کیت رنگ‌آمیزی فلورسانس مایکوباکتریوم (AFB)

(Investigation Use Only, IUO)

Ref: APFLOUK1

مقدمه:

تشخیص اولیه آزمایشگاهی سل و باکتری‌های اسید فست به بررسی مستقیم اسمیرهای رنگ‌آمیزی شده، وابسته است. از میان روش‌های تشخیصی موجود، بررسی میکروسکوپی اسمیر رنگ آمیزی شده خلط، بهترین انتخاب است. اساس این روش بدین صورت است که دیواره سلول گونه‌های مایکوباکتریوم، غنی از لیپیدهای پیچیده ای است که از نفوذ رنگ‌های معمول آنیلین به داخل سلول ممانعت می کند، لیکن زمانی که تحت شرایط خاص با رنگ‌های فلوروکروم رنگ آمیزی می‌شوند، حتی با محلول‌های الکل-اسید نیز به آسانی بی رنگ نمی‌شوند. به علت این مشخصه، نه تنها M.Tuberculosis، بلکه تمام اعضای گونه‌های مایکوباکتریوم، به عنوان باسیل اسید فست (AFB) نامیده می‌شوند.

در حال حاضر، دو نوع رنگ‌آمیزی اسیدفست برای تشخیص مایکوباکتریا در نمونه‌های بالینی استفاده می شود:

- رنگ آمیزی کربول فوشین (روش زیل نلسون ([ZN] Ziehl-Neelsen) و عملکرد اصلاح شده آن که بدون حرارت دادن به رنگ انجام می‌گیرد [Kinyoun-cold staining].
- رنگ‌آمیزی فلوروکروم (auramine یا auramine-rhodamine).
- با استفاده از روش فلوروکروم، مایکوباکتریا به شکل میله‌های فلورسنت روشن در برابر پس زمینه تیره‌تر تشخیص داده می‌شوند. رنگ‌آمیزی فلوروکروم دارای حساسیت بیشتری بوده و زمان کمتری برای بررسی اسمیر در مقایسه با رنگ آمیزی Kinyoun یا ZN مورد نیاز است زیرا اسمیرها می‌توانند با بزرگنمایی کمتر مورد بررسی قرار گیرند.

محتویات کیت:

- محلول A، ۳۰ میلی لیتر
- محلول B، ۳۰ میلی لیتر
- محلول C، ۳۰ میلی لیتر
- لام‌های کنترل مثبت و منفی

محلول های آماده به مصرف با پایداری ۱۲ ماه در دمای محیط

توجه: محلول B حاوی اسید رقیق شده است بنابراین باید مسائل ایمنی عمومی در نظر گرفته شود.

ممکن است عدم استفاده از ویال باعث ایجاد کدورت در محلول گرددکه این امر تاثیری در فرآیند رنگ آمیزی نخواهد داشت.

تجهیزات موردنیاز برای آماده‌سازی اسمیر، رنگ‌آمیزی و بررسی میکروسکوپی:

- ظروف برای نگهداری نمونه
- لوپ با قطر داخلی ۳ میلی متر برای پخش کردن خلط بر روی اسلاید
- اسلاید میکروسکوپ (بدون چربی و خش)
- قلم برای علامت‌گذاری و نوشتن اطلاعات شناسایی برروی اسلاید میکروسکوپ
- گیره مخصوص نگهداری اسلاید (Forceps) برای نگه‌داشتن اسلاید اسمیر
- شعله آتش (چراغ بونزن) برای فیکس کردن اسمیر بر اسلاید و حرارت دادن اسمیر در هنگام رنگ آمیزی
- رک رنگ آمیزی برای نگه داشتن اسلایدها
- رک کشویی برای خشک کردن اسلایدهای رنگ شده در معرض هوا
- میکروسکوپ مجهز به منبع نور فلورسنت و مجموعه ای از فیلترهای مناسب

جمع‌آوری نمونه:

- نمونه ها باید در ظروف نمونه تمیز، با دهانه باز و ضد نشتی جمع آوری شوند. برای جلوگیری از انتقال نمونه از یک ظرف به ظرف دیگر، استفاده از ظروف پلاستیکی یکبار مصرف (با ظرفیت ۵۰ میلی لیتر) ترجیح داده می شود. در صورت عدم دسترسی، لوله‌های مخروطی استریل (لوله نمونه) ۵۰ میلی لیتر قابل استفاده می-باشد.
- بیماران باید از دستورالعمل‌های کتبی دقیق برای جمع آوری نمونه خلط مناسب برای تشخیص سل استفاده کنند.
- میزان مناسب نمونه برای انجام این آزمایش می‌بایست حدود ۵-۳ میلی لیتر باشد.
- بررسی میکروسکوپی اسمیر جهت تشخیص گونه های مایکوباکتریوم می تواند برای طیف گسترده‌ای از نمونه‌های بیولوژیکی از جمله خلط، مایع پلور و ... استفاده شود. برای اطمینان از بهینه سازی بازیابی باکتری‌های TB از خلط، حداقل باید دو نمونه جمع آوری و پردازش شوند.
- نمونه‌های جمع آوری شده در صبح زود بالاترین میزان AFB را دارند. با این حال، ثابت شده است که نمونه‌های تشخیصی مطلوب در هر زمانی قابل جمع آوری هستند.
- به دلیل حساسیت کم روش مذکور، انجام میکروسکوپی آزمایش برروی اسمیر تهیه شده از خون یا نمونه‌های دارای خون توصیه نمی شود.
- همچنین تشخیص میکروسکوپی اسمیر از نمونه‌های ادرار به صورت روتین به علت تشخیص مکرر saprophytic mycobacteria colonizing دستگاه ادراری، توصیه نمی شود.

یادداشت مهم:

- خلط هرگز نباید در آزمایشگاه جمع‌آوری شود.
- هنگام سرفه فرد به منظور جمع‌آوری خلط، آئروسل‌های عفونی تولید می‌شود، در نتیجه توصیه می شود جمع‌آوری نمونه با فاصله از سایر افراد و ترجیحاً در فضاهای آزاد یا در اتاق‌هایی با فشار منفی و دارای تهویه مناسب هوا انجام شود.

مدیریت نمونه:

- جهت دستیابی به بهترین نتیجه لازم است نمونه در کوتاه‌ترین زمان ممکن مورد بررسی قرار گیرد (کمتر از۲۴ ساعت).
- برای بررسی میکروسکوپی، فاصله بین جمع آوری و رنگ آمیزی اهمیت زیادی ندارد.
- حتی اگر نمونه با تاخیر به آزمایشگاه ارسال گردد نیز نتایج قابل قبولی بدست خواهد آمد.

آماده سازی اسمیر:

- توصیه می شود که اسلایدها در صورت امکان زیر هود بیولوژیکی کلاس I یا IIB آماده شوند. اگر اسمیر پس از سانتریفیوژ نمونه (اسمیر تغلیظ شده) تهیه شود، درپوش سانتریفیوژ باید زیر هود بیولوژیکی باز شود.
- باید اسمیرها با استفاده از اسلایدهای جدید، تمیز، فاقد چربی و خش تهیه شوند. با استفاده از مداد، شماره پذیرش یا شماره نمونه را در انتهای مات شده اسلاید ثبت کنید. اگر از اسلایدهای ساده استفاده می شود، اطلاعات ذکر شده را با استفاده از قلم الماس یادداشت کنید.

شرکت پژوهش و توسعه امیرپیوند

ایران، تهران، خیابان شریعتی، خیابان شهید دستگردی (ظفر)، بعد از خیابان شمس تبریزی، ساختمان بهاران، پلاک ۱۴۸، واحد ۱ / کد پستی: ۱۹۱۹۷۵۴۹۴۱

021-26422362

co.ap-rad.com

order@co.ap-rad.com

- در صورتی که اسمیر مستقیما از یک نمونه تازه (بدون سانتریفوژ پیشین) تهیه شده باشد، با استفاده از یک اپلیکاتور یا لوپ، ذرات چرکی زرد رنگ خلط را انتخاب کرده و جدا کنید.
- اسمیر را به صورت بیضی شکل در مرکز اسلاید آماده کنید. اندازه اسمیر باید دارای طول ۳-۲ سانتی‌متر و عرض ۲-۱ سانتی‌متر باشدکه در یک دوره بین ۱۰۰ تا ۱۵۰ فیلد شمارش شود.
- برای پخش مناسب خلط، آنس را کاملا محکم و با زاویه ۹۰ درجه بر روی اسلاید فشار دهید و در دایره‌های کوچک متمرکز یا مارپیچ حرکت دهید.
- آنس استفاده شده را در ظرف مناسب امحا کنید.
- از یک آنس جداگانه برای هر نمونه استفاده کنید.
- پخش کامل نمونه بسیار مهم است، به خصوص در مورد نمونه های غلیظ یا چرکی؛ نباید خیلی ضخیم و یا خیلی نازک باشد. پیش از رنگ آمیزی، اسمیر را در فاصله تقریبی ۵-۴ سانتی‌متری بر روی یک تکه کاغذ چاپ نگه دارید. اگر متن قابل خواندن نباشد، یعنی اسمیر بسیار ضخیم است.
- برای نمونه‌های تغلیظ شده (پس از سانتریفوژ شدن با دور ۳۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه)، یک یا دو قطره از رسوب را باید بر روی اسلاید بگذارید.
- اجازه دهید اسمیر به طور کامل در دمای اتاق زیر هود بیولوژیکی خشک شود.
- اسمیر را زیر نور مستقیم خورشید یا با حرارت شعله، خشک نکنید.
- اسلاید خشک شده را ۲ تا ۳ بار برروی شعله به مدت ۲ تا ۳ ثانیه حرکت دهید. توجه داشته باشید برای جلوگیری از سوزاندن اسلاید از حرارت زیاد و یا نگه داشتن طولانی اسمیر بر روی شعله اجتناب نمایید.
- همچنین اسلایدها را می توان به صورت پشت سر هم، به مدت دو ساعت بر روی صفحات گرم (۷۵-۶۵ درجه سانتی‌گراد)، زیر هود بیولوژیکی فیکس کرد.

روش رنگ آمیزی فلوروکروم:

- آماده سازی و حرارات دادن اسمیرهای فیکس شده .
- اسمیرهای شماره گذاری شده را روی یک قفسه رنگ‌آمیزی قرار دهید (حداکثر ۱۲ عدد).
- اسلایدها را با محلول رنگ آمیزی A بپوشانید (غرقاب کنید) و به آنها اجازه دهید به مدت ۱۵ دقیقه در رنگ بمانند.
- اطمینان حاصل کنید که رنگ بر روی اسلایدها باقی می ماند. از حرارت دادن و یا استفاده از دستمال (حوله) کاغذی اجتناب کنید.
- اسلاید را با آب بشویید. جریان آب را بر لبه اسلاید قرار داده و رنگ را به آرامی بشوئید.
- اسلایدها را با محلول B بپوشانید (غرقاب کنید) و به مدت سه دقیقه اجازه دهید تا رنگ ها را از بین ببرد.
- اطمینان حاصل کنید که اسلاید ها به طور کامل با محلول B پوشیده شده‌اند.
- محلول B را با آب بشویید، آب اضافی را از روی اسلاید پاک کنید.
- هر یک از اسلایدها را با محلول C بپوشانید و دو دقیقه صبر کنید.

نکته: محلول C بر روی اسلاید ها بیش از دو دقیقه باقی نماند، زیرا ممکن است باعث کاهش شدت فلورسانس (Fluorescence quenching) گردد.

- محلول C را شستشو دهید. آب اضافی را از اسلایدها پاک کنید.
- اجازه دهید اسمیر در جریان هوا خشک شود. توجه داشته باشید لکه آب بر روی آن نماند. اسلایدها را در اولین زمان ممکن پس از رنگ‌آمیزی مورد بررسی قرار دهید.

مطالعه با میکروسکوپ فلورسانس:

شناسایی مایکوباکتریوم با رنگ فلورسنت بر اساس وابستگی فلوروکروم به اسیدهای میکولیک موجود در دیواره سلولی است. فلوروکروم به وسیله نور آبی برانگیخته می شود. بررسی اسمیر با میکروسکوپ فلورسانس دارای مزایای زیر است:

- تصاویر فلورسانس دارای کنتراست بالا برای شناسایی آسان‌تر باسیل‌های اسید فست (AFB) است.
- رنگ آمیزی اسمیر با فلوروکروم این فرصت را ایجاد می‌کند تا با استفاده از لنزهایی با بزرگنمایی کم و متوسط (۱۰x، ۲۰xو ۴۰x) سطح بیشتری از اسمیر رنگ‌شده را مورد بررسی قرار دهیم. البته توصیه می‌شود اسمیر مورد نظر با لنز ۱۰۰xنیز مورد بررسی قرار گیرد.
- روش رنگ‌آمیزی فلوروکروم ساده‌تر از روش Ziehl-Neelsen است.

ثبت و گزارش:

ثبت و گزارش نتایج اسمیرهای میکروسکوپ در جدول ۱ خلاصه شده است.

جدول ۱

IUATLD /WHO scale (1000x field = HPF)	Microscopy system		
	Bright field (1000x magnification: 1 length= 2 cm= 100 HPF)	Fluorescence (200–250x magnification: 1 length= 30 fields= 300 HPF)	Fluorescence (400x magnification: 1 length= 40 fields= 200 HPF)
Negative	Zero AFB/1 length	Zero AFB/1 length	Zero AFB/1 length
Scanty	1–9 AFB/1 length or 100 HPF	1–29 AFB/1 length	1–19 AFB/1 length
1+	10–99 AFB/1 length or 100 HPF	30–299 AFB/1 length	20–199 AFB/1 length
2+	1–10 AFB/1 HPF in at least 50 fields	10–100 AFB/1 field on Average	5–50 AFB/1 field on average
3+	>10 AFB/1 HPF in at least 20 fields	>100 AFB/1 field on average	>50 AFB/1 field on average

بررسی اسمیر فلوروکروم:

با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت، ۳۰ فیلد از یک طرف، اسلاید را با بزرگنماییx ۲۵۰-۲۰۰، معادل ۳۰۰ فیلد در بزرگنمایی x ۱۰۰۰، به صورت متناوب بررسی کنید. با بزرگنمایی ۴۰۰ می توان بررسی ۴۰ فیلد را انجام داد.

- **گزارش مثبت:** مثبت برای باسیل اسید فست؛ تعداد باسیل های اسید فست را گزارش کنید (تصویر شماره ۱).
- **گزارش منفی:** منفی برای باسیل‌های اسید فستی که در آن هیچ ارگانیسمی در هیچ یک از ۱۰۰ فیلد مشاهده نشده باشد (تصویر شماره ۲).

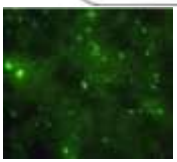
شرکت پژوهش و توسعه امیرپیوند

ایران، تهران، خیابان شریعتی، خیابان شهید دستگردی (ظفر)، بعد از خیابان شمس تبریزی، ساختمان بهاران، پلاک ۱۴۸، واحد ۱ / کد پستی: ۱۹۱۹۷۵۴۹۴۱

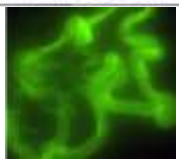
021-26422362

co.ap-rad.com

order@co.ap-rad.com



تصویر ۱



تصویر ۲

کنترل کیفیت:

- این کار با ارزیابی کیفیت نمونه انجام می شود؛ نظارت بر عملکرد میکروسکوپی، معرف ها و تجهیزات؛ بررسی نتایج میکروسکوپی و مستند سازی اعتباربخشی روش‌های میکروسکوپی.
- یک اسلاید کنترل مثبت و منفی باید در هر دوره رنگ‌آمیزی برای تأیید عملکرد صحیح روش و همچنین شدت رنگ‌آمیزی ارگانیسم‌های اسید فست مورد استفاده قرار گیرد.

جدول ۲ شایع‌ترین علل بروز خطا در بررسی میکروسکوپی اسمیر را نشان می‌دهد.

اسلایدهای کنترل را باید پیش از خواندن اسمیر بیمار ارزیابی کرد تا صحت رنگ‌آمیزی را تأیید کند، اگر کیفیت اسلایدهای کنترل مورد قبول باشد می‌توان اسمیرهای بیمار را خواند و گزارش کرد.

اگر اسلایدهای کنترل غیرقابل قبول باشند می‌بایست روش انجام آزمایش و معرف‌ها مجدد بررسی شوند.

پس از شناسایی و اصلاح مشکل، باید تمامی اسلایدهای بیمار با مجموعه جدیدی از کنترل ها تکرار شوند. نتایج حاصل از کنترل کیفیت معرف ها باید در دفترچه گزارش معرف، ثبت شود.

جدول ۲

خطاها	دلایل	اقداماتی که باید انجام شود
منفی کاذب	اسمیر بیش از حد ضخیم است، جدا شدن در هنگام رنگ‌آمیزی	بهبود همگن سازی، کاهش مواد ذخیره شده.
	اسمیر بیش از حد نازک است.	مقدار اسمیر را افزایش دهید یا اسمیری با ابعاد ۲×۱ سانتی متر تهیه کنید.
	رنگ‌آمیزی نامناسب	کیفیت معرف‌های کنترل را بررسی کنید، معرف‌های جدید تهیه کنید، رقت را بررسی کنید.
مثبت کاذب	آلودگی متقاطع Cross-contamination	در هنگام رنگ آمیزی، از برخورد اسلایدها با یکدیگر اجتناب کنید، از جارهای رنگ‌آمیزی استفاده نکنید. لنز شیئی میکروسکوپ را پس از بررسی هراسلاید، تمیز کنید. به منظور بررسی بروز آلودگی محیطی، آب/محلول مورد استفاده را بررسی کنید.
	رسوبات سرخ	محلول جدید آماده کنید، قبل از استفاده فیلتر کنید.

تداخل:

- همچنین ممکن است سایر میکروارگانیسم های اسید فست با رنگ auramine O رنگ شوند. میکروارگانیسم‌هایی نظیر نوکاردیا، رودوکوکوس، Legionella micdadei، کیست‌های گونه‌های کریپتوسپوریدیوم و گونه‌های سیکلوسپورا درجاتی از اسید فست را نشان می‌دهند.

محدودیت تست:

- یک محدودیت عمده استفاده از این روش، حساسیت کم آن (۷۵-۲۵٪ در مقایسه با کشت) و همچنین نیاز به تعداد زیادی باسیل برای مثبت اعلام کردن نتیجه آزمایش (در محدوده ۵x ، مقدار $۱۰^{۴}$-$۱۰^{۳}$ باسیل/ میلی لیتر) است.
- این روش اجازه شناسایی گونه‌های مختلف را نمی‌دهد و همچنین مایکوباکتریوم‌های زنده و از بین رفته را از هم تشخیص نمی‌دهد.

دفع پسماندها:

با زباله های با منشاء انسانی یا حیوانی باید همانند زباله‌های زیستی برخورد شود و با احتیاط دفع گردند. هنگام برخورد و دفع چنین نمونه‌هایی، اقدامات احتیاطی جهانی را بکار گیرید.

علائم و توضیحات	
سری ساخت	LOT
شماره رفرنس	REF
تاریخ تولید	
تاریخ انقضا	
مطالعه بروشور	
استفاده در موارد تشخیصی و بالینی	IVD
استفاده در موارد تحقیقاتی	IUO
شرایط نگهداری	
آدرس شرکت	
علائم خطر	

جهت ارتباط با واحد پشتیبانی با شماره ۰۲۱-۲۶۴۲۲۹۴۰ تماس بگیرید.

شرکت پژوهش و توسعه امیرپیوند

ایران، تهران، خیابان شریعتی، خیابان شهید دستگردی (ظفر)، بعد از خیابان شمس تبریزی، ساختمان بهاران، پلاک ۱۴۸، واحد ۱ / کد پستی: ۱۹۱۹۷۵۴۹۴۱

021-26422362

co.ap-rad.com

order@co.ap-rad.com