اجرام نوک تیز مانند : تکه شیشه خرد شده ، و یا نفوذ میکروب از راه خراشها یا برشهای جلدی نیز می توانند سبب ابتلا شوند.

تمام سطوح و وسایل کار در اتاق کشت (room Isolation,) از جمله هود ایمنی باید بالقوه عفونت زا تلقی گردیده و باید به طور مرتب با وسیله مناسب تمیز شوند .

برای این منظور می توان از یک ماده ضد عفونی کننده ، اتوکلاو و یا اشعه UV بسته به نوع وسیله استفاده کرد.

راههای جلوگیری از آئروسل:

استفاده از هود ایمنی برای جلوگیری از ایجاد آئرسل و محل نصب آن باید مطابق با الزامات آزمایشگاه سل باشد. (کنار پنجره و در معرض جریان هوا نباشد ، تردد در محل نصب هود حداقل باشد و ...) .

باید مسیر جریان هوا در آزمایشگاه به گونه ای باشد که سیستم تهویه (Circulation) نبوده و از منطقه تمیز به طرف قسمت کمتر تمیز در حرکت باشد.

به این ترتیب هوا از قسمت راهرو و یا کریدور آزمایشگاه به طرف محوطه عمومی آن حرکت کرده و سپس از این ناحیه به طرف اتاق کشت رفته و در مسیر خود به هود ایمنی وارد شده و به اتاق باز نمی گردد.

وسایل:

نگهداری و تعمیرات عادی وسایل آزمایشگاه سل باید با نظارت دقیق انجام شود. بازرسی وسایل اتاق کشت ، سرویس نمودن و تمیز کردن آنها باید با نظارت فرد با تجربه ای انجام شود.

اگر در نظر است که وسیله ای برای تعمیر و یا نگهداری از اتاق کشت به خارج از آزمایشگاه منتقل شود باید سطوح آن را با ماده ای مناسب ضد عفونی کرد.

لامپ UV

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

مواد ضد عفونی کننده :

قدرت کشندگی یک ماده ضد عفونی کننده به عواملی همچون جمعیت ارگانیسم مورد هدف ، غلظت ماده مورد استفاده ، مدت زمان تماس با جرم آلوده و حضور مواد آلی در آن بستگی دارد.

برای از بین بردن باسیل سل مواد ضد عفونی کننده مناسب شامل ترکیبات حاوی فنل ، هیپوکلرید ، الکل ها ، فرمالدئید ، یدوفور و یا گلوتارآلدئید می باشند. این ضد عفونی کننده ها را بر اساس نوع موادی که باید آلوده زدایی شوند ، انتخاب می کنند.

ترکیباتی که بر علیه سایر ارگانیسم ها موثر می باشند ، ممکن است تاثیری بر باسیل سل نداشته باشند. مثلا ترکیبات آمونیوم چهار تایی با غلظت های توصیه شده بر روی باسیل سل ، بی تاثیر می باشند.

محلولهای ضد عفونی کننده را باید همه روزه به صورت تازه تهیه کرد و پس از تهیه محلول رقیق شده نمی توان آن را ذخیره کرد ، زیرا غیرفعال می شوند.

ضد عفونی کننده های رایج در آزمایشگاه سل به اختصار ذکر می شوند.

فنل

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

هیپوکلریت

هیپوکلریت نیازی به رقیق کردن ندارد ولی به فعال کننده نیاز دارد و معمولا شرکت سازنده ، آن را همراه محلول عرضه می نماید.

گلوتارالدئید به صورت محلول ۲ ٪عرضه می شود ؛ در حالی که فعال کننده آن یک ترکیب بی کربنات است.

گلوتار آلدئید برای ضد عفونی کردن سطوح میز کار و وسایل شیشه ای مناسب است. محلول فعال شده را باید ظرف دو هفته مصرف کرده و در صورت کدورت آن را حذف کرد.

الکل ها

معمولا اتانل ۷۰ ٪یا پروپانول را در مخلوط با شن (برای پاک کردن لوپ) و یا آلوده زدایی سطوح کار مورد استفاده قرار می دهند . ضمنا برای ایجاد تعادل لوله در سانتریفوژ نیز از یک لوله حاوی اتانول استفاده می شود.

وقتی که دستها آلوده می شوند ، ابتدا آنها را با الکل ۷۰ ٪می شویند و سپس با صابون تمیز می کنند ؛ که روش بسیار موثری است.

لباسهای حفاظت کننده

چون ایمنی هود صد در صد موثر نبوده و نقایص فیزیکی و مکانیکی در آن ممکن است ، روی دهد ، پوششهای حفاظت کننده به خصوص ماسک به حفاظت بیشتر پرسنل کمک می کند. در صورت استفاده از ماسک این پوشش باید قادر به فیلتر نمودن بیش از ۹۰ ٪اجرام با قطر ۰/۵ تا ۱ میکرومتر باشد. همچنین گانهای جراحی بیمارستان برای آزمایشگاه سل مفید است و تمام پوشش های محافظت کننده مانند گان را باید قبل از شستشو اتوکلاو کرد.

نظارت بهداشتی پرسنل آزمایشگاه سل

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

در صورت انجام کشت و ایجاد مخاطره چه باید کرد ؟

در صورت شکستن یک لوله یا یک ظرف حاوی کشت مایع مقادیر بسیار زیادی آئرسل ایجاد می شود.

باید اقدامات زیر انجام شود :

۱- بلافاصله اتاق را ترک کنید ، زیرا خطر آئروسل های ایجاد شده به مراتب بیشتر از آن است که فقط سطح محیط را بپوشاند.

۲- هود را روشن گذارده و برای حداقل ۴ ساعت به اتاق آلوده باز نگردید. این مسئله به رقیق شدن مقدار nuclei Droplet در اتاق کمک می کند . همچنین عبور هوای آلوده از مسیر فیلتر هود مانع از سرایت آلودگی به مناطق خارج از آزمایشگاه می شود.

۳- در صورت امکان ، پس از سپری شدن ۴ ساعت ، اتاق حادثه دیده و یا اتاقها را با گاز فرمالدئید ضد عفونی کنید . این کار را نمی توان در مکانهایی که امکان نشت گاز فرمالین وجود دارد انجام داد.

طرز ضد عفونی کردن آزمایشگاه با فرمالدئید

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

۱ - تمام منافذ خروجی اتاق را مسدود کنید. این کار را می توان با چسباندن کیسه های زباله در روی شیارهای خروجی هوا انجام داد. همین طور اطراف چهارچوب درها و سایر منافذ را که امکان نشت فرمالین وجود دارد ، مسدود کنید.

رطوبت نسبی اتاق را باید تا ۷۰ ٪بالا برد تا از میزان تاثیر فرمالدئید اطمینان حاصل کرد.

۲- مقدار فرمالین مورد نیاز آزمایشگاه را محاسبه کرده ، روی اجاق برقی بگذارید تا بجوشد. به ازای هر فوت مکعب فضای اتاق یک میلی لیتر فرمالین لازم است. (هر متر مکعب برابر است با ۳۵/۳ فوت مکعب) مثلا یک اتاق با فضای ۱۰×۱۲×۱۰ فوت که حجم آن ۱۲۰۰ فوت مکعب می گردد به ۱۲۰۰ میلی لیتر فرمالین نیاز دارد. برای ایجاد رطوبت ۷۰ ٪در این اتاق باید ۴۳۹ میلی لیتر آب نیز همزمان با فرمالین تبخیر شود (۱۸/۴ میلی لیتر آب به ازای هر متر مکعب فضای اتاق).

احتیاط :

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

۳- پس از تبخیر فرمالدئید باید ۴ ساعت (ترجیحا یک شب) صبر کرد تا فرمالین متصاعد شده در فضا باقی

بماند. پس از آن ماسک زده ، وارد اتاق شده و جلوی منافذ خروجی هوا را باز کنید.

جریان هوا را برقرار کرده تا تمامی گاز فرمالدئید از محوطه خارج شود.

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

تذکر :

گاز فرمالین قادر است داخل لوله های محیط کشت شود. بنابراین ، در محلی که انکوباتورهای محیط کشت وجود دارد بایستی دقت شود ، کشت ها از تاثیر فرمالین محافظت شوند.

کنترل کیفی آب مقطر و آب شیر در آزمایشگاه سل

آب مقطر و آب شیر را از نظر آلوده بودن به باسیل های اسید فست در هر ماه کنترل کنید . اگر آب کدر یا کثیف به نظر رسید ، ۲۰۰-۲۵۰میلی لیتر را در چند لوله سانتریفوژ نموده و از رسوب آن گسترش تهیه شود

راه دیگر این است که یک لیتر آب را از فیلتر غشایی (Membrane Filter)که اندازه منافذ آن ۰/۲۲ میکرومتر است عبور داده و سپس فیلتر را به قطعات کوچک خرد نموده و آن را در سطح محیط (J.L) بگذارید.