جمهورية مصر العربية
وزارة الصحة والسكان

دليل معامل الدرن

٢٠١٥

الإفتتـــــــــــــــاحية

من اهم وسائل مكافحة الدرن هو الاكتشاف المبكر للمرض والذى يعتمد فى المقام الاول على المعامل التشخيصية القائمة على فحص البصاق للمرضى المشتبه اصابتهم بالمرض والمزارع الدرنية ، لذا تعتبر المعامل من اهم الوسائل التشخيصية التى توصى منظمة الصحة العالمية بتقويتها لتتمكن الدول من مكافحتة وانخفاض معدلاته.

ولأن البرنامج القومى لمكافحة الدرن فى مصر يهدف فى المقام الاول الى خفض معدلات الاصابة والانتشار للمرض وتحقيق الاهداف المستدامة التى وضعتها منظمة الصحة العالمية ، عن طريق تقوية معامل الدرن المنتشرة فى جميع وحدات الأمراض الصدرية وتزويدها بأحدث وسائل التشخيص والعمل على ضبط الجودة بتلك المعامل من خلال الزيارات الاشرافية التى يقوم بها ذوى الخبرة من مسئولى المعامل بالمحافظات وتحت اشراف فريق متميز من المعامل المركزية والبرنامج القومى لمكافحة الدرن وتدريب الفريق القائم على العمل.

وحتى تتواكب وسائل التشخيص والتقييم مع كل حديث فقد قام فريق من ذوى الخبرة فى هذا المجال بإعداد هذا الدليل الذى يعتبر دليلا ومرشدا لجميع العاملين فى معامل الدرن بجمهورية مصر العربية
ومن هذا المنطلق فإننا نتقدم بخالص الشكر والتقدير لكل من شارك فى اعداد هذا الدليل فى طبعته الثانية ، التى تأتى تحديثا للطبعة الأولى التى صدرت عام 2005 وقامت بإعدادها د. مشيرة اسماعيل (مدير المعمل المرجعى للدرن فى ذلك الوقت واحد الخبراء الذين استعانت بهم منظمة الصحة العالمية) فى تقييم معامل الدرن بدول الاقليم.

كما اتقدم ايضا بخالص الشكر والتقدير لهذا الفريق الذى يقوم بدوره على احسن وجه ويعمل فى دائرة عمل مكتملة لتحقيق الهدف الذى نصبو اليه نحو جعل مصرنا الحبيبة خالية من هذا المرض فى الاعوام القادمة.

مدير عام
الادارة العامه للامراض الصدرية
المدير التنفيذى للبرنامج القومى لمكافحة الدرن

د. وجدى عبد المنعم

جمهورية مصر العربية
وزارة الصحة والسكان

دليل معامل الدرن

٢٠١٥

الإشراف العام

د. أحمد صفوت

رئيس
الادارة المركزية للمعامل

د. وجدى عبد المنعم

مدير عام الإدارة العامة للأمراض الصدرية
والمدير التنفيذى لبرنامج مكافحة الدرن

إعداد

المادة العلمية

الطبعة الاولي :

مديرة المعمل المرجعي : د. مشيرة اسماعيل عام ٢٠٠٥

الطبعة الثانية :

اسرة المعمل المرجعي لتشخيص الدرن

المعامل المركزية بوزارة الصحة والسكان

مديرة المعمل المرجعي

د. عزة عبد الفتاح حجازي

اخصائي معمل

د.جيهان سيف الدين

اخصائي معمل

د. هويدا قاسم ابراهيم

اشراف تنسيقي

أ.أحمـد سمـير

بالتنسيق والتعاون مع

د. فاتن علي شكري

إستشاري المعامل بالبرنامج القومي لمكافحة الدرن

د. أمل صلاح

مسئولة مكافحة العدوي بالبرنامج

الفهرس

مقدمة	٤
اجراءات مكافحة العدوي والسلامة بمعمل الدرن	٥
أعمال التطهير والتخلص من المخلفات البيولوجية	١٣
أعمال الصيانة بالمعمل	١٤
حالات الطوارئ	١٦
التعقيم	١٨
الطرق المعملية لتشخيص الدرن	١٩
أولا– الفحص المجهري المباشر	٢٢
ثانيا: المزارع الدرنية	٣٠
طرق تحضير المستنبتات الصلبة	٣١
اختبارات تصنيف الميكوبكتيريا علي المستنبتات الصلبة	٣٩
طريقة عمل الحساسية الدرنية علي المستنبتات الصلبة	٤٧
ضبط الجودة بمعمل الدرن	٥٤
أولا : ضبط الجودة داخل المعمل	٥٥
ثانيا: ضبط الجودة الخارجي	٥٩
طرق ضبط الجودة للمزارع الدرنية والحساسية	٦٢
طريقة عمل المزارع الدرنية علي المستنبتات السا ئلة (جهاز الباكتك ٩٦٠)	٦٦
طريقة عمل الحساسية الدرنية علي المستنبتات السائلة للصف الاول	٦٩
طريقة عمل الحساسية الدرنية علي المستنبتات السائلة للصف الثاني	٧٤
اختبارات ضبط الجودة لجهاز الباكتك	٧٦
تشخيص الميكوبكتريا بجهاز الجين اكسبرت	٧٩
كيفية حساب وطلب الكيماويات اللازمة لعمل ١٠٠٠ شريحة	٨٣
نماذج تقارير المرور وتقارير ضبط الجودة بمعمل الدرن	٨٤
نماذج لارسال العينات المراد فحصها الي معمل الدرن	٩٢
المصطلحات العلمية	٩٧
المراجع العلمية	٩٨

الـــــدرن
Tuberculosis

مقدمـــــة

مرض الدرن من الأمراض المعدية شـــديدة الخطورة (Risk group III) والتى تنتقل عن طريق الجهاز التنفسى وقد انتشـــر هذا المرض فى معظم دول العالم بما فيهم مصر وأصبح يصيب ثمانية ملايين من البشـــر كل عام ويحصد أرواح الملايين منهم سنوياً .

وقـــد أعلنـــت منظمة الصحة العالمية (WHO) أن ٩٥ ٪ من حالات الدرن توجد في الدول النامية وأن ٧٥ ٪ من هذه الحالات تحدث بين أفراد المجتمع المنتجين اقتصاديا أي من سن ١٥-٥٠ عاما .

ونتيجـــة لنجـــاح برنامج مكافحـــة الدرن فى مصـــر (NTP) ونتيجـــة لتطبيق نظام العـــلاج تحت الملاحظة والقصيـــر الأمـــد (DOTS) بنســـبة ١٠٠٪ فـــى كل أنحـــاء مصـــر فـــإن عـــدد الحـــالات الدرنيـــة الجديـــدة المتوقعـــة ســـنوياً (Estimated incidence) ١٥ حالـــة لـــكل ١٠٠ ألـــف مـــن الســـكان.

البكتريا المسببة للدرن : -

تم اكتشـــاف البكتريا المســـببة للدرن بواسطة العالم روبرت كوخ سنة ١٨٨٢ – وتنقســـم البكتريا المسببة للمرض Mycobacterium tuberculosis complex إلي ٤ فصائل هي :

1- Mycobacterium tuberculosis.
2- Mycobacterium bovis (including BCG).
3- Mycobacterium microti.
4- Mycobacterium africanum.

وميكروب Mycobact .Tuberculosis نوعان : -

- النوع الذي يصيب الإنسان Human Mycobacteria
- النوع الذي يصيب البقر Bovine Mycobacteria

طريقة انتقال العدوى :

- ينتقل ميكروب الدرن عن طريق الســـعال والبصق والعطس علي شـــكل رذاذ صغير جدا يدخل إلي الرئة عن طريق الاستنشاق .
- اللبن الملوث بعصيات الدرن من حيوان مريض أو من متداولي الأغذية المصابين بالمرض .

أعضاء الجسم المعرضة للإصابة بالمرض :-

- إصابـــة الرئـــة تمثل حوالي ٨٥ ٪ من الحـــالات المرضية وقد تحدث الإصابة بنســـبة ١٥ ٪ في بعض الأعضـــاء الأخـــرى مثل : – العظام – الحنجرة – الجهاز البولي والتناســـلي – الجهاز الهضمي والغشـــاء البريتونى – الغدد الليمفاوية – الجلد – العينين – المخ والأعصاب .

إجراءات مكافحة العدوي والسلامة بمعمل الدرن

Safety Measures & Infection Control in TB Lab

- يعتبر ميكروب الدرن من مجموعة الميكروبات شديدة الخطورة (Risk group III).
- كل من يعمل بقسم الدرن مسئول عن سلامته وسلامة زملائه .

ينتقل ميكروب الدرن عن طريق الهواء، واستنشاق الرذاذ المحتوي علي الميكروب قد يؤدي للعدوى

- ويمكن القضاء علي ميكروب الدرن بالوسائل التاليه:

ومن الأسباب الشائعة لانتشار الرذاذ بالمعمل :

١. اثناء جمع عينات البصاق من المرضي او المشتبه بهم.
٢. اثناء استخدام الماصات والمحاقن .
٣. أثناء تحضير المسحات علي الشرائح .
٤. اثناء تدوير العينات داخل جهاز الطرد المركزي(Centrifuge).
٥. عند حرق إبرة الزرع .
٦. المراوح (يمنع استخدام المراوح عند عمل المسحات حتى يتم تثبيت العينة).
٧. اثناء القاء المخلفات في اوعية التطهير.

الشروط الواجب توافرها فى العاملين بمعامل الدرن : -

- قبل استلام العمل بالمعمل يجب إجراء الآتى:-

١. اختبار التيوبركلين.

٢. أشعة على الصدر.

٣. التدريب على طرق السلامة بالمعمل.

يوجد ثلاث مستويات للمعامل على أساس التحكم فى العدوى:

نوع المعمل	المستوى (L)	الأعمال التى يقوم بها المعمل
المعمل الطرفى	L1	• استلام العينات . • الفرد والصبغة . • الفحص الميكروسكوبى المباشر لميكروب الدرن
المعمل الوسطى	L2	• نفس الأعمال التى يقوم بها المعمل الطرفى (L1) + . • فصل الميكوبكتريا من العينات ثم الزرع في ٢L ســواء درنيه او غير درنيه . • قراءة المزارع .
المعمل المرجعى	L3	• يقوم بنفــس الأعمال التى يقوم بها المعمــل الطرفى (L1) والمعمل الوسطى (L2) + . • عمل اختبارات الحساســية للأدوية النوعية لميكروب الدرن واختبارات التصنيف للميكوبكتريا فى (L3) . • تحضير معلق بكتيــرى لحفظ الميكوبكتريا ولعمل اختبارات البيولوجيا الجزيئة .

ملحوظة:

يعتبر العمل فى (L3) أكثر خطورة حيث أن فى بعض الأحيان يتم فصل ميكوبكتريا مقاومة للأدوية (الخط الأول والثانى).

مكافحة العدوي في المعمل الطرفي (L 1):

I- وصف المعمل :

- يجب ان يحتوي علي ثلاث حجرات:
  - حجرة لاستلام العينات.
  - حجرة للفرد والصبغة.
  - حجرة للفحص الميكروسكوبي وتسجيل النتائج.

ملحوظة : اذا لم يتوافر عدد الحجرات المطلوبة يراعي تحديد اسطح العمل كل علي حدة.

- يجب ان تكون اسطح الحوائط والارضيات ملساء والفواصل اقل ما يمكن.
- يجب ان تكون البنشات ملساء ذات نوعية تتحمل المواد المطهرة المختلفة.
- يجب ان يكون المعمل جيد التهوية والإضاءة.
- يجب ان يكون الصرف الصحي جيدا.
- يجب ان يحتوي المعمل علي حوضين احدهما لغسيل الايدي والاخر للصبغة.
- يحظر دخول المرضي والموظفين داخل المعمل.
- يجب تقليل الحركة داخل المعمل قدر الامكان.

II- فنيو المعمل :

- يسأل عن التاريخ الطبى أو المرضى التابع لهم (شكوى أى مرض أو أعراض)
- عمل أشعة تشخيصية واختبار تيوبركلين لهم قبل بدء المهنة .
- اذا وجد اختبار التيوبركلين سلبيا يعاد بعد اسبوعين ويتم استشارة الطبيب .
- التدريب على اجراءات السلامة بالمعمل .
- وضع لوحات بلاستيكيه او بغطاء بلاستيك (قابل للتنظيف) علي الحوائط مدون عليها اجراءات السلامه .
- يمنع الطعام والتدخين والشرب وتخزين الطعام بالمعمل .
- يمنع استخدام الفم فى استعمال الماصة .
- يستخدم القفاز عند التعامل مع العينات .

III -جمع العينات:

- ينصح المريض بالآتى :

- وضع اليد و استخدام المناديل الورقية على الفم عند البصق فى العبوة .
- يبصق فى الهواء الطلق خارج المعمل .

– مواصفات عبوة جمع البصاق :

- تكون مصنوعة من البلاسيتك الصلب .
- شفافة و ذات فوهة واسعة .
- محكمة الغلق بواسطة غطاء حلزونى.
- اذا لم يستطع المريض احضار عينة , لابد من التخلص من العبوة وإعدامها .
- إذا أردنا التخلص من المخلفات , يوضع عليها مطهر (فينول ٥٪) ثم تعدم فى الاوتوكلاف ثم المحرقة (في حالة عدم وجود اوتوكلاف يجب ابقاء الفينول علي العينات لمدة ٢٤ ساعة قبل اعدامها بالمحرقة).
- تعتبر استمارات المرضى ملوثة ويتم التخلص منها في اكياس جمع النفايات الخطرة

IV– خطوات العمل :

- تنظف عروة الزرع المعدنية من البصاق العالق بعد فرد العينة بحكها فى الرمل الموضوع فى زجاجة ومن فوقة كحول ٧٠٪ , ثم تحرق فى اللهب ويفضل استخدام المراود الخشبية احادية الاستخدام .
- لابد أن تتم عملية فرد العينات فى مكان ليس به تيار هواء .
- عدم استخدام مروحة أثناء عملية فرد العينات على الشرائح .
- يمنع تجفيف الشريحة باستخدام اللهب بل بتركها تجف فى الهواء وذلك منعا لانتشار الرذاذ.

V – لتخلص من المخلفات واستخدام المطهر :

- لابد من استخدام طريقة معترف بها (مسموح بها) للتخلص من المخلفات البيولوجية.
- تلقى المخلفات (القفازات – عبوات البصاق – العيدان الخشبية –عروات الزرع البلاستيك – ورق الترشيح) فى الكيس الأحمر بسلة المهملات ثم يعدم فى الأوتوكلاف ثم يرسل الى المحرقة .
- يضـــاف فينـــول ٥٪ أو ديتول ١٠٪ على عبوات البصاق المطلوب التخلص منها لمدة ٢٤ ســـاعة اذا لم يتوفر اوتوكلاف.
- تطهر الأيدى بكحول ٧٠٪ بعد غسلها بالماء والصابون.

VI –مستلزمات المعمل الطرفى (L1) :

- مروحة شفط هواء فى المعمل ضعيف التهوية .
- لمبة أشعة فوق بنفسجية لتعقيم الأسطح بالمعمل (يراعي عمل صيانة للمبة الاشعة سنويا).
- بنشات ومقاعد مناسبة للعمل .
- حوض لغسيل الأيدى وحوض اخر للصبغة.
- مكتب ودولاب لحفظ الكيماويات و السجلات وغيرها .

- لا يوجد حاجة لكابينة سلامة بيولوجية.

مكافحة العدوى فى المعمل الوسطى (L2) :

I- وصف المعمل:-

يجب ان يحتوى المعمل على ثلاث حجرات على الأقل :

- حجرة للتعامل مع العينات وتحتوى هذه الحجرة على كابينة ســـلامة بيولوجية وجهاز طرد مركزى وحضان وثلاجة أو أكثر .
- حجـــرة للتعقيم والاعدام وتحتوى هذه الحجـــرة على عدد ٢ أوتوكلاف (تعقيم + أعدام)، عدد ١ فرن هواء ساخن، عدد ٢ حوض لغسيل الأدوات التى سيعاد استخدامها بعد ادخالها فى الأوتوكلاف .
- حجرة لتحضير المستنبتات (الميديا) تحتوى على حمام مائى، أفران لتسوية الميديا، ثلاجات ،حضانات، جهاز لتقطير المياه .

ملحوظة :

- يجب توفير دولاب لتخزين وحفظ الكيماويات والصبغات.
- يمكن تحضير الصبغات والمستنبتات في حجرة واحدة.

- بالاضافة الى الشروط الواجب توافرها فى (L1) يجب الالتزام بالآتى :

- تغلق النوافذ أثناء العمل .
- يصمم أثاث المعمل بحيث يكون سهل تنظيفه والقضاء على الحشرات والقوارض .
- توفير حوض لغسل الأيدى وشماعات للمعاطف .
- توفير بنشـــات مصنوعة من مادة مقاومة للتأكل من الماء أو الأحماض أو الكحول أو المطهرات الأخرى وتكون سهلة التنظيف (Epoxy) .

II. مستلزمات المعمل الوسطى (L2) :

- بالاضافة الى المستلزمات الموجودة بالمعمل الطرفى , يجب توفير الآتى :

- كابينة سلامة بيولوجية (Class II A 2)
- أوتوكلاف للتعقيم واخر للاعدام .
- جهاز طرد مركزى به غطاء للrotor و bucket لكل زجاجة .
- سلة مهملات معدنية ذات غطاء معدنى حتى يسهل تعقيمها .

III. خطوات العمل :

– بالاضافة الى ما سبق ذكره فى L1 :

- يجب اتخاذ الحذر عند الدخول الى المعمل أثناء العمل .
- تكتب تعليمات على باب المعمل توضح :
  ١) علامة الخطر .
  ٢) اسماء المسئولين بالمعمل .
  ٣) L2 .
- وضع المعطف (البالطو) المعملى أثناء العمل .

IV. التخلص من المخلفات :

– إعدام المخلفات البيولوجية قبل التخلص منها وذلك عن طريق وضعها فى أوتوكلاف الاعدام .

– تعقيم المستلزمات التى سيعاد استخدامها مثل الزجاجيات وسلات المهملات المعدنية وذلك عن طريق وضعها فى اوتوكلاف التعقيم .

المعمل المرجعي L3

i. مكان العمل :–

– بالاضافة الى الحجرات المطلوب تواجدها فى المعمل الوسطى، يستلزم توافر حجرة لعمل اختبارات الحساسية للعقاقيـــر المضادة للدرن وإختبارات التصنيف للميكروب بحيث تحتوى على، كابينه ســـلامة بيولوجية، حمام مائى، ثلاجات، جهاز طرد مركزى، حضانات .

– يجب فصل المعمل عن بقية الحجرات التابعة للمعامل الاخرى.

– يجب توافر أبواب مزدوجة وبينهما ســـتارة هوائية تقفل ذاتيا ونوافذ يمكن احكام غلقها بحيث تســـمح باستخدام غاز تطهير للحجرة .

– يجب توافر مولد كهربائى لحالات القصور الكهربى المفاجىء .

– يجب أن يكون الضغط الجوى فى المعمل أقل منه خارج المعمل حتى لايسمح بخروج هواء ملوث من المعمل ويفضل وجود جهاز انذار يعمل فى حالة تغير مســـتوى الضغط ويضاف مرشـــح HEPA ذو مواصفات محددة (قطر الثقب فيه 0.3µm) علي مروحة العادم.

II . مستلزمات المعمل المرجعى :–

– بالاضافة الى ماسبق ذكره فى المعمل الوسطى:

- كابينة سلامة بيولوجية Class II A2 .
- اوتوكلاف فى نفس الحجرة أو إذا تعذر ذلك يجب نقل المواد الخطرة المطلوب إعدامها أو تعقيمها بحذر شديد وباتخاذ اجراءات السلامة المطلوبة .

III. خطوات العمل :

– بالاضافة الى ما سبق ذكره بالمعمل الوسطى L2 :

- دخول المعمل بحذر والاقلال من الحركة أثناء العمل .
- يكتب التعليمات الاتية على باب المعمل :

١) علامة الخطر .

٢) اسماء المسئولين بالمعمل .

٣) L3 .

٤) تحديد الخطورة البيولو جية .

٥) ارتداء الواقيات الشـــخصية (البالطو أوالجاون احادي الاستخدام، ماسك وقفازات وواقي العين) قبل الدخول للمعمل.

ملحوظة: لايتم نقل الأجهزة والمستلزمات من معمل الى آخر.

IV. التخلص من المخلفات:

– بالاضافة الى ما سبق ذكره بالمعمل الوسطى L2 :

- يفضل توافر حوض ســـعته حوالى ٢–٥ لتر داخل كابينة الســـلامة يحتوى على ١٠٪ ديتول لإلقاء السوائل الملوثة والقطن والشاش وورق النشاف به .
- يجب توافر سلة المهملات المعدنية ذات الغطاء المعدنى .

كابينة السلامة البيولوجية

الشروط الواجب توافرها أثناء العمل فى الكابينة :

١) يجب تحضير كل مستلزمات العمل قبل البدء فى العمل .

٢) تشغيل الكابينة ومصباح الاشعة فوق البنفسجية لمدة نصف ساعة قبل بداية العمل.

٣) يجب اختبار اتجاه الهواء بالكابينة للتأكد من مروره خلال الفتحات وليس فى اتجاه القائم بالعمل .

٤) تطهير أســـطح الكابينة من الداخل باســـتخدام المطهر (كحول ٧٠٪ أو ديتول ١٠٪) ثم بقطن مشبع بماء مقطر معقم.

٥) لاتملأ الكابينة بمستلزمات غير مستخدمة حتى لا تتكدس الكابينة فيضطرب اتجاه الهواء بها .

٦) عدم وضع أى شىء فوق فتحات الهواء فى مقدمة الكابينة أو وضع اليدين أثناء العمل فوقها.

٧) تجمع الأدوات النظيفة على جانب والأدوات الملوثة على جانب أخر.

٨) يجب أستخدام القفازات فوق فتحة الأكمام حتى لايتسرب الهواء اليها ويستحب استخدام اكمام ذات الاستخدام الواحد او جاون باكمام ويتم التخلص منها بعد انتهاء العمل في الاكياس الحمراء.

٩) تحـــرك الأيدى بهدوء وببطىء داخل الكابينة وعند إدخالهـــا أو اخراجها من الكابينة حتى لا يضطرب اتجاه الهواء.

١٠) لا يستخدم اللهب داخل الكابينة حتى لايضطرب اتجاه الهواء .

١١) تلقى الملوثات فى المطهر (ديتول ١٠٪) قبل إخراجها من الكابينة .

١٢) تطهر الأسطح الداخلية للكابينة بالكحول ٧٠٪ ثم الماء المقطر المعقم بعد الانتهاء من العمل.

١٣) تترك الكابينة تحت التشغيل لمدة ٥ دقائق بعد الانتهاء من العمل .

١٤) تغلق واجهة الكابينة ويتم تشغيل لمبة الأشعة فوق البنفسجية داخل الكابينة لمدة نصف ساعة

١٥) تنفذ أعمال الصيانة للكابينة سنويا من قبل الشركة أو الهيئه المسئولة .

أعمال التطهير والتخلص من المخلفات البيولوجية:

١) التطهير باستخدام المطهر :

طريقة عمل المطهر	أمثلة للمطهر
– تدمير الغشاء الدهنى للخلية وخروج السائل الخلوى .	كحول اثيلى . كلورايد. فينول.
– القضاء على البروتينات والانزيمات الأساسية للخلية (الموجودة بالسائل الخلوى) .	كلورايد . H_2O_2 (ماء الأكسجين.) فينول .

– المطهرات المستخدمة فى معمل الدرن :

- ٧٠% كحول لتطهير الأيدى و الجلد , الجروح , الأســـطح الداخلية للكابينة وال rotor التابع لجهاز الطرد المركزى .
- كلور او ديتول ١٠٪ : يسكب به السوائل المراد إعدامها ويطهر به الأسطح والأدوات .

٢) التعقيم أو الاعدام :

- بالأوتوكلاف عند درجة الحرارة ١٢١ °م لمدة ٢٠ دقيقة للقضاء على البكتريا .

٣) المخلفات البيولوجية :

- تجمع فى الأكياس الحمراء المخصصة لهذه المخلفات ثم تنقل الى المحرقة بطريقة منتظمة .

٤) استخدام الفورمالدهايد فى التطهير :

- يستخدم لتطهير الأماكن صغيرة السعة مثل كابينة السلامة والحضان. يعادل بعد ذلك الفورمالدهايد بالنشادر حيث أنه مسرطن ويسبب حساسية .يفضل استخدام ماء الاكسجينH2O2 حيث انه آمن وغير مسرطن.

أعمال الصيانة بالمعمل

❖ **مسئوليات العمال :**

- تنظيف الأرضيات والأحواض بالماء والصابون يوميا .
- تجميع المخلفات يوميا .
- تنظيف النوافذ والحوائط والدواليب أسبوعيا .

❖ **مسئوليات بقية أعضاء المعمل :**

- وضـــع مخلفات العمل فى الكابينة فى الحوض المحتوى على محلول ٥ ٪ كلور او ديتول ١٠٪ وتركها لمدة ساعتين ثم إعدامها فى الأوتوكلاف .

❖ **أعمال الصيانة للأجهزة فى المعمل L2,L3 :**

- **كابينة السلامة البيولوجية : -**
- صيانة يومية بعد الانتهاء من العمل .
  - تنظيف من الداخل بديتول ١٠ ٪ ثم بماء مقطر يتم تعقيمه ثم تجفف بالورق النشاف وتزال طاولة العمل وينظف ويطهر المكان تحتها بكحول ٧٠٪ ويشطف بالماء والصابون.
- صيانة سنوية للكابينة (تطهير ومعايرة) بواسطة الشركة المتخصصة.

جهاز الطرد المركزى : -

- إذا ســـكبت الســـوائل به , ينظف من الداخل ب ١٠٪ ديتول وماء وصابون ويراعى صيانته كل ٦ شهور من قبل الشركة المتخصصة.

الحضان : -

- ينظف الحضان اسبوعيا بالكحول ٧٠٪ و تكون الصيانة العامة سنويا عن طريق الشركة.

الأوتوكلاف : -

- يشطف بالماء والصابون وينظف الفلتر شهريا .
- وتكون الصيانة العامة سنويا عن طريق الشركة .

الديب فريزر : – 20 °م و –80°م

- يزال الثلج المترسب على الباب مرة شهريا حتى يحكم غلق الباب ويتم إزالة الأتربة من الظهر الخلفى.
- تكون الصيانة العامة سنويا بواسطة الشركة المتخصصة.

الثلاجات :

- تكون الصيانة العامة ســـنويا أوعند اللزوم عن طريق اخـــلاء الثلاجات من المحتويات وفرزها وإختبار تاريخ انتهـــاء الصلاحية لهذه المحتويات والتخلص مـــن المنتجات منتهية الصلاحية . كما تزال الأتربة من الظهر الخلفى لكل ثلاجة شهريا.

حـــالات الطـــوارىء

يعتبر الاهمال هو السبب الرئيسى لحالات الطوارىء .

اولا . إذا سكبت مواد ملوثة داخل كابينة الحماية :

- يستخدم قفاز جديد .
- يوضع ورق نشـــاف على مكان الســـكب ويصب عليه ديتول ١٠٪ ويمسح المسكوب بالورق النشاف المشبع بالديتـــول . يكرر ذلك مرة أخرى ويلقى الورق بكيـــس النفايات. ينظف المكان بعد ذلك بماء مقطر و معقم ويجفف.
- يجب ترك الكابينه تعمل طوال فتره التنظيف والتطهير.
- إذا تسرب السائل المسكوب تحت طاولة العمل , تزال هذه الطاولة وينظف تحتها بما سبق ذكره .

ثانيا . إذا سكبت مواد ملوثة على المعطف المعملى (البالطو) :

- يخلع البالطو ويغســـل جيدا بالماء والصابون ويجفف ويكوى وإذا كان ورقيايلقى فى كيس النفايات ويعدم فى الأوتوكلاف .
- يستخدم بالطو آخر نظيف .

ثالثا. إذا سكبت مواد ملوثة خارج كابينة السلامة :

مثل سكب علب البصاق على الأرض – كسر زجاجات مزارع ايجابية النتيجة .

- يترك المعمل لمدة ساعة حتى يترسب الرذاذ المنبعث من المواد الملوثة ويصبح تحت مستوى الفم والأنف .
- يمنع دخول العاملين الي المعمل .
- يدخل المسئول للمعمل مرة أخرى بالبالطو والقفاز والقناع (الماسك).
- يتم احتواء الانسكاب اولا بالقطن او الشاش ثم يرمى بالسلة الخطرة يوضع المطهر و يترك لمدة نصف ساعة.
- يرفع محتوى المواد الملوثة وتلقى فى الأكياس الحمراء .
- يتم تنظيف و تطهير المعمل بالكامل ثم يعرض للاشعة فوق البنفسجيه لمدة نصف ساعه.

رابعا . إذا سكبت مواد ملوثة على الجلد:

- يشطف الجلد بماء ساخن .
- يطهر الجلد بكحول ٧٠٪ .
- يضغط على الجلد بورق نشاف بعد تطهيره.

خامسا . إذا انثقب القفاز وجرح الجلد أثناء العمل :

- يخلع القفاز داخل الكابينة ثم تغسل الايدي بماء جاري .
- يطهر الجلد بكحول ٧٠٪ .
- إذا كان هناك نزيف، يغســـل يالماء والصابون ويطهر ويتم الضغط على مكان النزيف بدون عســـر لمكان الجرح.

سادسا . إذا سكبت مواد ملوثة فى العين :

- تشطف العين لمدة ¼ ساعة بالماء الجارى.
- تفتح العين أثناء عملية شطفها بالماء.

ملحوظة : عند حدوث أى حالة طوارى بالمعمل :

- يبلغ مدير المعمل أو الطبيب المسئول .

يكتب تقرير بالحادثة مبين به وصف الحادثة واسم المصاب والاجراء الذى اتخذ لضمان سلامة العاملين بالمعمل .

الشروط المطلوبة دوليا وعالميا لنقل مزارع الميكوبكتريا الدرنية (Mycobacterium Tuberculosis Complex)

- فى حالة نقل السلالات الدرنية خارج البلاد، يراعى الشروط الآتية:
- تعد مزارع الMTC من المواد المعدية (Category A) التى تحتوى على كم هائل من الميكروب الحى الذى يسبب المرض للانسان . كما تتضاعف الخطورة إذا كان الميكروب مقاوم للعقاقير المضادة له.
- المزارع إما أن تكون على ميديا صلبة (LJ) فى أنابيب أو زجاجات محكمة الغلق أو الأفضل أن تكون فى هيئة معلق من الميكروب فى ميديا سائلة (7H9) بحيث تكون الكمية 1.5ml من المعلق فى أنبوبة (crytube 2 m).
- كل أنبوبة تلف فى ورق نشـــاف وتوضع مع بقية الأنابيب أمثالها فى عبوة اخرى محكمة الغلق وتلك العبوة الأخيرة توضع فى عبوة أكبر مصنوعة من مادة الفيبر المتعرج أو الكرتون أو الخشـــب بحيث ترســـم عليها علامة الخطر (الحذر) من الخارج.

التعقيـــــــم

١. جميع العينات والمزارع والمواد المستخدمة في المعمل يجب تعقيمها قبل إعدامها أو إعادة استخدامها .

٢. يتم التعقيم في الأوتوكلاف لمدة ٢٠ دقيقة في درجة حرارة ١٢١°م (١,٢ ضغط جوي) للمحاليل عدا المواد البروتينية والسكريات .

٣. يجب التأكد من كفاءة الأوتوكلاف باستخدام المؤشرات البيولوجية أو الكيميائية مع كل دورة تعقيم.

٤. يراعى تنظيف الأوتوكلاف يوميا من الداخل والتأكد من وجود الكمية الكافية من الماء قبل تشغيله.

٥. عدم تكديس الأوتوكلاف لترك فرصة لدورة البخار وإخراج الهواء.

٦. حساب وقت التعقيم عند الوصول إلى درجة الحرارة المطلوبة و ليس عند بدء التشغيل .

٧. عدم فتح الجهاز قبل ان يبرد تماما .

٨. تعقم الزجاجيات فى فرن الهواء الساخن عند درجة ١٨٠°م لمدة نصف ساعة .

الطرق المعملية لتشخيص الدرن

العينات:

- **أنواع العينات:**

اولا : في حالات الدرن الرئوي

١- البصاق.

٢- الغسيل الشعبي.

ثانيا : في حالات الدرن خارج الرئة

١- البول.

٢- البراز.

٣- سوائل الجسم مثل سائل الاستسقاء(Ascitis)، ارتشاح تاموري(Pericardial effusion)، سائل بللوري (Pleural effusion)، سائل النخاع (C.S.F).

٤- البذل من الغدد الليمفاوية.

- **طرق التعامل مع العينات المختلفة : جمعها – حفظها- نقلها**

البصاق (Sputum):

- يجمع فى أكواب بلاستيك نظيفة ذات غطاء محكم و فوهة واسعة و يفضل ان تكون معقمة فى حالة طلب مزرعة .
- ينصح المريض بغسل الفم جيدا أو عمل مضمضة لإزالة بقايا الطعام أو الأدوية .
- يسعل المريض عدة مرات للتأكد من الحصول على العينة من داخل الرئة والشعب الهوائية.
- تؤخذ ٣ عينات على يومين متتاليين من المريض أحدهما عينة الصباح الباكر .
- يكفى لعمل الفحوص اللازمة من ٥-١٠ ملي بصاق فى حالة المزرعة و٣-٥ ملي فقط فى حالة الفحص المباشر.

البول (Urine):

- يجمـــع بول الصباح الباكـــر فى زجاجة نظيفة و جافة وتحفظ بعيدا عـــن الضوء و فى مكان بارد (الثلاجة)
- يفضل فحص ٥ عينات فى خمسة أيام متتالية لأن إفراز عصيات الدرن يكون متقطعا وترسل يوميا للمعمل .
- تترك العينة حتى تترسب ثم تدار فى جهاز الطرد المركزى و يؤخذ الراسب لعمل الفيلم ثم المزرعة.

سوائل الجسم(Body Fluids): – مثل :

- سائل الاستسقاء(Ascitis)، ارتشـــاح تاموري(Pericardial effusion)، سائل بللوري(Pleural effu–sion)، سائل النخاع الشوكي(C.S.F).

– يجـــب جمع هذه العينات تحـــت احتياطات تعقيم معينـــة (Aseptic conditions) في أنابيب أو زجاجات تحتوي علي مادة مانعة للتجلط مثل أوكسالات(oxalates) أوسترات (citrates)الصوديوم.

– هذه السوائل عادة ما تكون محتوية على عدد قليل من العصيات ومن الصعب اكتشافها في الفحص المباشر أو المزارع .

– ولزيادة فرصة اكتشـــاف عصيات الدرن : يجب جمع أكبر كمية من الســـائل وزرع عدد كبير من زجاجات المستنبتات .

– وقد وصف العالم(Eberle) طريقة لزيادة فرص اكتشاف العصيات في السوائل المختلفة :

١. يسحب السائل بكمية كبيرة في زجاجة معقمة .
٢. يضاف نقطتان من ٢٠ ٪ سترات الصوديوم المعقم لكل ١٠ مل من السائل .
٣. يدار السائل في جهاز الطرد المركزي بسرعة عالية لمدة ٣٠ دقيقة .
٤. يسحب السائل الفوقي(Supernatant)بواسطة ماصة باستير ويترك الراسب .
٥. يلقح جزء من الراسب علي طبق أجار دم ويحضن لليوم التالي .
٦. يحفظ باقي الراسب في الثلاجة .
٧. يزرع الراسب علي أكبر عدد من زجاجات المستنبتات إذا لم يظهر نمو علي طبق أجار الدم.
٨. يجب معاملة الراسب قبل الزرع بنفس الطريقة التي يعامل بها البصاق (طريقة التطهير والتركيز Concentration & Decontamination) إذا احتوى طبق أجار الدم علي ميكروبات .

حفظ ونقل العينة:

الحفظ :

- لايزيد الوقت بين أخذ العينة وزرعها عن ثلاثة أيام فى حالة البصاق اما البول وباقي سوائل الجسم تزرع بعد سحبها مباشرة.
- تحفظ عينات البصاق فى الثلاجة لحين نقلها وتنقل لمكان زرعها مرتين فى الأسبوع.

النقل:

- تنقل العينات فى عبوات خاصة معقمة ومحكمة الغلق وتوضع فى راكات خاصة يحمل كل راك من ٢٠–٣٠ عبوة توضع أفقياً فى الراك وتحاط كل عبوة بقطن حتى يمتص أى سائل مسكوب . يفضل وضع الراكات فى ثلاجات متنقلة محكمة الغلق وتكون بعيدة عن أشعة الشمس.
- توضع الاستمارات المرفقة بعيداً عن العينات . ترفق استمارة مع كل ثلاجة متنقلة توضح محتوياتها وأسماء المرضى .

- قبل التحرك بالثلاجة المتنقلة المحتوية على العينات ، يجب مراعاة الاتى :

١. مقارنة الأرقام الموجودة على العبوات بالأرقام التى بالاستمارة المرفقة .

٢. مقارنة عدد العينات بالثلاجة بعدد العينات المكتوبة بالاستمارة المرفقة .

٣. وجود المعلومات الكافية للمرضى على الاستمارة المرفقة .

٤. وجود تاريخ نقل العينات واسم المركز المأخوذ منه العينات على الاستمارة المرفقة .

إستلام العينة:

- يفضل استلام العينة فى مكان مخصص لاستلام العينات .
- تفتح الثلاجة المتنقلة فى كابينة السلامة البيولوجية إن وجدت .
- يراعى الاتى عند إخراج العينات :

١. لبس القفازات أثناء اخراج العينات .

٢. فحص العينات وملاحظة وجود أى سائل منسكب .

٣. تعقيم الثلاجة بفوطة مشبعة بـ٥٪ فينول من الخارج .

٤. فتح الثلاجة بحرص ويلاحظ وجود أى عبوات مكسورة . اذا وجدت عبوات مكسورةيطلب عينات أخرى من نفس المريض وتعقم العينات التالفة ثم تحرق .

٥. مقارنة الأرقام على العبوات بالأرقام على الاستمارة .

٦. تعقيم الثلاجة من الداخل بفوطة مشبعة بـ٥٪ فينول .

٧. التخلص من القفازات بالتعقيم والحرق .

٨. غسل الأيدى بالماء والصابون ثم ٧٠ ٪ كحول .

حفظ ونقل المزارع:

- توضع العينات المزروعة على المستنبت فى الحضان عند درجة ٣٥–٣٧°م لحين ظهور المستعمرات عليها أو حتى يمر عليها ٨ أسابيع .
- تحفظ المزارع الإيجابية فى الثلاجة عند درجة ٢ – ٨°م لحين نقلها .
- تنقل المزارع الإيجابية بنفس الراكات السابق وصفها فى نقل عبوات البصاق ولكن لا داعى لوضع القطن حولها، ثم توضع فى الثلاجة المتنقلة لنقلها إلى المعمل المركزي لعمل اختبارات الحساســية لها .

II-الاختبارات المتبعة في التشخيص

أولا الطرق التقليدية في التشخيص:

١-الفحص المجهري المباشر:

المزايا :

١. وسيلة سريعة للتشخيص .

٢. قليلة التكاليف .

٣. لا تحتاج إلي مهارة فائقة أو تجهيزات معقدة .

٤. يعطى مؤشرا تقريبياً(Rough index) لعدد العصيات في العينة .

٥. اكتشاف المريض المعدى(infectious) وكذلك متابعة المريض أثناء العلاج .

العيوب :

١. يعتبر من الوسائل الأقل حساسية لاكتشاف المرض (Less sensitive)

٢. أشـــار العالم Cummings إلي أن عينة البصاق لا تكون إيجابية في الفحص المجهري إلا في حالة وجود (٥٠٠٠-١٠٠٠٠عصية / مل) .

٣. لا يفرق بين عصيات الدرن النموذجية وغير النموذجية (Less specific) .

أ: صبغة الزيل نلسن (Ziehl Neelsen)–(Z.N.)

تحضير الكواشف

١- محلولا لفوكسين الكحولي المركز:

فوكسين قاعدي (basic fuchsin)	١٠ جم
كحول إثيلي ٩٥ ٪	١٠٠ مل

ملحوظة : يمكن تحضير محلول الفوكسين بـ ٣ جم حسب جودة الصبغة.

٢- محلول الفينول ٥ ٪ :

بللورات فينول	٥٠ جم
ماء مقطر	٩٥٠ مل

تسيل بللورات الفينول فى حمام مائي ثم يؤخذ منها ٥٠ مل في مخبار وتضاف إلي الماء المقطر حتى ١ لتر

٣- تحضير صبغة الزيل نلسن الشغالة:

محلول الفوكسين الكحولي المركز	١٠٠ مل
محلول فينول ٥ ٪	٩٠٠ مل

تخلط وترج جيدا ثم ترشح في زجاجة بنية اللون .

يكتب أسم الصبغة وتاريخ التحضير علي الزجاجة وتحفظ بعيدا عن الضوء .

٤- تحضير الكحول الحمضي (محلول التبهيت):

– كحول مثيلي ٩٥ ٪	٩٧٠ مل
حامض الهيدروكلوريك المركز	٣٠ مل

ملحوظة :يضاف الحامض الى الكحول دائماًوليس العكس.

٥- الصبغة المبينة : (Contrast or Counter stain) :

– كلوريد أزرق المثيلين	٠,١ جم
ماء مقطر	١٠٠ مل

يمزج لإذابته جيدا .

طريقـــة العمـــل

١- طريقة إعداد المسحات :

الترقيم :ترقم الشـــرائح علي طرف الشريحة بالحفر بواسطة القلم ذو الطرف الماسي او يكتب علي الجزء المصنفر من الشريحة.

الفرد :ينقل الجزء الصلب المتقيح من العينة إلي الشـــريحة بواسطة عيدان خشـــبية كما في حالة البصاق أو بعروة الزرع كما ينقل الراســـب بواسطة ماصة باستير في حالة البول وغيره من السوائل بعد تدويره في جهاز الطرد المركزى.

تفرد العينة بعروة الزرع الســـلك بمساحة١×٢ ســـم بحيث تكون متجانسة ورقيقة بقدر الإمكان .

يفضل عمل المسحة في صورة دوائر حلزونية متداخلة ومتكررة كما في الرسم .

ملحوظة: يجب عدم مزج العينة لان هذا يؤدى إلى تخفيفها.

التجفيف :تجفف الشريحة في الهواء لمدة ١٥-٣٠ دقيقة وينصح بعدم استعمال اللهب .

يجب عدم تعرض المسحة لضوء الشمس المباشر أو U.V.أو للحرارة الشديدة حيث يفقد الميكروب خاصية Acid – Fastness .

التثبيت :يثبت الفيلم بتمريره فوق موقد بنزن ثلاث مرات لمدة ٣-٥ ثوان.

تطهيـــر المواد الملوثة :بإلقائها فـــي وعاء معدني ذو غطاء وغير قابل للصدأ به مطهر ثم تعدم في الأوتوكلاف .

يجب حرق العروة الســـلك بين كل عينـــة وأخري بعد وضعها في زجاجة بها رمل وكحول لإزالة أي عالق بها حتى لا ينتشر الرذاذ بالمعمل.

٢- طريقة الصبغة :

- توضع الشـــرائح علي الحامل (١٠-١٢ شريحة علي الأكثر) بحيث يكون الســـطح المفرود عليه الفيلم لأعلي والطرف المرقم في أتجاه القائم بالعمل . وتوضع الشرائح متباعدة.
- يغطي الفيلم بقطعة من ورق الترشيح .
- يغطي سطح الشرائح بأكمله بالفوكسين القاعدي .

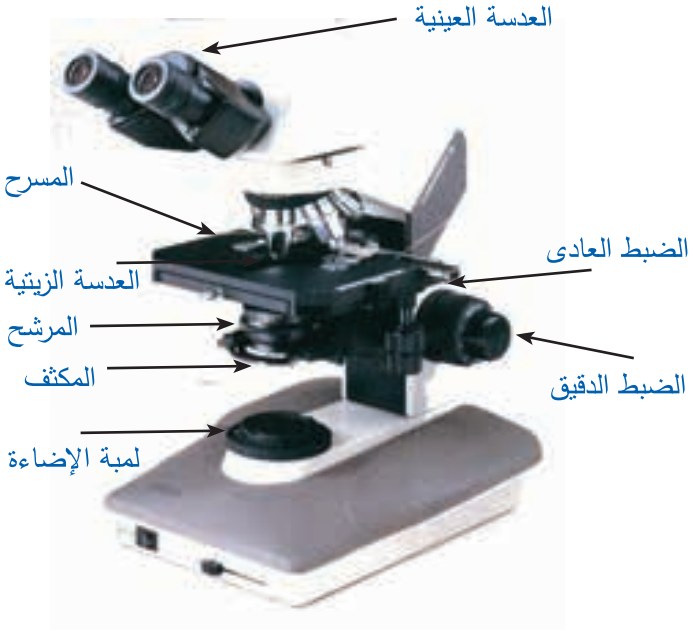
- يتم التسخين بلطف حتى يظهر بخار وذلك باستخدام قطعة من القطن علي مرود وتبلل بالكحول مع تجنب الغليان أو جفاف الصبغة وتكرر هذة العملية من ٢ – ٣ مرات .
- تترك الصبغة الدافئة علي الشريحة من ٧-١٠ دقائق .

- تشطف كل شريحة علي حدة بعد إزالة ورق الترشيح بواسطة ملقط (جفت) وإلقائه في وعاء الإعدام .

- يتم التخلص من ماء الشـــطف بوضع الشريحة مائلة بواسطة الجفت وتغطي الشرائح كل منها بمحلول إزالة اللون (الكحول الحمضي) لمدة ٣ دقائق ثم تشطف بماء الصنبور وتكرر هذه الخطوة حتى يزول اللون تماما
- تشطف الشرائح بالماء الجاري كل علي حدة في وضع مائل وبرفق.
- توضع الشـــرائح على الحامل وتغطي بالصبغة المبينة (counter stain) لمدة ٦٠ ثانية .

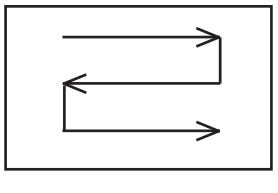
- تشـــطف وتترك لتجف في الهواء بعيداً عن ضوء الشمس (لا يستعمل ورق الترشيح في التجفيف) .
- يجـــب تجنـــب إجراء الصبغة لعدد كبير من الشـــرائح في آن واحد بســـبب الاحتمال الفعلى لانتقال التلوث من شريحة لأخرى .

٣- طريقةالفحص بالمجهر:

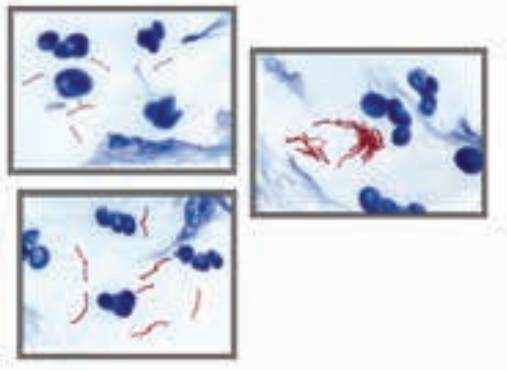


يستخدم المجهر ثنائي العدسة العينية (Bin-ocular) ذو مصدر ضوئي كهربائي

- يرفع المكثف لأعلي ويفتح الحجاب لآخره مع ضبط الضوء الكهربى .
- توضع الشريحة علي المسرح بعد وضع نقطة زيت سيدر على طرف الفيلم .
- لتجنب تلوث الزيت يجب عدم لمس الشريحة بالمـــرود الزجاجي أو قطارة الزيت ولكن تترك نقطة الزيت لتسقط على الشريحة .
- تفحص الشريحة بواسطة العدسة الزيتية ذات التكبير × ١٠٠ .
- يفحـــص مـــا لا يقل عن ٣٠٠ حقل مجهري قبل إعطاء النتيجة ســـلبية وذلك بفحص٣ خطوط طولية بطول الفيلم – كما فى الرسم ثم عشوائياً .



تظهر عصيات الدرن في شـــكل عيدان رفيعة حمراء مقوســـة بعض الشئ محببة إلي حد ما، منفردة أو مزدوجة أو مجموعات وتكون واضحة تماما على الخلفية الزرقاء. تعد العصيات الصامدة للحمض (AFB) ويسجل العدد في سجل النتائج بالشفرة المتفق عليها : –



أكثر من ١٠ عصيات في كل حقل مجهري	+++
من ١-٩ عصيات في كل حقل مجهري	++
من ١٠-٩٩ في ١٠٠ حقل مجهري	+
من ١-٩ في ١٠٠ حقل مجهري	يكتب العدد
عدم وجود عصيات	سلبي

بعد الفحص والتأكد من الرقم لكل شريحة تمسح بقطعة من الشاش مبللة بالزيلول للتخلص من زيت الغمر وتوضع في صندوق خاص بالشرائح حسب ترتيبها في سجل المعمل.

– يجب مسح العدسة الزيتية بعد فحص كل شريحة بقطعة من الشاش النظيف.

ب: صبغة فلوروكروم (Fluorochrome)

تســـتخدم صبغة فلوروسنتية لصبغ العصيات المقاومة للحمض مع اســـتخدام صبغة مبينة للخلفية مثل برمنجنات البوتاسيوم او باستخدام اكريدين برتقالى (Acridin orange).

تحضير الكواشف

أ– الصبغة :

محلول(أ):

اورامين (Auramine)	٠,١ جم
كحول إثيلى ٩٥ ٪	١٠ مل

محلول(ب):

بللورات الفنيول	٣ جم
ماء مقطر	٨٧ مل

- يمزج المحلولان (أ+ب)
- يحفظ فى زجاجة بنية اللون و محكمة الإغلاق بعيدا عن الحرارة و الضوء .

ملحوظة : إذا وجدت عكارة مع طول فترة التخزين لا يعني هذا فقد الفاعلية .

ب – محلول مزيل اللون:

حمض الهيدروكلوريك المركز	٠,٥ مل
الكحول الإثيلي ٧٠ ٪	١٠ مل

ملحوظة :

إذا وجدت عكارة مع طول فترة التخزين لا يعني هذا فقد الفاعلية .

ج – الصبغة المبينة:

١– برمنجات البوتاسيوم:

برمنجنات البوتاسيوم	٠,٥ جم
ماء مقطر	١٠٠ مل

تحفظ في زجاجة بنية.

٢– أكريدين برتقالى:

فوسفات الصوديوم الثنائي القاعدية اللامائي	٠,٠١ جم
ماء مقطر	١٠٠ مل
الأكريدين البرتقالي	٠,٠١ جم

يضاف الاكريدين البرتقالى بعد اذابة فوسفات الصوديوم في الماء المقطر ويذاب جيدا ثم يحفظ في زجاجات بنية اللون محكمة الإغلاق .

طريقة العمل

- تثبيت المسحات علي الشرائح بالتسخين .
- تغمر الشرائح بالأورامين لمدة ١٥ دقيقة بدون تسخين .
- تشطف بماء الصنبور ويسكب الماء .
- يزال اللون بالكحول الحمضي لمدة دقيقتين .
- تشطف بماء الصنبور ثم يسكب الماء .
- تغمر الشرائح بالصبغة المبينة ١ أو ٢ لمدة لا تزيد عن ٤ دقائق .
- تشطف بالماء ثم يسكب .
- تترك لتجف في الهواء .
- تفحص مباشرة بعد الصبغة .

الفحص المجهري :

- تفحص بالمجهر الاستشعاعي (Fluorescent Microscope)
- .BG-12or 5113 Primary filter with an OG-1 barrier filter system
- في هذا النظام تشع العصيات المقاومة للحمض ضوء اصفر متألق
- .(Bright Yellow Fluorescence)
- مع الصبغة المبينة ببرمنجنات البوتاســيوم تشــع الخلفية ضوء أصفر باهت يختلف عن لون العصيات ، أما مع الأكريدين البرتقالي فالخلفية تصبغ باللون الأحمر أو البرتقالي التي تختلف كلية عن الضوء المنبعث من العصيات .
- يمكن عمل فحص دقيق وســريع للأفلام بالعدسة الشيئية ذات التكبير × ١٠ وفي بعض الأحيان نحتاج إلي الفحص بواسطة العدسة × ٤٠ أو × ٤٥ للتحقق من شكل العصيات .
- يجب التأكد من الشرائح الإيجابية بصبغها بصبغة Z.N بدون إزالة الأورامين .

ج: صبغة الكينيون (الصبغة الباردة)

تحضير الكاشف:

فوكسين قاعدى	٤ جرام
كحول إثيلى ٩٥٪	٢٠ مل

يذاب مع الرج مع إضافة الكحول ببطء

ماء مقطر	١٠٠مل
بللورات الفينول المذابة	٨ جرام

تحضير محلول مزيل اللون والصبغة المبينة كما فى طريقة ال (ZN).

الخطوات:

١- تثبيت الفيلم على الشريحة بواسطة اللهب.

٢- يغطى سطح الشريحة بصبغة الكينيون كاربول فوكسين من ١٠ – ١٥ دقيقة بدون تسخين.

٣- تشطف الشرائح لإزالة الصبغة بالماء المقطر.

٤- يزال اللون بمحلول الكحول الحمضى لمدة ٣ دقائق.

٥- تشطف بالماء المقطر وتكرر الخطوة السابقة لإزالة اللون الأحمر تماما.

٦- توضع الصبغة المبينة (الميثيلين الازرق).

٧- تشطف بالماء وتترك لتجف فى الهواء وتفحص كما سبق.

ثانياً - المزارع الدرنية

أنواع المستنبتات (Media) المستخدمة لزرع ميكروب الدرن

أولاً : المستنبتات الصلبة (Solid Media)

أ – المستنبتات الصلبة المحتوية على البيض

لوفنشتاين جنسن Lowenstein Jensen

ستون برينك Stone Brink

• المميزات :

١- ذات حساسية عالية (Highly sensitive) حوالى ٩٨ ٪ .

٢- قليلة التكاليف .

٣- يمكن منها عمل الحساسية للأدوية النوعية المعالجة للدرن .

٤- يمكن التعامل مع كافة العينات الواردة .

• العيوب :

١- بطء نمو الميكروب حيث يستغرق من (٣ – ٨ أسابيع) .

٢- تحتاج إلى تركيز وتطهير بعض العينات التى تحتوى على ميكروبات ملوثة (Flora) مثل البصاق – الصديد – البول .... وغيره .

٣ – قد تحدث تلوث للمزرعة (٣ – ٤ ٪) من حجم العمل .

ب – المستنبتات الصلبة المحتوية على الأجار

ديوبس أوليك أسيد– Dubos Oleic Acid Media

Middle Brook 7 H 11

ثانياً : المستنبتات السائلة (Solid Media)

Middle Brook 7 H9, 7 H12

طرق تحضير المستنبتات الصلبة

أ- مستنبت Lowenstein Jensen

تحضير الأملاح

المادة	الاسم الكيميائي	الكمية
فوسفات أحادي البوتاسيوم	KH_2PO_4	٢,٤ جم
كبريتات الماغنسيوم	$Mg\ SO_4$	٠,٢٤جم
سترات الماغنسيوم		٠,٦جم
اسبراجين		٣,٦جم
جليسرين		١٢مل
ماء مقطر		٦٠٠مل

يضاف الماء المقطر قبل إضافة الجلسـرين ويذاب الخليط فى حمام مائى وبعد إضافة الجلسـرين تذاب الأملاح جيدا ثم تعقم فى الأوتوكلاف عند درجة حرارة ١٢٠ْم لمدة ٣٠ دقيقة .

ب- تحضير البيض : ١ لتر:

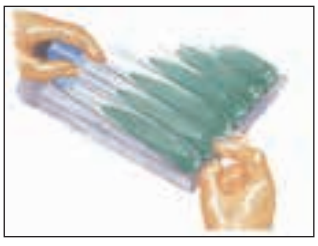
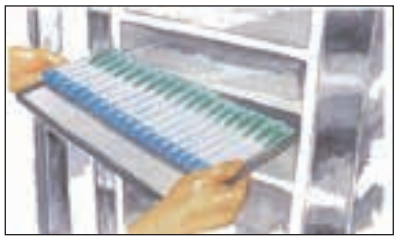
- يجب استعمال بيض حديث الإنتاج (أسبوع أو أقل) .
- يغسل البيض جيدا بالفرشاة وينقع فى صابون سائل ٥٪ ويترك لمدة ٢/١ساعة .
- يشطف بالماء الجارى لإزالة الصابون كلية ويجفف ثم يوضع البيض فى كحول ٧٠٪ لمدة ١٥دقيقة .
- يكسر البيض كل على حدة فى طبق بترى معقم للتأكد من أنه طازج بواسطة ملعقة معقمة وتوضع فى دورق معقم ثم يمزج صفار البيض بالبياض ويرشـح من خلال عدة طبقات من الشاش المعقم بواسطة قمع معقم .

ج- ملاكيت اخضر ٢٠مل ٢٪ .

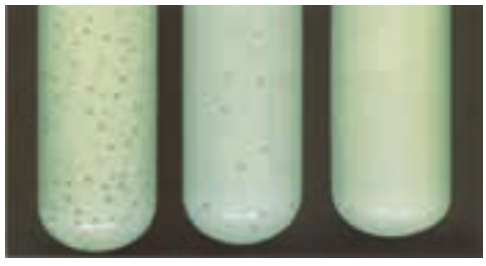
- يحضر فى فلاسـك معقمة يوزن ٢ جم ملاكيت أخضر + ١٠٠ مل ماء مقطر معقم ويذاب فى حمام مائى ولا يعقم فى الاوتوكلاف ويتم تحضيره فى نفس اليوم.

- بعد أن تبرد الأملاح يضاف إليها مزيج البيض ١ لتر والملاكيت الأخضر .
- تصب فى زجاجات خاصة معقمة ذات غطاء حلزونى (Screw – capped)6 مل لكل زجاجة .

تسوى المستنبتات فى فرن التسوية (Inspissator) فى وضع مائل عند درجة حرارة ٨٥°م لمدة ٥٠ دقيقة .

بعد أن يتم تسوية المستنبتات يجب التأكد من الآتى :



- تســوية المســتنبت فى حرارة ٨٥ْ مئوية وليس أكثر والدليل على ذلك عدم وجود فقعات هواء كثيرة كما في الصــورة. خلوهــا من التلوث بوضعها في الحضان من ٢ – ٤ ايام عند درجة حرارة ٣٧ °م ثم تحفظ بعد ذلك في الثلاجة

٢- ستون برينك Stonebrink:

أ- الأملاح:

٧جم	$KHPO_4$	فوسفات أحادية البوتاسيوم
٤جم	Na_2HPO_4	فوسفات ثنائية الصوديوم
١٢,٥٪		بيروفات الصوديوم
١لتر		ماء مقطر

تذاب الأملاح ثم تعقم فى الأوتوكلاف عند درجة ١٢٠مْ لمدة ٣٠ دقيقة .

ب- مزيج البيض:

- يحضر ٢ لتر كما فى طريقة تحضير مستنبت Lowenstein Jensen.

ج- ملاكيت أخضر ٢٪ ٤٠ مل (تحضر كما سبق) :

- يضاف محلول الأملاح ١ لتر بعد ان يبرد ومزيج البيض ٢ لتر والملاكيت.

الأخضر ٤٠ مل ويمزج جيداً فى ظروف تعقيم جيدة ثم يصب فى زجاجات.

معقمة كما سبق شرحه وتسوى ثم يجرى اختبار االتعقيم ثم تحفظ فى الثلاجة .

- يســـتخدم هذا المســـتنبت فى زرع ميكروب الدرن من أصل حيوانىBovine strain لأنها تفضل البيروفات عن الجليسرين.

ملحوظة:

- عند تحضير تشغيلة جديدة من مستنبت LJ يجب اختبار جودته فى زرع ميكروب الدرن وذلك بتلقيح عدد ٢ من زجاجات المســـتنبت المحضرة حديثا بواســـطة معلق من مستعمرة ايجابية للميكوبكتيريا وتحضينها مع بقية العينات.

طريقة الزرع على المستنبتات الصلبة

• طريقة تركيز وتطهير العينات قبل الزرع (Concentration & decontamination)

للحصول على مزارع جيدة يجب أولا القضاء على البكتريا المتعايشة (commensals) فى العينات الملوثة مثل البول والبصاق والصديد ومسحات الحلق.

أ – طريقة الصودا الكاوية : (Petroff's method)

- تســـتخدم هذه الطريقة لمعظم العينات وبالذات العينات المتماســـكة اللزجة(tenacious) لأن الصودا تعمل على إذابة المواد العضوية كما تقضى على الميكروبات المتعايشة وتستخدم فى حالة البصاق – الصديد .
- ولكن يجب أن يوضع فى الاعتبار ألا تزيد مدة تعرض عصيات الدرن للصودا الكاوية عن ٣٠ – ٤٥ دقيقة حتى لا تتأثر حيوية الميكروب (viability) وتعطى مزرعة سلبية كاذبة .

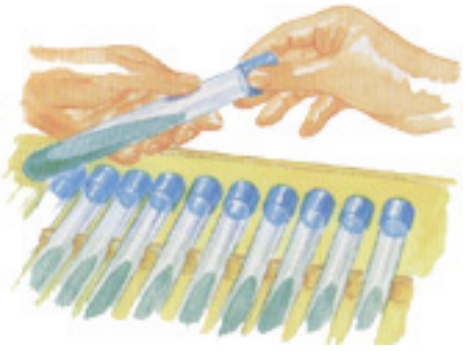
الطريقة :

- يضاف مقدار من الصودا الكاوية المعقمة بتركيز ٤ ٪ مساو للعينة وتغلق الزجاجة جيداً.

- توضع فى الهزاز لمدة ٢٠ دقيقة .
- تدار فى جهاز الطرد المركزى لمدة ١٥ دقيقة بسرعة ٣٠٠٠ دورة / دقيقة .
- يؤخذ الراسب الناتج ويعادل بواسطة حامض الهيدروكلوريك (١ N) المضاف إليه الفينول الأحمر ككاشف للرقم الهيدروجينى نقطة نقطة حتى نحصل على نقطة التعادل .

- يلقـــح ٢ زجاجةL.J + ١زجاجة Stonebrink بوضع ٢-٣ نقط من الراســـب المتعادل بواســـطة ماصات باستير معقمة.

- توضع المســـتنبتات الملقحة فى وضع مائل لمدة ٢-٤ أيام فى الحضان حتى يتم توزيع الراسب على سطح المستنبت مع مراعاة عدم غلق الغطاء كاملاً ثم يعدل وضعها بقية فترة التحضين التى تستمر لمدة ٦ إلى ٨ أسابيع عند درجة حرارة من ٣٥ْ إلى ٣٧ْم مع ضرورة غلق الغطاء بإحكام حتى لا يجف المستنبت .



طريقة تحضير محلول التعادل :

أ- حامض الهيدروكلوريك المدخن Fuming 37% 72 مل .

ب- الفينول الأحمر ١٪ ١ مل .

ج- يضاف ماء مقطر معقم حتى ١ لتر ثم يصب فى أنابيب اختبار ويعقم فى الأوتوكلاف .

نقطة التعادل:

هى أول نقطة تحول المحلول إلى اللون الأصفر .

ب - طريقة الـ NALC:

(N-acetyl-L- cysteine sodium hydroxide method)

المميزات :

١- يزيد من حيوية العصيات الحية مما يضاعف من النتائج أو المزارع الإيجابية .

٢- فصل ميكروب الدرن من العينات التى تحتوى على عدد قليل من عصيات الدرن .

٣- يحافظ على شكل عصيات الدرن مما يؤدى إلى سهولة الكشف عليها أثناء الفحص الميكروسكوبى .

التركيب : الوظيفة:

N–acetyl–L– cysteine يؤدى إلى تكسير المخاط.

الصودا الكاوية تعمل على قتل البكتريا غير الدرنية الموجودة بالعينة.

ملحوظة : يعمل ملح ســـترات البوتاســـيوم المضاف على التخلص من أيونات المعادن الثقيلة التى قد توجد بالعينة وتؤدى إلى وقف عمل الـ Acetyl cysteine .

طريقة التحضير :

لتحضير ١٠٠ مل من NaOHcysteineN acetyl–L :–

١– يعقم ٤ ٪ من الصودا الكاوية (٤ جم صودا كاوية + ١٠٠ مل ماء مقطر) .

٢– يعقم ٢,٩ ٪ سترات الصوديوم (٢,٩ جم سترات صوديوم + ١٠٠ مل ماء مقطر).

يؤخذ ٥٠ مل من المحلول (١) + ٥٠ مل من محلول (٢) + ٠,٥ جم من بودرة الـ NALC .

يوضع فى زجاجة ويستخدم هذا المحلول خلال ٢٤ ساعة فقط .

تحضير محلول الفوسفات المنظم الرقم الهيدروجيني ٦,٨

محلول رقم (١)

١٠٠ مل ماء مقطر ←——— يضاف إليها ١,١٩٢ جم من صوديوم ثنائى الفوسفات

٥٠٠ مل ماء مقطر ←——— يضاف إليها ٥,٩٦ جم من صوديوم ثنائى الفوسفات

١٠٠٠ مل ماء مقطر←——— يضاف إليها ١١,٩٣ جم من صوديوم ثنائى الفوسفات

محلول رقم (٢)

١٠٠ مل ماء مقطر ←——— يضاف إليها ٠,٩١٢ جم من فوسفات أحادي البوتاسيوم

٥٠٠ مل ماء مقطر ←——— يضاف إليها ٤,٩٦ جم من فوسفات أحادي البوتاسيوم

١٠٠٠ مل ماء مقطر ←——— يضاف إليها ٩,١٢ جم من فوسفات أحادي البوتاسيوم

ثم يضاف ٥٠ مل من محلول رقم (١) +٥٠ مل من محلول رقم (٢)

تحضير نالك (NaOH – NALC):

الحجم المطلوب تحضيره	Na OH % 4	٢,٩ ٪ سترات الصوديوم	(NALC Powder)
٥٠ مل	٢٥ مل	٢٥ مل	٠,٢٥ جم
١٠٠ مل	٥٠ مل	٥٠ مل	٠,٥ جم
٢٠٠ مل	١٠٠ مل	١٠٠ مل	١ جم

يستخدم هذا المحلول فى خلال ٢٤ ساعة .

الخطوات :

١- يؤخذ فى أنبوبة ســـنترفيوج معقمة (فالكون حجم ٥٠ مل) مقدار من الـ نالك هيدروكســـيد الصوديوم (NALC – NAOH) مع مقدار مساوى من العينة.

٢- توضع فى الهزاز (Vortex) لمدة ٥ – ٢٠ ثانية .

٣- تترك لمدة ١٥ دقيقة فى درجة حرارة الغرفة .

٤- يضـــاف محلول الفوســـفات المنظم (buffer phosphate) ذو الرقـــم الهيدروجينى ٦,٨ (PH 6.8) حوالى ٣٠ – ٤٠ مل .

٥- تخلط جيداً ثم توضع فى جهاز الطرد المركزى (Centrifuge) لمدة ١٥ دقيقة عند ٣٠٠٠ لفة / دقيقة Relative Centrifugal force.

٦- يصب السائل الفوقى .

٧- تكرر هذه الخطوات اذا كان البصاق شديد اللزوجة.

٨- يتم زرع الراســـب على مســـتنبت الـ L.J كما فى طريقة الـ Petroff بعـــد إضافة عدة نقط من محلول الفوسفات المنظم .

الخطوات المتبعة حتي تقرأ المزارع

- تختبر المزارع بعد تلقيحها بـ ٧٢ ساعة للتأكد من تبخر السائل من المستنبت وغلق أغطية الزجاجات بإحكام قبل أن يجف المستنبت وأيضاً لفحص المستعمرات الملوثة إن وجدت .
- بعد ذلك تفحص المزارع مرة كل أسبوع حتى مرور ٨ أسابيع، وإذا لم يتيسر ذلك فتفحص ٣ مرات :

١- بعد أسبوع لتحديد الميكوبكتريا سريعة النمو حتى لا تختلط بالميكوبكتريا الدرنية .

٢- بعد ٣-٤ أسابيع لتحديد المزارع الايجابية للميكوبكتريا الدرنية .

٣- بعد ٨ أسابيع لتحديد المزارع الايجابية للميكوبكتريا الدرنية بطيئة النمو، قبل اعطاء النتيجة السلبية .

ملحوظة: لا بد أن تحمل الزجاجة تاريخ تلقيح المزرعة حتى يمكن حساب وقت قراءتها .

عند وجود مزارع ملوثة، يراعى الآتى :

١- اذا كان سطح المستنبت ملوثاً كله أو إذا كان لون المستنبت متغيراً أو إذا لم يكن المستنبت صلباً و متماسكاً تعقم وتعدم .

٢- إذا كان التلوث يغطى جزءاً من سـطح المسـتنبت ويبقى بقية السطح سـليماً وذا لون غير متغير تترك فى الحضان حتى تقرأ أو تعطى نتيجة سلبية بعد ٨ أسابيع .

٣- اذا حدث نمو على المستنبت فى الأسبوع الثامن والأخير ، فذلك يمكن أن يكون تلوثاً أو ميكروبكتريا درنية. وللتأكد، يحضر فيلم من المسـتعمرات النامية ويصبغ بالزيل نيلسـن ويفحص لمعرفة ما إذا كانت المزرعة ايجابية أم سلبية وذلك بوجود عصيات مقاومة للحمض والكحول AFB .

قراءة المزرعة :

الشروط الواجب توافرها حتى حتى تكون مستعمرة ميكوبكتريا درنية :

تكون خشـنة السـطح، سـكرية اللون، متعرجة كالقرنبيط تنمو فى مدة بين ٣-٨ أسابيع (إذا نمت أثناء الأسبوع الأول فهى ميكوبكتريا سريعة النمو).

للتأكد من أن المستعمرة للميكوبكتريا الدرنية يؤخذ جزء من المستعمرة بإبرة الزرع ويذاب فى نقطة من محلول الملح (Saline Nacl) على الشريحة فيعطى مظهرا معلقا حيث أن الميكوبكتريا الدرنية لا تذوب فى محلول الملح. تترك العينة على الشـريحة لتجف، ثم تثبت على النار وتصبغ بالزيل نيلسن وتفحص. عند الفحص، تظهر الميكوبكتريا الدرنية على هيئة عصيات حمراء ومرصوصة فى شـكل أحبال متعرجة ذات أطوال مختلفة أو فى شكل تجمعات متفرقة .

إختبارات تصنيف الميكوبكتريا

I- إختبار النياسينNiacin test:

1.الإختبار العادى:

فكرة الإختبار:

- تنتج هذه الفصائل نياسين أثناء فترة نموها ولذلك فهى لاتحلله عند إضافته لها بل يتراكم ويفرز على المستنبت:
- M.tuberculosis
- M.simiae
- M.chelonae
- ويوضح هذا الإختبار إفراز وتراكم النياسين على المستنبت فى حالة وجود M.tuberculosis .

محلوظة :

- يجب أن تكون عدد المستعمرات على الميديا أكثر من ٥٠ مستعمرة.
- يجب تهوية الميديا أثناء التجربة بعدم غلق الأنبوبة بشدة.

الضوابط (Controls):

- -ve control Sterile distilled water
- +control ve مستخرج من مزرعة M.tuberculosis H37Rv

الخطوات:

- يضاف ١ مل ماء مقطر معقم للمزرعة. تشقق الميديا بطرف الباستيرحتى يدخل الماء بالميديا.
- توضع الأنبوبة أفقيا حتى يغطي السائل سطح الميديا.تترك الأنبوبة ٣٠ق حتى يفرز النياسين. إذا كان عدد المستعمرات قليلا, تترك فترة أطول من ٣٠ق .
- توضع الأنبوبة عموديا لمدة (٥)ق حتى يترسب السائل أسفل الأنبوبة.
- يسحب ½ مل من السائل لأنبوبة جديدة
- يضاف ½ مل من ٤٪ محلول الأنيلين و ½ مل من ١٠٪ بروميد السيانوجين.
- تغلق الأنبوبة ويلاحظ تحول لون المحلول إلى أصفر خلال (٥)ق (نتيجة إيجابى). هذا اللون يتكون بين المحلولين كدائرة مستديرة صفراء.

تحليل النتائج:

- السلبى: لا تغيير للون.
- الإيجابى: يظهر لون أصفر كدائرة مستديرة بين المحلولين أو كعمود أصفر عند رج الأنبوبة.

٢.إختبار الشرائط

الإختلاف عن الاختبار السابق:

- بعد شق الميديا وترك الأنبوبة لأفراز النياسين يوضع الشريط فى السائل.

الخطوات:

- يضاف ١ مل من ماء الملح المعقم للميديا الإيجابية.
- إذا كان النمو كثيرا, تشقق الميديا بالباستير حتى يسمح بدخول ماء الملح للميديا.
- توضع الأنبوبة أفقيا حتى يغطى السائل سطح الميديا.
- تترك الأنبوبة ٣٠ق حتى يفرز النياسين ويمكن تركها مدة أطول إذا كان عدد المستعمرات أقل.
- توضع الأنبوبة عموديا لمدة ٥ دقائق حتى يترسب السائل.
- ينقل ½ مل من السائل لأنبوبة جديدة بغطاء.
- يغرس الشريط فى السائل مع ملاحظة اتجاه السهم الذى يبين أى طرف من الشريط يغرس فى السائل.
- تترك فى درجة حرارة الغرفة لمدة ١٥-٢٠ق. تهز الأنبوبة ببطىء بدون هزها بعنف.
- يلاحظ لون السائل من أمام خلفية بيضاء. اللون الأصفر يؤكد الأيجابية. لا يؤخذ بظهور أى لون على الشريط.

II- إختبار إختزال النيترات(Nitrate Reduction Test)

- هذا الإختبار يفرق بين M.tuberculosis والميكوبكتريا الأخرى.

الشروط:

- تكون المزرعة عمرها ليس أكثر من ٤ أسابيع على الإيجابية.
- تكون شديدة الإيجابية (مستعمرات كثيرة على المزرعة).

الطريقة التقليدية (Classical Method)

- يذاب 3.02 gm فوسفات البوتاسيوم(KH2PO4) فى 1000 ml من الماء المقطر ـــــ محلول(١).
- يذاب 3.16 gm فوسفات صوديوم (Na2HPO4) في 1000 مللي ماء مقطر ـــــ محلول (٢)
- يضاف ٣٨٩ مللي من محلول (١) إلى ٦١١ مللي من محلول (٢) ويخلط.
  يضبط pH=7 محلول (٣).
- يذاب0.85gm نيترات الصوديوم فى١٠٠٠ مللي من محلول (٣)
- ويقسم في انابيب (كل انبوبة بها ١٠٠ مللي) وتعقم في الاوتوكلاف لمدة ٢٠ دقيقة
- وبهذا نحصل علي Substrate NaNO3
- محلول حمض الهيدروكلوريك:

- يضاف ١٠ مللي من conc HCL الي ١٠ مللي ماء مقطر (وليس العكس) (تخفيف ١:١) يخزن فى زجاجة داكنة اللون بعيدا عن الضوء فى الثلاجة.
- محلول sulfanilamide 0.2%:
- يذاب 0.2gm من السلفانيلاميد فى ١٠٠ مللي ماءمقطر ويخزن فى زجاجات
- داكنة اللون بعيدا عن الضوء في الثلاجة
- محلول N-naphthylethylene-diamine 0.1%:
- يذاب 0.1 gm من النافثايلإثيلين ديامين فى ١٠٠ مللي ماء مقطر ويخزن فى زجاجات داكنة اللون فى الثلاجة بعيدا عن الضوء

الضوابط (Controls):

-ve control :

- تستخدم مستخرج من أنبوبة غير مزروعة.

+ve control :

- يختبر مستخرج من أنبوبة مزروعة بـMTB H37Rv.

الخطوات:

- يضاف 0.2ml من ماء الملح المعقم فى أنبوبة بغطاء محكم.
- يسحب من مستعمرات عمرها ليس اكثر من شهر بلوب معقم و يمزج بالمحلول الملحي المعقم.
- يضاف 2ml من Substrate NaNO3 .
- يهز جيدا ويحضن عموديا فى ٣٧°م (حمام مائى) لمدة ٣ ساعات ثم يخرج.
- يضاف نقطة من dil.HCL . تهز الأنبوبة جيدا.
- يضاف عدد ٢ نقطة من sulfanilamide 0.2% .
- يضاف عدد ٢ نقطة من naphyl ethylene-diamine 0.1% .
- يختبر لظهور لون بمبى أو أحمر فورا.

تحليل النتائج:

- السلبى: لايظهر أى لون. هذا يعنى السلبية

يضاف كم بسيط من بودرة الزنك للأنابيب السلبية.

➢ إذا كان nitrate مازال موجودا يظهر اللون الأحمر سلبى حقيقى.

- **الإيجابى:** لون بمبى إلى أحمر داكن.
  - بمبى فاتح +/-.
  - بمبى +١ .
  - بمبى غامق +٢.
  - أحمر +٣.
  - أحمر غامق +٤.
  - أحمر نبيتى +٥.

أيجابى

٢. طريقة المستلزم البللورى(Crystalline Reagent Method)

المحاليل:

- نيترات الصوديوم Substrate فى ال buffer : كما سبق ذكره.
- المستلزم البللورى:
- Sulfanilic acid (١) جزء
- N-(1-naphthyl) – ethylene diamine dihydrochloride جزء(١)
- L(+) – tartaric acid (١٠) أجزاء
- توضع الكيماويات فى زجاجة داكنة اللون وتخلط جيدا بالهز الشديد (٣٠مرة). يحفظ هذا الخليط فى حرارة الحجرة.

الضوابط (Controls):

- **-ve control :**

يختبر مستخرج من أنبوبة غير مزروعة الميديا.

- **+ve control :**

يختبر مستخرج من مزروعة ايجابية بـMTB H37Rv.

الخطوات:

- يضاف 0.2ml ماء ملح معقم فى أنبوبة بغطاء محكم.
- يسحب من مستعمرات من مزرعة إيجابية عمرها ليس أكثر من شهر .
- يضاف 2ml من substrate NaNO3 .
- يهز جيدا ويحضن فى ٣٧°م بحمام مائى لمدة ٣ ساعات ويخرج.
- يضاف كم بسيط جدا بالspatula من الcrystalline reagent الى محلول الإختبار .
- يلاحظ لون بمبى ← أحمر فى الحالات الإيجابية.

3. إختبار الشرائط:

الخطوات:

- يضاف 1ml من ماء الملح المعقم فى الأنبوبة المحكمة الغلق.
- يؤخذ جزء من المستعمرات التى لم تتجاوز ٤ أسابيع على الإيجابية باللوب المعقم.
- يضاف الجزء المأخوذ من المستعمرات ويخلط بماء الملح.
- يسقط شريط النيترات بماسك معقم فى الأنبوبة (الشريط عليه سهم يشير إلى اتجاه الشريط).
- تغلق الأنبوبة جيدا وتحضن عموديا عند ٣٧°م لمدة ساعتين.
- بعد ساعة من التحضين, تهز الأنبوبة بهدوء دون إمالتها.
- بعد ساعيتن من التحضين, تمال الأنبوبة ٦ مرات حتى يبل الشريط .
- تترك الأنبوبة مائلة لمدة ١٠ق ويكون السائل مغطيا للشريط.
- يكشف عن لون الجزء العلوى من الشريط. اللون الأزرق ـــــــ ايجابى.

III- إختبار الPNBA) Paranitrbenzoic Acid)

الفكرة :

- يؤخر ال PNBA نمو الميكوبكتريا الدرنية.

الخطوات:

- يذاب ٥ جم من بودرة (تركيز ٩٩,٩٪) ال PNBA فى ١٠٠ مل بروبيلين جليكول حتى نحصل على تركيز ٥٠,٠٠ ميكروجرام/مل (أو ٥٠مجم/مل) (الستوك).
- يمكن حفظه فى الثلاجة (٢-٨°م).
- يؤخذ ٢,٤مل من الستوك ويضاف على ٢٤٠ مل ميديا (LJ) حتى نحصل على تركيز ٥٠٠ ميكرو جرام/مل.
- ظهور مستعمرات على المستنبات يدل على عدم وجود الميكوبكتريا الدرينة

IV- إختبار ال TCH) Thiophene-2-carboxylic Acid HYDRAZID)

الفكرة :

- يساعد ال TCH على نمو الميكوبكتريا الدرينة.
- يفرق بين (sisolucrebuT .M)&(sivoB.M) (إيجابى النياسين) والسلالات الغير مفرزة للصبغة البطيئة النمو. تعتبر معظم M.bovis حساسة للتركيز القليل من (5 ug /ml) TCH ولكن MTB والسلالات بطيئة النمو تعتبر مقاومة للTCH.

الخطوات:

- يؤخذ ٢٠,٦مجم من بودرة الTCH تركيز (٩٧٪) ويضاف على ٢٠ مل ماء مقطر معقم (**ســـتوك**). يمكن

حفظه فى الثلاجة (٢-٨°م).

- يؤخذ ½ مل من الستوك ويضاف على ٤,٥ مل ماء مقطر معقم (W١).
- يؤخذ ½ مل من W١ ويضاف على ٤,٥ مل ماء مقطر معقم (W٢).
- يؤخذ ٤,٨ مل من W٢ ويضاف على ٢٤٠مل ميديا (LJ) التركيز النهائى ٢ ميكروجرام/مل.
- عدم ظهور مستعمرات على المستنبات يدل على عدم وجود ميكوبكتريا الدرينة

V- إختبار الكتاليز (Catalase Test)

- تفرز الخلية الدرنية إنزيم الكتاليز الذى يحلل الH2O2------H2O+O2.
- ظهور غاز وفقاقيع الO2 مؤشر لتفاعل الكتاليز.

محلوظة:

- يجب أن تكون عدد المستعمرات على الميديا أكثر من ٥٠ مستعمرة.

المحاليل :

- ٠,٠٦٧mole phosphate buffer pH٧,٠
- يـــذاب(Na2HPO4 anhydrous) ٩,٤٧gdisodium phosphate فـــى مـــاء مقطر للحصول على Solution (١) (٠,٠٦٧M)
- يـــذاب (KH2PO4) ٩,٠٧g monopotasium phosphate فـــى ١٠٠٠ مللي ماء مقطر للحصول على Solution (٢) (٠,٠٦٧M)
- ماء أوكسجين H2O2 , ٣٠٪ (superoxol) ويخزن فى الثلاجة.
- يجب إرتداء قفازات وواقى للعين أثناء العمل.
- Tween 80 10ml
- ماء مقطر ٩٠ml.
- يمـــزج الTween مـــع الماء المقطر ويوضع فى الأوتوكلاف عند ١٢١°م – ١٠ دقائق قد يرقد الTween فى القاع لذلك يجب التقليب أثناء التبريد ويخزن فى الثلاجة.
- Complete Catalase reagent (Tween-Peroxide mixtur)
- قبل الإستخدام مباشرة تمزج أجزاء متساوية من ١٠٪ Tween٨٠ & ٣٠٪ H٢O٢ نأخذ ٠,٥ml من المزيج لكل سلالة فى الإختبار

الكونترولات:

- **طريقة التنقيط Drop method:**
- تستخدم أنبوبة مستنبت LJ غير مزروعة Negative Control وأنبوبة أخرى مزروعةPositive Control M.T.B H٣٧Rv
- الإختبار النصف كمى :c°٦٨
- تســـتخدم أنبوبة مســـتنبت LJ غير مزروعـــة Negative Control وأنبوبة أخـــرى مزروعة Positive

. Control M.terrae

طريقة العمل:

١. طريقة التنقيط Drop method:

- تستخدم أنبوبة LJ مضى على نموها ١٤ يوم.
- نضع ٢ نقطة من مزيج Tween–peroxide محضر للتو على سطح المستنبت.
- يلاحظ ظهور فقاعات الهواء فى خلال ٥ دقائق.

النتائج:

- لايوجد فقاعات ———— سلبى.
- قليل من الفقاعات ببطء ———— ايجابى (بطىء).
- فقاعات فورية غزيرة ———— إيجابى (سريع).

٢. طريقة النصف كمى:

- تستخدم أنبوبة LJ مضى على نموها ١٤ يوم.
- يضاف ١ مل من مزيج Tween–peroxide محضر للتو .
- تغطى الأنبوب بدون إحكام وتترك فى درجة حرارة الغرفة لمدة ٥ دقائق.
- يظهر عمود من الرغاوى, يقاس طول العمود.

النتائج:

- أقل من ٣١مم رغاوى لايوجد نشاط للكتاليز (أو نشاط قليل).
- من ٣١مم – ٤٥ مم رغاوى نتيجة لاتثبت إفراز الكتاليز .
- أكثر من ٤٥ مم رغاوى نشاط قوى للكتاليز .

٣. الإختبار c°pH٧,٠,٦٨:

الخطوات:

- يضاف ½ مل من Phosphate buffer 0.067M(pH=7) للأنبوبة (١٦x١٢٥mm) بماصة معقمة.
- تزرع من المستعمرات على محلول الbuffer باستخدام لوب معقم.
- توضع الأنبوبة فى حمام مائى ٦٨°م لمدة ٢٠ق.
- يضاف ½ مل من Tween–٨٠ للأنبوبة وتغلق.
- يلاحظ ظهور الفقاعات على ســطح السائل. لاتحرك الأنبوبة لأن Tween–٨٠ يمكن أن يخرج O٢ويعطي نتائج ايجابى كاذب.

- تترك الأنابيب ٢٠ق قبل إعدامها.

تحليل النتائج:

- **الإيجابى:** فقاعات.
- **السلبى:** لايوجد فقاعات.

– فـــى بعض الحالات النادرة: تظهر فقاعات وفوران من الخلايـــا الجذرية ولكن لاتكون هذه الفقاعات على سطح السائل فى هذه الحالة تحتسب ايجابية النتيجة.

طريقة عمل الحساسية الدرنية علي المستنبتات الصلبة(L-J)

تحضير المضادات الحيوية الخاصة لعمل الحساسيات بميكروب الدرن:

ملاحظات عامة :

١) يجب التأكد من صلاحية الأدوية المستخدمة و تركيز المضاد الحيوى.

٢) يجب مراعاة طريقة حفظ الأدوية ودرجة الحرارة المناسبة لها حتى لا تؤثر على فعالية الدواء .

٣) يجب مراعاة التعقيم اثناء التحضير باستخدام أدوات معقمة جيداً .

المعادلة المستخدمة لحساب وزن بودرة المضاد الحيوى فى الStock مهما اختلفت درجة النقاوة (Potency):

$$\frac{\text{Volume of dissolving Sol. (ml) X conc. of antibiotic in stock (µg /ml)X 1000}}{\text{Potency (µg /ml)}}$$

مثال :

*إذأ كان درجة نقاوة EMB 74%

*وزن بودرة EMB المذاب فى ٢٠ مل ماء مقطر لتحضير Stock تركيزة 10 µg/ml =

$$\frac{20X10 \quad X1000}{740} = 270.3 \text{ mg}$$

اولاً تحضير الريفامبيسين (RMP) درجة النقاء ٩٥ ٪ :

تحضير ال Stock :

- يذاب ١٠,٥ مليجرام بودرة فى ٢,٥ مل مثيانول للحصول على تركيز ٤ ميكروجرام / مل .
- يحضر ال Stock اول بأول (عند كل تحضيرة media) ولايخزن .

تحضير المضاد الحيوى على الميديا :

- ١ مل من Stock + ٢٠٠ مل ميديا = تركيز ٢٠ ميكروجرام / مل .
- ٢ مل من Stock + ٢٠٠ مل ميديا = تركيز ٤٠ ميكروجرام / مل .
- تحفظ الميديا المضاف اليها المضاد الحيوى لمدة لاتزيد عن اسبوعين.

ثانياً تحضير الايثامبيوتول (EMB) :

تحضير ال Stock :

- اذا كانت درجة النقاء ٧٤ ٪ .
- يذاب ٢٧٠,٣ مليجرام بودرة فى ٢٠ مل ماء مقطر = تركيز ١٠ ميكروجرام /مل.

- يمكن حفظة فى الثلاجة (٢-٨م) لمدة شهرين أو عند درجة - 20 ْ م لمدة ستة أشهر.

تحضير المضاد الحيوى على الميديا :

- يذاب ١/٢مل من Stock فى ٤,٥ مل ماء مقطر = محلول (١) .
- يؤخذ ١/٢ مل من محلول (١) ويضاف على ٤,٥ مل ماء مقطر = محلول (٢) .
- يؤخذ ٤ مل من محلول (٢) ويضاف على ٢٠٠ مل ميديا .
- التركيز النهائى ٢ ميكروجرام / مل .
- تحفظ الميديا المضاف اليها المضاد الحيوى لمدة لاتزيد عن شهرين.

ثالثاً تحضير استربتومايسين St :

تحضير ال Stock :

- اذا كانت درجة النقاء ٧٥,٨ ٪ .
- يذاب ٢٦٣,٨ مليجرام بودرة فى ٢٠ مل ماء مقطر = تركيز ١٠ ميكروجرام /مل
- يمكن حفظة فى الثلاجة (٢-٨م) لمدة شهرين أو عند درجة - ٢٠ ْ م لمدة ستة أشهر.

تحضير المضاد الحيوى على الميديا :

- يذاب ١/٢مل من Stock فى ٤,٥ مل ماء مقطر = محلول (١) .
- يؤخذ ٢ مل من محلول (١) ويضاف على ٢ مل ماء مقطر = محلول (٢) .
- يؤخذ ١,٦مل من محلول (٢) ويضاف على ٢٠٠ مل ميديا .
- التركيز النهائى ٤ ميكروجرام / مل .
- تحفظ الميديا المضاف اليها المضاد الحيوى لمدة لاتزيد عن شهرين.

رابعاً تحضيرالايزونيازيد INH :

تحضير ال Stock :

- اذا كانت درجة النقاء ٩٩,٩ ٪ .
- يذاب ٢٠٠,٢ مليجرام بودرة فى ٢٠ مل ماء مقطر = تركيز ١٠ ميكروجرام /مل.
- يمكن حفظة فى الثلاجة (٢-٨م) لمدة شهرين أو عند درجة -20 ْ ملمدة ستة اشهر.

تحضير المضاد الحيوى على الميديا :

- يذاب ١/٢مل من Stock فى ٤,٥ مل ماء مقطر = محلول (١) .
- يؤخذ ١/٢ مل من محلول (١) ويضاف على ٤,٥ مل ماء مقطر = محلول (٢) .
- يؤخذ ٠,٤ مل من محلول (٢) ويضاف على ٢٠٠ مل ميديا .

- التركيز النهائى ٠,٢ ميكروجرام / مل .
- تحفظ الميديا المضاف اليها المضاد الحيوى لمدة لاتزيد عن شهرين.

كيفية تخزين المضادات الحيوية :

١- تخزين البودرة (ينظر على العبوة) :

رفامبيسين : -٢٠ ْم .

الستربتومايسين والايثامبيوتول : ٤ ْم.

الايزونيازيد : درجة حرارة الغرفة ٢٠ ْم.

- تخزين الميديا المحتوية على المضادات الحيوية:

عند ٤ ْم بعيداً عن الضوء لمدة شهرين ما عدا الريفامبيسين لمدة أسبوعين.

خامسا تحضير الكاناميسن KAN :

تحضير ال Stock :

- اذا كانت درجة النقاء ٧٨,٩ ٪ .
- يذاب ٢٥٣,٥ مليجرام بودرة فى ٢٠ مل ماء مقطر معقم.
- يخزن عند -١٨ ْم لمدة شهر.

تحضير المضاد الحيوى على الميديا :

- ٢/١مل من Stock + ٤,٥ مل ماء مقطر = محلول (W١) .
- ٦ مل من W١ + ٢٠٠ مل ميديا.
- التركيز النهائى ٣٠ ميكروجرام / مل .
- يمكن تخزينها عند ٤°م لمدة شهر.

سادسا تحضير الأفلوكساسين :

تحضير ال Stock :

- اذا كانت درجة النقاء ١٠٠ ٪ .
- يذاب ٢٠ مليجرام بودرة فى ٢٠ مل ماء مقطر معقم.
- يخزن عند ٢-**8** ْ**م** لمدة شهر.

تحضير المضاد الحيوى على الميديا :

- ٢/١مل من Stock + ٤,٥ مل ماء مقطر = محلول (W١) .
- ٨٠٠ ميكرولتر من W١ + ٢٠٠ مل ميديا.
- التركيز النهائى ٢ ميكروجرام / مل .
- يمكن تخزينها عند ٤°م لمدة شهر.

سابعا تحضير الكابريوميسين CAP :

تحضير ال Stock :

- اذا كانت درجة النقاء ٨٤,٨٪ .
- يذاب ٢٣٥,٨ مليجرام بودرة فى ٢٠ مل ماء مقطر معقم.
- يخزن عند ٤ °م لمدة شهر.

تحضير المضاد الحيوى على الميديا :

- ٠,٥ مل من Stock + ٤,٥ مل ماء مقطر = محلول (W١) .
- ٨ ميكرولتر من W١ + ٢٠٠ مل ميديا.
- التركيز النهائى ٤٠ ميكروجرام / مل .
- يمكن تخزينها عند ٤°م لمدة شهر.

تحضير الكابريوميسين CAP بطريقة أخرى:

تحضير ال Stock :

- يذاب ٢٤ مليجرام بودرة فى ١٢ مل ماء مقطر معقم تركيز ٢ مجم/مل.

تحضير المضاد الحيوى على الميديا :

- يضاف ٤٨ مل ماء مقطر على Stock (W١) (تركيز ٤٠٠ ميكروجرام/مل) .

يؤخذ ٥٥,٥ مل من W١ ويضاف على ٥٠٠ مل ميديا (LJ) تركيز ——— ٤٠ ميكروجرام/مل.

ثامنا تحضير الأميكاسين AM :

تحضير ال Stock : يذاب ٢٤ مليجرام بودرة فى ١٢ مل ماء مقطر معقم ——— تركيز ٢ مجم/مل.

تحضير المضاد الحيوى على الميديا :

- يضاف ٢٤مل ماء مقطر على Stock (W١) (تركيز ٤٠٠ ميكروجرام/مل) .

يؤخذ ٥٥,٥ مل من W١ ويضاف على ٥٠٠ مل ميديا (LJ) تركيز ——— ٤٠ ميكروجرام/مل.

Preparation of the Stocks of anti TB drugs

Product	Potency (ug/ml)	Dissolving Solution	Volum (ml)	Concentration (ug/ml)	Weight of Antibiotic powder (mg)	storage of Stock
INH	999	SDW	20	10	200.2	From 2 to 8°c
EMB	740	SDW	20	10	270.3	From 2 to 8°c
RMP	950	Ethylene glycol	2.5	4	10.5	Prepared fresh
SM	758	SDW	20	10	263.8	From 2 to 8°c
KAN	773	SDW	20	10	258.7	< – 18°c
OFL	999	Naoh (0.1N)	20	1000	20	From 2 to 8°c
EIL	999	Propylene glycol	20	10	200.2	From 2 to 8°c
CAP	856	SDW	20	10	233.6	< – 18°c
	999	Propylene glycol	100	50	5g	From 2 to 8°c
ICH	970	SDW	20	10	206.2	From 2 to 8°c

Preparation of Antibiotic–Containing Media (LJ)

	Stock (ml)	SDW (ml)	Conc of w1 (ug/ml)	W1 (ml)	SDW (ml)	Conc of w2 (ug/ml)	w2 (ml)	Amount of LJ (ml)	Final conc of antibionic in LJ inedia (ug/ml)
INH (١٠)	0.5	4.5	1000	0.5	4.5	100	0.4	200	0.2
EMB (10)	0.5	4.5	1000	0.5	4.5	100	4	200	2
RMP (10)	2							200	40
SM (10)	0.5	4.5	1000	2	2	500	1.6	200	4
KAN (10)	0.5	4.5	1000	6				200	30
OFL (1000)	4	4	1000	0.8				200	2
ETH (10)	0.5	4.5	1000	2				200	10
CAP (10)	0.5	4.5	1000	8				200	40
PNB (50mg/ml)	2.4							240	500
TCH (10)	0.5	4.5	1000	0.5	4.5	100	4.8	240	2

تحضير محلول التعادل McFarland Opacity Tube

محلول (أ) كلوريد الباريوم :

- ١ جم من كلوريد الباريوم + ١٠٠ مل ماء مقطر معقم .

محلول (ب) حمض الكبريتيك :

- ١ مل حمض كبريتيك مركز + ٩٩ مل ماء مقطر .

محلول التعادل :

- يؤخذ ٩,٩٥ مل من محلول (ب) + ٠,٥ مل من محلول (أ) فتتكون عكارة يقاس عليها تركيز الميكروب الخاص لعمل الحساسية .

خطوات اختبار الحساسية (Proportional Method)

١. تحضير معلق الميكوبكتريا:

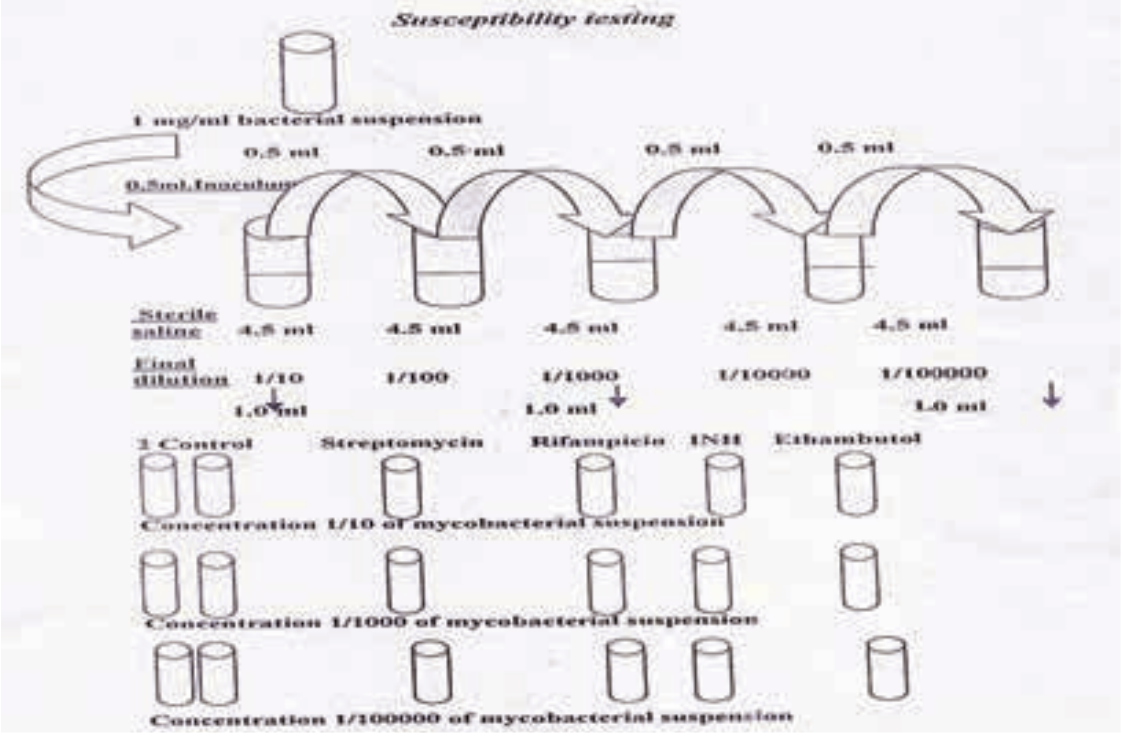
- تحضير معلق تركيزه ١mg/ml.
- يحضر من هذا المعلق تخفيف ١x ١٠٠ لزرع C١ والميديا المحتوية على المضادات الحيوية.
- من المعلق الأخير يحضر معلق أخر تخفيف١x ١٠٠ لزرع C٣ والميديا المحتوية على المضادات الحيوية.
- من المعلق الأخير يحضر معلق أخر تخفيف١x ١٠٠ لزرع C٥ والميديا المحتوية على المضادات الحيوية.

٢. تحضير معلق الميكوبكتريا:

- تتم عملية الزرع باســتخدام ماصة باســتير تنقط ٢ نقطة (٠,١ml)على الأنبوبة (او الزجاجة) ويفرد السائل على سطح الميديا بتحريك الأنبوبة.
- توضع الزجاجة أفقيا فى اليوم الأول للتحضين ثم توضع رأسيا بقية أيام التحضين.

٣. قراءة النتائج: استخدام طريقة Cannetti فى القراءة وتحليل النتائج.

- تقرأ الكنترولات أولا . يجب أن تكون المستعمرات على C١ عددها اكبر من ١٠٠ مستعمرة.
- تقارن زجاجات C٣ بالزجاجات المحتوية على الميديا + المضادات عند C١ . إذا كانت C١ المحتوية على المضادات أكثر من C٣مقاوم. إذا كانت أقل حساس.
- تقــارن زجاجات C٥ بالزجاجــات المحتوية على الميديا + المضادات عند C٣ إذا كانت C٣ المحتوية على المضادات أكثر من C٥ مقاوم. إذا كانت اقل حساس.



ضبط الجودة للفحص المباشر والمزارع الصلبة

تعريف:

المتابعة المستمرة لكل خطوات العمل بمعمل تشخيص الدرن بداية من تسلم العينة وحتى تسليم النتيجة .

الغرض من التطبيق :

١. تحسين كفاءة العمل .

٢. اكتشاف أي خطا وتصحيحه عن طريق مراقبة كل خطوات العمل .

٣. الحصول على نتائج صحيحة .

ينقسم إلى :

١. ضبط الجودة داخل المعمل IQC (Internal quality control)

٢. تقييم الجودة الخارجي EQA (External Quality Assessment)

٣. تحسين كفاءة العمل (Quality improvement)

وذلك بوضع الحلول لأى مشاكل قد تحدث وتحتاج إلى المتابعة المستمرة للعمل .

أولاً : ضبط الجودة داخل المعمل(IQC)

ويشمل الوسائل المتبعة داخل المعمل للتأكد من سير العمل بطريقة صحيحة وذلك بالنسبة للآتي :

- طريقة أخذ العينة واستكمال البيانات المناسبة وطريقة نقلها وحفظها.
- الكيماويات والصبغات والمستنبتات .
- خطوات التشخيص البكتريولوجي والربط بين نتائج الفحص المجهري المباشر والمزارع
- الأجهزة .
- تدريب العاملين بالمعمل من أطباء وفنيين وعمال .
- وجود دليل فني يتضمن جميع الاختبارات الأساسية بالمعمل للرجوع إليه عند الحاجة .

طريقة أخذ العينة :

- يجب حث المريض على إعطاء عينة بصاق وليس لعاب ، كذلك يجب أن تكون الكمية المناسبة (٣-٥ مل) فى الفحص المباشر وحتى ١٠ مل للمزرعة.
- من أسباب السلبية الكاذبة (انخفاض معدل النتائج الإيجابية) سيولة العينة أو عدم كفايتها للفحص
- فى حالة العينات الأخرى مثل البول ، ســوائل الجســم المختلفة – الأنسجة ... الخ ، يجب مراعاة طريقة أخذ العينة والكمية المناسبة .

نقل العينة وحفظها

- يعتمد نقل العينة وحفظها على نوع الفحص المطلوب :
- فــى حالة الفحص المجهري فقــط يجب أن تحفظ العينة بعيداً عن الضوء والحرارة وتكون مدة النقل والتخزين لا تزيد عن ٣ أيام .
- فى حالة المزرعة يجب حفظ العينة فى الثلاجة ونقلها فى صندوق مبرد(من ٢-٨ْ م) ويجب ألا تتعدى فترة النقل والتخزين ثلاثة أيام ، زيادة فترة التخزين عن ثلاثة أيام قد يؤدي إلى زيادة معدلات التلوث بالمزارع.
- يجب مراعاة الدقة فى كتابة البيانات ونقلها من طلب الفحص إلى العبوة التي تحتوى على العينة .
- ترقم العينة وتدون البيانات فى سجل المعمل وبنفس الرقم .

الكيماويات والصبغات والمستنبتات :

يجب مراعاة الآتي :

- تحضر الصبغات مرة كل أسبوع .
- اختبار الصبغات التي تم تحضيرها حديثاً بعينة إيجابية وأخرى سلبية قبل استعمالها لاختبار جودتها فى صبغ

عصيات الدرن وكذلك لاكتشاف وجود أي تلوث بعصيات الدرن .

- تخزيـــن مـــادة الفلوروكـــروم فـــى زجاجـــة بنية اللـــون ووضعها فـــى مكان مظلـــم حيث يمكـــن أن تفقد فعاليتها(Fluorescence)تدريجياً عند تعرضهالضوء الشمس .

فى حالة تحضير الصبغات بالمعمل يراعى الآتى :

١- استخدام بودرة الفوكسين القاعدى Basic fuchsin وليس Acid fuchsin .

٢- استخدام الماء المقطر وليس ماء الصنبور حيث ثبت أن مياه الصنبور قد تحتوى على الميكوبكتريا غير النموذجية Atypical Mycobacterium وهى ميكروبات غير مرضية رمامة (saprophytic)

٣- إذابة البودرة بالكامل وذلك باستخدام حمام مائى أو وضعها فى الحضان لمدة أسبوع .

٤- حفظها فى زجاجات بنية اللون حيث أن ضوء الشمس يؤثر على فعالية الصبغة .

٥- ترشيح الصبغة قبل استخدامها حيث أن بللورات الفينول تترسب سريعا على هيئة إبر حمراء قد يخطىء الفاحص فى تشخيصها على أنها عصيات الدرن.

٦- يجب أن تكون الزجاجات الخاصة بالصبغة سواء الفوكسين القاعدى / أو محلول التبهيت ذات غطاء محكم حتى لا يتبخر منها الكحول الذى يدخل فى تركيبها .

٧- استخدام الكحول الإثيلى فى تحضير الفوكسين القاعدى / والكحول المثيلى فى تحضير محلول التبهيت .

٨- يجب أن يستخدم حامض الهيدروكلوريك المركز والمدخن بنسبة لا تقل عن ٣٦٪.

- يجب ملاحظة لون وقوام المستنبتات قبل استعمالها لاكتشاف أي تغير بها.
- (عند وجود فقاقيع هواء بالمستنبت يدل هذا على زيادة تعرضها للحرارة أثناء التسوية)
- اختبار المستنبتات بعد تحضيرها وذلك بتحضينها لمدة ٤٨ ساعة إلى ٤ أيام للتأكد من عدم وجود أي تلوث بها .

الفحص البكتريولوجي

- إعادة فحص عدد ٣ شرائح (ايجابية وسلبية) يومياً بواسطة شخص آخر (double check) .
- يجب فحص المستعمرات التي تنمو على المستنبتات مجهرياً(Z.N.) للتأكدمن أنها لعصيات الدرن .

المتابعة المستمرة للنتائج لمعرفة معدلات :-

- المزارع الإيجابية .
- المزارع الملوثة (معدل تلوث ٢-٣٪ يعتبر مقبولاً ، بينما صفر٪ تلوث تعكس زيادة تركيز المحلول المطهر للعينة قبل الزرع وبالتالي قتل كثير من عصيات الدرن) .
- المزارع السلبية بالنسبة للنتائج الإيجابية للفحص المجهري وذلك بملاحظة نتيجة المزرعة ومقارنتها بالفحص المجهري لنفس العينة .

فى حالة وجود اختلاف بين نتيجة المزرعة والفحص المجهري لنفس العينة مثل وجود عصيات مقاومة للأحماض (AFB) فى الفحص المجهري وعدم نموها على المستنبتات يجب البحث عن السبب مثل :-

أ- توقف نمو البكتريا كنتيجة للعلاج خاصة الريفامبيسين والإيزونيازيد .

ب- خطوة التطهير السابقة لزرع العينة لم تتم بطريقة صحيحة بسبب :-

- زيادة تعرض العصيات الدرنية للمطهر (أكثر من ٤٥ دقيقة) .
- زيادة تركيز المطهر عن المطلوب .

ج- عدم جودة المستنبت .

د- درجة حرارة الحضان أقل أو أكثر من المطلوب (الدرجة المثلى تتراوح من٣٥-٣٧ْم).

الأجهزة

١- الميكروسكوب :

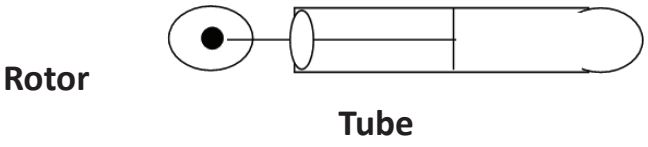
- يجب تنظيف العدســـات من الزيت بشاشـــة جافة وذلك بعد الانتهاء من العمل يومياً ولا يستخدم الزيلول إلا لمسح جسم الميكروسكوب لأن الزيلول يذيب البلاستيك المحيط بالعدسات ويؤدى إلى إتلافها ؛ضرورة تغطية الميكروسكوب لحمايته من الأتربة ؛ المحافظة على لمبة الإضاءة بعدم تركها مضاءة لمدة طويلة وعدم غلق المفتاح مرة واحدة بل يجب تقليل الإضاءة حتى تصل للصفر ثم يغلق المفتاح.

٢- الحضان :

- يجـــب التأكـــد من أن درجة الحرارة به من ٣٥ – ٣٧ ° م وذلك بوضع ترمومتر فى زجاجة بها ماء ووضعه بداخل الحضان .

٣- جهاز الطرد المركزى:

- يجب التأكد من أن الجهاز مضبوط على قوة الطرد النســـبية Relative centrifugal force وهى تســـاوى عدد اللفات / دقيقة + ½ القطر ويقاس من مركز الدوار حتى نصف طول الأنبوبة.



- ترص الأنابيب فى جهاز الطرد المركزى بحيث تكون متوازنة .
- يجب عدم فتح الجهاز حتى يستقر تماماً حتى لا تتكسر الأنابيب أو يخرج رذاذ يلوث عينة سلبية من أخرى إيجابية . ويجب عدم رج الأنابيب عند إخراجها حتى لا يحدث مزج بين الراسب والجزء الرائق .
- يفضل استخدام Swinging angle rotor حيث يتكون الراسب فى قاع الأنبوبة،
- وهذا أفضل من Fixed angle rotor حيث يتكون الراسب فى جانب من القاع .

Fixed angle rotor

Swinging angle rotor

٤- كابينة الحماية البيولوجية :

الاهتمـــام بكابينة الحمايـــة البيولوجية حيث أنها قد تكون مصدراً للتلوث وذلـــك بالعمل على تنظيفها من الأتربة وتطهيرها بمحلول الكلور ١- ٢٪ أوالفينول٥٪ .

١. التأكد من أن قدرة مروحة سحب الهواء (Exhaustion fan) من 50 – 75 قدم/ دقيقة (إذا قلت السرعة عن 50 هذا يعنى أن مرشح البكتريا فى حاجة للتغيير) .
٢. يجب اختبار اتجاه الهواء خلال الفتحة الأمامية باستخدام منديل ورقى .

٥- اختبار كفاءة الأوتوكلاف بيولوجياً حتى لا يكون مصدراً للتلوث .

٦

٧- اختبار كفاءة جهاز التقطير بتحليل المياه كيمائياً من آن لأخر بحيث يكون الرقم الهيدروجينى ٥ الى ٦.

ثانياً : تقييم الجودة الخارجي(EQA)

- يتم بين المعامل المركزية والمعامل الوسيطة والفرعية وبين المعامل المركزية ومعامل مرجعية دولية .
- قد تتأثر كفاءة العمل بمعامل تشـــخيص الدرن وتقل عن المســـتوى المطلوب لهذا يجب تحديد المشاكل التي تـــؤدي لذلك ومحاولة حلها ولا يتأتى هذا إلا عن طريق الإشـــراف على المعامل الوســـيطة والفرعية بانتظام بواسطة أفراد مدربين وذوي خبرة عالية .
- ويجب معرفة أن هذا الإشراف ليس له علاقة بالتفتيش الإداري الخاص بوزارة الصحة ، وإنما الغرض منه هو مساعدة العاملين بمعامل الدرن على حل المشاكل الفنية الخاصة بالعمل لتحقيق أفضل الأداء .
- ويعتبر تأكيد الجودة هو المهمة الأساسية المطلوبة من الإشراف على معامل الدرن .

الطرق المتبعة لتقييم الجودة الخارجي بالنسبة للفحص المجهري المباشر

- يقوم مســـئول الدرن فى المحافظة بجمع عدد ١٠ شـــرائح عشوائياً (ســـلبية وإيجابية) ثم تدون أرقام الشرائح ونتائجها فى استمارة مستقلة وتسلم هذه الشرائح إلى المعامل المركزية حيث يقوم المراجع الرئيسي بفحص هذه الشـــرائح دون معرفة مسبقة بنتائجها ثم تجري مقارنة بين نتائج المعامل المركزية والمعمل الوسيط أو الفرعي ، وفى حالة اختلاف النتائج تجري اتصالات بين المعملين لمعرفة أسباب الاختلاف لحل المشاكل .
- تتميز هذه الطريقة بكفاءتها فى تقييم طريقة تجهيز الشـــرائح من حيث الفرد والصبغة وكذلك فى تقييم كفاءة الفحص المجهري .
- يتم إجراء هذا التقييم كل ٣-٦ شهور وعند الحاجة يتم التقييم على فترات أقل.

توجد طريقة أخرى لتقييم الجودة الخارجي: EQA

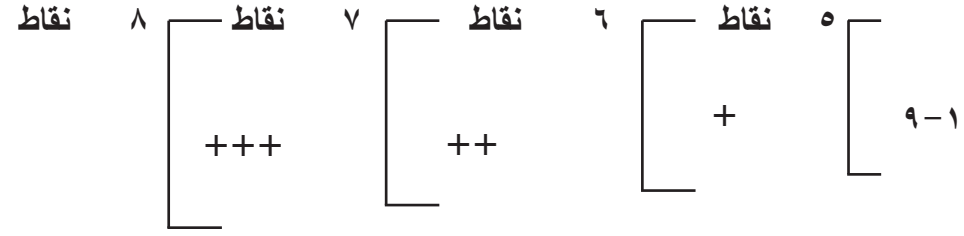
- وذلك باعداد مســـحات إيجابية مختلفة في درجة الإيجابية و أخرى ســـلبية ويتم تثبيتها وإرسالها الى المعمل المراد تقييمه ثم إرسال النتيجة إلى المعمل المرجعى بالبريد أو الفاكس.

درجة القراءة :

يقـــوم المراجع بتقييم النتائج لتحديد درجة القراءة بناء على دراســـة الاختـــلاف بين نتائجه ونتائج المعمل الخاضع للتقييم ، لذا يجب أن يقوم جميع القائمين بالفحص المجهري باســـتخدام رموز شـــفرية واحدة لتسجيل نتائج الفحص المباشر ، وهذه الرموز هي :

+++	**أكثر من ١٠ عصيات في كل حقل مجهري**
++	**من ١-٩ عصيات في كل حقل مجهري**
+	**من ١٠-٩٩ في ١٠٠ حقل مجهري**
يكتب العدد	**من ١-٩ في ١٠٠ حقل مجهري**
سلبي	**عدم وجود عصيات**

- فى حالة الشك تطلب عينه أخرى لإعادة الفحص .
- فى حالة تطابق النتائج يكون درجة الخطأ (score) ـ صفر .
- فى حالة تطابق الإيجابية مع اختلاف درجة القراءة تحسب نقطة واحدة لكل درجة اختلاف
- فى حالة اختلاف النتائج من السلبية للإيجابية تحسب النقاط كالآتي :



- فى حالة احتساب ٥ نقاط أو أكثر يجب سرعة التعرف على المشاكل القائمة التي أدت لهذا الخطأ.

الأسباب التي تؤدي إلى

خطأ فى تشخيص الفحص المجهرى:

الأسباب المحتملة للنتائج السلبية الكاذبة .

خطأ فى ا لتسجيل

- **خطا فى التدوين فى السجلات .**
- **خطا فى ملء استمارة التقييم .**

خطأ فى الفحص

- عدم فحص الشريحة بالكامل.
- قصور فى كفاءة الميكروسكوب (الضوء – العدسات) .
- قصور فى بصر القائم بالفحص (عمي ألوان – ضعف) .

خطأ فى الصبغة

- استخدام كيماويات غير جيدة .
- التسخين غير كاف مما يؤدي إلى ظهور العصيات بلون باهت.

الأسباب المحتملة للنتائج الإيجابية الكاذبة .

خطأ فى التسجيل	• خطا فى التدوين فى السجلات . • خطا فى ملء استمارة التقييم .
خطأ فى الفحص	• الخلط بين خدوش بالشريحة و العصيات الدرنية .
خطأ فى الصبغة	• تبهيت غير كاف مما يؤدى الى صبغ عصيات غير درنية . • عدم الترشيح قبل الاستعمال يؤدى إلى ترسب بللورات الفينول الحمراء .
تلوث الشريحة	• من عينة إيجابية أثناء إعداد المسحات أو الصبغة . • من المجهر (العدسة الزيتية) . • من زيت السيدر.

ضبط الجودة للمزارع الدرنية الصلبة (QC of Culture):

الأسباب التى قد تؤدى إلى خطأ فى تشخيص المزرعة :-

١- أسباب السلبية الكاذبة :

- أن تكون العينة غير صالحة للزرع (لعاب - خطأ فى حفظ العينة مثل تعرضها للضوء والحرارة) .
- التلقيح الخاطئ للمســـتنبت (رج العينة بعد تدويرها فى جهاز الطرد المركزى يؤدى إلى زيادة تخفيف الراسب) أو عدم التلقيح سهواً .
- خطأ فى تحضير المستنبتات (خطأ فى الرقم الهيدروجينى pH ، خطأ فى العناصر المستخدمة).
- خطأ فى طريقة الزرع :

- زيادة تركيز هيدروكسيد الصوديوم أو زيادة تعرض العينة له عن 45 دقيقة .
- خطأ فى درجة التعادل بحمض الهيدروكلوريك ويظهر هذا فى صورة تغيير للون المستنبت أزرق أو أصفر .
- عدم كفاءة التطهير Decontamination يؤدى إلى طمس المستعمرات بميكروبات أخرى.

- قصور فى جهاز الطرد المركزى .
- ارتفاع درجة حرارة الحضان جفاف المستنبت وقتل العصيات .
- انخفاض درجة حرارة الحضان غير كافية لنمو العصيات .
- خطأ فى تسجيل النتيجة بسجل المعمل.

(2) أسباب الإيجابية الكاذبة :

- التلوث ببصاق إيجابى :

- مباشر : من عينة إيجابية أخرى

- غير مباشر عن طريق :

* استخدام ماصة ملوثة فى عملية التلقيح .
* الرذاذ المتصاعد نتيجة فتح الزجاجات مباشرة بعد تدويرها فى جهاز الطرد المركزى .

- استخدام سوائل أو أدوات غير معقمة فى جمع العينات مثل الأنابيب والمناظير .
- خطأ فى التسجيل بسجل المعمل .

طرق ضبط الجودة :

لاكتشاف السلبية والإيجابية الكاذبة للمزارع الدرنية يجب مراعاة الآتى بانتظام :

١. مراجعة سجل المعمل لاكتشاف مزارع إيجابية غير متوقعة لعينات سلبية بالفحص المباشر للبصاق – ويمكن أن يكون ذلك نتيجة تلوث العينات من العينة الإيجابية الأولى التى تم زرعها فى نفس اليوم٠ مراجعة سجل المعمل للتأكد من عدم وجود مزارع سلبية متتابعة لعينات إيجابية بالفحص المباشر أوعدم ظهور مزارع إيجابية فى فترة معينة تم فيها استخدام مستنبتات دفعة (تشغيلة) واحدة (Same batch of media) .

٢. مراجعة الإحصائيات والتأكد من عدم وجود ارتفاع أو انخفاض غير عادى فى عدد المزارع الإيجابية أو السلبية وذلك بالمقارنة مع الإحصائيات الأخرى .

٣. مراجعة نسبة المزارع الملوثة من خلال الإحصائيات .

٤. تبادل العينات بين المعامل الوسيطة والمعامل المركزية لعمل مزارع أولية .

ضبط الجودة لاختبارات حساسية ميكروب الدرن للمضادات الحيوية

يمكن أن تكون هذه الاختبارات سلبية كاذبة (حساس كاذب) أو إيجابية كاذبة (مقاوم كاذب).

١- الاسباب الرئيسية للحساس الكاذب: False sensitive

- خطأ فى تحضير المستنبتات (خطأ فى الرقم الهيدروجينى pH ، خطأ فى العناصر المستخدمة)
- ارتفاع درجة حرارة الحضان عن٣٧° c جفاف المستنبت وقتل العصيات.
- انخفاض درجة حرارة الحضان عن ٣٥° C غير كافية لنمو العصيات
- طريقـــة تحضير المســـتنبت المحتوى على مضادات الـــدرن مثل زيادة تركيز واحـــد أو اكثر من مضادات الدرن، ويمكن الاشـــتباه فى ذلك فى حالة عدم وجود ســـلالات مقاومة خلال المدة المستخدم فيها مستنبتات تم تحضيرها فى وقت واحدولاســـتبعاد أو التأكد من هذا الاحتمال يمكن استخدام سلالة مقاومة معروفة يمكن الحصول عليها من مريض مصاب بالدرن سبق علاجه.
- خطأ فى تفسير النتائج :

يجب أن تحتوى زجاجة الضابط (Control No. 1) على 100 مستعمرة على الاقل وذلك لأن وجود عدد أقل قد لا يســـمح بظهور عدد كاف من المستعمرات على زجاجة الضابط وكذلك على الأنابيب المحتوية على المضادات الحيوية.

-الأسباب الرئيسية للمقاومة الكاذبة : False Resistance

- خطأ فى طريقة تحضير المستنبت المحتوى على مضادات الدرن مثل نقص تركيز واحد أو أكثر من مضادات الدرن نتيجة :
  - خطأ فى تخزين مضادات الدرن.
  - خطأ فى تحضير المحلول المركز.
  - إبطال مفعول مضادات الدرن بزيادة التسوية فى جهاز تجميد المستنبتات(Inspissator) .
  - استعمال الاقراص والكبسولات فى تحضير المستنبتات الخاصة بالحساسية.
  - خطأ فى وزن المضاد الحيوى المضاف.(مثل عدم تعديل الوزن حسب الـPotency)
- خطأ فى تفسير النتائج:
  - إذا احتوت كل من زجاجتى الضابط (١) ، (٣) على عدد لا يمكن حصره من المستعمرات الدرنية لا يمكن تقدير المقاومة ولكن يمكن فقط التعرف على السلالات الحساسة.
  - التلوث الذاتى لزجاجات مستنبتات الحساسية وذلك إذا رجت الزجاجات فقد تلقح إحدى المستعمرات أماكن اخرى من المستنبت وتبدأ مستعمرات جديدة فى النمو مما يزيد عدد المستعمرات عن المتوقع.

ملاحظة:

فى حالة وجود سلالات مقاومة لكل المضادات لكل العينات يزداد احتمال وجود تلوث بميكروبات غير نموذجية (Atypical Mycobacteria) ." لذا يفضل استخدام TCH, PNB, Catalase, Niacin " لتصنيف الميكروب.

طريقة تقييم الجودة الداخلى (IQA) لاختبارات الحساسية :

* عدد المستعمرات الموجودة على كل من زجاجتى الضابط (١) ، (٣) وكذلك على الزجاجات المحتوية على مضادات الدرن.
* تفسير النتائج (حساس أو مقاوم).
* يجب عمل عمل إختبار ضبط الجودة مع كل تشغيلة اختبار حساسية بعمل اختبار حساسية لعينة M.tuberculosis H37Rv التى تكون حساسة لجميع المضادات الحيوية المعالجة للدرن.

طريقة تقييم الجودة الخارجى (EQA) لاختبارات الحساسية :

* يجب أن يتم تقدير الحساسية بطريقة موحدة .

يجب أن يشـــمل التقرير الطريقة المستخدمة – تركيز مضادات الدرن ونوع المستنبت المستخدم هذا وتقوم المعامل المركزية حالياً بتبادل سلالات الدرن مع معامل الدرن العالمية.

طريقة عمل المزارع الدرنية علي المستنبتات السائلة

Mycobaterium Growth Indicator Tube (MGIT)

BACTEC System

انبوبة ال MGIT :

- تحتوى أنبوبة الMGIT على :

١. سائل البروث الذى يسرع من نمو الميكوبكتريا. ويتكون هذا السائل من:

Modified middle brook 7 H9 broth base + Casein Peptone.

٢. مادة الفلوروكروم المشبعة بالأكسجين وممزوجة بالسيليكون فى قاع الأنبوبة.عندما تنمو الميكوبكتريا, تمتص الأكسجين الموجود وتفرز ثانى أكسيد الكربون عندئذ ينشط الفلوروكروم ويشع .

تعطى الأنابيب نتيجة ايجابية من ٤-٤٢ يوم. بعد ذلك تقرأ نتيجة سلبية.

- يمكن أن تعطى الأنابيب نتيجة ايجابية كاذبة فى حالة :

١. تلوث بميكوبكتريا غير درنية وعندئذ يكون البروث خفيف التعكر.

٢. تلوث ببكتريا أخرى غير الميكوبكتريا ويكون البروث شديد التعكر.

- عند إنماء الميكوبكتريا خاصة MTB complex

يضاف لانبوبة MGIT

Growth supplement OADC+POES	+	لمنع التلوث PANTA
Oleic Acid		Polymixin B
Albumin		Amphotercin B
Dextrose		Nalidixic Acid
Catalase		Trimethoprim
Polyoxyethelynesterate (POES)		Azocilin

طريقة تخزين ال Kits :-

١. أنابيب ال MGIT :

- تحفظ فى درجة حرارة ٢-٢٥ °م بعيد ا" عن الضوء .
- لابد أن يكون الBroth رايق واذا كان معكرا" فلا يستعمل .
- تحفظ حتى تاريخ الانتهاء المكتوب على العبوة .

٢. زجاجات OADC :

- تحفظ فى درجة ٢-٨°م (فى الثلاجة) بعيدا" عن الضوء حتى تاريخ الانتهاء.

٣. زجاجات PANTA:

- تحفظ فى درجة حرارة ٢-٨°م .
- عند حلها تستخدم خلال ٥ أيام (بحيث تكون محفوظة فى الثلاجة) أو عند -٢٠°م فى Deep Freezer لمدة ٣ شهور وتقسم وإذا ساحت لاتستخدم مرة اخرى بعد هذه المرة .

التجهيزات التى تسبق خطوات Bactec 960 :

تجهيز العينة :

١. طريقة ال NALC-NaOH :

- عند تحضير ال NALC-NaOH, يستخدم فى ظرف ٢٤ ساعة.
- يخلط NaOH 4 % بكمية متساوية من Na Citrate 2.9% Sol.(١)
- يضاف ٢/١ جم من NALC Powder الى ١٠٠ مل من Sol.(١) Sol.(٢).

٢. طريقة تحضير Phosphate Buffer Sol. :

(Sol.A) :-

- ٥٠٠ml ماء مقطر يضاف اليها ٥,٩٦gm فوسفات ثنائى الصوديوم Na٢HPO٤.

(Sol.B) :-

- ٥٠٠ml ماء مقطر يضاف اليها ٤,٥٦gm فوسفات أحادى البوتاسيوم KH٢PO٤.
- يضاف ٥٠٠ مللى (solu A) الى ٥٠٠ مللى (solu B) ثم نقوم بضبط ph.
- يعقم فى الاوتوكلاف عند ١٢١ °م لمدة ٢٠ دقيقة .
- أذا كانت أكياس Phosphate Buffer جاهزة من الشركة :
- يضاف الكيس على ٥٠٠ml ماء مقطر ويعقم فى الأوتوكلاف عند ١٢١ °م لمدة ٢٠ دقيقة.

3. طريقة تحضير PANTA + OADC :

- يضاف ١٥ml من OADC على زجاجة ال PANTASol.(٣) .

الخطوات:

- ترقم Falcon tube ٥٠ مللى ويوضع فيها العينة ويضاف عليها كمية متساوية من Sol.(٢) (NALC – NaOH) وتغلق جيدا.
- توضع الأنبوبة على Vortex لمدة ١٥–٢٠ ثانية .
- تقلب الأنبوبة لخلط العينة بال NALC NaOH.
- تترك الأنبوبة فى درجة حرارة الحجرة لمدة ١٥–٢٠ دقيقة .
- يضـــاف Phosphate buffer معقم على العينـــة والNALC–NaOH حتى يصل لعلامة ٤٥ مل وتقلب الانبوبة يدويا" .
- توضع أنبوبة ال Falcon المعقمة فى السنترفيوج المبرد وتدار ٣٠٠٠xg لمدة ١٥ دقيقة .
- يسكب الرائق ويترك الراسب وتغلق الأنبوبة بعد اضافة Phosphate buffer (0.5–1ml) .
- ترقم أنبوبة الMGIT على حسب العينة (لايكتب الرقم على كود الأنبوب)
- يضاف ٠,٨ml من Sol.(٣) (OADC + PANTA) على أنبوبة ال MGIT .
- يضاف ٠,٥ml من العينة (الراسب) على أنبوبة ال MGIT .
- ترج الانبوبة وتترك فى درجة حرارة الحجرة ٢/١ ساعة ثم توضع فى جهاز الباكتيك ٩٦٠ وتختبر.

كيفية تطهير المزرعة الملوثة بأنابيب ال MGIT:

١. تسكب محتويات أنبوبة ال MGIT الملوثة فى أنبوبة Falcon 50ml.

٢. يضاف 8ml NALC – NaOH لل Falcon وتوضع على Vortex لمدة ١٥ ثانية.

٣. تترك الانبوبة لمدة 15 دقيقة .

٤. يضاف Phosphate buffer (ph = 6–8) 35ml ويخلط على السوائل السابقة.

٥.توضع ال Falcon فى السنترفيوج 3000xg لمدة ١٥ دقيقة .

٦.يسكب الراشح ويضاف Phosphate buffer على الراسب (0.5–1ml) .

٧. يزرع من أنبوبة ال Falcon 0.5ml من Suspension على أنبوبة MGIT جديدة عليها Growth PANTA – Supplement (٨٠٠ ميكرون).

٨.تترك الأنبوبة فى درجة حرارة الحجرة ٢/١ ساعة.

٩. تدخل الجهاز .

متى يتم عمل الSubculture من MGIT +ve:

أ. الأنابيب التى مر عليها أكثر من ٥ أيام ايجابية النتيجة .

ب. الأنابيب التى ظلت خارج الجهاز اكثر من ٤ ساعات.

ت. الأنابيب التى اعطت تلوث على الBlood agar و الفيلم سلبى.

الطريقة:

١.تخرج أنبوبة ال MGIT الايجابى من الجهاز Vortex + تترك ٤/١ ساعة.

٢.تحل PANTA بال OADC (١٥ مل) .

٣.تحضر أنبوبة MGIT جديدة ويضاف عليها :

- ٨٠٠ ميكرولتر من الPANTA+OADC .
- ٢/١ مل من الأنبوبة ال MGIT الايجابى .

٤.تدخل الأنبوبة فى الجهاز .

❖ عند قراءة الأنبوبة الأولية ايجابى , تخرج الأنبوبة من الجهاز ويتم عمل :

- فيلم .
- يزرع منها على طبق Blood agar ويدخل الحضان ٤٨ ساعة عند ٣٧ °م .
- إذا كان الفيلم ايجابى AFB و Blood agar ليس عليه نمو أو تلوث بعد ٤٨ ساعة ابدأ الحساسية (DST).
- إذا كان الفيلم سلبى AFB و Blood agar عليه نمو (تلوث) ← Subculture ← (DST).

كيفية عمل مزرعة على MGIT من مزرعة LJ ايجابى:

– يؤخذ جزء من المستعمرة باللوب (عروة الزرع) ويذاب فى ماء ملح معقم ويضبط على MF=1.

– يضاف على أنبوبة MGIT جديدة (مكتوب عليها رقم العينة).

٨٠٠ ميكرولتر من PANTA + OADC .

٥٠٠ ميكرولتر من المعلق المجهز والمضبوط على MF=1 .

– تدخل الأنبوبة فى الجهاز وتقرأ.

كيفية عمل الحساسية لادوية الصف الاول من مزرعة L.J ايجابى باستخدام جهاز Bactec 960:

– تحضير ستوك (Stock) المضادات الحيوية :

- يضاف ٤ مل ماء مقطر معقم على كل زجاجة مضاد حيوى (I Line) لعمل ال Stock .
- يمكن تقسيم ال Stock وحفظه فى –٢٠°م لمدة ٦ شهور .

– تحضير العينة :

١. تستخدم مزرعة ايجابية عمرها ليس أكثر من ١٤ يوم.

٢. يجهز معلق (Mac Farland = 1).

٣. Vortex لمدة ٢–٣ ق.

٤. يترك ٢٠ ق حتى يترسب .

٥. ينقل الراشح (Supernatant) لأنبوبة أخرى ويترك ١٥ ق ليترسب .

٦. ينقل الراشح لأنبوبة أخرى ويضبط على 0.5 = Mac Farland .

٧. يؤخذ ١ مل من المعلق الاخير ويضاف على ٤ مل محلول ملح معقم ويخلط.

الزرع على الانابيب MGIT ٩٦٠: -

١. يضاف (٨٠٠ ميكرون) من Sire Supplement لكل أنبوبة من MGIT 960.

٢. يضاف (١٠٠ ميكرون) من ستوك المضاد الحيوى على أنبوبة ال MGIT الخاصة به والتى تحمل رقم العينة .

٣. كيفية تحضير Growth Control :

- **يؤخذ (١٠٠ ميكرون) من المعلق الأخير بالماصة ويضاف على ١٠ مل محلول ملح معقم لعمل التخفيف ١/١٠٠ ويخلط .**
- **يؤخذ من المحلول (١/١٠٠) ٢/١ مل ويوضع على أنبوبة ال Growth Control ويخلط.**

٤. يوضع ٢/١ مل من المعلق (الغير مخفف) على الانبوبة المحتوية على المضاد الحيوى ويخلط .

٥. توضع الانابيب فى الراك الخاص وتدخل فى الجهاز.

كيفية عمل DST لأدوية الخط الأول من انبوبة MGIT ايجابى :

إذا ظهر ايجابى :-

١. تترك الأنبوبة فى الجهاز يوم آخر بعد عمل الفيلم ومزرعة الدم (Blood agar).

٢. اذا تركت الأنبوبة يوم أو يومين نكمل عملية DST .

٣. اذا تركـــت ٣ أيـــام أو ٤ أيـــام أو ٥ أيام يخفف ١ مل من البروث (الايجابـــى) + ٤مل ماء ملح معقم (١:٥ تخفيف) ويخلط.

عملية ال DST: -

❖ يضاف ٨٠٠ ميكرون من Supplement Sire لكل أنبوبة (بالتريتب التالى) :

إذا ظهر ايجابى :-

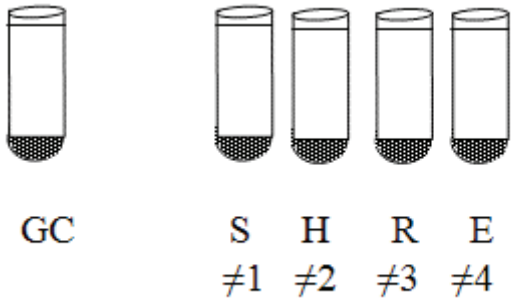
١. تترك الأنبوبة فى الجهاز يوم آخر بعد عمل الفيلم ومزرعة الدم (Blood agar).

٢. اذا تركت الأنبوبة يوم أو يومين نكمل عملية DST .

٣. اذا تركت ٣ أيام أو ٤ أيام أو ٥ أيام يخفف ١ مل من البروث (الايجابى) + ٤مل ماء ملح معقم (١:٥ تخفيف) ويخلط.

عملية ال DST: -

❖ يضاف ٨٠٠ ميكرون من Supplement Sire لكل أنبوبة (بالتريتب التالى) :



- يضاف ١٠٠ ميكرولتر من antibiotic Stock على كل أنبوبة خاصة بهذا ال antibiotic
- يجهز GC: يضاف 0.1ml من معلق الميكروب + 10ml من ماء الملح المعقم (تخفيف 1:100). يخلط .
- ثم يضاف 0.5ml من التخفيف (1:100). على أنبوبة GC-MGIT ويخلط.
- يضاف0.5ml من المعلق بدون التخفيف (1:100) لكل أنبوبة تحتوى على الantibiotic .يخلط.
- توضع الأنابيب فى الراك بالتريتب ثم توضع فى الجهاز .

تحديد نوعية الميكوبكتريا (TB complex or MOTT) باستخدام PNBA (Paranitrobenzoic acid) على جهاز Bactec 960

الفكرة: –

❖ يعطل PNBA نمو MTB–Complex فاذا لم يظهر نمو على المستنبت , فهذا دليل على ان الميكروب هو MTB–Complex .

تحضير PNBA reagent :–

❖ التركيز المطلوب : 500 mcg/ml .

❖ يضاف 1g من هيدروكسيد الصوديوم (الاقراص) على 80ml ماء مقطر معقم حتى يذوب .

❖ يضاف 4gm من PNBA على المحلول السابق.

❖ يضاف Phenolphthalein(Ph Ph) على المحلول باستخدام باستير حتى يصبح اللون بمبى.

❖ يضاف HCL مركز (37%) على المحلول باستخدام باستير حتى يصفر المحلول ويصبح أصفر رايق. اذا وجدت ترســـيبات يضاف هيدروكسيد صوديوم (أقراص) ويقلب. سوف يصبح اللون بمبى مرة أخرى .يعاد وضع HCl حتى يصفر ويصبح اللون أصفر رايق .

❖ يكمل المحلول بماء مقطر معقم الى 100ml .

❖ يقسم فى زجاجات صغيرة (0.5 -1 ml) وتوضع الزجاجات فى الاوتوكلاف عند 120°c لمدة ٢٠ دقيقة وتحفظ الزجاجات فى الثلاجة لمدة ٣ أشهر (2-8°c) .

إذا كانت عملية الزرع :–

❖ من أنبوبة MGIT ايجابى:–

١. اذا كان عمر الانبوبة MGIT الايجابى يوم أو يومين :

- يضاف ١ ml من البروث الايجابى على ٤ مل من محلول الملح المعقم (١: ٥) و يقارن المعلق ب٠,٥ MF ويستخدم هذا المعلق المخففى عملية الزرع على أنبوبة ال MGIT.

٢. اذا كان عمر الانبوبة MGIT الايجابى أكثر من ٥ أيام، يعاد الزرع على أنبوبة MGIT جديدة .

❖ من LJ ايجابى :

- تستخدم مزرعة عمرها ١٤ يوم ليس أكثر .
- يحضر معلق ويقارن بMF1 .
- Vortex ٢–٣ دقيقة.
- يترك ٢٠ ق حتى يترسب .
- يسكب الراشح فى أنبوبة معقمة ويترك ١٥ ق حتى يترسب.

- يسكب الراشح فى أنبوبة معقمة ويقارن ب0.5 MF باستخدام محلول ملح معقم .
- يخفف المعلق الاخير (1 ml) ب(4 ml) محلول ملح معقم .
- يؤخذ 1/2 ml من المعلق الاخير لعملية الزرع .

❖ **عملية الزرع:**

١. تجهز أنبوتبان MGIT :

- (Growth Control (GC.
- PNBA.

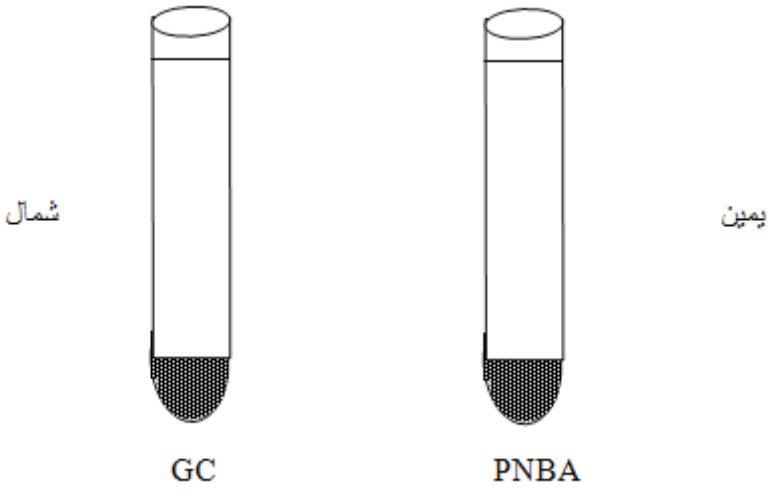
٢. يضاف٠,٥ ml من SIRE Supplement لكل أنبوبة MGIT .

٣. يضاف 100 ميكرون من PNBA reagent المجهز سابقا على أنبوبة ال MGIT المسماه PNBA .

٤. يضاف٠,٥ ml من المعلق على كل أنبوبة من MGIT .

❖ **عملية الزرع:-**

٥. توضع الانبوتبان فى الراك ذى الخانتين بحيث:



٦. يدخل الراك فى الجهاز.

❖ القراءة:-

- GC MGIT tube تعطى ايجابى اذا كان400 GU
- تختبر أنبوبة PNBA MGIT اذا كان GU = أو أقل من 10 ⟵ Sensitive.

اذا كان GU أكثر من 10 ⟵ resistant .

كيفية عمل DST لأدوية الخط الثانى على الباكتيك٩٦٠

الخط الثانى من المضادات الحيوية: ليس لها Kits بل يجهز الستوك من زجاجات البودرة.

❖الأميكاسين:-

- يذاب 332µg من البودرة فى 1ml ماء مقطر معقم ستوك (Stock).
- يضاف 1ml من الستوك على 3ml ماء مقطر معقم W1.
- يضاف 0.1ml من W1 على أنبوبة MGIT .
- التركيز النهائى (1µg/ml) .
- تكمل الخطوات التابعة لإختبار الحساسية على الباكتيك.

الكابريوميسين :-

- يذاب ٤١٥ µg من البودرة فى ١ml ماء مقطر معقم ستوك (Stock).
- يضاف١ml من الستوك على١ ml ماء مقطر معقم W١.
- يضاف٠,١ ml من W١ على أنبوبة MGIT .
- التركيز النهائى (٢,٥µg/ml) .
- تكمل الخطوات التابعة لإختبار الحساسية على الباكتيك.

الكابريوميســين :تستخدم هذه الطريقة عند تحضير كميات بالمليجرام من المضاد الحيوى حيث يؤخذ فى الاعتبار درجة النقاء

- تحضير الستوك.

$$\text{وزن البودرة} = \frac{\text{حجم المذيب} \times \text{التركيز المطلوب} \times ١٠٠}{\text{درجة النقاء}}$$

❖ الكابريوميسين : تستخدم هذه الطريقة عند تحضير كميات بالميكروجرام من المضاد الحيوى حيث لا يؤخذ فى الاعتبار درجة النقاء

- يقسم الستوك فى كريوفيالز (أنابيب صغيرة) كميات ٠,٢ ml وتخزن فى -٧٠ °م لمدة عام .
- عند استخدام الستوك ، يخرج من الديب فريزر حتى يسيح ثم يستخدم بدون تأخير.
- يخفف ستوك المضاد الحيوى بإيضافة ١٠٠ ميكرولتر من الستوك على ٩٠٠ ميكرولتر ماء مقطر معقم (= تخفيف ١:١٠).
- يسكب باقى الستوك (لايستخدم بعد سيحانه مرة اخرى).
- تكمل الخطوات التابعة لإختبار الحساسية على الباكتيك.

❖الكاناميسين :

- يحسب وزن المضاد الحيوى المذاب فى الماء المقطر لتحضير الستوك.

وزن البودرة = حجم المذيب x التركيز المطلوبx 100

درجة النقاء

يقسم الستوك أحجام صغيرة (0.2ml) فى كريوفيالز ويخزن فى -٧٠ °م لمدة عام .

- عند الاحتياج ، يسيح ويستخدم.
- يخفف الستوك (١٠:١) يضاف ١٠٠ ميكرولتر من الستوك على ٩٠٠ ميكرولتر من الماء المقطر المعقم.
- لايثلج الستوك مرة أخرى.
- تكمل الخطوات التابعة لإختبار الحساسية على الباكتيك.

❖ **الأوفلوكساسين :-**

- تحضير الستوك.

وزن = 10x 1660

1000

= 16.6 mg يذاب فى 10ml ماء مقطر معقم / هيدروكسيد الصوديوم.

❖ **لإذابة الأوفلوكساسين :-**

- توضع البودرة فى أنبوبة معقمة.
- يستخدم 0.1N هيدروكسيد الصوديوم لإذابة المضاد الحيوى فى الماء المقطر المعقم.

(لتحضير 0.1N هيدروكسيد الصوديوم : يذاب ٤ جم هيدروكسيد الصوديوم فى ١ لتر ماء مقطر معقم).

- يضاف هيدروكســيد الصوديــوم نقطة بنقطة مع التحريك البطىء بعد كل نقطــة حتى يذوب المضاد تماما ويصبح المحلول رايق تماما.
- يخفف المضاد بالماء المقطر الى الحجم المطلوب.
- يقسم الستوك الى كميات صغيرة 0.2ml فى كريوفيالز يمكن تخزينه عند- ٧٠ °م لمدة سنة.
- نكمل مثل الكاناميسين.
- نكمل خطوات اختبار الحساسية.

اختبارات ضبط الجودة ل جهاز ال BACTEC

Quality Control for BACTEC System

❖ **التحكم فى الجودة بالنسبة لصبغ الأفلام من الأنابيب الايجابية بجهاز الباكتيك ٩٦٠:-**

- يجهز معلق من عينات ايجابى MTB تعادل (1-0.5 McFarland) وتزرع على انابيب MGIT. لابد أن يعطى الفيلم منها ايجابى ve AFB+ بعد إخراجها من الجهاز.
- يجهز معلق من عينات ايجابى E.coli (أى سلبى MTB) تعادل (1-0.5 McFarland) لابد أن يعطى الفيلم منها ve AFB– .
- لو MOTT (Rapid Growers) يعطى فيلم AFB ايجابى خفيف (الصبغة خفيفة) .

❖ **التحكم فى الجودة بالنسبة لل MGIT medium :-**

- تجهيز عينات Q.C : عينات معروف انها ايجابى المزرعة تجهز المزرعة الايجابى.
- تجهيز معلق المزرعة وعمل S.C (يظهر بعد ١٠-١٥ يوم) .
- يسحب من الColony ويضاف على 4ml من 7H9 broth معقم والخرز الزجاجى عددها (6-8) وقطرها (1-2mm).
- Vortex لمدة ١-٢ق (McF>1) .
- يترك المعلق ٢٠ق.
- ينقل الراشح بالماصة لأنبوبة أخرى ذات غطاء محكم ومعقمة (T2) .

- يترك هذا الراشح ليترسب ١٥ق.
- ينقل الراشح لأنبوبة أخرى T3 .
- يضبط على McF 0.5 ويعتبر هذا QC suspension ويمكن تجميد هذا المعلق بعد تقسيمه كميات صغيرة (كل كمية = ١-٢ مل) فى زجاجات عند -٧٠°م. يمكن اســتخدام المعلق المجمد فى حدود مدة اقصاها ٦ شهور. عند الحل لايستخدم المعلق مرة أخرى.

❖ يجب تحليل النتائج كل ٦ شهور على الأكثر وحصر الآتى :

- فيلم (+) ، مزرعة (+) .
- فيلم (-) ، مزرعة (+) .
- فيلم (+) ، مزرعة (-) .
- فيلم (-) ، مزرعة (-) .
- Avg.Time-to-detection +ve control
- التلوث Avg.Time-to-detection

❖ **ضبط الجودة بالنسبة للتسجيل:-**

- يسجل Lot.no. بالنسبة لل:

- أنابيب الMGIT – OADC -Growth Supplement – PANTA .

- يسجل تاريخ زرع و إدخال كل تشغيلة.
- يسجل إسم القائم بالعمل.
- يسجل تاريخ الايجابية لكل عينة.
- يسجل نتيجة الأفلام من أنابيب الMGIT الايجابى.
- تقارن نتائج الMGIT بالنتائج على الLJ .
- يجب إجراء اختبارات الجودة على جميع المواد المستخدمة فى العمل مثل NaOH-NALC و Phosphate buffer وعلى الخطوات المتبعة. تتابع تواريخ انتهاء الصلاحية باستمرار لكل مادة على حدة.
- يجب عمل negative control و Positive مع كل مجموعة عينات (أى مع كل تشغيلة).

1. Negative control:

- يضاف 5ml من Phosphate buffer على أنبوبة MGIT .
- تدخل الجهاز مع كل تشغيلة. يجب أن تقرأ (سلبى) عند ٤٢ يوم.

2. Positive control:

- يضاف 5ml من معلق (MF=0.5) MTB مخفف 1:500 .
- تدخل الجهاز مع كل تشغيلة. يجب أن تقرأ (ايجابى) فى وقت محدد

(specified time-to-detection) يحدد بعد تكرار عمل +ve control مع عدة تشــغيلات. عند القراءة

يجب التأكد من عدم وجود تلوث بعمل فيلم للAFB .

التحكم فى الجودة بالنسبة للحساسية الدرنية علي جهاز BACTEC

- يجب عمل اختبار التحكم فى الجودة عند تحضير كل ستوك من المضادات الحيوية
- (PANTA–OADC–Growth supplement–SIRE supplement–MGIT) او عند شراء مستلزمات جهاز الباكتك
- تســـتخدم MTB H٣٧Rv كســـلالة أصلية وتزرع على الMGIT . يجب أن تعطى نتيجة حساســـة مع كل المضادات الحيوية. قبل زرع السلالة على الMGIT تزرع على L.J ثم تؤخذ عندما يمر على ايجابيتها مدة لاتزيد عن ١٤ يوم.
- يمكن حفظ السلالة على ماء ولبن فى –٧٠°م فى أنابيب صغيرة لمدة ٦ شهور.

صيانة جهاز ال Bactec 960:

❖ **الصيانة اليومية:–**

١. اختبار آلة الطباعة والورق بالطريقة المكتوبة فى الدليل.

٢. اختبار حركة الأدراج والإضاءة الكاشفة (الخارجية والداخلية).

٣. اختبار الترمومترات الموجودة بالأدراج. يجب إعادة العمود المتقطع الملون الى السائل الموجود بالترمومتر الى طبيعته المتصلة.

٤. إختبار حرارة الجهاز من مفتاح قراءة الحرارة ومقارنتها بقراءة الترمومتر.

❖ **الصيانة الدورية :–**

١. تنظيف المرشحات شهريا، أو أسبوعيا إذا كان الجو متربا حتى لا يؤثر التراب على درجة الحرارة بالجهاز.

٢. تغيير الأنابيب (Calibration tubes) الكاشفة الموجودة على جهة الشمال من كل درج قبل موعد انتهاء الصلاحية.

٣. تنظيف الماسح الضوئى (Barcode Scanner Window) الذى توقف عن العمل بسبب الاتساخ .

❖ **معالجة حالة الطوارىء :–**

١. إذا سكبت أنبوبة MGIT مزروعة بداخل الجهاز، يوقف الجهاز فورا وتبلغ الشركة حتى يأتى المسئول ويقوم بأعمال التطهير اللازمة.

٢. إذا سكبت كمية صغيرة من أنبوبة ال MGIT على حافة الدرج، يمكن تطهيرها بقطع شاش مبللة بمطهر ضد الميكوبكتريا.

٣. عند تنظيف وتطهير الأدراج، يجب إيقاف الجهاز تماما حتى لاتزيد نسبة الرذاذ الملوث المنبعث من السائل المسكوب.

٤. يجب ان يكون هناك نظام صيانة دورية من قبل الشركة (اربع مرات سنويا علي الاقل حتي يتم المحافظة علي كفاءة الجهاز).

جهاز الجين اكسبرت
(GeneXpert Machine)

تحضير العينات :

١. يتم جمع عينات البصاق(لاتقل عن ١ مللي) في عبوات بلاستيك شفافة ذات غطاء محكم.
٢. يتم حفظ العينات في الثلاجة اذا لم يتم وضعها بالجهاز مدة لا تزيد عن ٤٨ ساعة.
٣. نقل العينات من معمل الي اخر يكون في ثلاجة حفظ صغيرة وفي خلال مدة لا تزيد عن ٤٨ ساعة ايضا.
٤. تنقل عينة البصاق الي انبوبة فالكون (اقل كمية ١ مللي ولاتزيد عن ٤ مللي).
٥. يضاف علي العينة ضعف المقدار من محلول (SR) بمعدل ٢--- ١.
٦. تقفل الانبوبة جيدا وترج بشدة لمدة من ١٠ –٢٠ مرة.
٧. تترك في درجة حرارة الغرفة مدة لا تقل عن ١٠ دقائق ولا تزيد عن ساعتين.
٨. بعد ١٠ دقائق ترج مرة ثانية من ١٠ –٢٠ مرة بشدة ثم تترك لمدة ٥ دقائق في درجة حرارة الغرفة.
٩. لا بد من التأكد ان العينة اصبحت سائلة والا تترك من ٥–١٠ دقائق اخري.
١٠. يتم ترقيم العينات بماركر علي جانب cartridge .
١١. يتم سحب ٢ مللي (علي الاقل) من العينة (لايجب سحب اي فقاقيع او مواد صلبة ان وجدت) بواسطة باستير معقم من انبوبة الفالكون.
١٢. ثم نضعها في ال cartridge وتقفل جيدا .

ملحوظة:

من الممكن استعمال الراسب المجهز من عينات البصاق بواسطة

NALC – NoOH – citrate solution

كالتالي:

- يؤخذ ½ مللي من الراسب في انبوبة فالكون.
- يضاف له واحد ونصف مللي من محلول (SR).
- يتبع نفس الخطوات السابقة من رقم ٦

- من الممكن ادخال الجهاز عينات من خارج الرئة بعد تجهيزها بواسطة

NALC – NoOH – Citrate solution

ثم معاملتها كالسابق

طريقة تشغيل الجهاز:

يفتح الجهاز بالترتيب كالتالي:

- يفتح ال UPS اولا بالضغط علي الزرار الايمن لمده 2 ثانيه.
- يفتح الجهاز من المفتاح الخلفي.
- يفتح اللاب توب الخاص بالجهاز.

طريقة إدخال العينة:

- نضغط علي كلمة Create Test علي شاشة اللاب توب (في الاعلي اقصي اليسار) سيظهر علي الشاشة جملة Scan the Cartridge barcode
- نقوم بتعريف الجهاز للعينة بواسطة ال Scaner
- بعد تعريف العينة يظهر علي الشاشة مربع فارغ لإدخال اسم المريض ورقم العينة
- يتم الضغط علي كلمة Start Test الذي يوجداسفل الشاشة
- يتم تحديد المكان المخصص لإدخال العينة بواسطة لمبة تضاء فنضع العينة ويقفل عليها
- بعد انتهاء المدة المحددة لكل اختبار (ساعة وخمسون دقيقة) تظهر النتيجة علي View Result Screen
- نطبع النتيجة بواسطة Sample Report As PDF –

قراءة النتائج :

- تظهر النتائج كالاتي:

MTB detected – or MTB Not Detected

Rif Resistance detected – or Rif Resistance Not Detected

- اذا ظهرت علي الشاشة احدي النتائج التالية:

_ Invalid

السبب : وجود مواد صلبة مثل الاكل أو عينة لزجة متكتلة لم تذوب

الحل: يعاد الاختبار بعينة جديدة للمريض

_ No Result

الاسباب : – انقطاع مفاجئ للتيار

– تم فتح الجهاز اثناء التشغيل

– تم ايقاف الاختبار اثناء التشغيل

الحل: اعادة الاختبار بعينة جديدة للمريض

– Errors : No 5007

الاسباب

- عينة شديدة اللزوجة
- عينة غير كافية
- وجود فقاعات هواء أثناء سحب العينة

الحل : اعادة الاختبار بعينة جديدة

– Error No 2008

السبب: العينة شديدة اللزوجة

الحل : اعادة الاختبار بعينة اخري

– Error No 2127

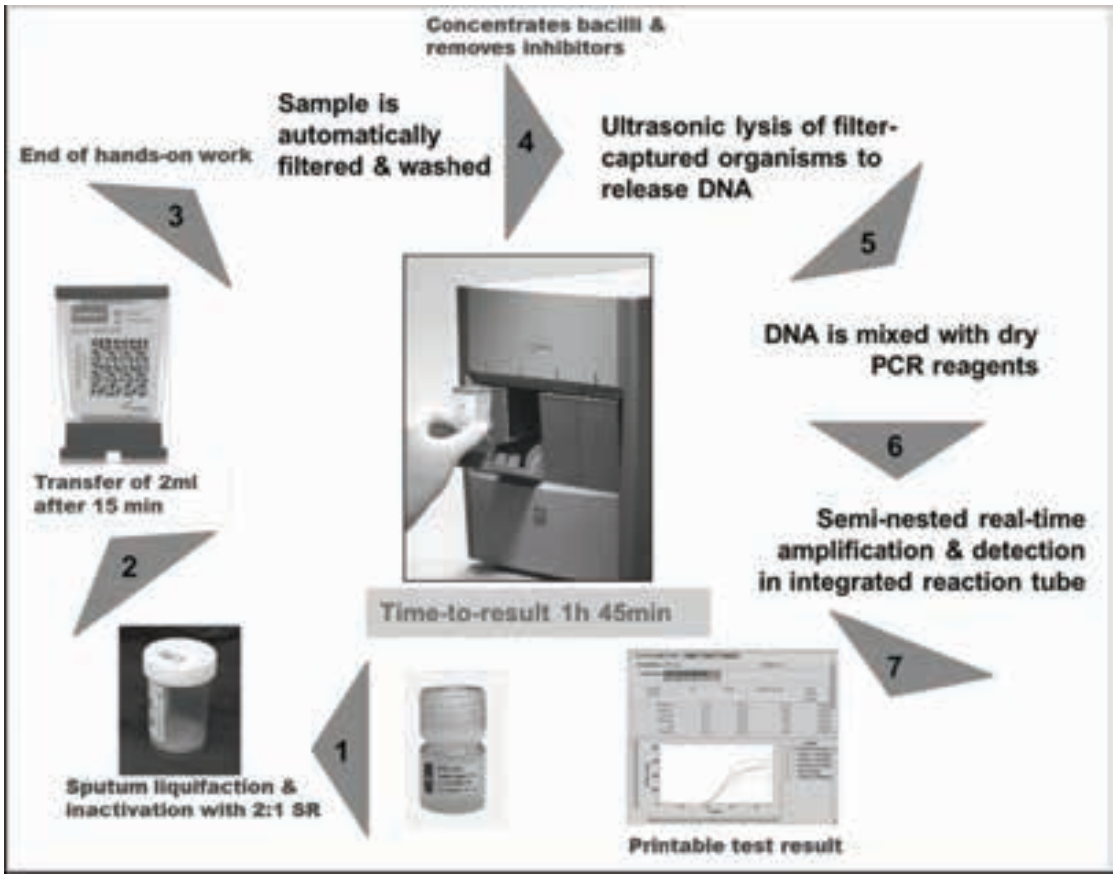
السبب : تقطع في التيار الكهربائي

الحل : تركيب UPS

– Error No 5011

السبب : – لم يتم قفل العبوة جيدا

الحل : يعاد الاختبار بعينة جديدة


Concentrates bacilli & removes inhibitors
Sample is automatically filtered & washed
4
Ultrasonic lysis of filter-captured organisms to release DNA
5
End of hands-on work
3
DNA is mixed with dry PCR reagents
6
Transfer of 2ml after 15 min
2
Semi-nested real-time amplification & detection in integrated reaction tube
Time-to-result 1h 45min
7
1
Sputum liquifaction & inactivation with 2:1 SR
Printable test result

كيفية حساب وطلب الكيماويات اللازمة لعمل صبغة لعدد ألف شريحة

بند	الكمية المطلوبة لألف شريحة	الوحدة	عدد المرضى	ملحوظة
فوكسين قاعدى	٤ زجاجات	عبوة ٢٥جم	كل ألف شريحة تقريبا" ٣٠٠ مريض	تحسب الكميات حسب عدد المرضى المترددين على المعمل إعتمادا" على الإحصائية النصف سنوية علما" بأن كل مريض يحتاج إلى عمل ٣ شرائح
مثيلين أزرق	١ زجاجة	عبوة ٢٥جم		
بللورات فينول	٥٠٠ جم	عبوة ٥,٠ جم		
كحول اثيلى ٩٥٪	١ لتر	عبوة ٥,٢ لتر		
كحول مثيلى ٩٧٪	٤ زجاجات	عبوة ٥,٢ لتر		
حمض هيدروكلوريك مركز ٣٧٪ مدخن	زجاجة ١ لتر	١ لتر		
زيت سيدر	١٠٠ مل	زجاجة ١٠٠ مل		
شرائح	٢٠ علبة	علبة ٥٠ شريحة		
عبوات بصاق	١٠٠٠ عبوة			

وزارة الصحة والسكان
الإدارة المركزية للمعامل
قسم الدرن

Ministry of Health
Central Health Laboratonica
TB Department

المرور على مستوصفات الصدر (أول زيارة)

المحافظة :

رقم التليفون :

اسم المركز أو المستوصف أو المستشفى :

تاريخ المرور :

القائم بالمرور :

I العاملون بالمعمل

مدير المعمل : الاسم

التخصص

عدد الأطباء :

الأسماء :

التخصص	مدرب	غير مدرب	مكان وتاريخ التدريب

عدد فني المعمل :

الاسماء :

مدرب	غير مدرب	مكان وتاريخ التدريب

العمال :

عدد العمال :

عبء العمل :

عدد المسحات لكل فني في المعمل :

II وصف المعمل

عدد الحجرات :

اضاءة جيدة : نعم لا

تهوية جيدة : نعم لا

تهوية جيدة : نعم لا

جودة البنشات :

الأرضيات والحوائط :

ملاحظات :

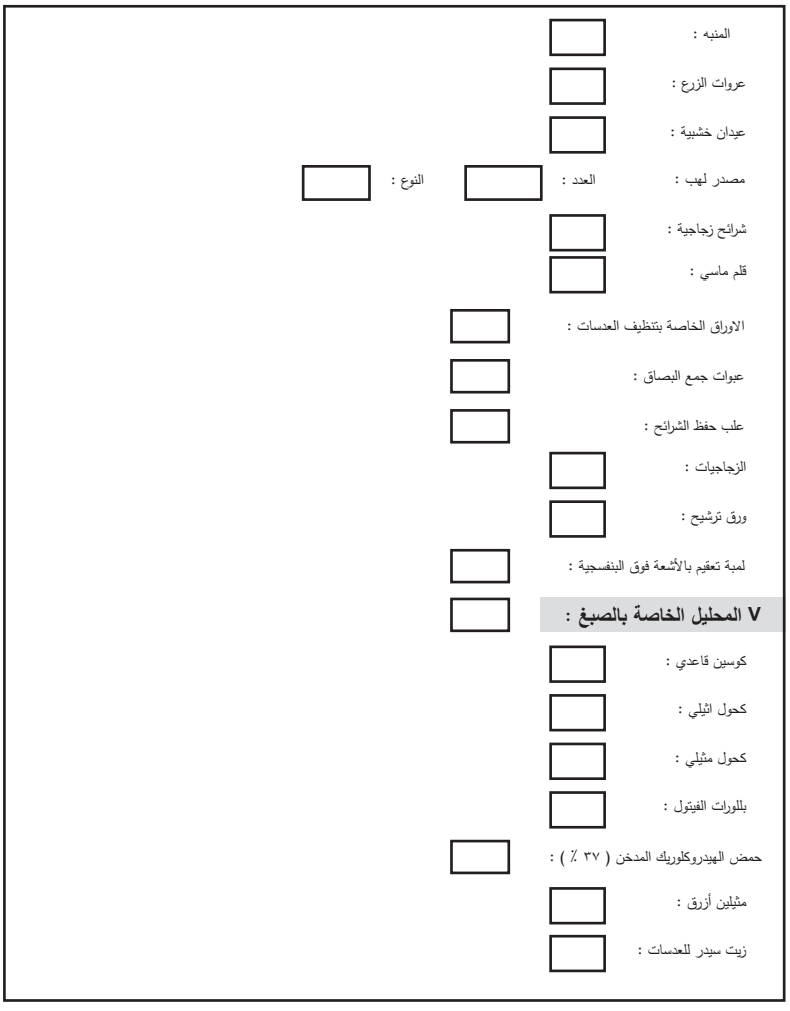
III الاعمال التي يقوم بها المعمل :

الفحص المباشر :

الفحوص الأخري :

IV الاجهزة والأدوات :

	العدد	الكفاءة
الميكروسكوب :		
الثلاجات :		
جهاز تقطير المياة :		
الميزان الكهربي :		


المنبه :
عروات الزرع :
عيدان خشبية :
مصدر لهب :
العدد :
النوع :
شرائح زجاجية :
قلم ماسي :
الاوراق الخاصة بتنظيف العدسات :
عبوات جمع البصاق :
علب حفظ الشرائح :
الزجاجيات :
ورق ترشيح :
لمبة تعقيم بالأشعة فوق البنفسجية :
V المحاليل الخاصة بالصبغ :
كوسين قاعدي :
كحول اثيلي :
كحول مثيلي :
بللورات الفينول :
حمض الهيدروكلوريك المدخن (٣٧ ٪) :
مثيلين أزرق :
زيت سيدر للعدسات :

خزين للمحاليل للربع سنة :

VI اجراءات السلامة :

مطهرات : نعم لا

(فينول ٥ ٪) : نعم لا

صابون : نعم لا

بلاطي المعمل : نعم لا

الاقنعة والقفازات : نعم لا

طريقة التخلص من العينات بعد الانتهاء من فحصها :

اضافة مطهر لعينات البصاق : نعم لا

جمع المواد الملوثة في اكياس المواد الخطرة : نعم لا

نقل مخلفات العمل للمحرقة : نعم لا

عمل المسحات في وجود نافذة مفتوحة : نعم لا

اختيار اتجاه الهواء اثناء عمل المسحات : نعم لا

ملاحظات

VII خطوات الفحص الميكروسكوبي :

١- جمع العينات :

* ما هي التعليمات التي تعطي للمريض للحصول علي عينة بصاق وليس لعاب ؟

* هل يتم ملاحظة جودة العينة ؟

-

-

* هل يتم فحص العينات بعد جمعها في اقل من يومين ؟

-

* هل يتم التفرقة بين عينة البصاق وعينة اللعاب اثناء الفحص ؟

-

عدد الكرات البيضاء / عدد الخلايا البشرية

اكثر من ١/١٠ = بصاق

اكثر من ١/١٠ = لعاب

* اذا كانت العينة لعاب ، هل تم تشجيع المريض لاعطاء عينة بصاق ؟

-

* هل يتم تسجيل ان العينة لعاب ؟

-

* النسبة المئوية لعينات اللعاب في الحالات المشتبة فيها بالدرن ؟

-

* ملاحظة عدد العينات التي يتم جمعها من كل مشتبه تبعا لسياسة البرنامج القومي لمكافحة الدرن ؟

نعم ☐ لا ☐

* اذا كانت الاجابة (بلا) : اذكر السبب

-

* ملاحظة عدد العينات التي تم جمعها من المرضى اثناء متابعة العلاج تبعا لسياسة البرنامج القومي لمكافحة الدرن ؟

نعم ☐ لا ☐

* الطريقة السليمة / الترقيم عبوات البصاق السليمة (على الغطاء وعلى جانب العبوة) ؟

-

* الطريقة السليمة لترقيم الشرائح (الرقم المعملى وبواسطة القلم الماسي او القلم الرصاصي)

نعم ☐ لا ☐

٢- عمل المسحات

متجانسة نعم ☐ لا ☐

المقاس ٢X١ سم نعم ☐ لا ☐

٣- خطوات الصبغة

* هل يتم ترشيح صبغة الفوكسين القاعدي والمثيلين الازرق قبل الاستخدام ؟

نعم ☐ لا ☐

* هل يتم تجفيف المسحات في الهواء قبل التثبيت ؟

نعم ☐ لا ☐

* مدة وضع المثيلين الازرق علي الشريحة : دقيقة

* مدة وضع الكاربون فوكسين علي الشريحة : دقيقة

* طريقة ازالة اللون : حمض الهيدروكلوريك ٣٧ ٪ او حمض الكبريتيك المركز ٢٥ ٪ ؟

-

* كم عدد الحلول التي يتم فحصها لكل شريحة ؟

أ) في حالة الايجابية : ب) في حالة السلبية :

* هل يتم تنظيف العدسة الزيتية بعد فحص كل شريحة ايجابية بورق تنظيف العدسات ؟

نعم ☐ لا ☐

VIII ضبط الجودة

١- ضبط الجودة الداخلي :

* هل يتم استعمال شرائح ايجابية وسلبية ككنترول لضبط جودة محاليل الصبغة ؟

نعم ☐ لا ☐

* هل يوجد عدد كافي من مخزون المسحات الايجابية والسلبية ؟

–

* هل يوجد الدليل الفني / المعملي بالمعمل ؟

–

٢- ضبط لبجودة الخارجي :

* هل يتم حفظ جميع الشرائح ؟

–

* هل يتم تنظيف جميع الشرائح قبل حفظها ؟

–

* هل يتم ترتيب الشرائح بنفس ترتيب سجل المعمل ؟

–

* هل يوجد تقارير التغذية الرجعية لعادة فحص الشرائح محفوظة بالمعمل ؟

اعادة فحص الشرائح اثناء المرور

	اسم الشريحة	نتيجة الفني		صبغة المسحات الدرنية	صبغة الخلية	بصاق او لعاب	
الشرائح الايجابية							
الشرائح السلبية							

تحديد ايجاب النتائج الكاذب

-

-

-

XI التســـجيل والتقارير المعملية

١- سجل المعمل

التسجيل حتى يوم المرور : كامل ☐ غير كامل ☐

التسجيل حتى يوم المرور : كامل ☐ غير كامل ☐

التسجيل حتى يوم المرور : ☐ ٣ ☐ ٢ ☐ ١

* هل يكتب النتائج اليجابية بالقلم الاحمر ؟

-

*هل يكتب درجة الايجابية ؟

-

٢- التقارير :

* هل يوجد طلب للفحص واخر للنتيجة : نعم ☐ لا ☐

٣- الاحصائيات

شهرية :

ربع سنوية :

نصف سنوية :

سنوية :

* هل يوجد سجل اشتباه ؟ نعم ☐ لا ☐

* هل يتم مقارنة سجل الاشتباه مع سجل المعمل ؟ نعم ☐ لا ☐

نوع الفحص المطلوب	الايجابية			السلبية		
	١	٢	٣	١	٢	٣
تشخيصي						
متابعة علاج						
فحص مخالط						
المجموع						

X المشاكل

مشاكل فنية

-

مشاكل ادارية

-

XI التوصيات

-

-

-

-

-

-

-

-

-

-

-

-

-

-

-

-

Annex (4)

Smear Results Sheet for Blinded Rechecking

Microscopy Centre : ____________________ **District :** ___________________________

Name of TU ____________ **Month/Year :** _____________

§

SI. No.	Lab No.	Result of LT of DMC, including grade for posisive smears
1.		
2.		
3.		
4.		
5.		
6.		
7.		
8.		
9.		
10.		
11.		
12.		
13.		
14.		
15.		
16.		
17.		
18.		
19.		
20.		
21.		
22.		
23.		
24.		
25.		

Name of Lab. Techician: ____________

Signature: ______________________ **Date** ____________

Annex (5)

EQA
Blinded Recheaching & Panel Testing

ANNEXURE C

EQA of Suptum Microscopy

Worksheet: Blinded Recheaching of DMC Slides

Microscopy Centre Code : ______________________________ **TU** _________

District: ______________________ **Month and Year:** _______________

Tick appropraite Column or writte letter as indicated below table

Sl. No.	Slide No.	AFB result / Grade by			Specimen Quality		Staining		Size		Thickness		Evenness	
		STLS	MC	Umpire	>10 WBC/ field	<10 WBC/ field	Good	Poor (U/O)	Good	Poor (B/S)	Good	Poor (K/N)	Good	Poor
			1		2		3		4		5		6	
1														
2														
3														
4														
5														
6														
7														
8														
9														
10														
11														
12														
13														
14														
15														
16														
17														
18														
19														
20														
Total														

1: MC result to be entered under supervision only after from completed by STLS
2: tick appropriate column
3: Tick if good; write 'U' if under-decolourized, 'O' if over-decolourized
4: Tick if good; write 'B' if too big, 'S' if too smal
5: Tick if good; write 'K' if too thick, 'N' if too thin
6: Tick appropriate column

Overall remarks:

Specimen quality:	Needs improvement	Yes	No
Smear ize:	Needs improvement	Yes	No
Smear thickness:	Needs improvement	Yes	No
Smear evenness:	Needs improvement	Yes	No
Staining:	Needs improvement	Yes	No

Remarks:

Date of examination: _________________ Signature of first controller: _______________________

نموذج طلب فحص بصاق

اسم المريض .... **الجنس: ذكر** ( ) **أنثى**( ) **السن** : ....

العنوان(بالتفصيل): ....

للمريض الجديد ....

الغرض من الفحص:

١- مريض جديد : ( )

٢-مريض متردد: ( )

رقم سجل الدرن :..... ..... تاريخ فحص أخر بصاق:..... .....

النتيجة :.... ....

٣- شهادة صحية

تاريخ العينة : ....

اسم الطبيب:

التوقيع:

نتيجة الفحص

مسلسل المعمل:

التاريخ	رقم العينة	النتيجة يكتب (سلبي أو إيجابي)	توصيف إيجابية البصاق×

تكتب النتائج بهذه الشفرة (١-٩) أو (+) أو(++) أو(+++)

التاريخ:

اسم القائم بالفحص:

التوقيع:

بحث مقاومة ميكروب الدرن للأدوية النوعية طلب فحص مزرعة درنية

من المعمل الطرفى إلى المعمل الوسيط

اسم المركز :

اسم المريض : كود المريض :

السن : النوع :

نتيجة فحص البصاق بالمعمل الطرفى :

نتيجة العينة الأولى	نتيجة العينة الثانية

فنى المعمل الاسم : التوقيع :

مدير الوحدة (الاسم) : التوقيع :

نتيجة مزرعة البصاق للدرن

من المعمل الوسيط إلى المعمل الطرفى

اسم المريض : كود المريض :

السن : النوع :

نتيجة فحص البصاق بالمعمل الطرفى :

نتيجة العينة الأولى	نتيجة العينة الثانية

نتيجة المزرعة :

إيجابى سلبى

مسئول المعمل الوسيط

الاسم : التوقيع : التاريخ : / /

بحث مقاومة ميكروب الدرن للأدوية النوعية طلب فحص حساسية

من المعمل الوسيط إلى المعمل المركزى

اسم المحافظة :

اسم المريض : كود المريض :

السن : النوع :

مسئول المعمل الوسطى :

الاسم : التوقيع : التاريخ : / /

نتيجة فحص حساسية ميكروب الدرن

(من المعمل المركزى إلى المعمل الوسيط ومنسق الدراسة والمعمل الطرفى)

اسم المحافظة :

اسم المريض : كود المريض :

السن : النوع :

Identification test

1- Atypical :

2- Typical human Bovine Other

نتيجة فحص الحساسية (S/R)

	SM	H	Rif	E
Sensitivity				

مدير المعمل المركزى للدرن :

الاسم : التوقيع : التاريخ : / /

استمارة تقييم الفحص المباشر للبصاق

استمارة رقم :

محافظة : اسم المعمل :

القائم بارسال العينات :

تاريخ الجمع :

اسم الفنى :

التقييم الفني للنتائج		ملاحظات من المراجع الرئيسي					
			ملاحظات علي التجهيز			ملاحظات علي الصبغة	
			جيد	متوسط	ضعيف	جيد	متوسط	ضعيف

عدد الشرائح	سلبي كاذب	ايجابي كاذب

ملاحظات

استماره تقييم فحص المزارع

استماره رقم:

محافظه:

التاريخ:

اسم المعمل:

رقم العينه	النتيجه بواسطه المعمل الوسيط	النتيجه بواسطه المعامل المركزيه

ملاحظات:

١-

٢-

٣-

معانى المصطلحات العلمية

WHO	منظمة الصحة العالمية
NTP	البرنامج القومى لمكافحة الدرن
DOTS	العلاج القصير الأمد تحت الملاحظة
ARI	الحالات الإيجابية المتوقعة سنوياً
BCG	االطعم المضاد لمرض الدرن
Tuberculin	االختبار حساسية لميكروب الدرن
BSC	كابينة الحماية البيولوجية
U.V	الأشعة فوق البنفسجية
Acid fastness	خاصية صمود ميكروب الدرن لإزالة الصبغة بواسطة الحمض
Relative Centrifugal force	القوة النسبية للطرد المركزى
L.J	مستنبتات اللوفنشتاين جنس
Swinging angle rotor	الدوار المتأرجح
Fixed angle rotor MGIT Tube	الدوار الثابت انبوبة المستنبت السائلة

المراجع العلمية

1- External Quality Assessment for AFB Smear Microscopy, CDC, IUATLD , KNCV , RIT , 2002.

2- Laboratory Services in Tuberculosis Control Part II , III Microscopy & Cul ture, WHO , 1998 .

3- Medical Laboratory Manual for Tropical Countries vol II, Monica Cheeslrough 1985.

4- Procedures for the Isolation & Identification of Mycobacteria Annie L. Vestal 1975.

5- T.B Bacteriology Examination to stop TB, AKIKO FUJIKI, RIT, JIKA, 2001.

6- WHO handbook for guidline development. Geneva: World Health Organiz tion, 2012

7- CDC. Guidelines for preventing the transmission of Mycobacterium tubercul sis in healh – care settings, 2005 MMWR 2005 / 54 (RR17); 1141.

8- BACTEC MGIT™ , 960 System User ‘ s manual, 6/2004

9- GeneXpert&Xpert MTB /RIF , Quick start guide ,3/ 2014

FIKRA adv. +202 37620834/5

WHO Representative Office Egypt
3 Magles El Shaab St., inside Ministry of Health and Population
Cairo, **11516**, Egypt
Tel: **(202) 2795 7706 – (202) 2795 3708**
Fax: **(202) 2795 3756**
e-mail: emwroegy@who.int
http://www.emro.who.int/countries/egy