

کیت رنگ آمیزی متیلن بلو به روش لوفلر

Ref: APMETSK1
(Investigation use only, IUO)

مقدمه:

کیت رنگ آمیزی متیلن بلو، لوفلر شرکت AP-RAD، یک کیت رنگ آمیزی چند منظوره است که استفاده از آن برای رنگ آمیزی باکتری و لکوسیت ها توصیه می شود. متیلن بلو، لوفلر در دسته رنگ آمیزی های ساده قرار دارد و توسط آن می توان مورفولوژی باکتری ها را بررسی کرد. استفاده از این رنگ در تفسیر آزمایش کوئلانگ (Quellung) نیز مفید است. متیلن بلو یک رنگ کاتیونی است و سلول ها را به رنگ آبی در می آورد. پدیده تغییر رنگ سلول ها، ناشی از حضور بار الکتریکی منفی مولکول ها در سلول است. به گونه ای که ذرات نظیر پلی فسفات ها که دارای بار مثبت هستند جذب ذراتی نظیر DNA و RNA که دارای بار منفی هستند می شوند.

احتمال شناسایی کورینه باکتریوم ديفتری با استفاده از رنگ متیلن بلو، لوفلر وجود دارد. متاکرومازی (تغییر رنگ حاصل از رنگ آمیزی) حالتی است که به طور مشخص در کورینه باکتریوم ديفتری دیده می شود. متاکرومازی ناشی از تجمع پلی فسفات های پلیمریزه شده با غلظت ها بالا در داخل سلول است. در این شرایط به شکل گرانول های پلی فسفات آبی رنگ که توسط سیئوپالاسم آبی کم رنگ (کم رنگ تر از رنگ آبی گرانول ها) احاطه شده اند مشاهده می شوند. اغلب به اجسام Babes-Ernst یا گرانول های متاکروماتیک نامیده می شوند. خود سلول ها نیز به شکل یک باند یا ریسمان دیده می شود.

رنگ متیلن بلو، لوفلر برای رنگ آمیزی باکتری های گرم منفی نظیر هموفیلوس آنفولانزا و نایسریا مننژیتیدیس که در مایع نخاع وجود دارند نیز استفاده می شود. رنگ آمیزی متیلن بلو، لوفلر نسبت به رنگ آمیزی گرم، کنتراست بیشتری میان پیکره باکتری های گرم منفی و پس زمینه آن ها ایجاد می کند. این نوع رنگ آمیزی مناسب رنگ آمیزی ترشحات مجاری ادراری آقایانی که مشکوک به نایسریا گنوره آ هستند، می باشد. علاوه بر موارد ذکر شده در رنگ آمیزی میکروارگانسیم ها، فردی به نام Harris در سال ۱۹۷۲ نشان داد که رنگ آمیزی متیلن بلو، لوفلر در شمارش لکوسیت های مخاط و مدفوع نیز می تواند موثر باشد.

محتویات کیت:

- محلول رنگ آمیزی متیلن بلو، ۳۰ میلی لیتر

شرایط نگهداری کیت:

- بلافاصله پس از دریافت کیت باید در دمای ۱۸-۲۵^oC نگهداری شود.
- اگر کیت فاقد تاریخ انقضا بود نباید از آن استفاده کرد. کیت باید به دور از دمای بالا و رطوبت نگهداری شود.

احتیاط:

- پیشنهاد می گردد که این محصول با اقدامات احتیاطی معمول حمل و نگهداری شود. از خوردن، استنشام و تماس آن با پوست پرهیز شود.
- این محصول تنها برای استفاده در محیط های آزمایشگاهی (in vitro) آزمایشگاه های تشخیصی طراحی شده و تنها باید توسط اپراتوری که به خوبی آموزش دیده و واجد شرایط لازم است مورد استفاده قرار گیرد. اقدامات احتیاطی زیستی و تکنیک های آسپتیک را رعایت کنید. بر اساس "اقدامات احتیاطی استاندارد" باید تمامی نمونه های آزمایشگاهی، عفونی در نظر گرفته شوند. "دستورالعمل اقدامات احتیاطی

جداسازی" در سایت مرکز کنترل و پیشگیری بیماری ها (CDC) به نشانی اینترنتی www.cdc.gov/ncidod/dhqp/gl_isolation.html موجود و قابل استفاده است.

- به منظور کسب اطلاعات بیشتر در مورد اقدامات احتیاطی خاص برای پیشگیری از انتقال عوامل عفونی از کلیه مواد و تجهیزات آزمایشگاهی و اطلاع از توصیه های ذکر شده مدیریتی هنگام مواجهه با بیماری های عفونی به سند M-29 که دستورالعمل تأیید شده CLSI است و تحت عنوان "حفاظت از پرسنل آزمایشگاه در برابر آلودگی های شغلی" نام دارد، مراجعه فرمایید.
- تمامی زباله های زیستی را پیش از آنکه در دسترس قرار گیرند استریل کنید.

هشدار:

- * باعث ایجاد سوزش می شود. از تماس با چشم، پوست و غشاهای مخاطی اجتناب کنید. اگر با چشم تماس پیدا کرد به سرعت با مقدار زیادی آب به مدت حداقل ۱۵ دقیقه بشویید سپس به پزشک مراجعه کنید.
- * محلول های رنگ آمیزی، ماهیت پرخطر دارند بنابراین هنگام کار با آن ها از لباس های مناسب و ایمن استفاده کنید. توصیه می شود مراحل رنگ آمیزی زیر هود، با تهویه مناسب انجام شود.

تجهیزات مورد نیاز برای آماده سازی، رنگ کردن و مشاهده گستره

زیر میکروسکوپ:

- سواب پنبه ای استریل در لوله آزمایش
- آسپانگ
- منبع مناسب نور
- لام (بدون چربی و بدون خراش)
- لامل
- اپلیکاتور
- نمونه / کشت باکتریایی
- دستمال کاغذی
- آسی لوبی شکل
- شعله آتش/چراغ بونزن
- سینی رنگ آمیزی
- بطری شست و شو
- محلول رنگ آمیزی متیلن بلو، لوفلر
- قلم الماس، به منظور ثبت شماره بر روی لام
- میکروسکوپ دو چشمی مجهز به منبع نور قابل مشاهده

جمع آوری نمونه:

- گستره از سواب حلق، بینی یا کشت باکتریایی از نمونه فردی که مشکوک به کورینه باکتریوم ديفتری است.
 - گستره CSF از رسوب نمونه مشکوک به باکتری مننژیتیس
 - گستره از نمونه ترشحات مجاری ادراری آقایانی که مشکوک به عفونت با نایسریا گنوره آ است.
 - گستره خلط، مدفوع یا مایعات بدن به منظور مشاهده لکوسیت ها و باکتری ها
- نمونه هایی که خارج از آزمایشگاه جمع آوری می شوند: نمونه ها باید ترجیحاً طی ۴۸ ساعت به آزمایشگاه انتقال داده شود



021-26422362



co.ap-rad.com



order@co.ap-rad.com

شرکت پژوهش و توسعه امیربیوند

ایران، تهران، خیابان شریعتی، خیابان شهید دستگردی (ظفر)، بعد از خیابان شمس تبریزی،

ساختمان بهارن، پلاک ۱۴۸، واحد ۱ / کد پستی: ۱۹۱۹۷۴۹۴۱

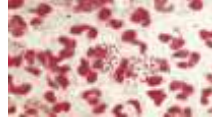
نکات ایمنی زیستی:

- هنگامی که کورینه باکتریوم دیفتری ها رنگ آمیزی می شوند با ظاهری شبیه باند یا ریسمان با گرانول های ماکروماتیکی که رنگ آبی تا عمق آن ها نفوذ کرده است، مشاهده می شوند.
- لکوسیت ها به رنگ آبی روشن (سلول سیتوبلاسم)، همراه با هسته های آبی تیره مشاهده می شوند.
- به منظور کسب اطلاعات بیشتر به رفرنس های معتبر مراجعه فرمایید.

- مسئله ایمنی عمومی باید در مورد تمامی نمونه ها در نظر گرفته شود.
- تمام اموری که بر روی نمونه افراد مشکوک به کورینه باکتریوم دیفتری یا سایر باکتری های بیماری زا و یا کشت هایی که احتمالاً منجر به تولید آئروسول می گردند می باشد باید در کلین های امن یا در زیر هود انجام شود.

رنگ آمیزی گستره ها:

در تمامی موارد، یکی از گستره ها باید با روش رنگ آمیزی گرم، رنگ شود.



تصویر شماره ۲: تصویر میکروسکوپی رنگ آمیزی متیلن بلو ترشحات مجاری ادرار آقایان. نشان دهنده دیپلوکوسی های گرم منفی درون سلولی با PMNL. (x1000)



تصویر شماره ۱: تصویر میکروسکوپی رنگ آمیزی متیلن بلو ترشحات مجاری ادرار آقایان. نشان دهنده دیپلوکوسی های درون سلولی با PMNL. (x1000)

کنترل کیفی:

هر سری ساخت تولید شده کیت رنگ آمیزی متیلن بلو شرکت AP-RAD، با استفاده از میکروارگانیسم های اختصاصی کنترل کیفی شده اند. جدول ذیل، فهرستی از ارگانیسم هایی است که به طور معمول برای آزمایش کیت های شرکت AP-RAD استفاده می شوند.

Test Organisms	Results
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	Stains blue in color
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	Stains blue in color
<i>Corynebacterium diphtheria</i> ATCC® 8028	Cell appears banded or beaded with deep blue granules and a lighter blue cytoplasm

مراحل رنگ آمیزی:

رنگ آمیزی ساده:

- ۱- به منظور بررسی گستره، آن را آماده کرده و حرارت دهید یا با متانول بر روی یک لام شیشه ای شفاف فیکس کنید.
- ۲- گستره را در رنگ متیلن بلو، لوفلر غوطه ور کنید.
- ۳- اجازه دهید گستره به مدت ۱ تا ۳ دقیقه در رنگ بماند.
- ۴- گستره را زیر شبر آب بشویید و خشک نمایید.
- ۵- گستره را در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی 1000x و با کمک روغن ایمرسیون مشاهده نماید.

رنگ آمیزی لکوسیت ها:

- ۱- یک قطره مدفوع مایع یا بخش کوچکی از مخاط را توسط یک اهلپکاتور چوبی بر روی یک لام شیشه ای شفاف قرار دهید.
- ۲- دو قطره از رنگ متیلن بلو، لوفلر به آن اضافه کنید.
- ۳- رنگ را با نمونه به خوبی و با دقت مخلوط کنید و یک لامل بر روی آن قرار دهید. به منظور رنگ شدن کامل هسته ها اجازه دهید ۲ تا ۳ دقیقه در این حالت باقی بماند.
- ۴- با بزرگنمایی کم (100x)، مقادیر کمی را شمارش کنید و از لکوسیت ها و اریتروسیت ها در هر بخش میانگین تقریبی به دست آورید
- ۵- شمارش افتراقی باید با بزرگنمایی بیشتر (400x) انجام شود. در صورت امکان، ۲۰۰ سلول را بشمارید.

تنها سلول هایی که به وضوح، تک هسته یا چند هسته ای بودنشان قابل شناسایی هستند در شمارش افتراقی حساب می شوند. سلول های اپیتلیال و ماکروفاژهایی که به وضوح قابل شناسایی نیستند نادیده گرفته می شوند.

مشاهدات / ملاحظات:

- هنگام مشاهده میکروسکوپ با استفاده از روغن ایمرسیون، سلول های باکتری به رنگ آبی متوسط و پس زمینه آن به رنگ آبی روشن تر مشاهده می شوند.

کنترل کیفی مصرف کننده:

- توصیه می شود هر سری ساخت جدید از کیت رنگ آمیزی متیلن بلو ابتدا توسط کنترل های مثبت و منفی معین، آزمایش شوند و همچنین هر روز پیش از استفاده بررسی گردند.
- توصیه می شود که کنترل مثبت هایی که برای این آزمایش استفاده می شوند به صورت هم زمان برای نمونه بیمار نیز استفاده شوند. نتایج این رنگ آمیزی تنها در صورتی گزارش می شود که نتیجه به دست آمده از گستره کنترل مثبت نیز قابل قبول باشد.

گزارش نتایج:

برخی از موارد گزارش شده از نمونه بیمار به شرح زیر است، اما توجه به نتایج اختصاصی حاصل از نمونه بیمار الزامی است.

گستره های گلو و بینی:

- هیچ ارگانیسم شبیه به کورینه باکتریوم دیفتری با گرانول های ماکروماتیک مشاهده نشد.

از نظر مورفولوژیکی مشکوک به کورینه باکتریوم دیفتری است. از رنگ آمیزی آلبرت استفاده کنید و برای ارزیابی نهایی به تمام یافته های بالینی توجه نمایید.

گستره ترشحات مجاری ادراری:

- هیچ باکتری شبیه به نایسریا گونه A در درون و برون سلول مشاهده نشد.
- درون سلول، دیپلوکوسی های شبیه به نایسریا گونه A مشاهده شد.

گستره رسوبی CSF:

- هیچ باکتری در درون و برون سلول مشاهده نشد.
- درون سلول، باکتری؛ همراه با لکوسیت های PMN مشاهده شد.



021-26422362



co.ap-rad.com



order@co.ap-rad.com

شرکت پژوهش و توسعه امیریبوند

ایران، تهران، خیابان شریعتی، خیابان شهید دستگردی (ظفر)، بعد از خیابان شمس تبریزی،











ساختمان بهاران، پلاک ۱۴۸، واحد ۱ / کد پستی: ۱۹۱۹۵۴۹۴۱

دفع ضایعات:

- برای دفع ضایعات به قوانین مصوب وزارت بهداشت توجه کنید.
- در صورتی که ضایعات منشا انسانی یا حیوانی داشته باشند به عنوان مواد خطرناک زیستی شناخته شده و باید با احتیاط دفع گردند. در هنگام استفاده و یا دفع نمونه ها از اقدامات احتیاطی عمومی استفاده کنید.

منابع:

1. Henry, J.B., ed. 2017. Clinical Diagnosis and Management, 22th ed., Vol. I. W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA.
2. Isenberg, H.D. Clinical Microbiology Procedures Handbook, Vol. I, II & III. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
3. Koneman, E.W., et al. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, PA.

علام و توضیحات	
	سری ساخت
	شماره رفرنس
	تاریخ تولید
	تاریخ انقضا
	مطالعه بروشور
	استفاده در موارد تشخیصی و بالینی
	استفاده در موارد تحقیقاتی
	شرایط نگهداری
	آدرس شرکت
علام خطر	
	

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



021-26422362



co.ap-rad.com



order@co.ap-rad.com

شرکت پژوهش و توسعه امیر بیوند

ایران، تهران، خیابان شریعتی، خیابان شهید دستگردی (ظفر)، بعد از خیابان شمس تبریزی،

ساختمان بهاران، پلاک ۱۴۸، واحد ۱ / کد پستی: ۱۹۱۹۷۵۴۹۴۱