بسم الله الرحمن الرحیم

مجموعه روش‌های اجرایی استاندارد میکروسکوپی مالاریـــا (MM-SOP)

مترجم وگرد آورنده:

علیرضا صادقی

زیر نظر:

دکتر احمد رئیسی

دکتر عباس شهبازی

با همکاری:

آقایان مسعود یریان

علی حافظی

امیر محمد ابراهیمی و

فیروزه گوشه

بهار ۱۳۹۷

سرشناسه: صادقی، علیرضا، ۱۳٤۷، گردآورنده، مترجم
عنوان و نام پدیدآور: مجموعه روش‌های اجرایی استاندارد میکروسکوپی مالاریا (MM-SOP)/ مترجم و گردآورنده علیرضا صادقی، با همکاری مسعود یریان ... [و دیگران].
مشخصات نشر: تهران: وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، معاونت بهداشتی، ۱۳۹۶.
مشخصات ظاهری: ۸۳ ص.: مصور، جدول.
شابک: ۸ـ۵۲ـ۶۵۷۰ـ۹٦٤ـ۹۷۸
وضعیت فهرست‌نویسی: فیپا
یادداشت: با همکاری مسعود یریان، علی حافظی، امیرمحمد ابراهیمی، فیروزه گوشه.
موضوع: مالاریا ـ ـ تشخیص ـ ـ دستنامه‌های آزمایشگاهی
موضوع: Malaria -- Diagnosis -- Laboratory manuals
موضوع: میکروسکوپی پزشکی ـ ـ دستنامه‌های آزمایشگاهی
موضوع: Medical -- microscopy -- Laboratory manuals
موضوع: مالاریا ـ ـ حذف
موضوع: Malaria -- Elimination
شناسه افزوده: یریان، مسعود
شناسه افزوده: ایران. وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی. معاونت بهداشتی
رده‌بندی کنگره: ۱۳۹۶ ۳م۲ص/RC۱۵۸
رده‌بندی دیویی: ۶۱۶/۹۳۶۲۰۷۵
شماره کتابشناسی ملی: ٥۰۹٤۳٤٤

مجموعه روش‌های اجرایی استاندارد میکروسکوپی مالاریـا (MM-SOP)

مترجم وگرد آورنده: علیرضا صادقی
زیر نظر: دکتر احمد رئیسی، دکتر عباس شهبازی
با همکاری: آقایان مسعود یریان، علی حافظی، امیر محمد ابراهیمی و فیروزه گوشه
ناشر: وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، معاونت بهداشت
چاپ و صحافی: مجسمه
نوبت چاپ: اول ـ بهار ۱۳۹۷
شابک: ۸ـ۵۲ـ۶۵۷۰ـ۹۶۴ـ۹۷۸

حق چاپ و نشر برای وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی محفوظ است.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

تمیز کردن و ذخیره‌سازی لام‌های میکروسکوپی ٦

آماده‌سازی محلول ذخیره گیمسا ١٠

تهیه آب بافر با PH= ٧/٢ ..... ١٣

تهیه آب بافربا PH =٧/٢ با استفاده از قرص‌های بافری ١٩

آماده‌سازی محلول رنگ گیمسای رقیق شده ٣٦

خون گیری از سر انگشت و تهیه گسترش‌های ضخیم و نازک خون ٤١

جمع آوری خون سیاهرگی به روش خون گیری با سرنگ و تهیه گسترش‌های خونی از خون جمع آوری شده درلوله حاوی ضد انعقاد ٤٥

برچسب نویسی گسترش‌های خونی مالاریا ٤٩

ثبت وگزارش نتایج میکروسکوپی ٥٢

رنگ آمیزی گسترش‌ها خونی ٥٤

بررسی میکروسکوپی گسترش‌های ضخیم ونازک جهت تشخیص انگل‌های مالاریا ٥٩

شمارش انگل مالاریا ٦٤

آماده‌سازی لکه‌های خون برروی کاغذ فیلتر ٦٩

استفاده، مراقبت و نگهداری از میکروسکوپ ٧٦

تیم برنامه حذف مالاریا از همکاری‌های ارزشمند جناب آقای دکتر شهبازی در تهیه و تدوین دستورالعمل کشوری روش‌های اجرایی استاندارد میکروسکوپی مالاریا قدردانی می‌نماید.

مقدمه

تشخیص سریع و درمان موثر و فوری اساس مدیریت مالاریا و کلید کاهش مرگ و میر و ابتلا به این بیماری است. در حال حاضر عمده‌ترین روش تشخیص مبتنی بر انگل مالاریا روش میکروسکوپی است. یک آزمایش میکروسکوپی در صورتی قابل پذیرش است که، هزینه اثر بخش باشد، نتیجهٔ آن بطور مستمر و پیاپی صحیح باشد و در مدت زمان قابل قبولی انجام گیرد. تحقق این شرایط نیاز به یک برنامه فراگیر و فعال دارد که ما به آن تضمین کیفیت (Quality Assurance) می‌گوییم.

هدف اصلی برنامه تضمین کیفیت اطمینان از انجام فرایند تشخیص میکروسکوپی توسط افراد شایسته و با انگیزه، تحت آموزش‌ها و نظارت موثر و نظام تدارکاتی مناسب برای تدارک مواد و تجهیزات مورد نیاز است. از جمله مهمترین ویژگیهای یک برنامه تضمین کیفیت میکروسکوپی مالاریا وجود دستورالعمل‌های اجرایی استاندارد (Standard Operating Procedures) (SOPs) در کلیه سطوح نظام کنترل/ حذف مالاریا است.

SOPهای دقیق و خوب یک جزء اساسی از یک سیستم مدیریت کیفیت اثر بخش و موثر هستند. تمام جنبه‌های برنامه کنترل/ حذف مالاریا باید بوسیله SOPها پوشش داده شوند. SOPها به تفصیل، تمام جزئیات آزمایش‌ها و فرآیندها (از جمله QA / QC) را در آزمایشگاه‌ها توصیف می‌کنند. آنها برای استانداردسازی فرآیندها و اطمینان از سازگار بودن و قابل تکراربودن نتایج ضروری هستند. همهٔ دوره‌های آموزشی باید مبتنی بر SOPها باشند. اگرچه معمولاً SOPها در سطح مرکزی برنامه مالاریا تولید می‌شوند، ولی همهٔ کارکنان درگیر اجرای آن باید در نگارش و بازنگری آن مشارکت نمایند.

SOPها باید:

- بصورت چاپی و یا الکترونیکی در آزمایشگاه موجود باشند.
- با سیاست‌های جاری در آزمایشگاه سازگار باشند.
- علی رغم ساده بودن، باید حاوی همهٔ اطلاعات مورد نیاز باشند.
- کاملا سازگار با شرح وظایف کارکنان باشند.
- بطور منظم بازنگری شوند و مستندات مربوطه حفظ شود.
- تغییرات آنها به اطلاع عموم رسانده شود و توسط صاحبنظران دارای اعتبار گردند.
- نسخه‌های قدیمی باید از رده خارج و بایگانی شوند.
- همهٔ استفاده‌کنندگان در فرایند بازنگری مشارکت داده شوند.
- در همه انواع بازدیدها وجود SOPها ارزیابی شوند.
- در تمام فرایندهای QA (اعم از فنی و اجرایی) مورد استفاده قرار گیرند.

خوشبختانه در سالهای اخیر توجه به نقش مهم SOPها در ارتقاء خدمات رو به افزایش بوده است، هر چند که هنوز راه زیادی برای پیمودن باقیست. در این راستا همکار عزیزمان جناب آقای علیرضا صادقی جهرمی در دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی جهرم با همکاری عزیزانی از سایر دانشگاههای علوم پزشکی مجموعهٔ کامل و باارزشی از SOPهای سازمان بهداشت جهانی را در زمینهٔ تشخیص میکروسکوپی مالاریا در قالب این کتاب گردآوری و ترجمه نموده‌اند. با توجه به اینکه همهٔ SOPهای این کتاب توسط WHO تدوین شده و اکثر فرایندهای تشخیص میکروسکوپی مالاریا را شامل می‌گردند تدوین این کتاب را می‌توان گام مهمی در جهت تثبیت نظام تضمین کیفیت تشخیص میکروسکوپی مالاریا و استانداردسازی فرایندهای متنوع آن در آزمایشگاههای مالاریا دانست. انتظار می‌رود مدیران و کارشناسان مسئول آزمایشگاههای مالاریا در سطوح شهرستان و دانشگاه بر اجرای دقیق و کامل SOPها در آزمایشگاههای مالاریا نظارت نموده و در عین حال تجارب با ارزش خود را در اختیار تهیه‌کنندگان این کتاب قرار دهند تا در ویرایشهای بعدی مورد استفاده قرار گیرند.

حق یارتان باد

دکتر عباس شهبازی

بهار ۱۳۹۷

تمیز کردن و ذخیره‌سازی لام‌های میکروسکوپی

روش اجرایی استاندارد میکروسکوپی مالاریا MM-SOP-01

۱. هدف

توضیح روش مناسب برای انتخاب، شستشو، بسته‌بندی و ذخیره‌سازی لام‌هایی که برای تهیه گسترش‌های خونی جهت بررسی میکروسکوپی مالاریا مورد استفاده قرار می‌گیرند.

این روش تنها با تایید یک هماهنگ‌کننده کشوری مسئول تضمین کیفیت میکروسکوپی مالاریا قابل تغییر است. تمام روش‌های تخصصی توصیف شده برای همه میکروسکوپیست‌های مالاریا در آزمایشگاه‌های مرجع کشوری، آزمایشگاه‌های بیمارستانی و آزمایشگاه‌های بهداشتی ارائه‌دهنده خدمات سلامت مجری برنامه میکروسکوپی مالاریا، اجباری است.

۲. مقدمه

لام‌های شیشه‌ای مورد استفاده در میکروسکوپی معمولا در جعبه‌های ۵۰ یا ۷۲ تایی تهیه می‌شوند. ممکن است برروی برچسب آنها کلماتی نظیر "شسته شده" یا "تمیزشده" قید شده باشد. برای میکروسکوپی مالاریا، لام‌های شیشه‌ای صاف بایستی دارای کیفیت "ممتاز"، همراه با لبه‌های ساب خورده و انتهای مشجر باشد. انتهای مشجر را باید برای اطلاعات نویسی لام استفاده کرد. شیشه‌های مورد استفاده برای لام‌های با کیفیت عالی در شرایط جغرافیایی گرم دچار تیرگی وکدورت نمی شوند. لام‌های شیشه‌ای با کیفیت ضعیف، ارزانتر بوده اما خیلی سریع در شرایط آب و هوایی گرم و مرطوب کدر می‌شوند، شستشو هم قادر به حذف کدورت نبوده و اینگونه لام‌ها برای روش‌های میکروسکوپی مناسب نیستند. اگرچه برروی برخی ازجعبه‌های لام عبارت"شسته شده" یا " تمیز شده" قید شده، اما این به معنای استفاده مستقیم ازلام‌های موجود دراین جعبه‌ها نیست. این لام‌ها بایستی پیش از استفاده برای تهیه گسترش‌های خونی، شسته، خشک و بسته‌بندی شوند.

لازم است که پیش از استفاده معلوم کنیم لام مورد استفاده تمیز و عاری از خراش است. استفاده ازلام‌های کثیف و دارای خراش منجر به کیفیت نامطلوب گسترش شده که آن هم به نوبه خود درکیفیت و دقت تشخیص تأثیر نامطلوب دارد. لام‌هایی که کمی خراشیدگی دارند و برای تهیه گسترش‌های خونی نامطلوب بوده را می‌توان به بخش‌های دیگر آزمایشگاه منتقل کرده و از آنها برای موارد روتین استفاده کرد.

فعالیت میکروسکوپی مالاریا را می‌توان به حالت‌های متنوع، از یک میکروسکوپیست تنها در یک آزمایشگاه دور دست با ارائه تعداد کمی خدمات آزمایشگاهی تا یک آزمایشگاه بزرگ با خدمات متنوع اپیدمیولوژیکی، مطالعات مربوط به بررسی مقاومت دارویی و دیگر فعالیت‌های موجود دراین زمینه مشاهده کرد. برای اطمینان از اینکه کارکنان آزمایشگاه دارای مواد مناسب، لام‌های تمیز و بسته‌بندی شده و رنگ مناسب و دیگر فرآورده‌های مورد نیاز با کیفیت هستند، اغلب از منابع مرکزی اقدام به تهیه و تدارک آن می‌شود. اگرچه در مناطق روستایی کارکنان آزمایشگاه باید خود اقدام به شستن لام‌های خود بنمایند، درچنین شرایطی وجود یک مرکز خرید قابل اعتماد لازم است تا لام‌ها را پیش از تحویل به صورت آماده، تمیز و بسته‌بندی شده تحویل دهد. درچنین وضعیتی کیفیت کار به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش خواهد یافت چرا که دسترسی به حجم زیادی از لام‌های مورد نیاز و با کیفیت برای فعالیت آزمایشگاه‌های دور از دسترس امکان پذیر می‌شود.

تمیز کردن درمورد بسته‌های کوچک لام بهتر انجام می‌شود.

۳. مواد، تدارکات و تجهیزات

- لام‌های شیشه‌ای نو با کیفیت عالی و انتهای مشجر
- دو تشت یا ظرف پلاستیکی با سایز متوسط
- یک مایع شوینده با کیفیت خوب
- پارچه مخصوص شستشو یا اسفنج نرم
- نمونه‌ای ازپارچه پنبه‌ای تمیز و فاقد کرک (نمونه‌ای از آنچه که برای خشک کردن ظروف سفال و شیشه‌ای استفاده می‌شود)
- مقداری آب تمیز
- برگه‌های کاغذ تمیز به ابعاد تقریبی ۱۱ cm × ۱۵ cm
- جعبه خالی لام از نوعی که درآن لام‌های جدید چیده شده
- نوارچسب تمیز
- نوار لاستیکی
- یک گنجه، کابینت یا دستگاه خشک ساز با ژل سلیکای فعال شده (فاقد کلرید کبالت باشد).

۴. هشدارهای ایمنی

برای پیشگیری از خراشیدگی اتفاقی اندام‌ها یا آسیب ناشی از لام‌های شیشه‌ای، درحین شستشو، دستکش بپوشید. هرگونه لام شکسته را در ظرف مخصوص اجسام تیز بیاندازید.

۵. روش اجرا

شرح فعالیت	نمودار اجرا
۱. لام‌های جدید را از یکدیگر جدا کرده و آنها را به مدت ۸-۴ ساعت یا درصورت صلاحدید برای یک شب دریک مایع شوینده قرار دهید. اگر ممکن باشد لام‌ها را پیش از آنکه در مایع شوینده غوطه ور کنید برای مدت ۳۰ دقیقه بجوشانید. ۲. بعد از غوطه ورکردن، هر دو طرف لام را تمیز کنید. این کار را با گرفتن لبه لام بین انگشتان و شصت و با کشیدن هردو سمتشان برروی پارچه شستشو یا اسفنج تمیز انجام دهید . ۳. هنگامی که لام‌ها تمیز شدند، آنها را جهت حذف مقادیر اندک باقی مانده مایع شوینده دوبار با آب تمیز بشویید. ۴. هر لام را با یک پارچه پنبه‌ای تمیز خشک کنید. لام‌های لب پریده یا خراشیده، برای میکروسکوپی مالاریا مناسب نبوده و بایستی دور انداخته شود. از این لام‌ها برای مقاصد دیگر در آزمایشگاه می‌توان استفاده کرد، برای مثال، برای رنگ آمیزی گیمسا در بخش خون شناسی ۵. لام‌های خشک شده را در بسته های۱۰تایی و درکاغذ تمیز بپیچید. انتهای بسته لام را به سمت پایین برگردانید، باپیچاندن یک نوارچسب تمیز به دور آن، محفوظ کنید، و بسته را آماده برای مصرف در جعبه خالی لام قرار دهید. جعبه را با بستن یک نوار پلاستیکی به دور آن محفوظ کنید. ۶.چنانچه لام‌ها بلافاصله مورد استفاده قرار نمی گیرند مقداری ژل سیلیکا در داخل جعبه قراردهید. ۷. برای ثبت مستندات کنترل کیفیت(QC)، ازیک ماژیک مارکر برای برچسب‌نویسی جعبه‌ها با تاریخ، شماره جعبه، تعداد لام در هر جعبه و نام یا حروف اول نام افرادی که لام‌ها را تمیز کرده‌اند، شبیه آنچه که درزیر آمده استفاده کنید، و در دفتر عملکرد روزانه کنترل کیفیت ثبت کنید. مثال تمیز شده ۱۴ تیرماه ۱۳۹۶ ۱ از ۵۰ - ۵ نام و نام خانوادگی(یا حروف نام) ۸. لام‌های تمیز و چیده شده در جعبه را در یک گنجه یا کابیت کوچک قرار دهید یا در صورت امکان در یک جعبه خشک‌کننده (بویژه در شرایط آب و هوای مرطوب) نگهداری کنید تامطمئن شوید که تا زمان استفاده خشک باقی می‌ماند. لام‌هایی که در دمای اتاق و در شرایط رطوبت بالا باقی می‌مانند بعد از چند هفته به یکدیگر می‌چسبند و قابل استفاده نبوده مگر آنکه دوباره شستشه و خشک شوند.	۱. لام‌های جدید را برای مدت ۸-۴ ساعت در یک مایع شوینده غوطه ور کنید. ↓ ۲. لام‌ها را با پارچه یا اسفنج، تمیز کنید. ↓ ۳. لام‌ها را دوبار با آب تمیز بشوئید. ↓ ۴. با دقت لام‌ها را خشک کنید. ↓ ۵. لام هارا در کاغذ تمیز بپیچید و در یک جعبه قرار دهید. ↓ ۶. برای ذخیره سازی‌های طولانی مدت، ژل سیلیکا در داخل جعبه قرار دهید. ↓ ۷. جعبه را به عنوان تمیز شده، برچسب گذاری کنید و روش را در در دفتر عملکرد روزانه کنترل کیفیت بنویسید. ↓ ۸. جعبه را داخل کابینت یا خشک کننده، ذخیره کنید.

۶. نکات

- از لام‌ها استفاده مجدد نکنید.
- لام‌های لب پریده یا خراشیده را دور بریزید.
- هنگام استفاده از لام‌های تمیز شده، از آنهایی استفاده کنید که جزء اولین سری تمیز شده هستند نه آنهایی که اخیرا تمیز شده‌اند.

۷. تذکرات

درشرایط آب و هوای گرم و مرطوب، قارچ‌ها خیلی سریع برروی لام‌های شیشه ای، عدسی‌های میکروسکوپ و منشورها رشد می‌کنند. مگر اینکه با نگهداری لام‌ها در محیط خشک از رشد قارچ جلوگیری کنید، درغیر این صورت تفسیر دقیق گسترش‌های خونی مشکل و گاهی حتی غیر ممکن می‌شود.

۸. کنترل کیفیت و مستند سازی

در دفتر عملکرد کنترل کیفیت، اطلاعات را به شکل زیر ثبت کنید:

تاریخ شستشو	تعداد جعبه	تعداد لام درهر جعبه	نام وامضای فرد تمیز کننده
روز/ماه/سال	۵	۵۰	نام، نام خانوادگی امضا

۹. منابع

WHO . اصول میکروسکوپی مالاریا. بخش۱. راهنمای آموزش گیرندگان. چاپ دوم.ژنو: 2010

۱۰. سوابق مستند

تاریخ ماه/سال	ویرایش	توضیحات	فرد مسئول (نام، نام خانوادگی)
۱۳۹۶/۴/۱۴	۲	بازبینی و ویرایش فارسی	اعضای تیم تدوین‌کننده SOP ۱. دکتر عباس شهبازی ۲. مهندس مسعود یریان ۳. علیرضا صادقی ۴. علی حافظی ۵. فیروزه گوشه

آماده‌سازی محلول ذخیره گیمسا

روش اجرایی استاندارد میکروسکوپی مالاریا MM-SOP-02

۱. هدف

شرح جزییات روش آماده‌سازی محلول ذخیره رنگ گیمسا برای رنگ آمیزی روزانه گسترش‌های نازک و ضخیم مالاریا

این روش تنها با تایید یک هماهنگ‌کننده کشوری مسئول تضمین کیفیت میکروسکوپی مالاریا قابل تغییر است. تمام روش‌های تخصصی توصیف شده، برای همه میکروسکوپیست‌های مالاریا درآزمایشگاه‌های مرجع کشوری، آزمایشگاه‌های بیمارستانی یا آزمایشگاه‌های بهداشتی ارائه‌دهنده خدمات سلامت مجری برنامه میکروسکوپی مالاریا، اجباری است.

۲. مقدمه

رنگ گیمسا رایج‌ترین رنگ مورد استفاده در رنگ آمیزی گسترش‌های خونی جهت تشخیص مالاریا است. این رنگ به عنوان یک محصول تجاری و آماده مصرف در دسترس می‌باشد، اما کیفیت آن بسته به منبع تهیه آن متنوع است. برای اطمینان از تداوم کیفیت این رنگ و استاندارد بودن محصول، می‌توان آن را از آزمایشگاه مرجع مسئول برنامه کشوری مالاریا تهیه و در اختیار بیمارستان یا آزمایشگاه‌های مراکز بهداشتی مجری برنامه میکروسکوپی مالاریا قرار داد. چنانچه اصول و قوانین ساده‌ای را درهنگام تهیه رنگ ذخیره گیمسا مد نظر قرار دهیم، رنگ تهیه شده در سطح کشوری یا استانی ممکن است حتی نسبت به رنگ تجاری از کیفیت بهتری برخوردار باشد.

۳. مواد، تدارکات و تجهیزات

مواد مورد نیاز برای ساختن ml ۵۰۰ رنگ گیمسا عبارتند از:

- پودر یا رنگ گیمسا، gr ۳/۸ (ترجیحاً دارای درجه رنگ از کمیته تاییدکننده مواد بیولوژیک، جهت اطمینان از اینکه رنگ با کیفیت و استاندارد در دسترس است).
- متانول مطلق، خالص، با درجه عالی، فاقد استون، ml ۲۵۰
- گلیسرول، با درجه عالی، خالص، ml ۲۵۰
- تعدادی مهره شیشه‌ای شسته شده با متانول، قطر mm ۵-۳، ۱۰۰ - ۵۰ عدد
- یک آبسلانگ یا قاشق مدرج.
- کاغذ توزین
- استوانه مدرج
- قیف پلاستیکی یا شیشه‌ای
- یک بطری شیشه‌ای درب پیچ دار تیره یا کهربایی، تمیز و خشک، با ظرفیت ml ۵۰۰ (چنانچه موجود نبود، یک بطری شیشه‌ای محکم عاری از مواد شیمیایی، خشک و تمیز یا بطری پلی اتیلینی با سایز مناسب را می‌توان استفاده نمود به شرطی که دور آن را با کاغذ تیره بپوشانید).
- ترازوی دیجیتال با قدرت توزین تا gr۰/۰۱
- یک همزن، چنانچه موجود باشد.

۴. هشدارهای ایمنی

متانول و رنگ گیمسا قابل اشتعال بوده و چنانچه بلعیده یا تنفس شوند به شدت سمی هستند. از تماس و استنشاق بخارات آن خودداری کنید. در هنگام عدم استفاده، بایستی آن را در کابینت یا گنجه درب بسته نگهداری کنید.

مراقبت‌های عمومی – شامل استفاده از ابزارهای حفاظت پرسنلی نظیر دستکش، عینک ایمنی، ماسک و گان یا روپوش آزمایشگاهی را بایستی به کار گرفت.(MM-SOP-11 را ببینید: روش‌های ایمنی عمومی در آزمایشگاه میکروسکوپی مالاریا).

۵. روش اجرا

شرح فعالیت	نمودار اجرا
۱. حدود ۵۰ عدد مهره شیشه‌ای شسته شده با متانول را درون یک بطری تیره یا کهربایی قرار دهید. ۲. مقدار ۳/۸ g از پودر گیمسا را برروی یک کاغذ و با یک ترازوی دیجیتال وزن کنید، و بایک قیف به درون بطری بریزید. ۳. به آرامی ۱۰۰ mlمتانول به آن اضافه کنید، مطمئن شوید که تمام رنگ خشک درون قیف به داخل بطری شسته می‌شود. ۴. درب بطری را محکم ببندید و بایک حرکت دورانی برای مدت ۳-۲ دقیقه بچرخانید تا کریستال‌های رنگ شروع به حل شدن کند. ۵. مقدار۲۵۰ ml گلیسرول را با قیف به مخلوط اضافه کنید، و مجدداً برای ۵-۳ دقیقه بچرخانید. ۶. ۱۵۰ ml باقی مانده متانول را به مخلوط رنگ اضافه کنید، مطمئن شوید که این مقدار متانول، مقدار باقی مانده گلیسرول برسطح قیف را به درون مخلوط رنگ تخلیه می‌کند. ۷.درب بطری را محکم ببندید. ۸. عمل چرخاندن را برای روز اول حدود ۶ بار و هربار برای مدت ۳-۲ دقیقه ادامه دهید. ۹. به مدت حداقل یک هفته و هروز حدود ۶ بار و هربار برای مدت ۳-۲ دقیقه بطری محتوی مخلوط رنگ را بچرخانید. چنانچه شیکر موجود باشد می‌توانید از آن استفاده کنید. ۱۰.بطری رنگ ذخیره را به وضوح با شماره سری ساخت برچسب نویسی کنید، نام فردی که محلول ذخیره را آماده کرده، تاریخ تهیه و تاریخ انقضاء را در دفتر عملکرد کنترل کیفیت ثبت کنید. محلول ذخیره رنگ گیمسا شماره بسته: ۰۱-۱۳۹۶ تهیه کننده: نام، نام خانوادگی تاریخ تهیه:۱۴ تیرماه ۱۳۹۶ تاریخ انقضاء: ۱۴ تیرماه ۱۳۹۸ ۰۱-۱۳۹۶ بیانگر سال تهیه و شماره ذخیره است ۱۱. درب پیچ دار بطری را، پیش ازجذب بخار آب از هوا محکم ببندید، و در محیط خنک و دور از نور نگهداری کنید.	۱. حدود ۵۰ مهره در داخل بطری قرار دهید. ↓ ۲. مقدار۳/۸ گرم از پودر گیمسا را وزن کنید و درون بطری بریزید. ↓ ۳. ۱۰۰ ml از متانول را به آرامی درون بطری بریزید. ↓ ۴. درب بطری را محکم ببندید، و برای مدت ۳-۲ دقیقه به شکل دورانی بچرخانید. ↓ ۵. ۲۵۰ ml گلیسرول را به مخلوط اضافه کنید، و برای ۳-۲ دقیقه بچرخانید. ↓ ۶. ۱۵۰ mlباقی مانده متانول را اضافه کنید. ↓ ۷. درب پیچ دار بطری را محکم ببندید. ↓ ۸. عمل چرخاندن برای روز اول را به تعداد ۶ بار و هربار به مدت ۳-۲ دقیقه انجام دهید. ↓ ۹. به مدت ۷ روز هرروز بچرخانید ↓ ۱۰. اطلاعات را به طور واضح روی بطری بنویسید، و در دفتر عملکرد کنترل کیفیت ثبت کنید. ↓ ۱۱. درب بطری را محکم ببندید و درجای خنک و دور از نور مستقیم خورشید نگهداری کنید.

۶. نکات

درتمام اوقات باید درب بطری محکم بسته باشد تا از جذب بخار آب، تبخیر و اکسیداسیون رنگ توسط رطوبت زیاد پیشگیری شود. چنانچه درب بطری با چوپ پنبه محکم شود رنگ گیمسای ذخیره ساخته شده، از رطوبت حفظ شده و تا مدت طولانی تری در دمای اتاق پایدار می‌ماند.

رنگ ذخیره ساخته شده را در یک شیشه تیره، در شرایط خشک و خنک، در سایه و به دور از نورمستقیم خورشید نگهداری کنید. چنانچه از یک شیشه شفاف برای ذخیره‌سازی استفاده می‌کنید، برای جلوگیری از نفوذ نور یک کاغذ ضخیم تیره به دور آن بپیچید.

برای جلوگیری از معلق شدن دوباره ذرات رسوب یافته رنگ، بطری را برای مدت حداقل ۲۴ ساعت قبل از استفاده تکان ندهید. چراکه درحین رنگ آمیزی، این ذرات برروی گسترش‌ها رسوب کرده و باعث محو شدن جزئیات مهم در حین بررسی میکروسکوپی می‌شود.

محلول رنگ ذخیره گیمسا را با آب آلوده نکنید زیرا کمترین مقدار آب هم می‌تواند باعث تخریب رنگ شده و به طور فزاینده‌ای رنگ آمیزی را نامطلوب کند.

متناسب با نیاز روزانه مقادیر کمی از رنگ را هرروز فیلتر کنید و در ظرف درب بسته ای(ml ۵۰-۲۵) نگهداری کنید، زیرا با این کار احتمال آلودگی رنگ ذخیره کم می‌شود.

از پیپت مرطوب برای برداشتن رنگ ذخیره استفاده نکنید یا آن را درون رنگ قرار ندهید.

رنگ استفاده نشده یا مازاد مصرف را به درون بطری ذخیره رنگ یا به درون ظرف حاوی رنگ رقیق شده آماده مصرف برنگردانید، رنگی که از ظرف خارج شد باید سریعا استفاده و یا در صورت عدم استفاده دور ریخته شود.

۷. کنترل کیفیت و مستند سازی

یک برنامه کنترل کیفیت برای هریک از موارد زیر اجرا کنید:

برای هرسری یا هر شماره‌ای از محلول ذخیره تهیه شده.

پیش از استفاده از رنگ ذخیره به عنوان محلول رنگ رقیق شده آماده مصرف.

پیش از ارسال رنگ ذخیره برای استفاده سایر آزمایشگاه ها.

درحین کار، یا بعد از دریافت رنگ ذخیره از آزمایشگاه مرجع کشوری.

اطلاعات را در دفتر عملکرد کنترل کیفیت ثبت کنید.(MM-SOP 3c را ببینید: کنترل کیفیت محلول ذخیره گیمسا و آب بافر، برای رنگ آمیزی روزمره گسترش‌های خونی).

۸. SOPهای مرتبط

MM-SOP 3c: کنترل کیفیت محلول ذخیره گیمسا و آب بافر

MM-SOP-04: تهیه رنگ گیمسای رقیق شده آماده مصرف

۹. منابع

روش‌های اجرایی استاندارد برای میکروسکوپی مالاریا با رنگ گیمسا از Story J ۲۰۱۲(منتشر نشده).

WHO. اصول میکروسکوپی مالاریا. بخش ۱. راهنمای آموزش گیرندگان. ژنو۲۰۱۰

مراکز کنترل و پیشگیری از بیماریها. تشخیص آزمایشگاهی مالاریا. رنگ آمیزی انگل‌های مالاریا. آتلانتا، جورجیا:۲۰۱۳ (http://www.cdc.gov/dpdx/resources/pdf/benchAids/malaria/malaria_staining_benchaid.pdf, accessed 14 December 2015).

۱۰. سوابق مستند

تاریخ (ماه/ سال)	ویرایش	توضیحات	فرد مسئول (نام ونام خانوادگی)
۱۳۹۶/۴/۱۴	۲	بازبینی و ویرایش فارسی	اعضای کمیته تدوین‌کننده SOP دکتر عباس شهبازی مهندس مسعود یریان علیرضا صادقی علی حافظی فیروزه گوشه

تهیه آب بافر با PH= ۷/۲

روش اجرایی استاندارد میکروسکوپی مالاریا M-SOP-03A

۱. هدف

توضیح روش آماده‌سازی آب بافر با PH = ۷/۲ جهت استفاده درتهیه محلول رقیق شده آماده مصرف رنگ گیمسا برای رنگ آمیزی گسترش‌های خونی مالاریا.

این روش تنها با تایید یک هماهنگ‌کننده کشوری مسئول تضمین کیفیت میکروسکوپی مالاریا قابل تغییر است. تمام روش‌ها برای همه میکروسکوپیست‌های مالاریا درآزمایشگاه‌های مرجع کشوری، آزمایشگاه‌های بیمارستانی یا آزمایشگاههای بهداشتی ارائه‌دهنده خدمات سلامت مجری برنامه میکروسکوپی مالاریا، اجباری است.

۲. مقدمه

انگل‌های مالاریا با یک رنگ آمیزی صحیح، در زیر میکروسکوپ به وضوح قابل رویت هستند. آب بافر جهت رقیق‌سازی رنگ بایستی پیش از رنگ آمیزی آماده شود. استفاده از آب بافر با PH مناسب تضمین‌کننده یک رنگ آمیزی خوب است.

این SOP دارای سه جزء است:

- تهیه آب بافر با PH= ۷/۲
- تهیه مایع تصحیح کننده۲٪
- چک کردن و تنظیم PH آب بافر

PH نشان‌دهنده میزان اسیدی یا قلیایی بودن یک مایع است. PH براساس یک درجه بندی، از عدد صفر (خیلی اسیدی) تا ۱۴ (خیلی قلیایی) می‌باشد. محلول‌هایی که نه اسیدی هستند و نه قلیایی به عنوان خنثی و با PH= ۷ تعریف می‌شوند. PH یک محلول را می‌توان با PH متر یا نشانگر رنگی نظیر مقایسه گر لاوی باند اندازه گرفت. از نوار نشانگر کاغذی نیز می‌توان استفاده کرد. اما این نوارها به سرعت تحت تاثیر رطوبت غیرقابل اعتماد می‌شوند.

برنامه کشوری حذف مالاریا ممکن است انواعی از PH مترها یا نشانگرها را توصیه کند.کارکنان آزمایشگاه‌ها باید نحوه استفاده ازهرکدام از آن‌ها را که درآزمایشگاه خود دارند بیاموزند.

دراین SOP استفاده ازمقایسه گر لاوی باند جهت اندازه گیری PH آب بافر توضیح داده شده است.

آب را می‌توان با اضافه کردن بافرهای نمکی، اسیدی تر یا قلیایی تر نمود. این بافرهای نمکی را می‌توان جداگانه نگهداری نمود و در زمان لزوم با حجم‌های مشخص برای به دست آورن یک PH معین بایکدیگر مخلوط نمود.وزن بافرهای نمکی باید متناسب با یکدیگر باشد. باید مطمئن شد که این بافرها به طور صحیح نگهداری شده و رطوبت جذب نکرده اند، در غیر این صورت کارایی لازم را ندارند.

قرص‌های طراحی شده (قرص‌های بافری) به شکل تجاری در دسترس بوده و زمانی که با مقدار مشخصی از آب (۱لیتر) مخلوط شوند دارای PH معینی می‌شوند. قرص‌های بافری وزن نمی شوند و در آزمایشگاه‌های دارای امکانات محدود، قابل استفاده هستند. یک SOP جداگانه (MM-SOP-03P) برای آزمایشگاه‌های استفاده‌کننده از قرص بافر تهیه شده است. قرص‌ها باید به دور از هوا و در شرایط خشک نگهداری شوند درغیر این صورت سریعا آب جذب نموده و غیر قابل مصرف می‌شوند. برخی ازکارکنان آزمایشگاه‌ها نتایج حاصل از رنگ آمیزی با استفاده از آب بافر ساخته شده با قرص بافر را نامعتبر می‌دانند درحالی که شواهدی دال بر تایید این نظریه وجود ندارد.

۳. مواد، تدارکات و تجهیزات

۳-۱- تهیه آب بافر با PH= ۷/۲

- ترازوئی با دقتی در حد ۰/۰۱ gr (یک ترازوی دو کفه‌ای عالی است) ترازوهای دیجیتالی تک کفه‌ای نیز قابل استفاده و مناسب است.
- کاغذ صافی دایره‌ای با قطر ۱۱ سانتی متر
- فلاسک استوانه‌ای شیشه‌ای با ظرفیت ۱ لیتر

- بشر شیشه‌ای با ظرفیت ۲۵۰ میلی لیتر
- آبسلانگ
- آب مقطر یا آب دیونیزه (۱ لیتر)
- پتاسیم دی هیدروژن فسفات (بدون آب) KH2PO4
- دی سدیم هیدروژن فسفات(بدون آب) Na2HpO4
- کاغذ لیبل و ظرف شیشه‌ای درب پیچ دار تمیز و خشک با ظرفیت ۱ لیتر یا ۵۰۰ میلی لیتر

۳-۲- تهیه مایع تصحیح‌کننده با غلظت ۲٪

- ترازوی دیجیتالی با دقت وزن gr ۰/۰۱ یا با دقت بالاتر (یک ترازوی دو کفه‌ای متعادل یا ترازوی دیجیتالی تک کفه‌ای متعادل)
- کاغذ صافی دایره‌ای با قطر ۱۱سانتی متر
- دو ظرف شیشه‌ای درب چوب پنبه‌ای با ظرفیت‌های ۱۰۰یا ۱۵۰ میلی لیتری
- پتاسیم دی هیدروژن فسفات (بدون آب) KH2PO4
- دی سدیم هیدروژن فسفات (بدون آب) Na2HpO4
- آب مقطر یا دیونیزه حدود ۲۰۰ میلی لیتر
- آبسلانگ
- دو بشر با ظرفیت ۲۵۰ میلی لیتر
- یک استوانه مدرج با ظرفیت ۱۰۰میلی لیتر و
- کاغذ لیبل

۳-۳- چک کردن و تنظیم PH آب بافر

- آب بافر تهیه شده
- دو ظرف حاوی مایع تصحیح‌کننده و
- یک PH متر(PH متر پرتابل یا دستی) یا نشانگر رنگی PH و اجزاء مرتبط با آن

چنانچه شما از مقایسه گر لاوی باند استفاده می‌کنید نیاز خواهید داشت به:

- ۲ سلول شیشه‌ای نشانگر رنگ PH
- یک ظرف محتوی نشانگر برومو تیمول بلو و
- یک پیپت مدرج ۱ میلی لیتری

۴. روش اجرا

توضیح فعالیت	نمودار مراحل
۴-۱- تهیه آب بافر با PH= ۷/۲	***۴-۱- تهیه آب بافر با PH= ۷/۲***
۱. بایک ترازوی دو کفه‌ای مقدار ۰/۷گرم از پتاسیم دی هیدروژن فسفات را وزن کنید. مطمئن شوید که اشاره گر ترازو دقیقا در نقطه صفر قرار گیرد این کار را با تنظیم پیچ ترازو روی بازوی راست انجام دهید. یک کاغذ صافی درهردو کفه قراردهید.مجددا تعادل را روی صفر تنظیم کنید این بار با حرکت دادن نشانگر وزنی ترازو در امتداد بازوی مدرج ترازو این عمل را انجام دهید، نشانگر وزنی ترازو را تا عدد ۰/۷ گرم، روی بازوی مدرج پیش ببرید. اکنون ترازو آماده است با یک قاشق چوبی(آبسلانگ) مقداری KH2PO4 روی کاغذ صافی کفه چپ بگذارید تا زمانی که به عدد۷/.گرم برسد.	۱. مقدار ۰/۷ گرم از پتاسیم دی هیدروژن فسفات (KH2PO4) راوزن کنید.
۲. KH2PO4 وزن شده را دریک بشر شیشه‌ای بریزید و ml ۱۵۰ آب مقطر اضافه کنید به هم بزنید تا نمک کاملا حل شود	۲. KH2PO4 وزن شده را به بشر شیشه‌ای منتقل و ml ۱۵۰ آب مقطر اضافه کنید. تا حل شدن کامل آن به هم بزنید.
۳. مقدار ۱گرم Na2HpO4 وزن کنید یک کاغذ صافی تمیز و تازه را درکفه چپ قرار دهید عمل بالانس کردن ترازو را مانند قبل انجام دهید. اما این بار نشانگر وزنی را روی عدد۱ تنظیم کنید.با استفاده از یک آبسلانگ تمیز مقداری Na2HpO4 را درکفه سمت راست بریزید و وزن را مشابه آنچه که در بالا گفته شد متعادل کنید.	۳. معادل ۱گرم دی سدیم هیدروژن فسفات (Na2HpO4) وزن کنید.
۴. Na2HpO4 را به محلول بشر اضافه کرده و مانند مرحله ۲ به هم بزنید.	۴. Na2HpO4 را به محلول داخل بشر اضافه کرده وکاملا به هم بزنید.
۵. زمانی که نمک‌ها حل شدند این محلول را به یک فلاسک مخروطی منتقل وحجم رابه ۱ لیتر برسانید.	۵. محلول رابه یک فلاسک شیشه‌ای مخروطی وارد کرده و حجم رابا آب مقطر به علامت ۱ لیتر برسانید.
۶. آب بافر رابه یک ظرف شیشه‌ای منتقل کنید.سپس به وضوح اطلاعات مربوط به تاریخ تهیه، تاریخ انقضاء ونام تهیه‌کننده رابراساس دستور العمل کنترل کیفیت وارد کنید. آب بافر با PH= ۷/۲ تهیه کننده: نام کوچک نام بزرگ تاریخ تهیه: ۱۴تیرماه ۱۳۹۶ تاریخ انقضاء: ۲۴ تیرماه ۱۳۹۶	۶. آب بافر را در یک ظرف شیشه‌ای بریزید. براساس دستورالعمل کنترل کیفیت آنرا لیبل کنید.
۷. آب بافر را برای ۷روز با درب محکم بسته شده، در شرایط خنک و به دور از نور خورشید نگه دارید. توصیه می‌شود از یک ظرف تیره یا قهوه‌ای استفاده کنید.	۷. آب بافر را درجای خنک و به دور از نور مستقیم خورشید نگه دارید.

شرح فعالیت	نمودار مراحل
۴-۲-۱- تهیه Na2HpO4 ۲٪.	***۴-۲-۱- تهیه Na2HpO4 ۲٪.***
۱.مقدار ۲ گرم از Na2HpO4 را وزن کنید.	۱. مقدار ۲ گرم Na2HpO4 وزن کنید.
۲. آن را در یک بشر تمیز ریخته و ml ۱۰۰ آب مقطر اضافه کرده و به هم بزنید تا کاملا حل شود.	۲. آن را در یک بشر با ۱۰۰ml آب به هم بزنید تا کاملا حل شود.
۳. محلول را در یک ظرف شیشه‌ای ریخته وبه عنوان محلول Na2HpO4 ۲٪ لیبل کنید. نام تهیه‌کننده و تاریخ تهیه مایع تصحیح‌کننده را روی لیبل بنویسید.	۳. محلول را به یک ظرف شیشه‌ای منتقل کرده و آن را لیبل کنید.
۴. ظرف حاوی محلول Na2HpO4 ۲ ٪ را در جای خنک ودور از نور مستقیم خورشید نگهدارید.	۴. ظرف را درجای خنک و دور از نور خورشید نگهداری کنید.
۴-۲-۲- تهیه KH2PO4 ۲٪.	***۴-۲-۲- تهیه KH2PO4 ۲٪.***
۱. مقدار ۲ گرم از KH2PO4 را وزن کنید.	۱. مقدار ۲ گرم KH2PO4 وزن کنید.
۲. آن را در یک بشر تمیز ریخته و ml ۱۰۰ آب مقطر اضافه کرده و به هم بزنید تا کاملا حل شود.	۲. آن را در یک بشر با ۱۰۰ml آب به هم بزنید تا کاملا حل شود.
۳. محلول را در یک ظرف شیشه‌ای ریخته و به عنوان محلول KH2PO4 % ۲ لیبل کنید.تاریخ تهیه و نام تهیه‌کننده مایع تصحیح‌کننده را روی لیبل بنویسید.	۳. محلول را به یک ظرف شیشه‌ای منتقل کرده وآن را لیبل کنید.
۴. ظرف حاوی محلول KH2PO4 % ۲ را در جای خنک و دور از نور مستقیم خورشید نگهدارید.	۴. ظرف را درجای خنک و دور از نور خورشید نگهداری کنید.

شرح فعالیت	نمودار مراحل
۴-۳. چک کردن و تنظیم PH آب بافر	***۴-۳. چک کردن و تنظیم PH آب بافر***
قبل از هربار استفاده، PH آب بافر را چک کنید. برای تنظیم PH مقادیر کمی از مایع تصحیح‌کننده را به آب بافر اضافه کنید: چنانچه PH کمتراز ۷/۲ (خیلی اسیدی) باشد از ۲٪Na2HpO4 یا چنانچه PH بالاتر ۷/۲ باشد (خیلی قلیایی) از KH2PO4 ٪۲ استفاده می‌کنیم. تنظیم می‌تواند براساس مراحل زیر باشد. این مراحل براساس مقایسه گر لاوی باند، در اندازه گیری PH است.	این مراحل روش استفاده از مقایسه گر لاوی باند، در اندازه گیری PH است.
۱. مقداری ازآب بافر را به هر حفره شیشه‌ای نشانگر رنگی PH تا سطح عدد ۱۰ml اضافه کنید.	۱. مقداری ازآب بافر را به هر حفره شیشه‌ای نشانگر رنگی PH تا سطح عدد ۱۰ml اضافه کنید.
۲. یک حفره را در سمت چپ مقایسه گر نشانگر رنگی PH ، به عنوان حفره کنترل در نظر بگیرید.	۲. یک حفره در سمت چپ مقایسه گر نشانگر رنگی PH را به عنوان حفره کنترل در نظر بگیرید.
۳. مقدار۰/۵ ml از نشانگر برمو تیمول بلو را به حفره دیگر اضافه کرده، مخلوط کنید و حفره را درسمت راست مقایسه گر قرار دهید	۳. مقدار۰/۵ ml از نشانگر برمو تیمول بلو را به حفره دیگر اضافه کرده، مخلوط کنید و حفره را درسمت راست مقایسه گر قرار دهید.
۴. نشانگر رنگی PH را به حالت روشن شفاف نگهدارید، پس زمینه سفید دیسک را بچرخانید تا زمانی که رنگ آن با رنگی که در خانه سمت راست است یکسان شود.	۴. دیسک را بچرخانید تا زمانی که رنگ آن با رنگ حفره سمت راست یکسان شود.
۵. PH آب بافر موجود در فلاسک شیشه‌ای را با اضافه کردن ۲ یا ۳ قطره از مایع تصحیح‌کننده مناسب تنظیم کنید: Na2HpO4 برای قلیایی کردن PH و KH2PO4 برای اسیدی کردن PH. اضافه کنید.	۵. با اضافه کردن قطراتی از مایع تصحیح‌کننده مناسب به آب بافر ذخیره در فلاسک شیشه ای، PH را تنظیم کنید.
۶. PH آب بافر را باتکرار مراحل ۱ الی ۵ چک کنید. این مراحل را تا زمان رسیدن به PH صحیح ۷/۲ ادامه دهید.	۶.. ظرف محتوی آب بافر را درجای خنک و دور از نور خورشید نگهدارید.

۵. نکات

- انواع مختلفی از PH متر وجود دارند. به کارکنان آزمایشگاه توصیه می‌شود نحوه کار با PH متری را که در آزمایشگاه خود دارند، یاد بگیرند.
- بهتر است آب بافر را درجای خنک و دوراز نور مستقیم خورشید نگه دارید. توصیه می‌شود برای جلوگیری از رشد باکتری وقارچ و جلبک از یک ظرف تیره یا یک ظرف شفاف شیشه‌ای پیچیده در کاغذ قهوه‌ای استفاده کنید.
- بافر را دائما از نظر آلودگی چک کنید.
- برای جلوگیری از تغییر PH و آلودگی، بافر را بیش از ۷روز نگهداری نکنید.
- PH آب بافر را قبل از هربار استفاده چک کنید و در دفتر Log -book یاداشت نمایید.

۶. کنترل کیفیت ومستند سازی.

- بر روی هر سری از آب بافر ساخته شده و همچنین پیش از هربار استفاده، برنامه کنترل کیفیت را اجرا کنید و اطلاعات را در دفتر Log-book ثبت کنید.(MM-SOP 3c را ببینید: برنامه کنترل کیفیت محلول ذخیره رنگ گیمسا و آب بافر).

۷. SOP مرتبط

- MM-SOP 3c را ببینید: برنامه کنترل کیفیت محلول ذخیره رنگ گیمسا و آب بافر

۸. منابع

- WHO. اساس میکروسکوپی مالاریا. بخش ۱. راهنمای آموزش. چاپ دوم. ژنو:۲۰۱۰

۹. سوابق مستند

تاریخ (روز/ماه/ سال)	ویرایش	یاداشت	فرد مسئول (نام و نام خانوادگی)
۱۳۹۶/۰۴/۱۴	۲	بازبینی شده و ویرایش فارسی	اعضای کمیته تدوین SOP ۱.دکتر عباس شهبازی ۲.مهندس مسعود یریان ۳. علیرضا صادقی ۴. علی حافظی ۵. فیروزه گوشه

تهیه آب بافربا ۷/۲= PH با استفاده از قرص‌های بافری

روش اجرایی استاندارد میکروسکوپی مالاریا MM-SOP-03B

۱. هدف

توضیح جزئیات روش آماده‌سازی آب بافر ۷/۲ =PH با استفاده از قرص بافر برای استفاده درتهیه محلول رقیق شده رنگ گیمسا جهت رنگ آمیزی روزانه گسترش‌های خونی مالاریا.

این روش تنها با تایید یک هماهنگ‌کننده کشوری مسئول تضمین کیفیت میکروسکوپی مالاریا قابل تغییر است. تمام روش‌های تخصصی توصیف شده برای همه کارکنان میکروسکوپیست مالاریا درآزمایشگاههای مرجع کشوری،آزمایشگاه‌های بیمارستانی یا آزمایشگاه‌های بهداشتی ارائه‌دهنده خدمات سلامت مجری برنامه میکروسکوپی مالاریا، اجباری است.

۲.مقدمه

انگل‌های مالاریا را در صورت رنگ آمیزی مناسب به وضوح در زیر میکروسکوپ می‌توان دید. کیفیت رنگ آمیزی شدیدا وابسته به PH محلول رنگ رقیق شده آماده مصرف می‌باشد. استفاده از آب بافر با PH صحیح (۷/۲) برای رقیق‌سازی رنگ ذخیره به تضمین کیفیت رنگ آمیزی و تشخیص دقیق ویژگی‌های خاص انگل‌های مالاریا کمک می‌کند. آب بافر را بایستی پیش از رنگ آمیزی گسترش‌ها تهیه و از نظر کنترل کیفیت مورد ارزیابی قرار داد.

PH معیاری از میزان اسیدیته یا بازیته یک مایع است. این برپایه درجه‌ای از نزدیک به صفر (خیلی اسیدی) تا ۱۴ (خیلی بازی) می‌باشد. مایعاتی که نه اسیدی هستند ونه قلیایی به عنوان خنثی با PH=۷ شناخته می‌شوند. PH یک مایع را می‌توان با PH متر یا بایک نشانگر رنگی PH، مانند مقیاس گر لاوی باند اندازه گرفت. نوار نشانگر کاغذی را همچنین می‌توان استفاده کرد، اما این نوارها خیلی سریع تحت تاثیر رطوبت قرار گرفته و نتایج آنها غیر قابل اعتماد می‌شود.

دراین مستند، استفاده از قرص‌های بافری تجاری را که درصورت حل شدن در مقدار معینی از آب مقطر (معمولا ۱ لیتر) PH خاصی را نشان می‌دهند توضیح داده شده است. قرص‌های بافری معمولا وزن نشده اند و بیشتر در آزمایشگاههای با امکانات محدود مورد استفاده قرار می‌گیرند. آنها باید، درهرصورت، در پوشش‌های نفوذ ناپذیر(ظروف دربسته) نسبت به جریان هوا و در شرایط خشک نگهداری شوند، ازطرفی دیگر، آنها سریعا رطوبت جذب کرده و در این صورت بایستی دور انداخته شوند. برخی از کارکنان اعتقاد دارند که نتایج حاصل از رنگ آمیزی زمانی که از آب بافر تهیه شده با قرص استفاده می‌شود چندان مطلوب نیست، اما شواهدی دال بر تایید این نظریه وجود ندارد.

۳. مواد، تدارکات و تجهیزات

- قرص بافر فسفاته تجاری برای ۱ لیترآب (PH ۷/۲)
- ظرف ۱ لیتری آب مقطر یا آب دو بار تقطیر شده تجاری
- استوانه مدرج، ۱ لیتری
- بشر یا فلاسک مخروطی ۱ لیتری
- بطری شیشه‌ای درب پیچ دار، تمیز و خشک، ۱ لیتری یا ۵۰۰ ml و
- یک پنس یا انبرک کوچک

۴. روش اجرا

شرح فعالیت	نمودار اجرا
۱. مقدار ۱ لیتر آب مقطر یا آب دوبار تقطیر را درون یک فلاسک یا بشر بریزید.	۱. مقدار ۱ لیتر آب مقطر یا آب دوبار تقطیر را درون یک فلاسک یا بشر بریزید.
۲. با استفاده از یک پنس یا انبرک کوچک، یک قرص بافر فسفاته درون بشر یا فلاسک بیاندازید. دقت کنید که قرص را با دستتان لمس نکنید.	۲. یک قرص بافر درون بشر یا فلاسک بیاندازید.
۳. به آرامی فلاسک یا بشر را بچرخانید تا زمانی که قرص کاملا حل شود.	۳. با چرخش آرام مخلوط کنید.
۴. ظرف آب بافر را به روش زیر برچسب نویسی کنید و روش را در دفتر عملکرد کنترل کیفیت بنویسید. آب بافر با PH=۷/۲ تاریخ تهیه:۱۴ تیرماه ۱۳۹۶ تاریخ انقضاء: ۲۴ تیرماه ۱۳۹۶ تهیه کننده : نام و نام خانوادگی	۴. ظرف محتوی آب بافر را برچسب نویسی کنید، و روش کار را در دفتر عملکرد روزانه کنتر ل کیفیت بنویسید.
۵. از این آب بافر با PH= ۷/۲ برای تهیه رنگ گیمسای رقیق شده استفاده کنید.	۵. از این آب بافر با PH= ۷/۲ برای تهیه رنگ گیمسای رقیق شده استفاده کنید.

۵. نکات

- قرص‌های بافری (PH= ۷/۲) را بایستی در ظروف دربسته بدون هوا، دور از نور خورشید و رطوبت نگهداری کرد.
- چنانچه بخار آب یا رطوبت به آنها برسد دیگر قابل استفاده نیستند. بسته رطوبت گیر یا بسته ژل سیلیکا (بدون کلرید کبالت) را باید برای جلوگیری از جذب رطوبت در بطری محتوی قرص بافر قرار داد.
- همیشه پیش از استفاده، تاریخ انقضاء قرص بافر را چک کنید.
- آب بافر تهیه شده را درمکانی خنک و به دور از نور مستقیم خورشید نگهداری کنید. برای جلوگیری از رشد باکتری، قارچ و جلبک توصیه می‌شود آب بافر تهیه شده را درظرف تیره یا در یک بطری شیشه‌ای روشن که به دور آن کاغذ قهوه‌ای پیچیده شده نگهداری کنید.
- به طور منظم از نظر آلودگی آن را چک کنید.
- برای اجتناب از تغییر در PH و جلوگیری از آلودگی، آب بافر را بیش از ۷ روز نگهداری نکنید.
- از راهنمای شرکت سازنده برای استفاده و نگهداری قرص‌های بافری استفاده کنید. لزوما مقدار آب مقطری را که شرکت سازنده توصیه نموده استفاده کنید. در صورت عدم انجام چنین کاری منجر به نتایج نامطلوبی در رنگ آمیزی می‌شود.
- درصورت وجود امکانات مورد نیاز، روزانه PH آب بافر را پیش از استفاده چک کنید، و نتایج را در دفتر عملکرد روزانه کنترل کیفیت بنویسید.

۶. کنترل کیفیت و مستند سازی

برای هرسری جدید آب بافر و پیش ازهربار استفاده، یک بررسی کنترل کیفیت انجام دهید و نتایج را در دفتر عملکرد روزانه کنترل کیفیت (log-book) ثبت کنید.(MM-SOP 3c رابببینید: کنترل کیفیت محلول ذخیره گیمسا و آب بافر).

۷. SOPهای مرتبط

MM-SOP 3c: کنترل کیفیت محلول ذخیره گیمسا و آب بافر

۸. منابع

WHO. اصول میکروسکوپی مالاریا. بخش۱. راهنمای آموزش گیرندگان. ویرایش دوم. ژنو:۲۰۱۰

۹. سوابق مستند

تاریخ (ماه/ سال)	ویرایش	توضیحات	فرد مسئول
۱۳۹۶/۰۴/۱۴	۲	بازبینی و ویرایش فارسی	اعضای کمیته تدوین SOP ۱. دکتر عباس شهبازی ۲. مهندس مسعود یریان ۳. علیرضا صادقی ۴. علی حافظی ۵. فیروزه گوشه

کنترل کیفیت محلول گیمسای ذخیره و آب بافر

روش اجرایی استاندارد میکروسکوپی مالاریا MM-SOP-03C

۱- هدف

توضیح روش بررسی کنترل کیفیت (QC) رنگ گیمسای ذخیره و آب بافر(PH=۷/۲) برای رنگ آمیزی روزمره گسترش‌های خونی مالاریا. این SOP قابل کاربرد برای موارد آماده‌سازی محلول‌ها در محل و همچنین در مواردی که محلول‌ها به شکل تجاری در دسترس هستند، می‌باشد.

این روش تنها با تایید یک هماهنگ‌کننده کشوری مسئول تضمین کیفیت میکروسکوپی مالاریا قابل تغییر است. تمام روش‌های تخصصی توصیف شده برای همه میکروسکوپیست‌های مالاریا درآزمایشگاه‌های مرجع کشوری، آزمایشگاه‌های بیمارستانی یا آزمایشگاه‌های بهداشتی ارائه‌دهنده خدمات سلامت مجری برنامه میکروسکوپی مالاریا، اجباری است.

۲- مقدمه

بررسی کارایی محلول‌ها تحت عنوان "کنترل کیفیت" (QC) شناخته می‌شود. به منظور تشخیص دقیق مالاریا، لازم است که گسترش‌های خون را با یک رنگ گیمسای ذخیره با کیفیت و آب بافر با PH=۷/۲ رنگ آمیزی نمود. این محلول‌ها باید پیش از استفاده تست شده و یک برنامه کنترل کیفیت برای موارد زیر اجرا شود:

- برای هرسری جدید یا هر مقداری از رنگ ذخیره تهیه شده
- پیش از ارسال رنگ ذخیره به آزمایشگاهها جهت استفاده
- در محل استفاده، بعد از دریافت رنگ ذخیره از آزمایشگاه مرجع کشوری
- پیش از استفاده از رنگ ذخیره جهت تهیه رنگ گیمسای رقیق شده آماده مصرف
- برای هرسری جدیدی از آب بافر تهیه شده با PH=۷/۲

حتی المقدورکیفیت رنگ و آب بافر بایستی بر روی گسترش نازک خونی، که از نظر وجود انگل مالاریا مثبت است چک شود. گسترش‌های مثبت انگل ویواکس به علت مورفولوژی خاص دانه‌های شوفنر ارجح تر است. درصورت نبود لام مثبت ویواکس از یک گسترش مثبت پلاسمودیوم فالسی پاروم و بررسی وجود شکافهای مورر (در صورت وجود تروفوزوئیت بالغ) استفاده کنید.

چنانچه هیچ گونه نمونه مثبتی از انگل مالاریا وجود نداشت، یک گسترش منفی را می‌توان برای بررسی کیفیت رنگ و میزان رنگ پذیری گلبول‌های قرمز و سفید مورد استفاده قرار داد.

برای این کار باید نمونه‌ای از یک گسترش نازک خون، زمانی که خون تازه در دسترس است تهیه نمود و در ۲۰- درجه یا دمای سردتر نگهداری کرد. در این SOP روش کار توضیح داده شده است. گسترش‌های رنگ آمیزی نشده‌ای که در دمای اتاق نگهداری شود در گذر زمان تخریب می‌شود.

نتایج مورد انتظار

رنگ رقیق شده بایستی با هردو غلظت ۳٪ و ۱۰٪ تست شود. گلبول‌های قرمز بایستی به رنگ صورتی متمایل به خاکستری، پلاکت‌ها به رنگ صورتی پررنگ و گلبول‌های سفید خون (لنفوسیت، نوتروفیل، و مونوسیت) با هسته آبی ارغوانی و سیتوپلاسم کم رنگ دیده می‌شوند. ائوزینوفیل‌ها دارای گرانول‌های درشت با رنگ قرمز ارغوانی در سیتوپلاسم، و نوتروفیل‌ها دارای گرانول‌های ظریف

ارغوانی هستند. دانه‌های بازوفیلیک در گلبول‌های قرمز غیر آلوده به رنگ آبی دیده می‌شوند. رنگ‌های ذکر شده در بالا با هرسری ساخت رنگ و ویژگی‌های ذاتی خون ممکن است تغییر کند.

انگل‌های مالاریا با رنگ آمیزی صحیح باید دارای هسته‌ای به رنگ قرمز یا صورتی و سیتوپلاسم آبی باشند. چنانچه از پلاسمودیوم ویواکس برای تست رنگ استفاده شود، دانه‌های شوفنر بایستی به شکل دانه‌های صورتی مفروش در سیتو پلاسم گلبول قرمز دیده شوند.اگر از پلاسمودیوم فالسی پاروم استفاده شود، شکافهای مورر به شکل اجسام درشت و به شکل ناهمگن درسیتوپلاسم گلبول قرمزپراکنده هستند.

زمان مناسب رنگ آمیزی برای هرسری ازرنگ گیمسای ذخیره بایستی از قبل تعیین شود. رنگ آمیزی گسترش‌های خونی که خیلی تیره یا خیلی رنگ پریده هستند با تنظیم زمان رنگ آمیزی قابل تصحیح است. برای مثال، چنانچه سلول‌ها ظاهری رنگ پریده داشته باشند و دانه‌های استیپلینگ (منقوط) ضعیف باشند، زمان بیشتری لازم است تا نتیجه مطلوبی حاصل شود. زمان مطلوب بدست آمده را بایستی در دفتر عملکرد کنترل کیفیت (QC) ثبت نمود و برای این سری از رنگ ذخیره استفاده کرد.

۳- مواد، تدارکات وتجهیزات

- رطوبت گیر(فاقد کلرید کبالت باشد)
- یک جعبه پلاستیکی یا کیسه زیپ دار، فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد یا ۷۰- درجه
- لام‌های ازپیش شسته شده
- یک جعبه مقوایی (برای لام‌های میکروسکوپی)

۴- هشدارهای ایمنی

متانول و رنگ گیمسا بسیار قابل اشتعال بوده و در صورت استنشاق یا بلعیده شدن به شدت سمی هستند. از تماس یا استنشاق آن خودداری کنید. زمانی که مورد استفاده نیستند، آنهارا بایستی در یک گنجه درب بسته نگهداری کنید.

- هشدارهای عمومی- شامل استفاده از ابزارهای حفاظت فردی نظیر دستکش، عینک ایمنی، ماسک و روپوش آزمایشگاهی – بایستی به کارگرفته شوند. (MM-SOP-11 رابببنید: روش اجرایی ایمنی عمومی در آزمایشگاه میکروسکوپی مالاریا).

۵- روش اجرا

شرح فعالیت	نمودار اجرا
۵-۱- کنترل کیفیت رنگ گیمسای ذخیره	۵-۱- کنترل کیفیت رنگ گیمسای ذخیره
۱- یک گسترش نازک از خون مالاریا مثبت، و به طور ایده ال از نوع پلاسمودیوم ویواکس، تهیه کنید	۱. یک گسترش نازک تهیه کنید.
۲- رنگ گیمسای رقیق شده ۳٪ و ۱۰٪را از رنگ گیمسای ذخیره به شرحی که در(MM-SOP-04آماده‌سازی رنگ گیمسای رقیق شده) آمده و با استفاده از آب بافر با PH= ۷/۲ بسازید. فقط از آب بافری که قبلا مراحل کنترل کیفیت را گذرانده است استفاده کنید.	۲. رنگ گیمسای رقیق شده ۳٪ و ۱۰٪ را از رنگ گیمسای ذخیره جدید درست کنید.
۳- لام را با متانول فیکس کنید، واجازه دهید خشک شود. لام را براساس(MM-SOP-07 رنگ آمیزی گسترش‌های خونی مالاریا) برای هردو حالت سریع ۱۰٪ و آهسته ۳٪ رنگ کنید.	۳. لام‌ها را با متانول فیکس کنید، و بارنگ گیمسا رنگ کنید (MM-SOP-07).
۴. لام‌ها را ازنظر کیفیت رنگ چک کنید.	۴. لام‌ها را بررسی کنید.
۵- چنانچه لازم است، زمان رنگ آمیزی را تنظیم کنید، و مراحل ۱ الی۴ را تکرار کنید تا زمانی که نتایج مورد انتظار بدست بیاید.	۵. چنانچه لازم باشد، زمان رنگ آمیزی را تنظیم کنید، و مراحل ۱ الی۴ را دوباره تکرار کنید.
۶- جزئیات را(مشاهدات و عملکردها) همراه با نام تعداد کارکنانی که برنامه کنترل کیفیت (QC) را اجرا نموده اند در دفتر عملکرد کنترل کیفیت (log-book) ثبت کنید.	۶. نتایج را دردفتر عملکرد کنترل کیفیت (QC log-book) ثبت کنید.

شرح فعالیت	نمودار اجرا
۵-۱- کنترل کیفیت آب بافر با PH=۷/۲	۵-۱- کنترل کیفیت آب بافر با PH=۷/۲
۱. یک گسترش نازک از خونی که می‌دانید از نظر مالاریا مثبت است، و به طور ایده ال از نوع پلاسمودیوم ویواکس باشد.	۱- یک گسترش نازک آماده کنید
۲- رنگ گیمسای رقیق شده ۳٪ و ۱۰٪ را با آب بافر ذخیره جدید به شرحی که در(MM-SOP-04آماده‌سازی گیمسای رقیق شده) آمده و با PH= ۷/۲ بسازید. فقط از رنگ گیمسای ذخیره‌ای که قبلا مراحل کنترل کیفیت را گذرانده است استفاده کنید.	۲- رنگ رقیق شده ۳٪ و ۱۰٪ را از رنگ گیمسای ذخیره جدید درست کنید.
۳- لام‌ها را با متانول فیکس کنید، واجازه دهید خشک شوند. لام را بر اساس(MM-SOP-07 رنگ آمیزی گسترش‌های خونی مالاریا) برای هردو حالت سریع ۱۰٪ و آهسته ۳٪ رنگ کنید.	۳. لام‌ها را با متانول فیکس کنید، و با رنگ گیمسا رنگ کنید(MM-SOP-07).
۴- لام‌ها را برای مشخص نمودن کیفیت رنگ آمیزی بررسی کنید.	۴. لام‌ها را بررسی کنید.
۵- نتایج، مشاهدات و عملکردها را در دفتر عملکرد کنترل کیفیت (QC log-book) ثبت کنید.نام تمام کارکنان مشارکت‌کننده دربرنامه QC را ثبت کنید.	۵. نتایج را دردفتر عملکرد کنترل کیفیت (QC log-book) ثبت کنید.

شرح فعالیت	نمودار اجرا
۵-۳- آماده‌سازی گسترش‌های خونی مثبت مالاریا برای QC (کنترل کیفیت).	۵-۳- آماده‌سازی گسترش‌های خونی مثبت مالاریا برای QC (کنترل کیفیت).
۱. با استفاده از لام‌های تمیز و شسته شده، تعدادی گسترش خونی (MM-SOP-05) ازبیمار مالاریای مثبت فالسی پاروم و ویواکس تهیه کنید. اگر گسترش دارای تروفوزوییت در حال رشد یا بالغ و در مورد پلاسمودیوم ویواکس دارای گامتوسیت یا شیزونت نیز باشد بسیار عالی است. اجازه دهید با جریان هوا خشک شود.	۱- تهیه گسترش‌های خونی از خون مالاریا مثبت.
۲. گسترش‌های نازک را براساس آنچه که در (MM-SOP-07 رنگ آمیزی گیمسای گسترش‌های خونی مالاریا)توضیح داده شده فیکس کنید، و اجازه دهید با جریان هوا خشک شود.	۲. گسترش نازک را با متانول فیکس نموده، و در هوا خشک کنید.
۳. لام‌ها را محکم درجعبه لام از جلو به عقب بچینید(جعبه‌های مقوایی که درآن لام‌ها بسته‌بندی می‌شوند، مناسب اند)، و جعبه را با اطلاعاتی مانند نوع و مراحل انگل ها، تعداد لام، تاریخ تهیه و نام کارمندی که آنها را تهیه نموده برچسب نویسی کنید.	۳. لام هارا محکم در جعبه لام بسته‌بندی کنید، و برچسب نویسی کنید.
۴. جعبه لام‌ها را در یک جعبه پلاستیکی یا کیسه زیپ دار حاوی رطوبت گیر قرار دهید(فاقد کلرید کبالت باشد).	۴. جعبه لام را در یک جعبه دیگر یا کیسه زیپ دار پلاستیکی با یک رطوبت گیر قرار دهید.
۵. در ۲۰- درجه یا دمای سردتر نگهداری کنید، در ۷۰- درجه عالی است. نتایج را دردفتر عملکرد کیفیت (QC log-book) ثبت کنید.	۵. در ۲۰- درجه یا سردتر نگهداری کنید.
۶. هرزمان که نیاز باشد لام‌ها را خارج نموده، و با قراردادن در یک خشک‌کننده اجازه دهید که به دمای اتاق برسند.	۶. درهنگام نیاز لام‌ها را بیرون آورده و با قراردادن در یک خشک‌کننده به دما برسانید.

۶- نکات

- به یاد داشته باشید که رنگ ذخیره گیمسا و آب بافر (PH= ۷/۲)را در زمان مقرر تهیه کنید تا برنامه کنترل کیفیت در زمان خود کامل شود.
- رنگ ذخیره گیمسا و آب بافر را در بطری تیره، بادرب چوب پنبه‌ای محکم شده در مکانی خنک و به دور از نور مستقیم خورشید نگهداری کنید.
- مقادیر کمی از رنگ گیمسای ذخیره را که نیاز دارید فیلتر کنید و از آن به عنوان رنگ صاف شده استفاده کنید نه از کل بطری.
- مقدار رنگ استفاده نشده را به بطری ذخیره یا بطری استفاده روزانه برنگردانید. زمانی که رنگ ازبطری خارج شد، باید سریعا مورد استفاده قرار گیرد یا دور ریخته شود.
- زمانی که از قرص بافر استفاده می‌شود و نتایج مورد انتظار بدست نمی آید، درصورت وجود امکانات، باید PH اندازه گیری و تنظیم شود. در غیر این صورت بافر را باید دور ریخت ویک محلول تازه ساخت. چنانچه محلول آب بافر دوم در بررسی کنترل کیفیت مردود شد، با آزمایشگاه مرجع کشوری جهت بررسی بیشتر علت آن تماس حاصل فرمایید. چنانچه قرص بافر با یک سری ساخت دیگر وجود داشته باشد از آن استفاده کنید.
- PH آب بافر را در فواصل زمانی منظم چک کنید.
- چنانچه متوجه خرابی در رنگ آمیزی شدید، ذخیره رنگ گیمسا و آب بافر را چک کنید.
- از نظر ماکروسکوپی، گسترش خونی باید ظاهری آبی – خاکستری داشته باشد. رنگ قرمز صورتی نشانه‌ای از رنگ پذیری نامطلوب است(خیلی اسیدی).
- هنگامی که زمان رنگ آمیزی تنظیم شد، تعدادی لام را می‌توان به طور هم زمان ولی با مدت زمان‌های متفاوت رنگ آمیزی کرد. برای مثال، با رنگ ۱۰٪، سه لام را باید باهم و برای مدت زمان های۹،۸ و ۱۰دقیقه رنگ کرد، و آن مدت زمانی که بهترین نتایج را بدست داد بایستی برای آن سری از رنگ گیمسای ذخیره انتخاب کرد.

۷- مستندسازی

- تمام مراحل برنامه کنترل کیفیت(QC) بایستی ثبت شود.
- موارد ثبت شده بایستی، تاریخ بررسی، شماره سری محلول ها، تاریخ تهیه، نتایج بررسی تست کنترل کیفیتQC))و هر عمل انجام شده‌ای را نشان دهد. نام فردی که کنترل کیفیت را انجام داده نیز بایستی ثبت شود.
- تمام موارد ثبت شده کنترل کیفیت بایستی نگهداری شود.

نمونه برگه ثبت مستندات ضمیمه این SOP گردیده است.

۷- راه حل

تشریح وضعیت	علت احتمالی	عملکرد اصلاحی
ازنظر ماکروسکوپی، ظاهر گسترش نازک، قرمز صورتی است.	pH آب بافری که برای ساختن رنگ رقیق شده استفاده شده خیلی پایین است، (اسیدی)	PH آب بافر را در صورت وجود امکانات، چک کرده، آن را تنظیم کنید، چنانچه مقدور نبود آن را دور بریزید. چنانچه PH معادل ۷/۲ بود، بررسی کنید که تمام وسایل شیشه‌ای پیش از استفاده به طور مناسب آبکشی شده است یا خیر. مقادیر کمی از شوینده می‌تواند PH را تغییر دهد.
	آبی که برای شستشو استفاده شده خیلی اسیدی بوده است.	از آب بافر با PH=۷/۲ برای شستشو استفاده کنید.
گلبول‌های قرمز، لیز شده اند یا بخشی از آنها برروی گسترش نازک، لیز شده باشند.	گسترش نازک به قدر کافی با متانول فیکس نشده باشد.	تنها از متانول با کیفیت خوب و درجه بالا استفاده کنید. برای جلوگیری ازجذب رطوبت هوا و کاهش خاصیت فیکساسیون درب بطری را محکم ببندید.
گسترش ضخیم به طورکامل همولیز نشده است	گلبول‌های قرمز با متانول فیکس شده‌اند. گسترش ضخیم دچار فیکساسیون خود به خودی شده است. فیکساسیون خود به خودی گسترش‌های ضخیم ممکن است به دلیل تماس طولانی مدت گسترش‌ها با درجه حرارت بالا و رطوبت صورت گیرد. گسترش ضخیم درحین خشک کردن ناصحیح با سشوار یا صفحه داغ دچار فیکساسیون می‌شود	درحین فیکس کردن گسترش نازک، ازتماس گسترش ضخیم با الکل اجتناب کنید، چرا که متانول و بخار آن خیلی سریع باعث فیکساسیون گسترش ضخیم می‌شود. چنانچه گسترش‌ها بلافاصله رنگ آمیزی نمی شود لازم است که آنهارا در یک دستگاه خشک‌کننده واجد ژل سیلیکا (فاقد کلرید کبالت) نگهداری کنید چنانچه نیاز به خشک کردن سریع باشد، گسترش را درمقابل یک سشوار و با حرارت کم به مدت ۵ ثانیه ودر فاصله ۳۰ سانتی متری خشک کنید
رنگ آمیزی ضعیف	آماده‌سازی نامطلوب محلول رنگ ذخیره و رنگ گیمسای رقیق شده	مطمئن شوید که محلول‌های رنگ به طور صحیح و براساس SOP های مربوطه تهیه شده‌اند. ازیک ترازوی دیجیتال دقیق برای توزین پودرگیمسا و استوانه مدرج دقیق برای اندازه گیری حجم‌های مورد نیاز استفاده کنید.

تشریح وضعیت	علت احتمالی	عملکرد اصلاحی
سطح گسترش پوشیده از رسوب است.	کیفیت رنگ استفاده شده خوب نیست.	از رنگ توصیه شده یا ساخته شده بوسیله آزمایشگاه مرجع کشوری استفاده کنید.
	کیفیت متانول یا گلیسرول استفاده شده خوب نیست.	تنها از متانول یا گلیسرول با کیفیت بالا استفاده کنید.
	رنگ ذخیره گیمسا فیلتر نشده است.	مقادیر کمی از رنگ گیمسا را کمی قبل از ساختن محلول رنگ رقیق شده فیلتر کنید
	نگهداری ناصحیح رنگ ذخیره	ذخیره گیمسا را در یک بطری تیره یا کهربایی، دریک مکان خنک و به دور از نور مستقیم خورشید نگهداری کنید.
		درب بطری را برای جلوگیری از جذب بخار آب محکم ببندید. به منظور جلوگیری از معلق شدن مجدد رسوبات به مدت ۲۴ ساعت پیش از استفاده از رنگ، از تکان دادن آن خوداری کنید.
	ذخیره گیمسا ممکن است با آب آلوده شده باشد.	برای جلوگیری از آلوده شدن ظرف ذخیره رنگ، مقادیر کمی از رنگ به اندازه استفاده روزانه را در ظرف کوچک دیگری نگهداری کنید. پیپت نم دار یا خشک را درون رنگ ذخیره گیمسا رها نکنید. هرگز رنگ استفاده نشده یا مازاد رنگ را به درون ظرف ذخیره رنگ یا ظرف رنگ رقیق شده برنگردانید، رنگی که برای یک بار از ظرف رنگ خارج شد یا باید استفاده شود یا دور ریخته شود.
	لام گسترش خون بعد از اتمام رنگ آمیزی به طور صحیح شستشو نشده است. رنگ رقیق شده آماده کار بعد از مدت ۳۰ دقیقه استفاده شده است.	چنانچه رنگ آمیزی در یک جار مخصوص یا سینی رنگ آمیزی انجام می‌شود، لایه متالیک رنگ (قوس وقزح) باقی مانده از رنگ را پیش از برداشتن لام‌ها حذف کنید.
	رنگ خیلی کهنه است	رنگ رقیق شده را باید دقیقا پیش از استفاده ساخت و بلافاصله استفاده کرد. مازاد رنگ باید دور ریخته شود.
رنگ آمیزی کم رنگ است.	زمان ناکافی رنگ آمیزی	زمان رنگ آمیزی را افزایش دهید. زمان مناسب رنگ آمیزی را باید برای هرسری جدید رنگ ازپیش تعیین کرد.
	رنگ گیمسای رقیق شده فیلتر شده است	رنگ رقیق شده را فیلتر نکنید. فقط بخش کوچکی از رنگ ذخیره گیمسا را باید پیش از استفاده فیلتر کرد

تشرح وضعیت	علت احتمالی	عملکرد اصلاحی
رنگ آمیزی خیلی تیره	زمان رنگ آمیزی خیلی طولانی است.	زمان رنگ آمیزی را کاهش دهید. زمان رنگ آمیزی را برای هر سری جدیدی از رنگ گیمسای ذخیره از پیش تعیین کنید.
گلبول‌های قرمز رنگ آمیزی شده به رنگ قرمز صورتی	PH رنگ خیلی پایین (اسیدی) است.	PH آب بافر را چک و در صورت وجود امکانات آن را روی ۷/۲ تنظیم کنید.درغیر این صورت آب بافر را دور بریزید. چنانچه PH همان ۷/۲ بود لوازم شیشه‌ای را چک کنید که آیا به طور مناسبی آبکشی شده اند یا خیر. مقادیر کمی از شوینده می‌تواند PH را تغییر دهد.
	آب استفاده شده برای آبکشی خیلی اسیدی است.	از آب بافر با PH=۷/۲ برای آبکشی استفاده کنید.
هسته گلبول‌های سفید به رنگ ارغوانی تیره نیست.	PH رنگ خیلی پایین (اسیدی) است.	PH آب بافر را چک کنید و در صورت وجود امکانات آن را روی ۷/۲ تنظیم کنید.درغیر این صورت آب بافر را دور بریزید. چنانچه PH آب بافر همان ۷/۲ بود لوازم شیشه‌ای را چک کنید که آیا به طور مناسبی آبکشی شده اند یا خیر. مقادیر کمی از شوینده می‌تواند PH را تغییر دهد.
دانه‌های شوفنر، دانه‌های جیمز یا شکافهای مورر قابل رویت نیست.	PH صحیح نیست.	چنانچه PH متر در دسترس بود PH آب بافر را اندازه بگیرید، وآن را روی ۷/۲ تنظیم کنید. درغیر این صورت آن را دور بریزید. چنانچه PH آب بافر همان ۷/۲ بود لوازم شیشه‌ای را چک کنید که آیا به طور مناسبی آبکشی شده اند یا خیر.مقادیر کمی از شوینده می‌تواند PH را تغییر دهد.
آلودگی‌ها (artifact) در لام گسترش خون قابل رویت است.	رشد قارچ برروی گسترش‌های خونی. گرده، اسپور، باکتری و آلودگی‌های موجود در آب بافر	بسته لام‌ها را درمکانی خشک وتمیز نگهداری کنید. گسترش‌های ضخیمی که بلافاصله قرار نیست رنگ آمیزی شوند را، دهموگلوبینه کنید وآنهارا در مکانی خشک نگهدارید. گسترش‌های خونی را در یک سینی درپوش دار خشک کنید. مطمئن شوید که دست‌ها و ناخن انگشتان بیمار قبل از خون گیری سرانگشتی تمیز شده است. آب بافر را دریک بطری تیره و باسر محکم شده، درجای خنک وبه دور ازنور مستقیم خورشید نگهدارید. آبی را که از چاه یا رودخانه‌ها و یا آب باران برای تهیه آب بافر و شسستشوی لام رنگ آمیزی شده استفاده می‌کنید فیلترکنید و بجوشانید.

۸- SOPهای مرتبط

MM-SOP-02: تهیه محلول ذخیره رنگ گیمسا

MM-SOP-03a: تهیه آب بافر با PH7.2

MM-SOP-03b: تهیه آب بافر با PH 7.2 با استفاده از قرص بافر

MM-SOP-04: تهیه محلول رقیق شده رقیق شده آماده به کار رنگ گیمسا

MM-SOP-05a: تهیه گسترش‌های نازک وضخیم خون

MM-SOP-07a: رنگ آمیزی گسترش‌های خونی با رنگ گیمسا

MM-SOP-11: روش‌های ایمنی عمومی در آزمایشگاه میکروسکوپی مالاریا

۹- منابع

WHO. اصول میکروسکوپی مالاریا. بخش 1. راهنمای آموزش گیرندگان. ویرایش دوم. ژنو: ۲۰۱۰

Storey J. روش‌های اجرایی استاندارد گیمسای میکروسکوپی مالاریا.۲۰۱۰

۱۰- مقدمه مستند

تاریخ (ماه/ سال)	ویرایش	توضیحات	فرد مسئول (نام، نام خانوادگی)
۱۳۹۶/۰۴/۱۴	۲	بازبینی و ویرایش فارسی	اعضای کمیته تدوین‌کننده SOP ۱. دکتر عباس شهبازی ۲. مهندس مسعود یریان ۳. علیرضا صادقی ۴. علی حافظی ۵. فیروزه گوشه

پیوست. برگه‌های ثبت نمونه‌های کنترل کیفیت

برگه ثبت کنترل کیفیت برای رنگ گیمسای ذخیره

تاریخ ساخت گیمسای ذخیره	تاریخ انقضاء	شماره ساخت	تعداد بطری‌های تهیه شده	حجم هر بطری بر حسب میلی لیتر	تاریخ کنترل کیفیت	تاریخ تهیه آب بافر وتنظیم PH	گونه های مالاریا و اظهار نظر درمورد کیفیت رنگ آمیزی	فعالیت انجام شده	نام و نام خانوادگی امضاء کارکنان عضو مجموعه که رنگ گیمسا را آماده کرده‌اند.	نام و نام خانوادگی امضاء کارکنان عضو مجموعه که کنترل کیفیت را انجام داده‌اند.
۱۳۹۳/۰۷/۲۶	۱۳۹۵/۰۷/۲۶	۱۳۹۳/۰۰۱	۵	۵۰	۱۳۹۳/۰۹/۰۲	۱۳۹۳/۰۹/۲۰ PH=۷/۲	پلاسمودیم ویواکس ضعیف ، خیلی تاریک، رسوب هم دارد.	نادیده گرفته شده	نام و نام خانوادگی امضاء	نام و نام خانوادگی امضاء
۱۳۹۴/۰۴/۱۱	۱۳۹۶/۰۴/۱۱	۱۳۹۴/۰۰۱	۵	۵۰	۱۳۹۴/۰۵/۰۸	۱۳۹۴/۰۵/۰۶ PH=۷/۲	پلاسمودیم ویواکس دانه‌های شوفنر قابل رویت، رنگ آمیزی کمی کم رنگ	تنظیم زمان رنگ آمیزی : ۱۰٪ به مدت ۱۰ دقیقه و ۳٪به مدت ۵۵ دقیقه	نام و نام خانوادگی امضاء	نام و نام خانوادگی امضاء

برگه ثبت کنترل کیفیت برای آب بافر با PH=7/2

تاریخ تهیه آب بافر	تاریخ انقضاء	تعداد بطری‌های آماده شده	حجم هر بطری (شیشه) بر حسب میلی لیتر	تاریخQC	شماره ساخت بطری گیمسای ذخیره	نوع مالاریا وملاحظاتی درمورد کیفیت رنگ آمیزی	کار انجام شده	نام و نام خانوادگی پرسنل عضو مجموعه که رنگ گیمسا را آماده کرده‌اند.	نام و نام خانوادگی پرسنل عضو مجموعه که QCرا انجام داده‌اند.
۱۳۹۳/۰۷/۲۶	/۰۷/۲۶ ۱۳۹۵	۲	۵۰۰	۱۳۹۳/۰۷/۲۶	۱۳۹۳-۰۰۱	دانه‌های شوفنر پلاسمودیوم ویواکس دیده نمی شود.	چک PHو رساندن به ۷/۲	نام نام خانوادگی امضاء	نام نام خانوادگی امضاء

ثبت لام‌های مثبت و منفی برای آزمایش‌های QC

تاریخ تهیه	مثبت یا منفی برای انگل مالاریا	گونه‌های مالاریا	مراحل انگل	شماره اسلاید	نام و نام خانوادگی پرسنل عضو مجموعه که لام خونی تهیه کرده اند	نظرات و یادداشت
۱۳۹۴/۰۱/۰۱	مثبت	پلاسمودیوم ویواکس	تروفوزوییت بالغ و گامتوسیت	۲۰	نام نام خانوادگی امضاء	
۱۳۹۴/۰۱/۱۵	منفی			۲۵	نام نام خانوادگی امضاء	

رنگ آمیزی گیمسا: برگ کار روزانه

تاریخ	شماره بیمار	شماره سری الکل متانول	شماره سری رنگ گیمسای ذخیره	شماره سری ساخت آب بافر وتاریخ	درصد محلول گیمسای رقیق شده آماده کار	نتایج کنترل کیفیت لام ها	نام پرسنلی که رنگ آمیزی را انجام داده
۱۳۹۴/۰۷/۲۹	۰۱/۱۲۳۴ ۰۱/۱۲۴۴	۱۲۳۴۵/۱۴	۲۰۱۵/۰۱	۱۴/۶۷۸۹ ۱۳۹۴/۰۷/۱۵	٪۱۰	پلاسمودیوم ویواکس: رنگ آمیزی خوب، رنگدانه‌ها قابل رویت	نام نام خانوادگی

آماده‌سازی محلول رنگ گیمسای رقیق شده

روش اجرایی استاندارد میکروسکوپی مالاریا MM-SOP-04

۱- هدف

توضیح روش تهیه رنگ گیمسای رقیق شده از محلول رنگ ذخیره جهت رنگ آمیزی روزانه گسترش‌های خونی مالاریا.

این روش تنها با تایید یک هماهنگ‌کننده کشوری مسئول تضمین کیفیت میکروسکوپی مالاریا قابل تغییر است. تمام روش‌های تخصصی توصیف شده برای همه میکروسکوپیست‌های مالاریا درآزمایشگاه‌های مرجع کشوری، آزمایشگاه‌های بیمارستانی یا آزمایشگاه‌های بهداشتی ارائه‌دهنده خدمات سلامت مجری برنامه میکروسکوپی مالاریا، اجباری است.

۲- مقدمه

یک رنگ گیمسای رقیق شده آماده مصرف، ساخته شده از یک رنگ ذخیره با کیفیت، که با آب بافر با PH=۷/۲ رقیق شده باشد، جهت انجام یک رنگ آمیزی مطلوب گسترش‌های خونی مالاریا توصیه می‌شود. معمولا جهت سهولت کار و همچنین به علت دشواری تهیه رنگ ذخیره استاندارد و رعایت SOP ها، رنگ‌های تجاری استاندارد خریداری و برای اجرای طرح‌های کشوری استفاده می‌شود.

رنگ آمیزی با رنگ گیمسا را می‌توان به دو روش سریع (رقت ۱۰٪) یا روش آهسته (رقت ۳٪) انجام داد. روش سریع بیشتر در مراکز سرپایی و آزمایشگاههای شلوغی که تشخیص سریع جهت تعجیل در درمان بیمار ضروری است استفاده می‌شود. روش آهسته بیشتر در رنگ آمیزهای تعداد زیاد لام، مانند لام‌های جمع آوری شده در بررسی‌های اپیدمیولوژیک یا تحقیقات میدانی استفاده می‌شود.

برخی آزمایشگاهها ترجیح می‌دهند که لام‌ها را به طور انفرادی رنگ کنند، حتی اگر تعداد لام زیاد داشته باشند، چرا که این کار باعث صرفه جویی در میزان رنگ مورد نیاز می‌شود. حجم رنگ گیمسای آماده‌ای که مورد نیاز است، مخصوصاً در مواردی که لام‌ها به طور انفرادی رنگ می‌شوند، بایستی به طور دقیق محاسبه شود تا مانع از به هدر رفتن حجم زیادی از رنگ در دراز مدت و تبدیل آن به پسماند شود.

۳. مواد، تدارکات وتجهیزات

برای محلول آماده گیمسای ۱۰٪

. رنگ گیمسای ذخیره فیلتر شده و منتقل شده به درون یک ظرف ml ۵۰-۲۵

. آب بافر، PH= ۷/۲

. بشر یا لوله، تمیز به حجم ml ۱۰-۵

. یک پیپت پاستور و

. کاغذ فیلتر واتمن، درجه(۱ الی ۳) ترجیحا ۳

برای محلول آماده گیمسای ۳٪

. رنگ گیمسای ذخیره فیلتر شده و منتقل شده به درون یک ظرف ml ۵۰-۲۵

. آب بافر، PH =۷/۲

. استوانه مدرج، تمیز، به حجم ml ۵۰۰-۱۰۰ و

. یک پیپت پاستور و

. کاغذ فیلتر واتمن، درجه (۱ الی ۳) ترجیحا۳

۴. هشدارهای ایمنی

- متانول (متیل الکل) قابل اشتعال و به شدت سمی است و چنانچه استنشاق یا به هر مقداری بلعیده شود، می‌تواند باعث کوری وحتی مرگ شود. بنابراین از تماس و استنشاق آن اجتناب شود و در زمان عدم استفاده، آن را در یک کمد یا گنجه قفل شده ذخیره کنید.
- پیشگیری‌های عمومی- شامل استفاده از ابزارهای حفاظت و ایمنی شخصی نظیر دستکش، عینک، ماسک روپوش یا گان آزمایشگاهی – بایستی استفاده شود.(MM-SOP-11 را ببینید: روش‌های ایمنی عمومی در آزمایشگاه میکروسکوپی مالاریا).

۵. روش اجرا

شرح فعالیت	نمودار آجرا
A. تهیه محلول رنگ رقیق شده ٪ ۱۰ از رنگ ذخیره برای رنگ آمیزی سریع چند لام. حدود ۳ml از رنگ برای هر لام گسترش خونی لازم است. ۱.مقدار ۹ml از آب بافر از پیش تهیه شده،PH=۷/۲، را به درون یک بشر یا لوله تمیز بریزید. ۲. محلول گیمسای ذخیره را با یک کاغذ واتمن شماره ۱ یا ۳ صاف کنید و به درون یک ظرف ml ۵۰-۲۵ منتقل کنید. ۳.بااستفاده از یک پیپت تمیزوخشک مقدار ۱ml از رنگ گیمسای ذخیره اضافه کنید. برای جلوگیری از آلودگی ظرف بزرگ حاوی رنگ گیمسای ذخیره ، مقدارمورد استفاده را مستقیما از آن برندارید. ۴. رنگ رقیق شده گیمسا را لحظه‌ای قبل از رنگ آمیزی گسترش‌های خونی آماده کنید. و در طی ۱۵ دقیقه مصرف کنید. مازاد مصرف را دور بریزید.	A. تهیه ۱۰ ml از محلول رنگ رقیق شده گیمسا با غلظت ۱۰٪ ۱. مقدار ۹ml از آب بافر را به درون یک بشریا لوله بریزید. ↓ ۲.. محلول گیمسای ذخیره را با یک کاغذ واتمن شماره۱ یا ۳ صاف کنید و به درون یک ظرف ۵۰ml-۲۵ منتقل کنید. ↓ ۳.با استفاده از یک پیپت تمیزوخشک مقدار ۱ml از رنگ گیمسای ذخیره اضافه کنید ↓ ۴. در طی ۱۵ دقیقه پس از تهیه مصرف کنید. مازاد مصرف را دور بریزید.

B. تهیه رنگ رقیق شده گیمسا از رنگ ذخیره جهت رنگ آمیزی تعداد ۱۰۰-۲۰ لام به روش آهسته. ۱. مقدار ۹۷ml از آب بافرازپیش تهیه شده با PH= ۷/۲ را درون یک استوانه مدرج تمیز بریزید. ۲. رنگ گیمسای ذخیره را با یک کاغذ واتمن شماره ۱ یا ۳ صاف کنید و به درون یک ظرف ml ۵۰-۲۵ منتقل کنید. ۳. بااستفاده از یک استوانه مدرج یا یک پیپت، مقدار ۳ml از رنگ گیمسای ذخیره بکشید. برای جلوگیری از آلودگی ظرف بزرگ حاوی رنگ گیمسای ذخیره ، مقدارمورد استفاده را مستقیما از آن برندارید. ۴. رنگ رقیق شده گیمسا را لحظه‌ای قبل از رنگ آمیزی گسترش‌های خونی آماده کنید و در طی ۱۵ دقیقه مصرف کنید. مازاد مصرف را دور بریزید.	B. آماده‌سازی مقدار ml ۱۰۰ از رنگ رقیق شده گیمسا با غلظت ۳% ۱. مقدار ml ۹۷ از آب بافر را درون یک استوانه مدرج بریزید. ↓ ۲. رنگ گیمسای ذخیره را با یک کاغذ واتمن شماره ۱ یا ۳ صاف کنید و به درون یک ظرف ml ۵۰-۲۵ منتقل کنید. ↓ ۳. مقدار ۳ml از رنگ گیمسای ذخیره اضافه کنید. ↓ ۴. در طی ۱۵ دقیقه پس از تهیه مصرف کنید. مازاد مصرف را دور بریزید.

۶. نکات

- استوانه مدرج، پیپت ها، ظروف و لوله‌ها را پیش از استفاده تمیز و خشک کنید.
- سعی شود برای رنگ آمیزی در طول یک روز یا رنگ آمیزی‌های مکرر، از رنگ با یک سری ساخت استفاده شود(Batch or lot). زیرا رنگ گیمسا بخار آب موجود در هوا را سریعا جذب نموده، و لذا زمانی که با آب دیونیزه یا آب مقطر یا هر نوعی از آب رقیق شود، ویژگی رنگ آمیزی خود را ازدست می‌دهد، به همین دلیل لام‌ها پس از مدت کوتاهی به طور ضعیفی رنگ می‌گیرند. لایه متالیک (قوس وقزح) برروی سطح رنگ گیمسای ساخته شده به سادگی به سطح گسترش خون چسبیده و تشخیص ساختارهای انگلی را دچار مشکل می‌کند.(توضیح اینکه برای هرسری رنگ آمیزی رنگ جدید بسازید و سریعا استفاده کنید).

۷. محاسبه حجم مورد نیاز از رنگ گیمسای ذخیره و آب بافر برای رنگ آمیزی انفرادی لام ها.

هرگسترش خونی نیاز به ۳ml از رنگ گیمسای رقیق شده دارد. حجم رنگ گیمسای ذخیره مورد نیاز برای رنگ آمیزی گسترش‌های خونی برای لام‌های منفرد از طریق فرمول زیر قابل محاسبه است:

حجم محلول گیمسای ذخیره مورد نیاز به ازاء هر لام = غلظت گیمسای خواسته شده (گیمسای مصرفی) ×۳ ml

مقدار آب بافر (PH=۷/۲) مورد نیاز برای رنگ آمیزی یک لام منفرد را می‌توان با فرمول زیر محاسبه کرد:

حجم آب بافربه ازاء هر لام = ۳ ml – حجم گیمسای ذخیره مورد نیاز به ازاء هرلام

مقدار ۳ ml رنگ گیمسای رقیق شده، با اضافه کردن حجمی از رنگ ذخیره مورد نیاز، به مقدار مورد نیاز از حجم محاسبه شده آب بافر با PH= ۷/۲ به ازای هر لام تهیه می‌شود.

مثال ۱: رنگ آمیزی ۱۵ لام با محلول گیمسای ۱۰ ٪

حجم رنگ گیمسای ذخیره مورد نیاز برای رنگ آمیزی ۱۵ لام منفرد با محلول گیمسای ۱۰٪ را می‌توان به شکل زیر محاسبه کرد:

$$\text{حجم رنگ گیمسای ذخیره مورد نیاز به ازاء هر لام} = \frac{10}{100} \times 3\ ml \times 15\text{لام}$$

$(0.1\times 3ml) \times 15$ لام $= 4.5$ Ml

به طور مشابهی، حجم آب بافر مورد نیاز برای رنگ آمیزی ۱۵لام منفرد با محلول گیمسای ۱۰٪ را می‌توان به شکل زیر محاسبه کرد:

حجم آب بافر به ازای هر لام $= [3ml-(0.1\times3ml)]\times15$ لام

$[3ml-(4.5ml)]\times15$لام $= 40.5ml$

بنابراین مقدار ۴/۵ میلی لیتر از رنگ گیمسای ذخیره را بایستی با ۴۰/۵ میلی لیتر آب بافر مخلوط نمود تا مقدار لازم از رنگ گیمسای رقیق شده آماده مصرف ۱۰٪ برای رنگ آمیزی ۱۵ لام تهیه نمود.

۸. SOPهای مرتبط

MM-SOP-02: آماده‌سازی محلول گیمسای ذخیره

MM-SOP-3a: آماده‌سازی آب بافر با۷/۲ PH

MM-SOP-3b: آماده‌سازی آب بافر با۷/۲ PH با استفاده از قرص بافر

MM-SOP-3c: کنترل کیفیت محلول ذخیره گیمسا وآب بافر

MM-SOP7a: رنگ آمیزی گسترش‌های خونی مالاریا با رنگ گیمسا

MM-SOP-11: رویه‌های ایمنی عمومی در آزمایشگاه میکروسکوپی مالاریا

۹. منابع

WHO. اصول میکروسکوپی مالاریا. بخش ۱. راهنمای آموزش گیرندگان.چاپ دوم. ژنو ۲۰۱۰

مرکز کنترل و پیشگیری از بیماریها. آزمایشگاه تشخیص مالاریا. رنگ آمیزی برای انگل‌های مالاریا. اتلانتا، جورجیا ۲۰۱۳

(http://www.cdc.gov/dpdx/resources/pdf/benchAids/malaria/malaria_staining_benchaid.pdf, accessed 14 December 2015)....

۱۰. سوابق مستندات

تاریخ (ماه / سال)	ویرایش	توضیحات	فرد مسئول (نام، نام خانوادگی)
۱۳۹۶/۰۴/۱۴	۲	بازنگری وویرایش فارسی	اعضای کمیته تدوین‌کننده SOP ۱. دکتر عباس شهبازی ۲. مهندس مسعود یریان ۳. علیرضا صادقی ۴. علی حافظی ۵. فیروزه گوشه

خون گیری از سر انگشت و تهیه گسترش‌های ضخیم و نازک خون

روش اجرایی استاندارد میکروسکوپی مالاریا MM-SOP-05A

۱. هدف

توضیح روش خون گیری از سرانگشت و تهیه گسترش‌های نازک و ضخیم خون برای تشخیص مالاریا با میکروسکوپ نوری.

این روش تنها با تایید یک هماهنگ‌کننده کشوری مسئول تضمین کیفیت میکروسکوپی مالاریا قابل تغییر است. تمام روش‌های تخصصی توصیف شده برای همه میکروسکوپیست‌های مالاریا درآزمایشگاههای مرجع کشوری، آزمایشگاه‌های بیمارستانی یا آزمایشگاه‌های بهداشتی ارائه‌دهنده خدمات سلامت مجری برنامه میکروسکوپی مالاریا، اجباری است.

۲. مقدمه

آزمایش لام خون محیطی به روش میکروسکوپی، یک تکنیک پایه است که هنوز ارزش خود را به عنوان یک روش استاندارد طلایی جهت تشخیص مالاریا حفظ کرده است.گسترش‌های خونی تهیه شده از خون مویرگی (به طریقه خون گیری نوک انگشت) برای تشخیص مالاریا بهترین روش است. کیفیت خوب گسترش‌های خونی برای دستیابی به یک تشخیص صحیح ضروری است.

۳. مواد و تجهیزات

- لام‌های شیشه‌ای تمیز به ابعاد ۲۵×۷۵ میلی متر، با یک انتهای مشجر جهت لیبل کردن، ترجیحا با حاشیه‌های (سابیده شده)، وکیفیت مناسب(MM-SOP-01 را ببینید:تمیز کردن وذخیره‌سازی لام‌های میکروسکوپی)
- سواپ الکلی یا الکل اتیلیک ۷۰٪
- لانست استریل، برای هربیمار یک عدد
- پنبه خشک (گلوله پنبه ای، سوآپ یا گاز)
- دستکش‌های لاتکس محافظ (بدون پودر)
- ظرف نگهداری وسایل نوک تیز یا هر ظرف نگهداری اجسام برنده که نسبت به سوراخ شدن یا پاره شدن مقاوم باشد (MM-SOP13 را ببینید: مدیریت پسماندهای تولید شده از تست‌های تشخیص مالاریا)
- ظرف نگهداری پسماندهای عفونی(MM-SOP13 را ببینید: مدیریت پسماندهای تولید شده از تست‌های تشخیص مالاریا)
- یک سینی یا جعبه به همراه یک پوشش محافظ برای خشک کردن لام‌ها به حالت افقی، جهت حفاظت لام‌ها از گرد و غبار و مگس
- یک رک خشک کننده
- فرم‌های ثبت اطلاعات بیمار(براساس آخرین پروتکل وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی) و یک قلم الماس یا ماژیک رنگ پایدار

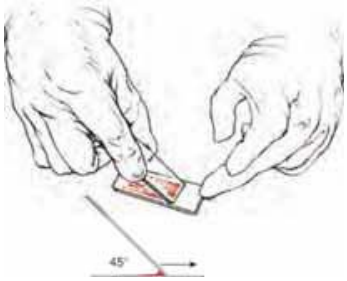
۴. هشدارهای ایمنی

- قبل از شروع به جمع آوری خون و درهنگام حمل لام ها، جهت حفاظت شخصی و اجتناب از تماس روغن با لام‌ها که ممکن است درمرحله تهیه گسترش اختلال ایجاد کند، دستکش لاتکس (بدون پودر) بپوشید.
- درهنگام حمل خون دستکش بپوشید و پیش از ترک محل کار و در هنگام یادداشت نویسی آنها را از دست خارج کنید.
- همیشه برای هر بیمار از یک لانست جدید استفاده کنید.لانست را سرپوش گذاری نکنید. هر گز از یک لانست استفاده مجدد نکنید.
- ازتماس خون چه درحالت مرطوب یا خشک با دست‌ها و انگشتان خود اجتناب کنید.
- دستان خود را با یک پوشش مقاوم در مقابل برش و خراشیدگی و نفوذ آب محافظت کنید.
- از برش و خراشیدگی اتفاقی اندام‌های خود درهنگام حمل اجسام نوک تیزی که درتماس با خون بوده اند اجتناب کنید.
- درپایان کار هرچه سریعتر دستان خود را با آب و صابون به طور کامل بشویید.
- چنانچه پوست شما با خون تماس حاصل کرد، سریعا با یک سوآپ پنبه‌ای آغشته به الکل خون را پاک کنید و تا جایی که ممکن است هرچه سریعتر محل تماس را با آب و صابون بشویید.
- اجسام نوک تیزی نظیر لانست و شیشه شکسته را باید در ظروف مخصوص اجسام نوک تیز برای دفع ایمن به روش سوزاندن یا اتوکلاو کردن دور انداخت. مواد یا اجسامی که نوک تیز نبوده ولی با خون آلوده شده اند را باید در کیسه زباله عفونی یا کیسه مخصوص اتوکلاو برای دفع ایمن به روش‌های سوزاندن یا اتوکلاو کردن دور انداخت.
- مکانی را برای خون گیری و جمع آوری خون انتخاب کنید که از میزان نور مناسبی برخوردار باشد.

۵. روش اجرا

آموزش تصویری	شرح فعالیت	نمودار اجرا
	۱.برچسب حاوی اطلاعات کامل بیمار را به انتهای مشجر لام شیشه‌ای بچسبانید و این اطلاعات را درفرم مخصوص پذیرش مالاریا ثبت کنید.(SOP 06: برچسب گذاری گسترش‌های مالاریا را ببینید). ۲. دستکش لاتکس محافظ بپوشید، از انگشت سوم بزرگسالان یا شصت پای نوزادان استفاده کنید(از پاشنه پای نوزادان یا انگشت شصت دست نوزادان و بزرگسالان استفاده نکنید). ۳. دست بیمار را درحالتی که کف دست به سمت بالاست نگه دارید و سر انگشت انتخاب شده را با قطعه‌ای از پنبه که با الکل ۷۰٪کمی خیس خورده یا با یک سواپ الکلی تمیز کنید. با مالش‌های نسبتا محکم چربی و روغن روی سطح انگشت را پاک کنید و جریان خون را در محل تحریک کنید. چنانچه لازم باشد انگشت را با ماساژ ملایم گرم کنید. اجازه دهید که الکل سرانگشت خشک شود.	۱. اطلاعات کامل بیمار را برروی لام بنویسید و در دفترپذیرش ثبت کنید ↓ ۲-۳. دستکش لاتکس بپوشید، انگشت سوم ازشصت را با سوآپ الکلی یا الکل ۷۰٪ تمیز کنید. اجازه دهید الکل در هوا خشک شود. ↓ ۴. با یک لانست جدید و استریل شده سطح انگشت را سوراخ کنید. ↓ ۵-۶. اولین قطره خونی راکه شکل گرفت با یک پنبه خشک پاک کنید. ↓ ۷. قطره دیگری را شکل دهید و با تماس لام با قطره خون یک قطره کوچک را جمع کرده و این قطره را برای تهیه گسترش نازک استفاده کنید. ↓ ۸. دو یا سه قطره کوچک دیگری را جمع آوری کنید، و از آنها برای تهیه گسترش ضخیم استفاده کنید. ↓ ۹. باقی مانده خون را ازسطح انگشت پاک کنید.
	۴. با استفاده از یک لانست جدید و استریل با یک حرکت سریع درقسمت مرکزی نوک انگشت یک سوراخ ایجاد کنید. ۵. فشار ملایمی را به انگشت وارد کنید(یا شصت پا)، تا قطره اول خون تشکیل شود. ۶. با یک تکه پنبه خشک قطره اول را پاک کنید، مطمئن شوید که هیچ رشته‌ای از پنبه برروی انگشت باقی نمانده که درخون بماند.	
	۷. سریع عمل کنید ولام‌ها را با لبه‌های آن در دست بگیرید، با فشارملایم قطره خون را برروی انگشت جمع کنید و با تماس لام با خون، قطره کوچکی را در میانه لام جهت گسترش نازک قراردهید. ۸. فشار بیشتری را بکار برید تا خون بیشتری خارج شود، و حدود دو یا سه قطره در فاصله ۱cm قطره مربوط به گسترش نازک قرار دهید. ۹. باقی مانده خون را با پنبه تمیز و خشک پاک کنید.	

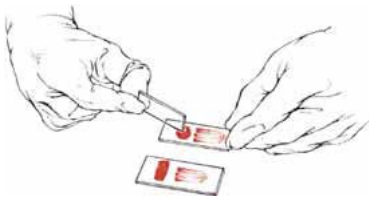
۱۰. بین زمان قطره گذاری و پخش قطرات (تهیه گسترش) فاصله نیندازید. گسترش‌های خونی را با یک لام دیگر و با استفاده از حاشیه تخت آن تهیه کنید.



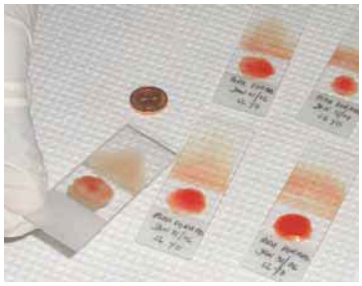
۱۱. برای کشیدن گسترش نازک، لبه یک لام تمیز (گسترش دهنده) را با زاویه۴۵درجه، درقسمت جلوی قطره مربوط به گسترش نازک قرار دهید.

۱۲. به آرامی لام گسترش‌دهنده را به عقب برده تا با قطره خون تماس یافته و خون درعرض لام گسترش‌دهنده پخش شود.

۱۳. سریعاً و با یک حرکت آرام و ممتد لام گسترش‌دهنده را به جلو(سمت خارج ازمرکز) حرکت داده تا یک انتهای شبیه به پر(شعله شمعی) ازخون به جای بگذارد.



۱۴. با کناره همان لام گسترش دهنده(که برای گسترش نازک استفاده شده) با حرکت چرخشی سه قطره خون را با هم مخلوط کرده و دایره‌ای به قطر ۱cm برای گسترش ضخیم بسازید. با سه تا شش حرکت سریع با کناره لام گسترش‌دهنده می‌توان یک گسترش ضخیم دایره‌ای یا چهار گوش ساخت.



۱۵. بعد از تهیه گسترش‌های نازک وضخیم اجازه دهید تا گسترش در حالت افقی و برروی جعبه لام خشک شود. چنانچه خشک کردن سریع لازم باشد، گسترش‌ها را با سشوار وحرارت ملایم برای مدت ۵ ثانیه درفاصله ۳۰cm خشک کنید. لام‌ها را هرگز در فاصله خیلی نزدیک به سشوار نگیرید زیرا ممکن است که گسترش‌ها با حرارت فیکس شود.

۱۰. لام حامل قطرات خون را به حالتی که خون روی سطح لام قراردارد روی یک سطح صاف قراردهید.

↓

۱۳-۱۱. بااستفاده ازیک لام تمیز به عنوان لام پخش کننده، گسترش نازک را درحالی که قطره مربوط به گسترش نازک را رو به جلو حرکت می‌دهید، با یک حرکت ملایم و ممتد تهیه کنید

↓

۱۴. با کناره لام گسترش دهنده، گسترش ضخیم را به شکلی که باحرکت چرخشی سه قطره خون را با هم ادغام می‌کنید یک دایره شکل دهید.

↓

۱۵. در مجاورت هوا و در حالت افقی گسترش‌ها راخشک کنید. چنانچه خشک کردن سریع لازم باشد از یک خشک‌کننده لام نیز می توان استفاده کرد

۶. نکات

- گسترش ضخیم باید در حالت تخت، خشک کرد و از آسیب گرد و غبار و مگس حفظ نمود.
- گسترش ضخیم چنانچه در معرض حرارت زیاد قرار گیرد فیکس می‌شود و لذا باید بلافاصله رنگ شود.
- گسترش ضخیم را می‌توان با سشواری که دروضعیت حرارت ملایم قرار داده شده به آرامی خشک کرد، اما باید مراقب بود که دچار فیکساسیون ناشی از حرارت نشود، که این حالت هم معمولا خیلی سریع رخ می‌دهد. به کار گیری روش خشک کردن با سشوار تنها باید توسط تکنیسنی که صلاحیت او برای انجام این روش اثبات گردیده انجام شود.
- از مداد ژله‌ای یا قلم خودکار برای ثبت اطلاعات استفاده نکنید، زیرا در هنگام فیکساسیون گسترش، جوهر پخش می‌شود.
- مقدار کمی از خون برروی لام گسترش‌دهنده باقی می‌ماند، چنانچه به شکل صحیحی تمیز شود می‌توان از این لام برای تهیه گسترش بیمار بعدی استفاده کرد. درحالتی دیگر، می‌توان لام تمیز دیگری را از جعبه لام برای کشیدن گسترش مورد استفاده قرار داد. از یک لام بیش از یک بار به عنوان لام گسترش‌دهنده استفاده نکنید.

۷. SOPهای مرتبط با این SOP

MM-SOP -01: تمیز کردن و ذخیره‌سازی لام‌های میکروسکوپی

MM-SOP-06: برچسب گذاری (اطلاعات نویسی) گسترش‌های مالاریا

MM-SOP-11: روش‌های ایمنی عمومی در آزمایشگاه میکروسکوپی مالاریا

MM-SOP-13: مدیریت پسماندهای تولید شده از تست‌های تشخیصی مالاریا

۸. منابع

WHO. اصول میکروسکوپی مالاریا. بخش ۱. راهنمای آموزش گیرندگان. چاپ دوم. ژنو۲۰۱۰.

۹. سوابق مستند

تاریخ (ماه/سال)	ویرایش	توضیحات	فرد مسئول (نام، نام خانوادگی)
۱۳۹۶/۰۴/۱۴	۲	بازنگری و ویرایش فارسی	اعضای کمیته تدوین SOP ۱. دکتر عباس شهبازی ۲. مهندس مسعود یریان ۳. علیرضا صادقی ۴. علی حافظی ۵. فیروزه گوشه

جمع آوری خون سیاهرگی به روش خون گیری با سرنگ و تهیه گسترش‌های خونی از خون جمع آوری شده درلوله حاوی ضد انعقاد

روش اجرایی استاندارد میکروسکوپی مالاریا MM-SOP-05B

۱. هدف

توضیح روش جمع آوری خون به روش خون گیری از سیاهرگ و تهیه گسترش‌های ضخیم و نازک از خون جمع آوری شده در لوله حاوی ضد انعقاد.

این روش تنها با تأیید یک هماهنگ‌کننده کشوری مسئول تضمین کیفیت میکروسکوپی مالاریا قابل تغییر است. تمام روش‌های تخصصی توصیف شده برای همه میکروسکوپیست‌های مالاریا درآزمایشگاه‌های مرجع کشوری، آزمایشگاه‌های بیمارستانی یا آزمایشگاه‌های بهداشتی ارائه‌دهنده خدمات سلامت مجری برنامه میکروسکوپی مالاریا، اجباری است.

۲. مقدمه

دربرخی مراکز بهداشتی، نمونه خون سیاهرگی را برای آزمایش‌های متعدد، که ممکن است تشخیص میکروسکوپی مالاریا نیز از آن جمله باشد جمع آوری می‌کنند. در این روش حجم بیشتری ازخون نسبت به روش خون گیری سر انگشت جمع آوری شده، و درلوله حاوی ضدانعقاد (ترجیحا EDTA اتیلن دی آمین ترا استیک اسید) نگهداری می‌شود. نمونه خون سیاهرگی مخلوط شده با EDTA را می‌توان برای تهیه گسترش‌های ضخیم و نازک خون جهت تشخیص مالاریا براساس رویه‌های توضیح داده شده در این مستند استفاده کرد.

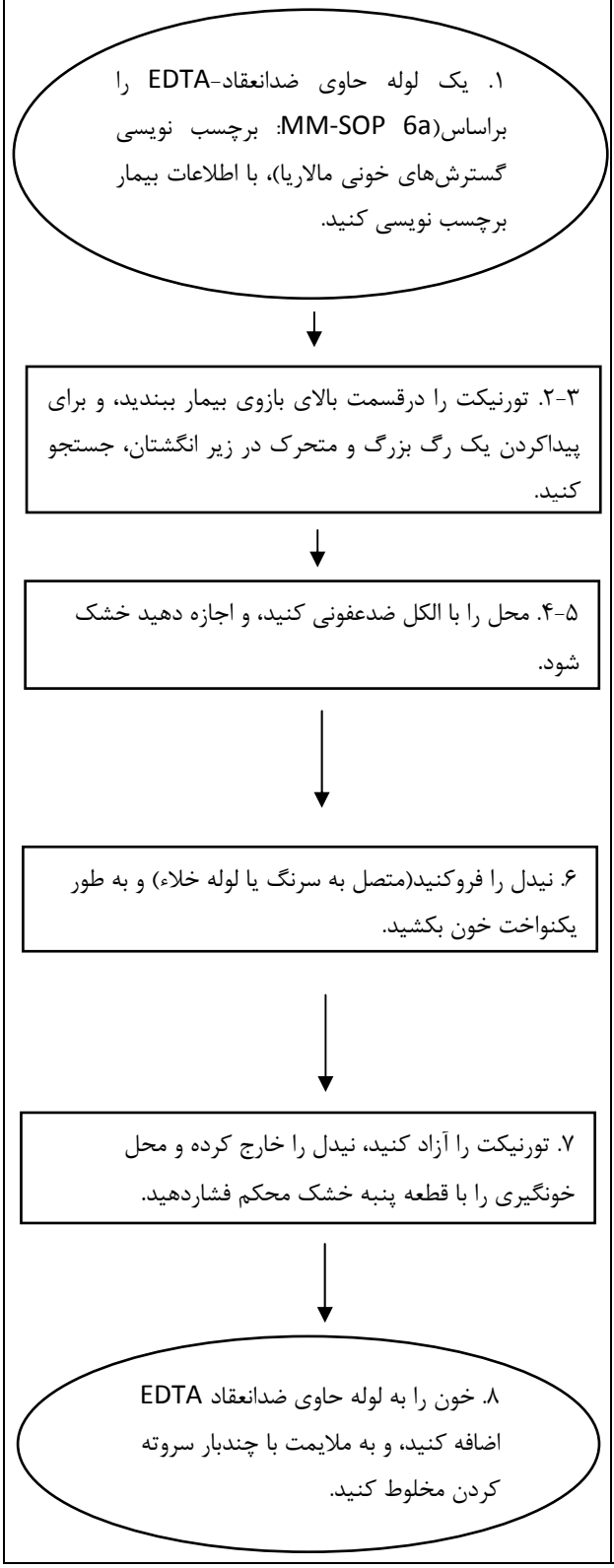
۳. مواد، تدارکات و تجهیزات

- لام‌های شیشه‌ای تمیز، mm ۷۵ × ۲۵، با یک انتهای مشجر برای برچسب نویسی، ترجیحا با لبه‌های سابیده، و با کیفیت مطلوب
(MM-SOP-01 راببینید: تمیزکردن وذخیره‌سازی لام‌های میکروسکوپی).
- یک سرنگ و سرسوزن (ضخامت ۲۱ یا ۲۳)، به ازای هربیمار یک عدد
- یک لوله خلاء حاوی ضدانعقادی مانند EDTA، باظرفیت ml ۵-۴، به ازای هربیمار یک عدد.
- اتیل الکل ۷۰٪ یا سواپ الکلی.
- پنبه خشک (قطعه‌ای پنبه، سواپ یا گاز)
- دستکش لاتکس محافظ (بدون پودر)
- تورنیکت
- ظرف جمع آوری وسایل نوک تیز یا هرگونه ظرف مقاوم به پارگی جهت جمع آوری وسایل نوک تیز(MM-SOP 13 را ببینید: مدیریت پسماندهای تولید شده ازتست‌های تشخیص مالاریا).
- ظرف جمع آوری پسماندهای عفونی(MM-SOP 13 را ببینید: مدیریت پسماندهای تولید شده ازتست‌های تشخیص مالاریا).
- میکروپیپت(سمپلر)
- نوک میکروپیپت (سرسمپلر)
- الگوی تهیه گسترش
- رک خشک کننده
- فرم ثبت اطلاعات (براساس آخرین پروتکل وزارت بهداشت و درمان و آموزش پزشکی) و
- یک مداد نرم

۴. هشدارهای ایمنی

- قبل از شروع به جمع آوری خون و در هنگام حمل لام ها، جهت حفاظت شخصی و اجتناب از تماس چربی به روی لام‌ها که ممکن است درمرحله تهیه گسترش اختلال ایجاد کند و همچنین درهنگام حمل خون دستکش لاتکس (بدون پودر) بپوشید و پیش از ترک محل کار و در هنگام یاداشت نویسی آنها را از دست خارج کنید.
- همیشه برای هر بیمار ازیک سرنگ و سرسوزن جدید استفاده کنید.
- ازتماس خون چه درحالت مرطوب یا خشک با دست‌ها و انگشتان خود اجتناب کنید.
- زخم‌ها یا خراشیدگی‌های روی دست خود را بایک پماد یا مرهم مقاوم به نفوذ آب بپوشانید.
- از برش یا خراش اتفاقی دست یا جایی ازبدن خود درهنگام حمل اجسام نوک تیزی که درتماس با خون بوده اند اجتناب کنید.
- در پایان کار هرچه سریعتر دستان خود را با آب و صابون و به طور کامل بشویید.
- چنانچه پوست شما با خون تماس حاصل کرد، سریعا با یک سواپ پنبه‌ای آغشته به الکل خون را پاک کنید و تا جایی که ممکن است هرچه سریعتر محل تماس را با آب و صابون بشویید.

۵. روش اجرا

شرح فعالیت	نمودار اجرا
۴-۱- جمع آوری خون به روش خون گیری از سیاهرگ ۱. برروی لوله حاوی ضد انعقاد EDTA اطلاعات بیمار شامل نام و نام خانوادگی، تاریخ وساعت نمونه گیری را بنویسد. (MM-SOP-6aرا ببینید: برچسب نویسی گسترش خونی مالاریا). ۲. یک تورنیکت (بازوبند) در قسمت بالای بازوی بیمار ببندید تا سیاهرگ بیمار دیده یا قابل لمس شود. ازبیمار بخواهید که مشت خودرا محکم کند تا رگ بیشتر مشخص شود. ۳. باانگشت اشاره خود، رگ بیمار را که به قدر کافی بزرگ و با تماس انگشت کمی متحرک است، لمس کنید. ۴. محل خون گیری را با سواپ الکلی یا پنبه آغشته به اتانول یا ایزوپروپیل الکل ۷۰٪ ضدعفونی کنید. محل تمیز شده را مجددا لمس نکنید. ۵. اجازه دهید که محل سوراخ کردن رگ برای مدت ۳۰ ثانیه با هوای طبیعی خشک شود تا خون جمع آوری شده با الکل آلوده نشود زیرا این امر منجر به همولیز می‌شود. ۶. سرنگ و سرسوزن استریل متصل به آن را در امتداد رگ به شکلی که سطح اریب برش خورده سر سوزن رو به بالا باشد در رگ فروکنید.به طوریکنواخت مقداری بین ml ۲ تا ml ۴ خون بکشید. نکته: ازآنجایی که ماده ضدانعقاد ممکن است درچسبیدن خون به سطح لام و همچنین دررنگ آمیزی گیمسا تداخل ایجاد کند، بویژه زمانی که نسبت خون و ضدانعقاد مناسب نباشد. لذا لازم است که حجم خون اضافه شده به یک لوله حاوی EDTA با ظرفیت ml ۵ کمتر از ml ۲ نباشد. ۷. پس ازجمع آوری مقدار مناسب خون، تورنیکت را بازکنید، به بیمار اعلام کنید که مشت خود را بازکند. نیدل را خارج کرده و قطعه‌ای پنبه خشک را محکم در محل سوراخ شده رگ قراردهید. به بیمار آموزش دهید درحالی که بازوی خود را به سمت بالا جمع کرده به فشار برروی پنبه ادامه دهد تا زمانی که خونریزی متوقف شود. ۸. خون را به لوله حاوی ضد انعقادEDTA منتقل کرده و با ملایمت وبه تعداد ۶ بار سروته نموده تا مخلوط شود. لوله را به شدت تکان ندهید.	۴-۱- جمع آوری خون به روش خون گیری از سیاهرگ 

شرح فعالیت	نمودار اجرا
۴-۲- آماده‌سازی گسترش‌های ضخیم و نازک	۴-۲- آماده‌سازی گسترش‌های ضخیم و نازک
۱. خون سیاهرگی موجود در لوله خلاء حاوی EDTA را پیش از استفاده به آرامی مخلوط کنید.	۱. خون موجود درلوله حاوی EDTA را پیش از استفاده با ملایمت مخلوط کنید.
۲. یک لام میکروسکوپی تمیز و برچسب نویسی شده را براساس الگوی تهیه استاندارد گسترش ضخیم (۱/۲cm یا ۱۲mm قطر) و نازک بردارید.(شکل ۱ را ببینید)	۲. یک لام تمیز با برچسب حاوی اطلاعات بیماررا براساس الگوی تهیه لام مالاریا بردارید (شکل ۱ ببینید).
۳. با یک میکروپیپت (سمپلر) وسرسمپلر محکم شده برسرآن مقدار ۶ میکرولیتر خون را به دایره بزرگ انتخاب شده جهت گسترش ضخیم منتقل کنید. با نوک سرسمپلر خون را پخش و دایره‌ای به قطر ۱cm بسازید، و به این شکل با ۶ حرکت سریع و چرخشی گسترش ضخیم را تهیه کنید.	۳. با سمپلری که نوک سمپلر محکم به آن متصل شده حجمی ازخون معادل ۶ µl را در جایگاه اختصاص داده شده به گسترش ضخیم بریزید و گسترش ضخیم را تهیه کنید.
۴. مقدار ۲ میکرولیتر از خون جمع آوری شده را به دایره کوچکتر لام الگو منتقل کنید.	۴. با سمپلر و نوک محکم شده قطره‌ای معادل ۲ µl را در محل دایره کوچکتر بریزید و گسترش نازک را تهیه کنید.
۵. برای تهیه گسترش نازک، لبه یک لام تمیز(لام پخش کننده) را با زاویه ۴۵ درجه در قسمت جلوی قطره در نظرگرفته شده قرار دهید.	۵-۷. با استفاده از یک لام تمیز(لام پخش کننده) و با حرکت دادن این قطره به سمت جلو با حرکت ملایم و متداوم گسترش نازک را تهیه کنید
۶. به آرامی لام پخش‌کننده را به عقب بکشید تا با قطره خون تماس حاصل کند و خون در لبه لام پخش شود.	
۷. لام گسترش‌دهنده را سریعا با یک حرکت نرم و یکنواخت به جلو (به سمت خارج از مرکز) بکشید تا لام پخش‌کننده یک انتهای پرمانند (شعله شمعی) را جهت گسترش نازک از خود به جا بگذارد.	
۸. لام تهیه شده را به صورت افقی خشک کنید. چسبندگی ضعیف، مشکلی است که به علت مخلوط شدن خون با EDTA بوجود می‌آید. چنانچه نیاز باشد که سریعا لام خشک شود می‌توان با حرارت ملایم حاصل از یک سشوار و در فاصله مناسب این کار را انجام داد. گسترش رادر فاصله نزدیک به حرارت قرار ندهید زیرا این عمل منجر به فیکس شدن گسترش با حرارت می‌شود.	۸. به حالت افقی و با جریان هوای آزاد خشک کنید. چنانچه خشک کردن سریع گسترش نیاز باشد از یک خشک‌کننده لام می‌توان استفاده کرد.

۶. نکات

- به علت تاثیر ضدانعقاد برروی مورفولوژی انگل، خون جمع آوری شده در لوله حاوی ضد انعقاد را نبایستی بیش از ۴ ساعت نگهداریم (درزمانی کمتر از ۴ ساعت گسترش‌ها تهیه شود).
- چنانچه خون سیاهرگی درجای دیگری غیراز آزمایشگاه که گسترش‌ها درآنجا تهیه می‌شوند گرفته شده باشد، لازم است که خون بلافاصله (به طور ایده ال درزمانی کمتر از ۱ ساعت) و بدون سرد کردن یا شرایط یخچالی به آزمایشگاه ارسال شود.
- گسترش ضخیم باید در حالت مسطح خشک شده و از آسیب گرد و غبار و مگس حفظ شود.
- گسترش ضخیم ممکن است چنانچه در معرض حرارت قرار گیرد به صورت خود به خودی فیکس شود، لذا باید بلافاصله رنگ آمیزی شود.
- گسترش ضخیم را می‌توان به آرامی بوسیله یک سشوار تنظیم شده روی وضعیت گرمای ملایم خشک نمود، اما باید مراقب بود که از فیکساسیون ناشی از حرارت جلوگیری شود که این امر خیلی سریع رخ می‌دهد. لازم است که صلاحیت تکنیسین استفاده‌کننده از این متد در استفاده از سشوار اثبات شده باشد.
- برای برچسب نویسی لام از خودکار یا مداد ژله‌ای استفاده نکنید، چرا که درهنگام فیکس کردن با الکل، جوهر پخش شده و باعث تخریب گسترش می‌شود.
- مقدار کمی از خون برروی لام گسترش‌دهنده باقی می‌ماند، چنانچه به شکل صحیحی تمیز شود می‌توان از این لام برای تهیه گسترش بیمار بعدی استفاده کرد، درغیر این صورت از یک لام تمیز دیگر موجود در بسته لام به عنوان لام پخش‌کننده جدید استفاده کنید.

۷. SOPهای مرتبط

MM-SOP-01: تمیز و ذخیره‌سازی لام‌های میکروسکوپی

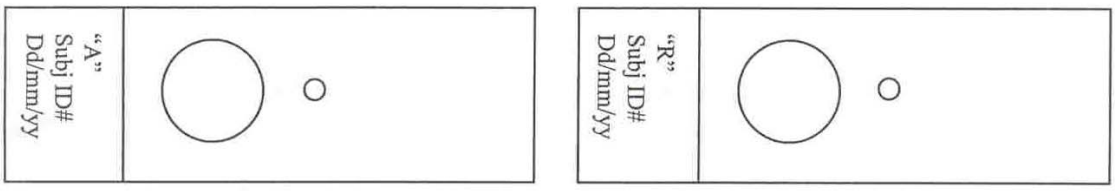
MM-SOP-06a: برچسب نویسی گسترش‌های خونی مالاریا

MM-SOP-13: مدیریت پسماندهای تولید شده از تست‌های تشخیصی مالاریا

۹. سوابق مستند

تاریخ (ماه / سال)	ویرایش	توضیحات	فرد مسئول (نام، نام خانوادگی)
۱۳۹۶/۰۴/۱۴	۲	بازنگری و ویرایش فارسی	اعضای کمیته تدوین SOP ۱. دکتر عباس شهبازی ۲. مهندس مسعود یریان ۳. علیرضا صادقی ۴. علی حافظی ۵. فیروزه گوشه

شکل ۱. الگوی تهیه لام خون محیطی(محل‌های قطره گذاری و قطر گسترش ضخیم)



برچسب نویسی گسترش‌های خونی مالاریا

روش اجرایی استاندارد میکروسکوپی مالاریا MM-SOP-06A

۱. هدف

توضیح روش توصیه شده برای اطلاعات نویسی گسترش‌های خونی مالاریا.

این روش تنها با تایید یک هماهنگ‌کننده کشوری مسئول تضمین کیفیت میکروسکوپی مالاریا قابل تغییر است. تمام روش‌های تخصصی توصیف شده برای همه میکروسکوپیست‌های مالاریا درآزمایشگاه‌های مرجع کشوری،آزمایشگاه‌های بیمارستانی یا آزمایشگاه‌های بهداشتی ارائه‌دهنده خدمات سلامت مجری برنامه میکروسکوپی مالاریا، اجباری است.

۲. مقدمه

اطلاعات نویسی صحیح گسترش‌های خونی مالاریا جهت اطمینان از اینکه نمونه و تاریخ آن مربوط به خود بیمار باشد مهم است. درستی یک تشخیص ممکن است به علت ننوشتن اطلاعات بیمار یا اشتباه نوشتن اطلاعات بیمار دچار خطا شود. اطلاعات نویسی بسیار مهم است، حتی اگر یک لام تهیه شده باشد.

اطلاعات نویسی گسترش‌های خونی مالاریا همچنین باعث تسهیل برنامه کراس چک در برنامه کنترل کیفیت لام‌های آزمایشگاه‌های زیرمجموعه کشوری توسط آزمایشگاه مرجع کشوری می‌شود.

۳. مواد وتدارکات مورد نیاز

- مداد نرم و باکیفیت
- لام شیشه‌ای حاوی گسترش، با انتهای مشجر،۲۶ mm x ۷۶ mm ، ضخامت ۱/۰-۱/۲ mm
- دفتر ثبت اطلاعات بیمار

۴. روش اجرا

شرح فعالیت	نمودار اجرا
۱. اطلاعات ثبت شده در فرم درخواست آزمایش را چک کنید و با دقت در دفتر ثبت مراجعات بنویسید.	۱. اطلاعات بیمار را با دقت چک کنید و در دفتر مراجعات روزانه ثبت کنید.
۲. قبل از اقدام به خونگیری از بیمار، یک مداد برای نوشتن اطلاعات ذیل برروی انتهای لام داشته باشید: کد آزمایشگاه، شماره شناسایی بیمار(کد پذیرش) یا شماره‌ای که در دفتر ثبت مراجعات روزانه می‌نویسید، تاریخ جمع آوری. مثال: ۰۱/۰۰۱ ۱۹/۰۱/۲۰۱۶ الگوی توصیه شده اطلاعات نویسی زیر را ببینید. نکته- اگرلامی با انتهای مشجر نداشتید، اطلاعات بیمار را می‌توان با یک مداد در قسمت ابتدایی و ضخیم تر گسترش نازک نوشت. نوک مداد را در حین استفاده زبان نزنید.	۲.در انتهای مشجر لام کد آزمایشگاه، شماره شناسایی یا کد بیمار، وتاریخ جمع آوری خون را پیش از اقدام به خونگیری از بیمار بنویسید.

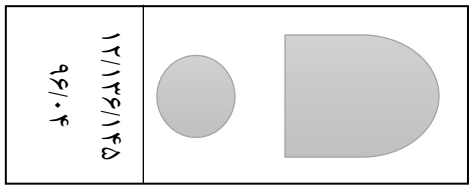
۵. نکات

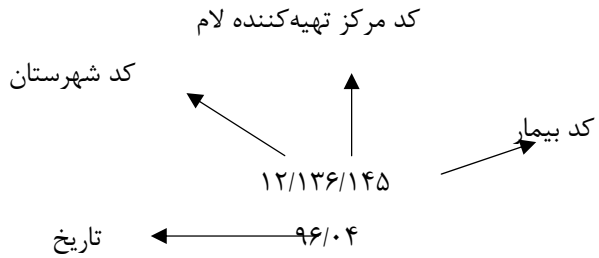
- اطلاعات نویسی بیمار را باید پیش از اقدام به خونگیری کامل کرد. در هنگام نوشتن اطلاعات، از تماس گسترش‌های خون با ابزار نوشتاری اجتناب شود.
- از خودکار یا مداد ژلاتینی برای اطلاعات نویسی استفاده نکنید، چرا که جوهر آن در هنگام فیکس نمودن گسترش با الکل پخش می‌شود.

۶. الگوی توصیه شده اطلاعات نویسی

در این سیستم، شهرستان‌های هر استان کد اختصاصی ۲ رقمی دریافت نموده و در هر شهرستان حداکثر ۳ رقم به کد مرکز تهیه‌کننده لام اختصاص می‌یابد،کد بیمار نیز به صورت سریال در هر ماه ثبت شده و تاریخ تهیه به صورت ماه و سال ثبت می‌شود.

برای مثال :





۷. منابع

WHO. اصول میکروسکوپی مالاریا. بخش۱. راهنمای آموزش گیرندگان. چاپ دوم. ژنو:۲۰۱۰

۸. سوابق مستند

تاریخ (روز/ماه/سال)	ویرایش	توضیحات	فرد مسئول (نام، نام خانوادگی)
۱۳۹۶/۰۴/۱۴	۲	بازنگری و ویرایش فارسی	اعضای کمیته تدوین SOP ۱. دکتر عباس شهبازی ۲. مهندس مسعود یریان ۳. علیرضا صادقی ۴. علی حافظی ۵. فیروزه گوشه

ثبت وگزارش نتایج میکروسکوپی

روش اجرایی استاندارد میکروسکوپی مالاریا MM-SOP-06B

۱. هدف

توضیح روش مناسب ثبت وگزارش نتایج آزمون تشخیص میکروسکوپی گسترش‌های خونی مالاریا

این روش تنها با تایید یک هماهنگ‌کننده کشوری مسئول تضمین کیفیت میکروسکوپی مالاریا قابل تغییر است. تمام روش‌های تخصصی توصیف شده برای همه میکروسکوپیست‌های مالاریا درآزمایشگاه‌های مرجع کشوری، آزمایشگاه‌های بیمارستانی یا آزمایشگاه‌های بهداشتی ارائه‌دهنده خدمات سلامت مجری برنامه میکروسکوپی مالاریا، اجباری است.

۲. مقدمه

ثبت وگزارش مناسب نتایج بررسی میکروسکوپی گسترش‌های خونی برای مراقبت بالینی بیماران مبتلا به مالاریا و همچنین ازجهت قابل اعتماد بودن اطلاعات نظارتی مالاریا که به عنوان پایه و اساسی برای مراقبت ها، ارزیابی و همچنین طراحی نقشه‌های عملیاتی می‌باشند، بسیار مهم است.

۳. مواد،تدارکات وتجهیزات

- دفاتر استاندارد آزمایشگاه مالاریا (براساس آخرین پروتکل وزارت بهداشت، درمان وآموزش پزشکی)
- فرم‌های استاندارد گزارش نتایج آزمایشات بیمار(براساس آخرین پروتکل وزارت بهداشت، درمان وآموزش پزشکی)
- خودکار و مداد
- ماشین حساب (برای محاسبه میزان تراکم انگل)

۴. روش کار

- بعد از بررسی میکروسکوپی، نتایج بایستی براساس رویه‌های استاندارد (MM-SOPs-08 09) ثبت وگزارش شود.
- تمام گونه‌ها و مراحل انگلی و شمارش را براساس SOP مربوطه ثبت نمایید.
- زمانی که شمارش برروی گسترش ضخیم کامل شد، چنانچه شمارش واقعی گلبول سفید بیمار دردسترس نبود، میزان تراکم انگل را براساس یک مقیاسی از ۸۰۰۰ گلبول سفید در میکرولیتر و براساس فرمول زیر محاسبه کنید

$$\text{تعداد انگل در میکرولیتر خون} = \frac{\text{تعداد انگل غیر جنسی شمارش شده} \times 8000\text{گلبول سفید}/\mu L}{\text{تعداد گلبول سفید شمارش شده}}$$

مثال ۱:

تمام مراحل شمارش شده انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم= 155

گلبول سفید شمارش شده متناسب با انگل= 208

شمارش انگل:

$$\frac{155 \times 800}{208} = 5962\text{انگل}/\mu L\text{خون}$$

نحوه گزارش: 5962 /µL انگل مالاریای پلاسمودیوم فالسیپاروم

مثال ۲:

تمام مراحل شمارش شده انگل پلاسمودیوم ویواکس= 88

گلبول سفید شمارش شده متناسب با انگل= 505

تعداد واقعی گلبول سفید شماش شده بیمار=6500

شمارش انگل:

$$\frac{88 \times 6500}{505} = 1133\text{انگل}/\mu L\text{خون}$$

در عفونت‌های مختلط (MIX) یا عفونت‌های بیش از یک گونه، همه گونه‌ها را باهم بشمارید (مراحل جنسی و غیر جنسی)، ونتایج را مانند مثال شماره ۳ گزارش کنید.

مثال ۳:

تمام مراحل انگلی پلاسمودیوم فالسیپاروم + تمام مراحل انگلی پلاسمودیوم ویواکس

انگل (همه مراحل) شمارش شده به ازاء ۲۰۲ گلبول سفید =۳۶۰

نحوه گزارش: ۱۴۲۵۷انگل در میکرولیتر خون (عفونت مختلط از نوع پلاسمودیوم‌های فالسیپاروم و ویواکس)

همچنین حضور موارد زیر نیز گزارش کنید:

- گامتوسیت ها. گامتوسیت‌های پلاسمودیوم فالسی پاروم به طور مجزا شمارش شده، اما همچنان درشمارش کلی انگل محاسبه می‌شوند. مجزا کردن گامتوسیت‌های پلاسمودیوم ویواکس یا پلاسمودیوم مالاریه از انگل‌های غیر جنسی، با دقت کافی جهت توجیه شمارش گامتوسیت به ندرت امکان پذیر است.
- شیزونت ها، ممکن است نشانگر شدت بیماری باشد.
- در دفتر پذیرش آزمایشگاه و در بخش میکروسکوپی شماره شناسایی بیمار، تاریخ و گونه یا گونه‌های انگل، مراحل انگلی و شمارش انگل را چنانچه انجام داده اید ثبت کنید. نحوه گزارش باید یکسان باشد. برای مثال:
- تروفوزوئیت پلاسمودیوم ویواکس دیده شد.
- تروفوزوئیت پلاسمودیوم فالسی پاروم دیده شد، شمارش، ۴۲۰۰۰ انگل در میکرولیترخون.
- گامتوسیت‌های پلاسمودیوم فالسی پاروم دیده شد.
- انگل مالاریا دیده نشد. ازاین عبارت به جای" منفی" باید استفاده شود.(Not Seen به جای Negative)

۵. SOPهای مرتبط

MM-SOP-06a: برچسب گذاری (اطلاعات نویسی) گسترش‌های مالاریا.

MM-SOP 08: بررسی میکروسکوپی گسترش‌های ضخیم ونازک خون برای شناسایی انگل‌های مالاریا.

MM-SOP-09: شمارش انگل‌های مالاریا.

۷. منابع

WHO. اصول میکروسکوپی مالاریا. بخش۱. راهنمای آموزش گیرندگان. چاپ دوم. ژنو ۲۰۱۰.

WHO. روش‌های اجرایی استاندارد بانک لام ملی مالاریا ژنو (درحال تهیه).

۸. سوابق مستند

تاریخ (روز/ماه/ سال)	نسخه	توضیحات	مقام مسئول (نام/نام خانوادگی)
۱۳۹۶/۰۴/۱۴	۲	بازنگری، ویرایش فارسی	اعضای کمیته تدوین SOP ۱. دکتر عباس شهبازی ۲. مهندس مسعود یریان ۳. علیرضا صادقی ۴. علی حافظی ۵. فیروزه گوشه

رنگ آمیزی گسترش‌ها خونی

روش اجرایی استاندارد میکروسکوپی مالاریا MM-SOP-07A

۱. هدف

توضیح روش رنگ آمیزی مناسب گسترش‌های خونی با رنگ گیمسا.

این روش تنها با تایید یک هماهنگ‌کننده کشوری مسئول تضمین کیفیت میکروسکوپی مالاریا قابل تغییر است. تمام روش‌ها برای همه میکروسکوپیست‌های مالاریا درآزمایشگاه‌های مرجع کشوری، آزمایشگاه‌های بیمارستانی یا آزمایشگاه‌های بهداشتی ارائه‌دهنده خدمات سلامت مجری برنامه میکروسکوپی مالاریا، اجباری است.

۲. مقدمه

یک رنگ آمیزی مناسب گسترش خونی، برای تشخیص مالاریا و بویژه برای شناسایی دقیق گونه‌های مالاریا بسیار حیاتی است. توصیه می‌شود از رنگ گیمسا که روش قابل اعتمادی برای رنگ آمیزی گسترش‌های ضخیم و نازک مالاریا می‌باشد استفاده شود. رنگ گیمسا ترکیبی از ائوزین و متیلن بلو (آژور) است. جزء ائوزین هسته انگل را قرمز می‌کند درحالی که جزء متیلن بلو باعث رنگ آبی سیتوپلاسم می‌شود. گسترش نازک با متانول فیکس می‌شود. دهموگلوبینه شدن گسترش ضخیم و رنگ آمیزی هم زمان رخ میدهد. بهترین PH برای ظهور رنگدانه‌های انگل، جهت شناسایی صحیح گونه‌ها PH=۷/۲ است.

روش‌های رنگ آمیزی

دو روش رنگ آمیزی با رنگ گیمسا شامل: روش سریع (محلول ۱۰٪ رقیق شده رنگ گیمسا)

روش آهسته (محلول ۳٪ رقیق شده رنگ گیمسا)

روش سریع(۱۰٪ رقیق شده رنگ گیمسا)

رایج‌ترین روش برای رنگ آمیزی ۲۰- ۱ لام در یک بار است. این روش در کلینیک‌های بیماران سرپایی و آزمایشگاه‌های شلوغ، جایی که یک تشخیص سریع جهت شروع درمان بیمار لازم است مورد استفاده قرار می‌گیرد. این روش، روش موثری است اما نیاز به رنگ بیشتری دارد. نیاز به سرعت بیشتر در انجام کار طبیعتا هزینه‌های اضافی (مصرف مازاد مواد) را به دنبال دارد.

روش آهسته(۳٪ رقیق شده رنگ گیمسا)

روش آهسته برای رنگ آمیزی تعداد بیشتر لام (>۲۰) استفاده می‌شود. این روش برای رنگ آمیزی گسترش‌های جمع آوری شده در حین بررسی‌های اپیدمیولوژیک و همچنین بازدید فیلد و برای تهیه تعداد زیادی از لام‌ها جهت آموزش، مناسب است. این روش برای زمانی که نتایج سریع لازم است کمتر کاربرد دارد. روش آهسته به دلیل میزان رنگ کمتری که مصرف می‌شود (۳٪ درمقایسه با۱۰٪) هزینه کمتری را بدنبال دارد.

۳.مواد و تدارکات لازم

برای روش سریع (محلول ۱۰٪ رقیق شده رنگ گیمسا)

- رنگ گیمسا (محلول ۱۰٪) (MM-SOP-04 برای روش آماده‌سازی را ببینید)
- یک ظرف یا بشر کوچک برای رنگ گیمسای رقیق شده
- متانول خالص، فاقد استون
- پیپت پاستور همراه با سر پلاستیکی
- ظرف یا بشر کوچک برای متانول
- رک یا صفحه مخصوص رنگ آمیزی

- تایمر
- رک مخصوص خشک کردن لام
- سشوار الکتریکی کوچک
- دستکش محافظ بدون پودر و یک بار مصرف و
- بافر تهیه شده با آب مقطر یا آب دیونیزه با PH= ۷/۲

برای روش آهسته (محلول ۳٪ رقیق شده رنگ گیمسا)

- رنگ گیمسا (محلول ۳٪) (MM-SOP-04 برای روش آماده‌سازی را ببینید)
- ظرف یا بشر کوچک برای رنگ گیمسای رقیق شده
- متانول خالص فاقد استون
- پیپت پاستور همراه با سر پلاستیکی
- ظرف یا بشر کوچک برای متانول
- جار رنگ آمیزی با قابلیت نگهداری ۲۰ عدد لام قرار گرفته به صورت پشت به پشت
- تایمر
- رک مخصوص خشک کردن لام
- سشوار الکتریکی کوچک
- دستکش محافظ بدون پودر و یک بار مصرف و
- بافر تهیه شده با آب مقطر یا آب دیونیزه با PH = ۷/۲.

۴. هشدارهای حفاظتی

۱. متانول قابل اشتعال است و چنانچه تنفس شود، یا بلعیده شود بسیار سمی است. اگر به مقدار زیاد بلعیده شود می‌تواند باعث کوری یا حتی مرگ شود. بنابراین از تنفس و بلعیدن آن اجتناب کنید. در هنگام عدم استفاده، بایستی ظرف آن را در قفسه بسته شده نگهدارید.

۲. حفاظت‌های عمومی شامل ابزارهای حفاظت شخصی مناسب نظیر دستکش، عینک ایمنی و لباس آزمایشگاهی یا گان و ماسک بایستی به کار گرفته شود. (MM-SOP-11 را ببینید: رویه‌های حفاظت عمومی در آزمایشگاه میکروسکوپی مالاریا).

۴. روش اجرا

شرح فعالیت	نمودار فعالیت
۵-۱. روش سریع (۱۰٪) ۱. مقدار مورد نیاز از رنگ گیمسای رقیق شده ۱۰٪ برای تعداد لامی که قرار است رنگ امیزی شود را محاسبه کنید. هر لام تقریبا نیاز به ۳ml از رنگ دارد. رنگ را لحظه‌ای قبل از استفاده و براساس پروتکلMM-SOP-04: تهیه کنید. ۲. برای فیکسه کردن گسترش ترجیحا از یک پیپت پاستور استفاده کنید یا لام را در ظرف کوچک حاوی متانول برای ۲ ثانیه غوطه ور کنید. مواظب باشید گسترش ضخیم فیکسه نشود زیرا متانول با فیکسه کردن گسترش ضخیم از همولیز جلوگیری می‌کند. ۳.لام‌ها را روی سینی یا رک خشک‌کننده قرار دهید. با قرار دادن لام‌ها روی یک سطح تخت اجازه دهید گسترش فیکس وکاملا خشک شود (تقریبا ۲ دقیقه).هرگز لام را به شکل عمودی و در حالتی که گسترش نازک پایین است قرار ندهید. ۴. لام‌ها را روی رک رنگ آمیزی رو به بالا قرار دهید. ۵. رنگ را به آرامی از قسمت بالا برروی لام بریزید. ۶. زمان تایمر را روی ۱۰-۸ دقیقه تنظیم کنید(زمان واقعی را قبلا باید با انجام سری‌های رنگ آمیزی بدست آورده باشید). (MM-SOP 3c را ببینید: کنترل کیفیت گیمسای ذخیره و آب بافر). ۷. در پایان زمان رنگ آمیزی، هرلام را به تنهایی و با ریختن قطرات آب بشویید. رنگ را مستقیما ازروی لام تخلیه نکنید چرا که لایه متالیک تشکیل شده، روی لام می‌ماند و باعث تخریب لام می‌شود. ۸. پس از شستشو لام را به صورت رو به پایین در رک خشک کن قرار دهید یا در حالت عمودی به صورتی که گسترش ضخیم رو به پایین است جهت خشک شدن قرار دهید. مواظب باشید قسمت ضخیم با لبه رک تماس نیابد. ۹. باقیمانده رنگ ۱۰٪ تهیه شده را دوربریزید.	۵-۱-روش سریع (۱۰٪) ۱. تهیه محلول رنگ گیمسای ۱۰٪ MM-SOP-04. ↓ ۲. با یک پیپت پاستور و با دقت فقط گسترش نازک را فیکس کنید. ↓ ۳. اجازه دهید که گسترش برروی رک یا سینی خشک کن در معرض هوا خشک شود. ↓ ۴. لام‌ها را رو به بالا برروی رک رنگ آمیزی قرار دهید. ↓ ۵. رنگ را به آرامی بر روی لام بریزید تا گسترش خونی کاملا پوشیده شود. ↓ ۶. زمان سنج را روی ۱۰-۸ دقیقه تنظیم کنید. ↓ ۷. به آرامی با ریختن آب تمیز رنگ را از روی لام بشوئید. ↓ ۸. اجازه دهید لام‌ها در هوای عادی خشک شوند. ↓ ۹. باقیمانده رنگ ۱۰٪ تهیه شده را دور بریزید.
شرح فعالیت	**نمودار مراحل فعالیت**

۵-۲. روش آهسته (۳٪)

۱. مقدار مورد نیاز از رنگ گیمسای رقیق شده ۳٪ را برای تعداد لامی که قرار است رنگ امیزی شود محاسبه کنید. رنگ را لحظه‌ای قبل از استفاده و براساس پروتکل(MM-SOP-04: تهیه رنگ رقیق شده گیمسا) بسازید.

۲. برای فیکسه کردن گسترش نازک ترجیحا از یک پیپت پاستور استفاده کنید یا لام را در ظرف کوچک حاوی متانول برای ۲ ثانیه غوطه ور کنید. مواظب باشید گسترش ضخیم فیکسه نشود زیرا متانول و بخار آن با فیکسه کردن گسترش ضخیم از همولیز جلوگیری می‌کند.

۳. لام‌ها راروی سینی یا رک خشک‌کننده قرار دهید. با قرار دادن لام‌ها روی یک سطح تخت اجازه دهید گسترش فیکس وکاملا خشک شود (تقریبا ۲ دقیقه).هرگز لام را به شکل عمودی و در حالتی که گسترش نازک پایین است قرار ندهیدزیرا باعث فیکس شدن گسترش ضخیم می‌شود.

۴. لام‌ها را پشت به پشت در جار رنگ آمیزی قرار دهید. دقت کنید که قسمت ضخیم لام کنار یکدیگر و در یک سمت جار قرار گیرد.

۵. رنگ را به آرامی در جار رنگ آمیزی بریزید. رنگ را مستقیما روی لام‌ها نریزید.

۶. زمان تایمر را روی ۶۰- ۴۵ دقیقه تنظیم کنید(زمان واقعی را از قبل با انجام سری‌های رنگ آمیزی بدست آورید).(MM-SOP 3c را ببینید).

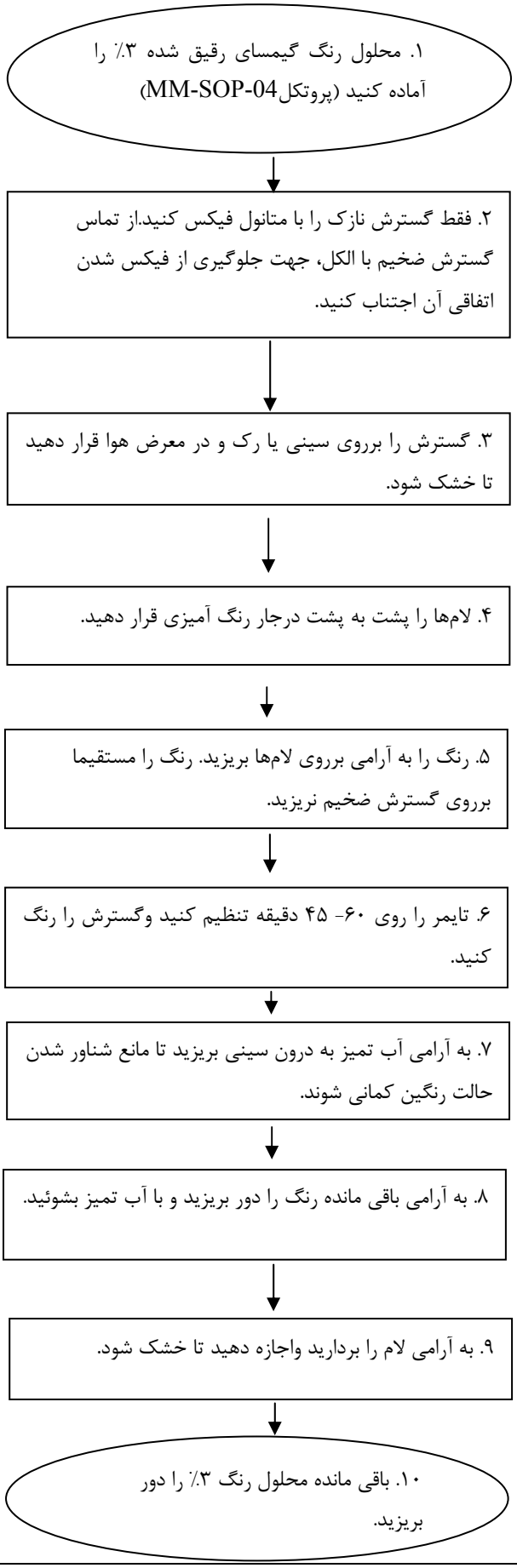
۷. به آرامی آب بافر به درون سینی بریزید تا از تشکیل حالت رنگین کمانی جلوگیری کنید. برای جلوگیری از تخریب گسترش ضخیم آب بافر را از قسمت انتهایی گسترش نازک بریزید.

۸. به آرامی باقیمانده رنگ را بشویید و تخلیه کنید.

۹. بادقت لام‌ها را یکی یکی بردارید وبه حالتی که گسترش رو به پایین است روی رک خشک کن قرار دهید مواظب باشید قسمت ضخیم گسترش با لبه رک تماس حاصل نکند.

۱۰. باقی مانده محلول رنگ ۳٪ را دور بریزید.

۵-۲. روش آهسته (۳٪)



۶. نکات

- **خشک کردن گسترش ضخیم**

گسترش ضخیم باید قبل از رنگ آمیزی کاملا خشک شود. می‌توان گسترش را سریعا با هوای گرم ملایم حاصل از سشوار خشک کرد. از گرفتن لام روی شعله جهت خشک کردن خود داری کنید زیرا باعث فیکس شدن گسترش و رنگ آمیزی نامطلوب می‌شود.

- **استفاده از آب بافر جهت شستشوی لام‌ها**

PH مورد استفاده برای شستشو بسیار مهم است به طور مثال آب اسیدی باعث بی رنگ شدن گسترش‌ها می‌شود. به همین خاطر توصیه می‌شود که از همان بافر رقیق‌کننده رنگ برای شستشو استفاده شود که دارای PH= ۷/۲ است.

- **مراقبت از لوازم شیشه‌ای و ابزار اندازه گیری**

استوانه مدرج، پیپت ها، جار رنگ آمیزی و بشرها بایستی پیش از استفاده تمیز و خشک شوند. رنگ آمیزی گسترش‌های خونی با لوازم کثیف نتایج نامطلوبی را به بار می‌آورد. ابزاری که برای رنگ آمیزی گیمسا استفاده می‌شود بایستی سریعا بعد از استفاده آب کشی شود. آنها را باید پیش از شستن در یک محلول شوینده غوطه ور کرد. لوازم را می‌توان با یک شوینده ملایم شست و متعاقبا آنها را با آب تمیز آب کشی نمود. چنانچه مقدار کمی از شوینده برروی ظروف شیشه‌ای و پلاستیکی باقی بماند می‌تواند PH آب و رنگ را تغییر داده و منجر به نتایج نامطلوب در رنگ آمیزی در استفاده‌های بعدی از آنها شود.

هشدارها

در حین رنگ آمیزی با رنگ گیمسا (۳٪یا ۱۰٪) برروی سطح لام یک لایه متالیک سبزرنگ شکل می‌گیرد. مواظب باشید که در حین آب کشی لام این لایه روی گسترش ننشیند چرا که چسبیدن آن به سطح لام باعث اختلال در آزمایش لام می‌شود.گسترش خونی بایستی تا جایی که امکان دارد بلافاصله بعد از تهیه رنگ آمیزی شود (البته برای تهیه لام آموزشی و اسلاید بانک باید بین زمان تهیه لام و رنگ آمیزی حداقل دو ساعت فاصله باشد). نگهداری لام‌ها برای چند روز در شرایط گرم و مرطوب پیش از رنگ آمیزی باعث فیکسه شدن خود به خودی گسترش ضخیم شده و آن را برای تشخیص میکروسکوپی نامطلوب می‌سازد.

تکنیک رنگ آمیزی لام‌های منفرد

۱. لام‌ها را با فاصله روی رک رنگ آمیزی بچینید مراقب باشید با یکدیگر تماس پیدا نکنند.

۲. رنگ را به آرامی برروی لام بریزید تا لام را کاملا بپوشاند. هر لام نیاز به تقریبا ۳ml از رنگ دارد. از ریختن مستقیم رنگ روی گسترش ضخیم بپرهیزید.

۳. اجازه دهید رنگ برای مدت ۶۰- ۴۵ دقیقه (برای محلول ۳٪ رنگ گیمسا) و ۱۵- ۱۰ دقیقه (برای محلول ۱۰٪ رنگ گیمسا) برروی لام باقی بماند. مدت زمان مناسب برای رنگ آمیزی با کنترل کیفیت داخلی، بدست می‌آید.

۴. پس از اتمام زمان رنگ آمیزی سطح لام را کاملا با آب بافر بپوشانید تا حالت رنگین کمان شکل گرفته برروی سطح لام حذف شود. آب بافر با PH=۷/۲ را باید از انتهای گسترش نازک و به آرامی برروی لام ریخت تا مانع از تخریب و شسته شدن گسترش‌های ضخیم شد.

۵. لام‌ها را یکی یکی بردارید و آنها را به شکلی که گسترش ضخیم رو به پایین باشد برروی رک خشک کن قرار دهید. مواظب باشید گسترش ضخیم با لبه‌های رک تماس نیابد.

۷. SOPهای مرتبط

MM-SOP-3c: کنترل کیفیت محلول ذخیره گیمسا و آب بافر

MM-SOP-04: تهیه محلول رقیق شده رنگ گیمسا

۸. منابع

WHO اصول میکروسکوپی مالاریا. بخش۱. راهنمای آموزشی. چاپ دوم.ژنو ۲۰۱۰.

Storey J. روش اجرایی استاندارد برای میکروسکپی مالاریا با رنگ گیمسا. ۲۰۱۲. منتشر نشده.

۹. سوابق مستند

تاریخ (روز/ماه/ سال)	ویرایش	توضیحات	فرد مسئول (نام ونام خانوادگی)
۱۳۹۶/۰۴/۱۴	۲	بازنگری و ویرایش فارسی	اعضای کمیته تدوین SOP ۱. دکتر عباس شهبازی ۲. مهندس مسعود یریان ۳. علیرضا صادقی ۴. علی حافظی ۵. فیروزه گوشه

بررسی میکروسکوپی گسترش‌های ضخیم ونازک جهت تشخیص انگل‌های مالاریا

روش اجرایی استاندارد میکروسکوپی مالاریا MM-SOP-08

۱. هدف

توضیح روش یافتن و تشخیص انگل‌های مالاریا در گسترش‌های رنگ آمیزی شده با رنگ گیمسا بوسیله میکروسکوپ نوری.

این روش تنها با تأیید یک هماهنگ‌کننده کشوری مسئول تضمین کیفیت میکروسکوپی مالاریا قابل تغییر است. تمام روش‌های تخصصی توصیف شده برای همه میکروسکوپیست‌های مالاریا درآزمایشگاه‌های مرجع کشوری، آزمایشگاه‌های بیمارستانی یا آزمایشگاه‌های بهداشتی ارائه‌دهنده خدمات سلامت مجری برنامه میکروسکوپی مالاریا، اجباری است.

۲. مقدمه

شناسایی نوع و مراحل انگل‌های مالاریا و تعیین میزان تراکم انگل در مراقبت بالینی بیمار مبتلا به مالاریا، در آزمون‌های بررسی مقاومت دارویی، بررسی‌های اپیدمیولوژیکی مالاریا و برنامه‌های کنترلی بسیار حائز اهمیت است.

بنابراین، تشخیص مالاریا برپایه بررسی گسترش خون محیطی بایستی با یک شمارش دقیق انگلی تکمیل گردد.

بررسی گسترش خون محیطی همچنین امکان یافتن چندین عامل بیماری خونی دیگر، تشخیص مورفولوژی انواع کم خونی‌ها و شناسایی چندین اختلال خون شناسی، که بایستی توسط میکروسکوپیست گزارش شود را نیز می‌دهد.

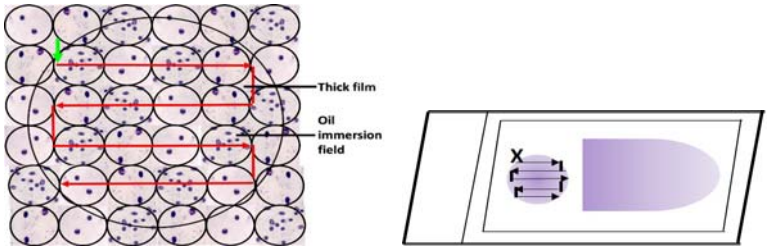
۳. مواد، تدارکات وتجهیزات

- یک میکروسکوپ دوچشمی، تجهیز شده با یک جفت چشمی ۱۰x(عدسی چشمی سرمیکروسکوپ) وشیئ‌های ۱۰x، ۴۰x و ۱۰۰x و بخش‌های مکانیکی(یک نشانگر شیئی و یک عدسی شیئی۶۰ x نیز ممکن است طراحی شده باشد).
- گسترش‌های رنگ آمیزی شده با رنگ گیمسا جهت بررسی میکروسکوپی
- روغن ایمرسیون، نوع A، با کیفیت بالا
- کاغذ لنز پاک کن
- یک خودکار و یک مداد و
- دفتر استاندارد ثبت گزارش عملکرد مالاریا (براساس آخرین پروتکل وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی)

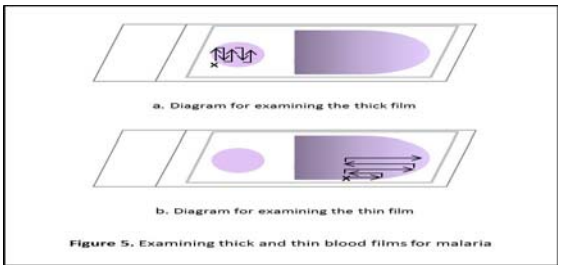
۴. روش اجرا

شرح فعالیت	نمودار آجرا
۴-۱- بررسی گسترش ضخیم ۱. گسترش رنگ آمیزی شده مورد نظر را روی صفحه میکروسکوپ قرار دهید، در حالی که برچسب اطلاعات درقسمت چپ لام باشد. موقعیت گسترش ضخیم در راستای عدسی شیئی ۱۰x باشد. ۲. میکروسکوپ را روشن کنید، منبع نور را در بهترین حالت تنظیم کنید و وضوح تصویر را با جستجو درون عدسی شیئی x ۱۰ برای چشم خود پیدا کنید. ۳. گسترش خونی را برای یافتن انگل‌ها و عناصر خونی، مورد جستجو قرار دهید. بخشی ازگسترش را که خوب رنگ آمیزی شده و توزیع یکسانی از گلبول‌های سفید دارد را انتخاب کنید ۴. قطره کوچکی از روغن ایمرسیون را روی گسترش ضخیم قرار دهید. برای جلوگیری از آلودگی دوطرفه و اتفاقی، هم روغن و هم لام، ازتماس نوک قطره چکان روغن با لام اجتناب کنید. اجازه ندهید که عدسی ۴۰x باروغن تماس حاصل کند. ۵. عدسی شیئی ۱۰۰x را به روی بخش انتخاب شده گسترش ضخیم ببرید. با تنظیم دقیق وضوح تصویر آن را به طور شفاف ببینید. برای جلوگیری از آسیب به لام صفحه مکانیکی را به آرامی بالا ببرید. ۶. با تنظیم دقیق، عناصر سلولی را به وضوح ببینید، وکیفیت گسترش را با بررسی وضوح تصویر مورد تایید قرار دهید. حضور ۲۰-۱۵ گلبول سفید در هرمیدان گسترش ضخیم بیانگر کیفیت مطلوب گسترش می‌باشد. گسترش‌های با تعداد کمتر گلبول سفید نیازمند بررسی وسیع تری می‌باشند. ۷. لام را به روش قاعده مندی مورد بررسی قراردهید. ازقسمت سمت چپ بالای گسترش شروع کنید(درشکل ۱ با پیکان عمودی سبز رنگ نشان داده شده) واز حاشیه میدان شروع کنید، سپس میدان به میدان و به حالت افقی به سمت راست حرکت کنید ۸. هنگامی که به انتهای دیگر گسترش رسیدید، به آرامی به سمت پایین لام حرکت کنید، سپس به سمت چپ، میدان به میدان، وهمچنان به جلو(تصویر پایین را ببینید). برای یک بررسی دقیق، به طور مداوم و در هر میدان، اقدام به تنظیم دقیق وضوح تصویر بنمایید.	۴-۱- بررسی گسترش ضخیم ۱- گسترش رنگ آمیزی شده را روی صفحه میکروسکوپ به شکلی که برچسب اطلاعات در سمت چپ وگسترش ضخیم در زیر عدسی شیئی ۱۰x باشد قرار دهید. ↓ ۲. میکروسکوپ را روشن کنید، و نور را دربهترین حالت تنظیم کنید. ↓ ۳. قطره‌ای روغن ایمرسیون را روی گسترش ضخیم قرار دهید. ↓ ۴. جستجو کنید و هر قسمتی که به خوبی رنگ گرفته را انتخاب کنید. ↓ ۵. عدسی شیئی ۱۰۰x را به سمت گسترش ضخیم بچرخانید، به شکلی که درون روغن قرار گیرد. ↓ ۶. با یک تنظیم دقیق، روی گسترش خونی متمرکز شوید. ↓ ۷. با اولین میدان بالا و سمت چپ شروع کنید، و سپس روی لام، میدان به میدان به سمت راست حرکت کنید. ↓ ۸. زمانی که به انتهای گسترش رسیدید، به سمت پایین حرکت کنید، سپس میدان به میدان به سمت چپ، و همینطور رو به جلو.

شکل.۱. بررسی یک گسترش ضخیم خون



شرح فعالیت	نمودار فعالیت
۴-۲. تشخیص حضور انگل مالاریا درگسترش ضخیم و شناسایی نوع آن ۱. بررسی گسترش را به تعداد ۱۰۰ میدان و با عدسی روغنی ادامه دهید. گسترش را درزیر عدسی روغنی میدان به میدان و (مطابق با شکل ۱) به جلو حرکت دهید و وضوح تصویر را به دقت تنظیم کنید. ۲. قبل ازاینکه بخواهیم یک گسترش ضخیم را به شکل " انگل مالاریایی مشاهده نشد" گزارش کنیم باید حداقل ۱۰۰ میدان میکروسکوپی با قدرت بزرگنمایی بالا مورد بررسی قرار دهیم. اگر مقدور باشد، بایستی کل گسترش ضخیم را ببینیم. ۳. درصورت مشاهده انگل، پیش از آنکه بخواهیم نوع انگل را شناسایی و اعلام کنیم، تعداد ۱۰۰ میدان دیگر را باید مورد بررسی قرار دهیم تا ازنبودن عفونت مختلط(MIX) مطمئن شویم. ۴. گسترش نازک را بایستی جهت تایید قطعی گونه انگل مورد بررسی قرار داد. برعکس گسترش ضخیم، گسترش نازک امکان مشاهده شکل کامل انگل و مورفولوژی گلبول قرمز را فراهم می‌کند. یک بررسی را در قسمت پر مانند انتهایی (نزدیک به انتهای شعله شمعی) و حاشیه گسترش نازک به شکلی که در روش ۴-۳توضیح داده شده انجام دهید. ۵. تمام انواع و مراحل مربوط به انگل را شناسایی و در دفتر ثبت گزارشات میکروسکوپی مالاریا ثبت کنید. (MM-SOP 6b را ببینید: ثبت وگزارش نتایج میکروسکوپی). نکته: به Bench aid سازمان بهداشت جهانی در زمینه شناسایی وتایید انواع انگل‌های مالاریا مراجعه کنید	۴-۲.تشخیص حضور انگل مالاریا در گسترش ضخیم و شناسایی نوع آن ۱. گسترش ضخیم را در زیر عدسی روغنی میدان به میدان و به شکلی افقی و عمودی مورد بررسی قرار دهید. ↓ ۲. حداقل ۱۰۰ میدان میکروسکوپی را پیش از گزارش " هیچ گونه‌ای از انگل مالاریا دیده نشد" ببینید. ↓ ۳. درصورت یافتن انگل، ۱۰۰ میدان دیگر را برای افزایش شانس تشخیص عفونت مضاعف جستجو کنید. ↓ ۴. گسترش نازک را همیشه برای تایید نوع انگل مشاهده شده در گسترش ضخیم ببینید. ↓ ۵. تمام گونه‌ها ومراحل دیده شده انگل را تعیین و ثبت کنید.

شرح فعالیت	نمودار فعالیت
۴-۳. بررسی گسترش نازک برای تایید گونه‌های انگل و عفونت‌های مختلط (MIX) ۱. برای تایید گونه‌های انگل یا عفونت‌های مختلط(MIX) بدنبال بررسی گسترش ضخیم، گسترش نازک را هم بررسی کنید. ۲. یک قطره روغن ایمرسیون در حاشیه پرمانند (نزدیک به انتهای شعله شمعی) گسترش نازک قراردهید. ۳. میدان را با عدسی X 10 پیدا کنید و با عدسی 100X بررسی را ادامه دهید. ۴. ناحیه زیر شعله شمعی یا حاشیه گسترش نازک، جایی که گلبول‌های قرمز کنار هم قرارگرفته و کمترین روی هم افتادگی وجود دارد را بررسی کنید. ازالگوی حرکت نشان داده شده در تصویر ۲ تبعیت کنید. درحاشیه گسترش حرکت کنید، سپس لام را به اندازه یک میدان به سمت خارج، یک میدان به سمت داخل حرکت دهید، به حالت حرکت عرضی برگردید و ادامه دهید. شکل۲. بررسی گسترش نازک  Figure 5. Examining thick and thin blood films for malaria ۵. تا زمان یافتن همه گونه‌های انگل مالاریا و تایید آن به جستجو ادامه دهید. تمام انواع و مراحل انگلی را پس از تایید در دفتر ثبت گزارشات میکروسکوپی مالاریا ثبت کنید. (MM-SOP 6b را ببینید: ثبت وگزارش نتایج میکروسکوپی). نکته: به Bench aid سازمان بهداشت جهانی در زمینه شناسایی و تایید انواع انگل‌های مالاریا مراجعه کنید.	۴-۳. بررسی گسترش نازک برای تایید گونه‌های انگل و عفونت‌های مختلط (MIX) ۱. گسترش نازک را بایستی جهت تایید گونه‌های انگلی و عفونت مختلط(MIX) مورد بررسی قرار داد. ↓ ۲. یک قطره روغن در حاشیه پرمانند گسترش قرار دهید. ۳. میدان را با عدسی X 10 پیدا کنید و با عدسی 100X بررسی را ادامه دهید. وضوح تصویر را برای چشم خود تنظیم کنید. ↓ ۴. گسترش نازک یا حاشیه پرمانند گسترش را ببینید، به شکل افقی یا عمودی از یک میدان به میدان بعدی بروید. ↓ ۵. گسترش را تا زمانی که همه انواع انگل مورد تایید قرار گیرد جستجو کنید.

۵. فرم‌ها و مستندات

- فرم گزارش نتایج (براساس آخرین پروتکل وزارت بهداشت، درمان وآموزش پزشکی)
- دفتر ثبت نتایج میکروسکوپی مالاریا (براساس آخرین پروتکل وزارت بهداشت، درمان وآموزش پزشکی باشد)

۶. SOPهای مرتبط

MM-SOP-06: ثبت وگزارش نتایج میکروسکوپی

۷. منابع

راهنمای کمک آموزشی WHO برای تشخیص مالاریا. ژنو۲۰۰۹.

راهنمای کمک آموزشی WHO برای تشخیص عفونت‌های فیلاریایی. ژنو۱۹۰۷.

راهنمای کمک آموزشی WHO برای تشخیص مورفولوژی کم خونی ها. ژنو ۲۰۰۱.

کتابچه راهنمای دستی تضمین کیفیت WHO برای میکروسکوپی مالاریا. ویرایش ۲. ژنو ۲۰۱۵.

اصول میکروسکوپی مالاریای WHO. بخش ۱. راهنمای آموزش گیرندگان. ویرایش دوم. ژنو ۲۰۱۰.

روش‌های اجرایی استاندارد بانک لام کشوری مالاریای WHO. ژنو ۲۰۱۵ (دردست تهیه).

۹. سوابق مستند

تاریخ (روز/ماه/سال)	ویرایش	توضیحات	فرد مسئول (نام، نام خانوادگی)
۱۳۹۶/۰۴/۱۴	۲	بازنگری و ویرایش فارسی	اعضای کمیته تدوین SOP ۱. دکتر عباس شهبازی ۲. مهندس مسعود یریان ۳. علیرضا صادقی ۴. علی حافظی ۵. فیروزه گوشه

شمارش انگل مالاریا

روش اجرایی استاندارد میکروسکوپی مالاریا MM- SOP- 09

۱. هدف

توضیح روش شمارش انگل‌های مالاریا برروی گسترش‌های ضخیم و نازک

این روش تنها با تایید یک هماهنگ‌کننده کشوری مسئول تضمین کیفیت میکروسکوپی مالاریا قابل تغییر است. تمام روش‌ها برای همه میکروسکوپیست‌های مالاریا درآزمایشگاه‌های مرجع کشوری، آزمایشگاه‌های بیمارستانی یا آزمایشگاه‌های بهداشتی ارائه‌دهنده خدمات سلامت مجری برنامه میکروسکوپی مالاریا، اجباری است.

۲. مقدمه

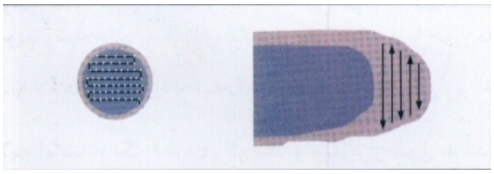
میزان تراکم انگل، اطلاعاتی را در مورد شدت عفونت و پاسخ به درمان به ما می‌دهد. شمارش انگل در مورد مراحل جنسی و غیر جنسی پلاسمودیوم فالسی پاروم، پلاسمودیوم ویواکس، پلاسمودیوم مالاریه و پلاسمودیوم اووال انجام می‌شود و تمام گونه‌ها و تمام مراحل تکاملی انگل‌های مالاریا شمارش و گزارش می‌شود.

شمارش انگل برروی گسترش ضخیم انجام می‌شود. تنها در صورتی که گسترش ضخیم موجود نباشد یا آسیب دیده باشد شمارش برروی گسترش نازک انجام می‌شود.

3. مواد، تدارکات وتجهیزات

- یک میکروسکوپ مجهز به دو عدسی چشمی ۱۰X و عدسی‌های شیئی ۱۰x، ۴۰x و ۱۰۰x و یک صفحه مکانیکی (ممکن است به یک نشانگر شیئی و یک عدسی شیئی ۶۰x مجهز شده باشد).
- یک شمارشگر دو یا چند انگشتی یا دو شمارشگر تک انگشتی (یکی برای شمارش انگل‌های مالاریا ودیگری برای شمارش گلبول‌های سفید).
- لام خونی رنگ آمیزی شده با رنگ گیمسا که قرار است شمرده شود.
- روغن ایمرسیون، (نوع A)، با کیفیت بالا
- لنز پاک کن
- یک خودکار و یک مداد
- یک ماشین حساب

۴. روش اجرا

شرح فعالیت	نمودار مراحل انجام
۴-۱. شمارش انگل روی گسترش ضخیم و محاسبه تراکم انگل ۱. لام شیشه‌ای را روی صفحه میکروسکوپ به گونه‌ای که لیبل آن درسمت چپ باشد قرار دهید. ۲. تمام فرم‌های انگل را بشمارید (در هردوشکل عفونت مختلط یا تک انگلی). در عفونت میکس تمام فرم‌های انگل با هم شمارش می‌شوند و وجود چندگونه‌ای نیز گزارش می‌شود. ۳. از بالاترین نقطه گسترش شروع کنید یک میدان با تعداد مناسبی از گلبول سفیدی که کنار هم قرار گرفته اند را انتخاب و شمارش را شروع کنید. ۴. با استفاده از یک شمارشگر هم انگل و هم گلبول سفید را با فشردن دکمه‌هایی که برای هرکدام درنظر گرفته اید بشمارید. اگر دوشمارشگر موجود باشد یکی را برای گلبول سفید ودیگری رابرای انگل استفاده کنید. ۵. بعد ازشمارش تمام انگل‌ها وگلبول سفید یک میدان به سمت میدان دیگر و با توجه به شکل زیر حرکت کنید و همان روش شمارش را تکرار کنید. مراقب باشید که میدان‌های انتخاب شده برروی هم نیافتد. شکل.۱. الگوی حرکت برای شمارش انگل وگلبول سفید 	۴-۱. شمارش انگل روی گسترش ضخیم و محاسبه تراکم انگل ۱. لام را به شکلی که لیبل آن به سمت چپ باشد روی میکروسکوپ قرار دهید. ↓ ۲. حضور انگل مالاریا و نوع گونه و مراحل آن را معین و ثبت کنید. ↓ ۳. از بالاترین نقطه سمت چپ گسترش برای یک میدان مناسب ازنظر انگل و گلبول سفید شروع کنید. شمارش را آغاز کنید. ↓ ۴. روی دکمه‌های انتخاب شده شمارشگر برای هر یک انگل و گلبول سفید که مشاهده می‌کنید جداگانه فشاردهید. ↓ ۵. بعد از شمارش تمام انگل‌ها و گلبول سفید در یک میدان به میدان بعدی بروید وروش شمارش را تکرار کنید، الی آخر.

شرح فعالیت	نمودار مراحل انجام
۶. برای اینکه بدانید چگونه شمارش را تمام کنید از قانون زیر می‌توانید استفاده کنید. • اگر مساوی یا بیش از ۱۰۰ انگل (≤۱۰۰) در ۲۰۰ گلبول سفید شمردید، شمارش را متوقف کنید و نتایج را به شکل تعداد انگل به ازای ۲۰۰ گلبول سفید ثبت کنید. • اگر مساوی یا کمتر از ۹۹ انگل (≥۹۹) در ۲۰۰ گلبول سفید شمردید شمارش را تا ۵۰۰ گلبول سفید ادامه دهید و نتیجه را به شکل تعداد انگل به ازای ۵۰۰ گلبول سفید ثبت کنید.	۶. بسته به تعداد انگل مشاهده شده، شمارش را بعد از ۲۰۰ یا ۵۰۰ گلبول سفید متوقف کنید. • اگر مساوی یا بیش از ۱۰۰ انگل (≤۱۰۰) در ۲۰۰ گلبول سفید شمردید، شمارش را متوقف کنید،و نتایج را به شکل تعداد انگل به ازای ۲۰۰ گلبول سفید ثبت کنید. • اگر مساوی یا کمتر از ۹۹ انگل (≥۹۹) در ۲۰۰ گلبول سفید شمردید شمارش را تا ۵۰۰ گلبول سفید ادامه دهید ونتیجه را به شکل تعداد انگل به ازای ۵۰۰ گلبول سفید ثبت کنید.
۷. تمام انگل‌ها و گلبول سفید میدان آخر را بشمارید، حتی اگر شمارش گلبول سفید از مرز ۲۰۰ یا ۵۰۰ نیز بگذرد.	۷. تمام انگل‌ها و گلبول سفید میدان آخر را بشمارید.
۸. تعداد واقعی انگل‌ها و گلبول‌های سفید را برروی یک برگ کار مناسب بنویسید.	۸. تعداد واقعی انگل‌ها وگلبول‌های سفید شمرده شده را ثبت کنید.
۹. زمانی که شمارش کامل شد، تراکم انگل را براساس تعداد واقعی گلبول سفید بیمار محاسبه کنید. اگر شمارش واقعی گلبول سفید را نداشتید، یک حد متوسطی ازگلبول سفید معادل ۸۰۰۰ در میکرو لیتر را برای محاسبه در نظر بگیرید از فرمول زیر برای محاسبه تعداد انگل استفاده کنید. $\text{تعداد انگل در میکرولیتر} = \frac{\text{تعداد انگل شمرده شده} \times 8000}{\text{تعداد گلبول سفید شمرده شده}}$	۹. شدت تراکم انگل را با فرمول زیر محاسبه کنید $\text{تعداد انگل در میکرولیتر} = \frac{\text{تعداد انگل شمرده شده} \times 8000}{\text{تعداد گلبول سفید شمرده شده}}$

شرح فعالیت	نمودار مراحل اجرا
۴-۲- نکته: در صورت فقدان گسترش ضخیم شمارش انگل روی گسترش نازک انجام می‌دهیم.	۴-۲. شمارش انگل روی گسترش نازک و محاسبه تراکم انگل
۱. تمام گلبول‌های قرمز آلوده را بشمارید. همه فرم‌های انگل از جمله گامتوسیت‌ها را نیز بشمارید. درعفونت میکس، تمام گلبول‌های قرمز آلوده با هم شمارش می‌شوند، وجود گونه‌های متعدد(حالت میکس) گزارش می‌شود.	۱. اگر گلبول‌های قرمز آلوده شده موجود باشند،تمام گلبول‌های قرمز آلوده را بشمارید و ثبت کنید.
۲. در قسمت بالای گسترش نازک، یک میدان با حدود ۲۵۰ گلبول قرمز را پیدا کنید. همه تعداد گلبول‌های قرمز آن میدان و تعداد انگل موجود را بشمارید. یک میدان نمونه (با بزگنمایی ۱۰۰) بایستی دارای ۲۵۰ گلبول قرمز باشد.	۲. از قسمت بالای گسترش نازک شروع کنید، بدنبال یک میدان تیپیک با گلبول‌های قرمز آلوده ودیگر گلبول‌های قرمز بگردید.
۳. از شمارشگر چند انگشتی استفاده کنید، گلبول‌های قرمز آلوده و غیر آلوده را با فشردن دکمه در نظر گرفته شده بشمارید. اگر شمارشگر دو انگشتی بود یکی رابرای گلبول قرمز آلوده ودیگری را برای غیر آلوده در نظر بگیرید.	۳. دکمه‌های در نظر گرفته شده را برای هرکدام از گلبول‌های آلوده وغیر آلوده فشار دهید.
۴. بعد از شمردن تمام انگل‌ها و گلبول‌های قرمز به میدان بعدی حرکت کنید، از الگوی نشان داده شده در شکل ۱ تبعیت کنید و روش شمارش را تکرار کنید. مراقب باشید که میدان‌ها روی هم نیافتند. در عرض گسترش به مقداری که لازم باشد حرکت کنید. تمام گلبول‌های آلوده و غیرآلوده را بشمارید حتی اگر تعدادگلبول‌های قرمز از ۲۵۰ عدد تجاوز کند.	۴. بعداز شمردن تمام گلبول‌های قرمز آلوده وغیر آلوده در یک میدان، نتایج را ثبت کنید، به میدان بعدی حرکت کنید، و همان روش شمارش را ادامه دهید.
۵. شمارش را زمانی که حدود ۲۰ میدان هریک با حدود ۲۵۰ گلبول قرمز (حدود ۵۰۰۰ گلبول قرمز) شمردید، متوقف کنید. تعداد واقعی گلبول‌های آلوده وغیر آلوده را برروی یک برگ کار مناسب یاداشت کنید. از این الگوها برای محاسبه شمارش کلی انگل در هر میکرولیتر خون استفاده کنید.	۵. بعد از دیدن ۲۰ میدان گسترش نازک، شمارش را متوقف کنید، و نتیجه شمارش تمام گلبول‌های آلوده و غیر آلوده را ثبت کنید.
۶. زمانی که شمارش کامل شد، میزان تراکم انگل را از روی مقدار واقعی گلبول‌های قرمز بیمار حساب کنید. اگر مقدور نبود، از یک میانگینی معادل ۵۰۰۰۰۰۰ درمیکرولیتر و فرمول زیر استفاده کنید. $\text{انگل در میکرولیتر خون} = \frac{\text{تعداد گلبول قرمز آلوده} \times 5000000}{\text{تعداد گلبول قرمز شمرده شده}}$	۶. بعد از ثبت تعداد کل آلوده‌ها و غیر آلوده در۲۰ میدان با استفاده از فرمول زیر شدت تراکم انگل را محاسبه کنید. $\text{انگل در میکرولیتر خون} = \frac{\text{تعداد گلبول قرمز آلوده} \times 5000000}{\text{تعداد گلبول قرمز شمرده شده}}$

۵. SOPهای مرتبط

MM-SOP 6b : ثبت وگزارش نتایج میکروسکوپی

MM-SOP 08: آزمون میکروسکوپی گسترش‌های ضخیم و نازک برای شناسایی انگل‌های مالاریا

۶. منابع

WHO. کمک راهنمای تشخیصی مالاریا. ژنووا ۲۰۰۹

WHO. تضمین کیفیت مالاریا. چاپ دوم. ژنووا ۲۰۱۵

WHO. اصول میکروسکوپی مالاریا. بخش ۱. راهنمای آموزشی. چاپ دوم. ژنو ۲۰۱۰

WHO. رویه‌های اجرایی استاندارد بانک لام مالاریا. ژنو ۲۰۱۵ (دردست تهیه)

۷. سوابق مستند

تاریخ (روز/ماه/ سال)	ویرایش	یاداشت	فرد مسئول (نام ونام خانوادگی)
۱۳۹۶/۰۴/۱۴	۲	بازنگری و ویرایش فارسی	اعضای کمیته تدوینSOP ۱. دکتر عباس شهبازی ۲. مهندس مسعود یریان ۳. علیرضا صادقی ۴. علی حافظی ۵. فیروزه گوشه

آماده‌سازی لکه‌های خون برروی کاغذ فیلتر

روش اجرایی استاندارد میکروسکوپی مالاریا MM-SOP-10

۱. هدف

توضیح روش آماده‌سازی لکه‌های خون خشک شده برروی کاغذ فیلترمناسب جهت آنالیز DNA

این روش تنها با تایید یک هماهنگ‌کننده کشوری مسئول تضمین کیفیت میکروسکوپی مالاریا قابل تغییر است. تمام روش‌های تخصصی توصیف شده برای همه میکروسکوپیست‌های مالاریا درآزمایشگاه‌های مرجع کشوری، آزمایشگاه‌های بیمارستانی یا آزمایشگاه‌های بهداشتی ارائه‌دهنده خدمات سلامت مجری برنامه میکروسکوپی مالاریا، اجباری است.

۲. مقدمه

بررسی وجود اسیدهای نوکلئیک با روش واکنش زنجیره پلیمرازی (PCR) برای تشخیص مالاریا بویژه برای موارد عفونت مختلط و کم انگل نسبت به روش میکروسکوپی حساس تر است. برخی از نمونه‌ها در آزمایشگاه به جهت تایید گونه انگل و همچنین موارد عفونت مختلط(MIX) ممکن است به روش PCR مورد آنالیز قرار گیرند.

جمع آوری خون به روش لکه گذاری برروی کاغذ فیلتر را همچنین می‌توان برای تعیین ژنوتیپ سوش انگل در تمایز عفونت‌های ناشی از انتقال محلی، از موارد وارده در برنامه حذف مالاریا مورد استفاده قرار داد.

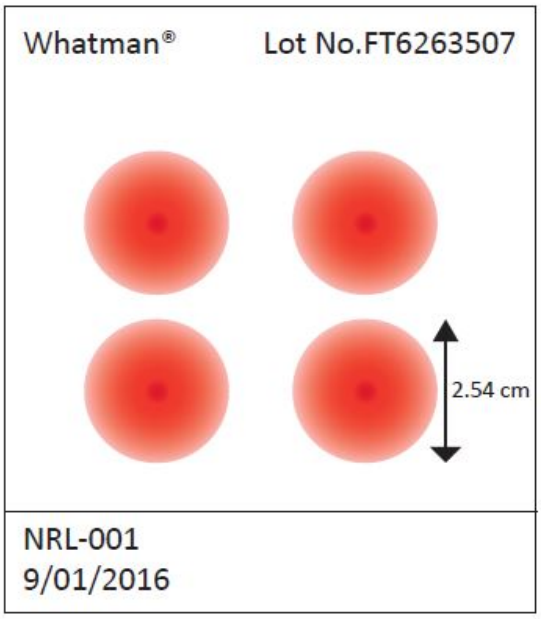
۳. مواد، تدارکات وتجهیزات

- کاغذ فیلتر واتمن ("آنالیزموقت سریع"(FTA)، واتمن ۲ یا ۳ یا واتمن ۹۰۳) برای امکان هردو آنالیز ژنوتیپی و سرولوژیکی.
- یک میکروپیپت(سمپلر)، با ظرفیت حجمی۲۰۰-۲۰ میکرولیتر، همراه با نوک متناسب آن
- کیسه پلاستیکی زیپ دار، برای هربیمار یک عدد
- جاذب رطوبت بدون کلرید کبالت (از آنهایی که به تازگی از محتویات بسته‌های تست‌های تشخیص سریع باز شده اند نیز می‌توان استفاده کرد، اما بایستی دقت کرد که تغییر رنگ نداده باشند، درغیر این صورت این رطوبت گیرها را از مراکز فروش آن تهیه کنید).
- خون کامل تازه یا خون همراه با ضد انعقاد (EDTA، سدیم سیترات، سیترات دکستروز یا هپارین)
- یخچال ۴ درجه سانتیگراد(برای نگهداری نمونه به مدت ۴ هفته چنانچه در طی این مدت آزمایش انجام شود)
- فریزر۲۰- درجه (برای نگهداری نمونه به مدت ۳ ماه چنانچه هدف نگهداری نمونه برای بیش ازیک ماه باشد) و
- فریزر ۸۰- (برای مواردی که قصد انجام آزمایش در بیش ازیکسال آینده باشد)

۴. روش اجرا

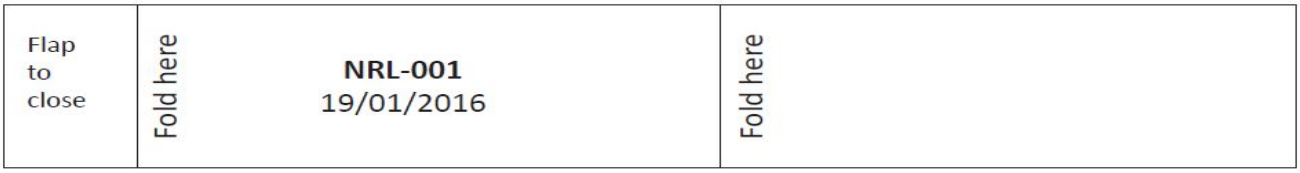
شرح فعالیت	نمودار اجرا
۱- کد آزمایشگاه، مشخصات بیمار یا کد و تاریخ نمونه گیری را روی کاغذ فیلتر بنویسید(مراجعه کنید به.MM-SOP-06a: برچسب نویسی گسترش‌های خونی مالاریا).به طور اختیاری شما ممکن است حروف اول نام و نام خانوادگی تکنیسین نمونه گیر را نیز بنویسید شکل ۱ را ببینید. ۲. اگر از کارت‌های FTA واتمن استفاده می‌کنید، مقدار ۱۲۵ میکرولیتر ازخون ((برای دایره ۲/۵۴ cm) جمع آوری شده درلوله را با پیپت بکشید و با حرکت دایره‌ای از مرکز به سمت بیرون و متحدالمرکز در مرکز ناحیه مشخص شده برروی کارت پخش کنید، برای هر بیمار حداقل دو دایره در نظر بگیرید. از لخته شدن خون برروی کاغذ اجتناب کنید، چرا که باعث تراکم ترکیبات شیمیایی برروی کارت می‌شود. همچنین خون را روی کارت نمالید یا به شکل گسترش (اسمیر) درنیاورید. ۳- اگر از کاغذ واتمن ۳،۲ یا ۹۰۳ استفاده می‌کنید، مقدار ۵۰-۴۰ میکرولیتر از خون بکشید و برروی ناحیه تعیین شده برای لکه‌ها پخش کنید. برای هر بیمار دو یا سه لکه تهیه کنید. شکل‌های ۲ و۳ را ببینید ۴- نمونه‌های قرار داده شده برروی کاغذ فیلتر برای نگهداری در دمای اتاق آماده است. ۵- چنانچه قرار است نمونه مدت کوتاهی بعد از لکه گذاری مورد آزمایش قرار گیرند اجازه دهید پیش از قرار دادن آن در کیسه پلاستیکی زیپ دارحداقل به مدت ۱ ساعت دردمای اتاق خشک شود. ازحرارت برای کوتاه کردن زمان خشک شدن استفاده نکنید. لکه‌های خون خشک شده نسبت به لکه‌های تازه گذاشته شده ظاهر تیره تری دارند. ۶- درون هر کیسه پلاستیکی زیپ دار حاوی نمونه‌های کاغذ فیلتر یک رطوبت گیر بگذارید. نمونه‌های خشک شده را همراه با رطوبت گیر در دمای اتاق نگهداری یا جابجا کنید. ۷- تمام شرایط نگهداری عاری از رطوبت را تحت نظر بگیرید(رطوبت گیر را به طور منظم برای هر تغییر رنگی که نشانگر تماس با رطوبت می‌باشد چک کنید و در صورت نیاز عوض کنید). ۸- چنانچه نمونه‌ها در مدت زمانی معادل ۴ هفته مورد آزمایش قرار گیرد آنها را در یخچال ۴ درجه نگهداری کنید. برای نگهداری طولانی تر، آنهارا در دمای ۲۰- یا ۸۰- درجه نگهداری کنید.	۱- کاغذ فیلتر را برچسب نویسی کنید. (MM-SOP-06a را ببینید: برچسب نویسی گسترش‌های خونی مالاریا). ↓ ۲. چنانچه از کاغذ واتمن FTA استفاده می‌کنید، مقدار ۱۲۵ µl خون را بکشید و در قسمت مرکز دایره مورد نظر پخش کنید. ↓ ۳. اگرازکاغذ واتمن ۳،۲ یا ۹۰۳ استفاده می‌کنید دو یاسه قطره ml ۵۰ - ۴۰ را با پیپت روی ناحیه طراحی شده (دایره) منتقل کنید. ↓ ۴. نمونه به کاربرده شده برای ساختن لکه‌ها اکنون آماده نگهداری در دمای اتاق است. ↓ ۵. پیش از اینکه کاغذ فیلتر را درکیسه زیپ دار بگذارید اجازه دهید نمونه به مدت ۱ ساعت دردمای اتاق خشک شوند ↓ ۶. داخل هر کیسه زیپ دار حاوی نمونه‌های کاغذ فیلتر، یک رطوبت گیر بگذارید. ↓ ۷. مطمئن شوید که فضای نگهداری کاملا خشک است. رطوبت گیر را به طور منظم چک کنید، ودرصورت لزوم آن را عوض کنید. ↓ ۸. چنانچه در طی چهار هفته نمونه آزمایش شود دریخچال ۴ درجه و برای نگهداری طولانی تر در۲۰- یا ۸۰- نگهدارید.

شکل.۱. لکه‌های خون خشک شده برروی کاغذ فیلتر FTA واتمن



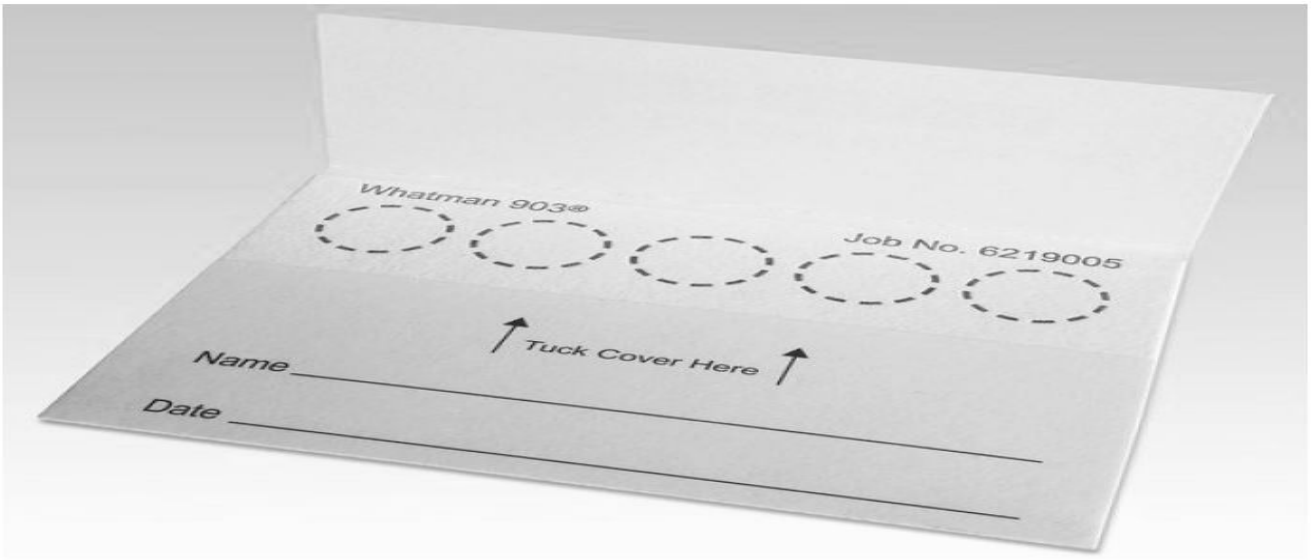
شکل.۲. لکه‌های خون خشک شده ۲ یا ۳ تایی برروی کاغذ صافی واتمن که به شکل قطعه ای، با ابعاد ۲/۵۴×۶/۳۵ سانتی متری برش خورده و یک نوار کاغذی سفت دیگری به عنوان یک پوشش و محل برچسب نویسی روی آن الصاق می‌شود

کاغذ صافی با ۲ یا ۳ لکه خون (نمای داخلی)



کاغذ سفت(نمای روبرو، به عنوان یک پوشش و همچنین محل برچسب نویسی برای کاغذ صافی حاوی خون عمل می‌کند)

شکل.۳. لکه‌های خون خشک شده برروی کاغذ واتمن ۹۰۳



۵. نکات

- برای جلوگیری از آلودگی کاغذ فیلتر دستکش دست کنید
- احتیاطات عمومی، شامل ابزارهای حفاظت پرسنلی مرتبط نظیر روپوش یا گان، ماسک و عینک لزوما باید استفاده شود.
- درزمانی که انجام آزمایش(مثال: تست تعیین ژنوتیپ و آزمون‌های سرولوژی) برروی نمونه‌ها بلافاصله امکان پذیر نیست ، چنانچه در یک فاصله زمانی ۴ هفته‌ای انجام شود آن را دریخچال ۴ درجه نگهداری کنید.
- چنانچه انجام آزمایش به ۳ ماهه بعد موکول شود نمونه‌ها را در ۲۰- درجه نگهداری کنید.
- چنانچه انجام آزمون به یک زمان طولانی تر به طور مثال بیش از یک سال موکول شود نمونه‌ها را در ۸۰- درجه نگهداری کنید.

۶. SOPهای مرتبط

MM-SOP-6a: برچسب نویسی گسترش‌های خونی

۷. منابع

WHO. روش اجرایی استاندارد بانک لام مالاریای کشوری. ژنو.۲۰۱۵ (دردست تهیه)

۸. سابقه مستند

تاریخ (ماه. سال)	ویرایش	توضیحات	فرد مسئول (نام و نام خانوادگی)
۱۳۰۹۶/۰۴/۱۴	۲	بازنگری و ویرایش فارسی	اعضای کمیته تدوین SOP ۱. دکتر عباس شهبازی ۲. مهندس مسعود یریان ۳. علیرضا صادقی ۴. علی حافظی ۵. فیروزه گوشه

روش‌های ایمنی عمومی در آزمایشگاه میکروسکوپی مالاریا

روش اجرایی استاندارد میکروسکوپی مالاریا MM-SOP-11

۱. هدف

توضیح روش‌های ایمنی عمومی درحین تهیه نمونه خون، حمل خون، آماده‌سازی گسترش و رنگ آمیزی برای میکروسکوپی مالاریا.

این روش تنها با تایید یک هماهنگ‌کننده کشوری مسئول تضمین کیفیت میکروسکوپی مالاریا قابل تغییر است. تمام روش‌ها برای همه میکروسکوپیست‌های مالاریا در آزمایشگاه‌های مرجع کشوری، آزمایشگاه‌های بیمارستانی یا آزمایشگاه‌های بهداشتی ارائه‌دهنده خدمات سلامت مجری برنامه میکروسکوپی مالاریا، اجباری است.

۲. مقدمه

کارکنان آزمایشگاه فعالیت‌هایی انجام می‌دهند که ممکن است در حین انجام آنها در تماس با بافت انسانی و نمونه‌های مایع، با خطراتی مواجه شوند. مایعات بدن انسان، بویژه نمونه‌های خون، به طور بالقوه منبعی از بیماری‌های قابل انتقالی مانند: ابتلاء به ویروس های HIV-1 و HIV-2 (ویروس نقص ایمنی انسانی)، انواع هپاتیت‌های نوع B و C و ویروس‌های تب زای خونریزی‌دهنده (ویروس ابولا) که از طریق تماس مستقیم با پوست پاره شده و غشاء موکوسی وارد بدن انسان می‌شوند، می‌باشد. ابتلای به این عفونت‌ها می‌تواند ازطریق تماس مستقیم با خون و دیگر مایعات بدن ایجاد شود. ورود اتفاقی از طریق پارگی‌های روی پوست که بوسیله اجسام برنده، تماس با سایر ابزارها و اشیاء جامد آلوده دیگر نیز می‌تواند صورت گیرد. تمام کارکنان آزمایشگاه و مجموعه درگیر بایستی با فرض براینکه تمام نمونه‌های انسانی، بالقوه آلوده‌کننده هستند، پیشگیری‌های عمومی را برای اجتناب از ابتلای به عفونت‌های با منشاء خون انسانی را به کار بگیرند. سرپرست آزمایشگاه بایستی مطمئن شود که تمام کارکنان به خوبی آموزش‌های لازم را درمورد پیشگیری‌های عمومی دیده اند و اینکه راهنمایی‌های مرتبط به نحو مناسبی در آزمایشگاه درمعرض دید کارکنان قراردارد.

۳. مواد، تدارکات و تجهیزات

- گان یا روپوش آزمایشگاهی
- عینک ایمنی(عینک آزمایشگاهی)
- اتانول یا ایزوپروپیل الکل ۷۰ ٪ یا هیپوکلریت سدیم ۱۰ ٪
- شوینده
- محلول هیپوکلریت حاوی کلرین ۱ گرم در لیتر در دسترس برای استفاده عمومی
- محلول هیپوکلریت حاوی کلرین ۵ گرم در لیتر
- دستکش لاتکس یک بارمصرف
- صابون مایع ضدباکتری یا ضدعفونی کننده
- ظرف نگهداری اجسام نوک تیز (Safty Box)
- ظرف مخصوص پسماندهای عفونی
- ظرف مخصوص پسماندهای غیر عفونی
- حوله دست یا دستمال کاغذی
- آب
- یک اتوکلاو (ازنوع مرغوب)

۴. روش اجرا

۴-۱. آزمایشگاه یا محل کار

- یک مکان تمیز، مرتب و عاری از گرد و غبار با فضای کافی به اندازه حداقل دو نفر تکنیسین آزمایشگاه مهیا کنید.
- سطوح کاری را بلافاصله بعد از پایان کار یا در پایان یک روز کاری با سفیدکننده (هیپوکلریت سدیم)، ایزوپروپیل الکل یا اتانول ۷۰٪ تمیز یا ضدعفونی کنید.

- تمام محلول‌ها و رنگ‌ها را به جهت استفاده مناسب با اطلاعاتی نظیر نام، تاریخ تهیه و شروع مصرف و تاریخ انقضاء در صورت امکان برچسب نویسی کنید.
- تمام ظروف شیشه‌ای و دیگر وسایل نظیر ظروف رنگ آمیزی را برای استفاده مجدد با شوینده تمیز کرده و با آب بشویید.
- تمام وسایل و ابزارهای مورد استفاده را در جعبه‌ها یا کشوهای طراحی شده برای این کار، نگهداری کنید، برروی قسمت خارجی آن به شکل مناسبی برچسب بزنید و در محلی که عاری از گرد و غبار، خاک و حشرات باشد نگهداری کنید.
- نمونه‌های خون را براساس قوانین کشوری یا بین المللی قابل اجرا، بسته‌بندی و منتقل کنید.
- مواد شیمیایی آسیب رسان نظیر متانول را در زمان عدم استفاده در گنجه قفل شده نگهداری کنید.

۴-۲. حفاظت شخصی

- تمام کارمندانی که با نمونه‌های خون سروکار دارند بایستی براساس یک خط مشی کشوری واکسینه شده باشند(برای مثال درمقابل هپاتیت B).
- در آزمایشگاه یا در فیلد از دستکش‌های لاتکس یک بار مصرف در هنگام حمل خون استفاده کنید. برای تمام روش‌هایی که احتمال تماس اتفاقی و مستقیم با خون و یا مواد عفونی وجود دارد دستکش بپوشید. دستکش‌های آلوده یا سوراخ شده را دور بیاندازید.
- زمانی که در آزمایشگاه کار می‌کنید روپوش یا گان بپوشید، و درهنگام ترک آزمایشگاه و یا درزمانی که درخارج آزمایشگاه هستید آن را از تن درآورید.
- عینک ایمنی به چشم بزنید.
- زخم‌های پوستی نظیر بریدگی ها، خراشیدگی‌ها و التهاب‌های پوستی را با یک پماد (مرهم) ضدآب یا چسب زخم پیش از دستکش به دست کردن بپوشانید.
- داروها، وسایل آرایشی یا مواد غذایی را در آزمایشگاه نگهداری نکنید، از به کار بردن فراورده‌های ترکیبی، لنزهای تماسی، خوردن و آشامیدن در محل‌های کار آزمایشگاه خودداری کنید.
- استفاده از تلفن همراه درآزمایشگاه نبایستی مجاز باشد.
- در هنگام استفاده از کامپیوتر شخصی و تلفن ثابت، دستکش‌ها را از دست خارج کنید.
- شستشوی مناسب دست‌ها را در زیر شیرآب و با استفاده از ضدعفونی کننده‌های پوست، صابون مایع ضد باکتری یا الکل ۷۰٪ را قبل و بعدازکار و همچنین پیش از ترک آزمایشگاه انجام دهید.

۴-۳. ایمنی درحین خون گیری وحمل آن

- فقط از لانست، سرنگ و سرسوزن‌های زیرپوستی یک بار مصرف استفاده کنید. هرگز از آنها استفاده مجدد نکنید.
- ازپیپت‌ها به طور صحیح استفاده کنید مثلا هرگز با دهان مکش نکنید، از ابزارهای مکانیکی برای مکش استفاده کنید.
- سرسوزن‌ها را دقیقا لحظه‌ای قبل ازاستفاده باز کنید، آنهارا با دقت حمل کنید. بعد از استفاده، سرپوش گذاری(Recape) نکنید، سرسوزن را درون سطل مجهز به تیغه برش بیاندازید. کل مجموعه سرنگ و سرسوزن برش خورده را دریک ظرف مخصوص پسماندهای نوک تیز بیاندازید.
- درهنگام حمل خون دقت کنید که حباب یا ذرات مایع معلق درهوا(aerosol (با منشاء خون ایجاد نشود.

۴-۴. تماس اتفاقی با عفونت‌های بالقوه نمونه‌های خون

- تمام روش‌های کمک‌های اولیه بایستی در آزمایشگاه به طور شفاف و قابل اجرا در معرض دید باشد.
- هرگونه آسیب و حوادث فهرست شده در زیر را هرچه سریعتر به مامور (متصدی) بخش کنترل عفونت آزمایشگاهی یا مدیر آزمایشگاه، سرپرست یا شخصی که عهده دار کمک‌های اولیه است گزارش کنید.
- هرگونه تماس و یا اتفاقی که ناشی از تماس با نمونه‌های بالقوه عفونت زا (برای مثال: خون، سرم، پلاسما) باشد.
- هرگونه ریزش خون در چشم یا برروی پوست بریده شده، بریدگی ناشی ازشیشه شکسته یا سوراخ شدگی با نیدل یا سرنگ، و هرگونه علائم ناخوشی که بعد از یک اتفاق رخ دهد.
- هرگونه ریختن خون را بایستی سریعا با دستمال کاغذی پوشاند تا خون ریخته شده جذب شود، و سپس محلول هیپوکلریت ۵ گرم در لیتر یا اتانل ۷۰٪ را بادقت برروی دستمال ریخت.

- زمانی که سلامت پوست به هردلیلی مانند، بریدگی پوست، خراش و یا سوراخ شدگی پوست بوسیله سرسوزن‌های آلوده به هم می‌ریزد، پوشش آلوده شده را بیرون بیاورید و بلافاصله ناحیه آسیب دیده را برای مدت ۱۵دقیقه با آب و صابون بشویید.
- زمانی که خون درچشم ترشح شد، بلافاصله چشم را درزیر فشار آب و با شدت برای حداقل ۱۵دقیقه بشویید.
- به دستور العمل روش‌های ایمنی استاندارد برای موارد اورژانسی مراجعه کنید.
- در صورت نیاز، پیگیر توصیه‌های پزشکی آن باشید.

۵. منابع

WHO. اصول ایمنی زیستی در آزمایشگاه. ویرایش سوم. ژنو۲۰۰۴.

۶. سوابق مستند

تاریخ (ماه/سال)	ویرایش	توضیحات	فرد مسئول (نام، نام خانوادگی)
۱۳۹۶/۰۴/۱۴	۲	بازنگری و ویرایش فارسی	اعضای کمیته تدوین SOP ۱. دکتر عباس شهبازی ۲. مهندس مسعود یریان ۳. علیرضا صادقی ۴. علی حافظی ۵. فیروزه گوشه

استفاده، مراقبت و نگهداری از میکروسکوپ

روش اجرایی استاندارد میکروسکوپی مالاریا MM-SOP-12

۱. هدف

توضیح روش جامع درمورد استفاده، مراقبت و نگهداری ازمیکروسکوپ در آزمایشگاه‌های مجری طرح میکروسکوپی مالاریا.

این روش تنها با تایید یک هماهنگ‌کننده کشوری مسئول تضمین کیفیت میکروسکوپی مالاریا قابل تغییر است. تمام روش‌های تخصصی توصیف شده برای همه میکروسکوپیست‌های مالاریا درآزمایشگاه‌های مرجع کشوری، آزمایشگاه‌های بیمارستانی یا آزمایشگاه‌های بهداشتی ارائه‌دهنده خدمات سلامت مجری برنامه میکروسکوپی مالاریا، اجباری است.

۲. مقدمه

میکروسکوپ‌های نوری دوچشمی با عدسی‌های شیئی x ۱۰ و x ۴۰ و یک عدسی شیئی x ۱۰۰ روغنی همراه با یک عدسی چشمی x ۱۰ برای میکروسکوپی مالاریا توصیه می‌شود. ماکزیمم پهنای قابل دید یک میدان زمانی بدست می‌آید که منبع نوری میکروسکوپ دارای تابش نوری کافی بوده و این امکان را بوجود بیاورد که در صورت بسته شدن دیافراگم ، شفافیت میدان ازدست نرود. ترجیحاً این میکروسکوپ باید دارای یک لامپ داخلی، کندانسور قابل تنظیم(درمواردی از کندانسور ثابت هم می‌توان استفاده کرد) و یک فیلتر آبی رنگ باشد.

دقت میکروسکوپی مالاریا وابسته به نحوه عملکرد و استفاده صحیح از میکروسکوپ می‌باشد. میکروسکوپ بایستی در بهترین شرایط نصب شود، از آسیب محافظت شود، متناسب با شرایط کار مورد استفاده قرارگیرد، به طور منظم سرویس و نگهداری شود و در صورت نیاز به تعمیر توسط یک پرسنل با صلاحیت مورد تعمیر قرار گیرد. مراقبت از میکروسکوپ بویژه در مراکزی که در نواحی پرگرد و غبار قرار دارند اهمیت خاصی دارد، بنابراین درچنین شرایطی بایستی در زمان عدم استفاده از میکروسکوپ آن را با روکش مخصوص میکروسکوپ پوشاند تا در هنگام نظافت کف آزمایشگاه از آسیب درامان بماند.

۳. مواد، تدارکات و تجهیزات

- میکروسکوپ مجهز به دو جفت عدسی x۱۰ چشمی و عدسی‌های شیئی x۱۰، x۴۰ و x۱۰۰ (روغنی) و قسمت‌های مکانیکی.
- پوشش محافظت کننده از گرد و غبار
- کاغذ لنزپاک کن مخصوص
- محلول تجاری مخصوص تمیز کردن میکروسکوپ
- پارچه نرم

۴. روش

۴-۱- نقل و انتقال و جابه جایی میکروسکوپ

- میکروسکوپ را با جعبه محافظ اصلی خود و درحالی که درون وسایل خاص بسته‌بندی خود (کائوچوی مخصوص آن) قرارداده اید جابجا کنید تا از تکان خوردن درحین جابجایی جلوگیری شود.
- چنانچه جعبه اصلی آن موجود نبود، ازجعبه‌ای که به طورخاص برای نقل و انتقال میکروسکوپ توسط شرکت سازنده ساخته شده و یا یک محفظه دست ساز متناسب با میکروسکوپ که محتوی فوم یا مواد مشابه بسته‌بندی باشد، برای جلوگیری از تکان خوردن در حین نقل و انتقال استفاده کنید.

- درحین انتقال، میکروسکوپ را از حرکت و لرزش اضافی محافظت کنید. به گونه‌ای ببندید که در حین انتقال در داخل وسیله نقلیه به اطراف حرکت نکند و از بالای دیگر وسایلی که همزمان انتقال داده می‌شوند نیافتد، میکروسکوپ را از تماس با آب (باران، سیل، افتادن در آب)، حرارت زیاد، تابش نور مستقیم خورشید و جوندگان محافظت کنید.
- میکروسکوپ را با دو دست و به شکلی که یک دست در زیر میکروسکوپ و دست دیگر ستون میکروسکوپ را نگه داشته حمل کنید.

۴-۲- مکان میکروسکوپ

- میکروسکوپ را روی یک میز محکم، مسطح، هموار و بدون لرزش قرار دهید. در بزرگنمایی‌های بالا، کمترین حرکت میز منجر به جابجایی بسیار بزرگی در تصویر دیده شده توسط میکروسکوپیست می‌شود.
- میکروسکوپ را در جایی قراردهید که میکروسکوپیست بتواند پاهای خود را به طور کامل در زیر میز قرار دهد. ترجیحا از صندلی‌هایی با قابلیت تنظیم ارتفاع استفاده کنید.
- میکروسکوپ را در مقابل پنجره رو به تابش شدید خورشید قرار ندهید. آنرا درمقابل دیوار یا پنجره تاریک قرار دهید.

۴-۳- نصب میکروسکوپ

- از راهنمای شرکت سازنده جهت بهترین حالت نصب سیستم نوری و استفاده عمومی پیروی کنید.
- روزنه دیافراگم را جهت دست یابی به بیشترین مقدار عمق میدان، در وضعیت توصیه شده توسط شرکت سازنده قراردهید.
- چنانچه شرکت سازنده دیافراگمی را برروی کندانسور تعبیه کرده باشد، آن را در هنگام استفاده از عدسی ۱۰۰x شیئ خود تنظیم کنید.
- از روش زیر برای مواردی که عدسی چشمی میکروسکوپ برداشته می‌شود استفاده کنید.
  - کندانسور را بالا بیاورید.
  - لامپ را در وضعیت "low" قراردهید.
  - شیئ 40x را انتخاب کنید.
  - دیافراگم را ببندید.
  - قطعه چشمی را بردارید.
  - در داخل لوله محل عدسی چشمی نگاه کنید، شروع به تنظیم کندانسورکنید تا زمانی که کناره دیافراگم به طوردقیق قابل رویت شود(درنقطه کانونی چشم ما قرارگیرد) بدون اینکه یک حاشیه خارجی به رنگ سبز یا قرمز دیده شود.
  - دیافراگم را تازمانی که عدسی شیئی کاملا با نور پر شود بازکنید.
  - شکل نور معمولاً به حالت هشت وجهی است، زمانی که نقاط هشت ضلعی نور به سطح خارجی عدسی شیئی برخورد می‌کند، دراین حالت دیافراگم را بازکنید تا نور به حالت دایره‌ای ظاهرشود.
  - قطعه چشمی را جایگزین کنید.
- یک روش جایگزین دیگر، حالتی که نیاز به برداشتن عدسی چشمی نباشد، اینست که میکروسکوپ را در وضیت تابش قرار کهلر دهید.
  - دیافراگم روی کندانسور را ببندید.
  - منبع نوری زیر میکروسکوپ، جایی که نور به درون کندانسور منعکس می‌شود را ببندید.
  - شدت تابش نور را تا جایی که ممکن است بالا بیاورید.
  - یک گسترش خونی رنگ آمیزی شده را روی صفحه قرار دهید، روغن ایمرسیون اضافه کنید، از عدسی شیئی 100x روغنی استفاده کنید.
  - درون عدسی چشمی میکروسکوپ نگاه کنید، کندانسور را با بالا و پایین کردن تنظیم کنید تا حاشیه میدان شفاف شود.

- در صورت نیاز از پیچ تنظیم روی کندانسور برای حرکت دادن دایره نور به سمت مرکز میدان استفاده کنید.
- شدت نور را پایین بیاورید، و پیش از استفاده، روزنه دیافراگم و منبع نور را باز کنید.

- فاصله بین دو عدسی را تنظیم کنید.
- دو عدسی چشمی را نیز تنظیم کنید.

۴-۴- استفاده از میکروسکوپ

- با اجزاء میکروسکوپ و عملکرد آنها جهت استفاده بهینه آشنا شوید.
- منبع نوری میکروسکوپ را روشن کنید، میزان مناسب نور را جهت دستیابی به سطح بهینه‌ای از شفافیت با تغییر (کم و زیاد کردن) دکمه تنظیم نور در پایین میکروسکوپ تنظیم کنید.
- عدسی شیئی با بزرگنمایی کوچک را درموقعیت قرار دهید، چشمی را بردارید، به سمت پایین و داخل لوله چشمی نگاه کنید و آیینه و دیافراگم را به گونه‌ای تنظیم کنید که نور در داخل لوله به سمت بالا منعکس شده و یک پرتو نورحتی المقدور دایره‌ای قابل رؤیت، در میدان دیده شود.
- نمونه را ابتد با شیئی ۱۰x، سپس با ۴۰ x و متعاقباً با شیئی ۱۰۰x روغنی ببینید.

پیشگیری از آسیب به عدسی شیئی ۴۰x

- بلافاصله هر مقدار روغنی که به صورت اتفاقی با عدسی شیئی۴۰x تماس حاصل نموده را پاک کنید. چرا که عدسی ۴۰x بلافاصله بعداز ۱۰۰x قرار گرفته و همچنین به علت اینکه این عدسی یک عدسی بلند است، به آسانی در تماس اتفاقی با روغن ایمرسیون قرار می‌گیرد.
- عدسی شیئی ۴۰x درمقابل روغن، نفوذناپذیر نیست، و باقی ماندن هر مقدار روغن روی آن باعث نفوذ روغن به درون عدسی و رسوب برروی عدسی پایین تر می‌شود. دراین مورد تنها شرکت سازنده قادر به بازکردن عدسی شیئی و تعمیر آن می‌باشد.

پیشگیری از آسیب به عدسی شیئی ۱۰۰x

- قبل از برداشتن لام صفحه مکانیکی را پایین بیاورید.
- بعد از پایان بررسی میکروسکوپی، بلافاصله با کاغذ مخصوص لنز پاک کن و تمیزکننده تجاری عدسی، عدسی شیئی را پاک کنید. چنانچه این کار را انجام ندهید، روغن روی عدسی در گذر زمان سفت و سخت شده و روی کارایی نوری آن اثر می‌گذارد.
- برای محافظت از عدسی شیئی ۱۰۰x، بایستی عدسی را در زمان عدم استفاده به سمت بالا بچرخانید.

۴-۵- مراقبت‌های روزانه

- میکروسکوپ را ازجهت آسیب احتمالی و عدم کارایی بررسی کنید.
- هرگونه آسیب و عملکرد بد میکروسکوپ را در دفتر مراقبت‌های روزانه میکروسکوپ یاداشت کنید. اجزای میکروسکوپ را با پارچه تمیز پاک کنید.
- عدسی‌های شیئی را در پایان کار روزانه تمیز کنید.
- مطمئن شوید که روغن باقی مانده را پاک کرده اید. هیچ قسمتی از میکروسکوپ را با گزیلول پاک نکنید، چراکه هم به میکروسکوپ آسیب می‌زند و هم سمی است.
- عدسی شیئی را لزوماً با کاغذ لنز پاک کن تمیز نمایید. هرگز عدسی‌ها را با الکل، پارچه معمولی، دستمال کاغذی، دستمال توالت، پارچه نخی یا حوله دستی تمیز نکنید، زیرا باعث ایجاد خراش روی سطح عدسی می‌شود.

- میکروسکوپ را در زمان عدم استفاده با یک روکش ضد گرد و غبار بپوشانید.
- در پایان روز میکروسکوپ را خاموش کنید، و برای جلوگیری از آسیب ناشی از نوسانات جریان برق میکروسکوپ را از برق بکشید.
- صفحه اتصال عدسی‌ها را بدون روکش نگذارید، از روکش مخصوص عدسی‌ها یا از نوار مخصوص لاک و مهر کردن استفاده کنید.

۴-۶- نگهداری

- در آب و هوای گرم و مرطوب قارچ‌ها به آسانی روی عدسی‌ها و منشور رشد می‌کنند. بنابراین میکروسکوپ را در زمان عدم استفاده و برای جلوگیری از رشد قارچ برروی سطوح شیشه‌ای آن، در شرایط تمیز و خشک نگهداری کنید. برای مثال میکروسکوپ را می‌توان در یک محفظه با دمای ثابت و رطوبت پایین نگهداری کرد. عدسی‌ها و منشور را می‌توان در جعبه غیرقابل نفوذ نسبت به جریان هوا و حاوی رطوبت گیر (فاقد کلرید کبالت) نگهداری کرد.

۴-۷- تعمیرات

- پرسنل استفاده‌کننده از میکروسکوپ معمولا می‌توانند یک لامپ شکسته یا یک فیوز ازکار افتاده را با رعایت دقیق مراحل دستورالعمل شرکت سازنده تعویض کنند. سایر تعمیرات بایستی به وسیله یک تکنیسین یا مهندس سرویسکار صاحب صلاحیت انجام شود.
- عدسی‌ها و همچنین پایه عدسی‌های یک میکروسکوپ را با دیگری تعویض نکنید.
- سرویس‌های دوره ای، نظیر تنظیم نور، تعویض عدسی‌ها و تعمیر و روغن کاری صفحه میکروسکوپ، بایستی توسط یک کارشناس فنی صاحب صلاحیت انجام پذیرد.
- تمام تعمیرات انجام شده را در برگه مراقبت و نگهداری میکروسکوپ ثبت کنید.

۵. نکات

ایمنی و مراقبت

- منبع نوری و اتصالات میکروسکوپ بایستی به شکلی ثابت و ایمن بوده و کارکنان را در معرض خطر برق گرفتگی قرار ندهد.
- میکروسکوپ و اتصالات برقی آن نبایستی در معرض تماس با آب باشد.
- بایستی از آسیب به چشمان به علت تماس چشم با نور شدید لامپ هالوژنی مراقب نمود.
- از میکروسکوپ بایستی به شکلی سازگار با بدن(ارگونومیک) استفاده کرد تا از خستگی کمر و گردن جلوگیری شود.

تضمین کیفیت

- وضعیت و نحوه مراقبت از میکروسکوپ را بایستی در حین بازدیدهای نظارتی مورد بررسی قرار داد. دقت شود که آیا یک دفتر ثبت مراقبت از تجهیزات آزمایشگاهی نیز وجود دارد.
- یک نمودار مراقبت از میکروسکوپ نظیر جدول موجود در انتهای این SOP نیز ممکن است استفاده شود.

علل خطا

تعمیرات غیرتخصصی منجر یه معیوب نمودن میکروسکوپ می‌شود.

- برداشتن عدسی سر میکروسکوپ، مگر اینکه آنها به گونه خاصی برای لام‌های داخل یا خارج لوله میکروسکوپ طراحی شده باشند.
- برداشتن عدسی سر میکروسکوپ از میکروسکوپ‌های یکپارچه، و در معرض قرار گرفتن قسمت‌های نوری درمقابل گرد و خاک و قارچ.

۷. منابع

WHO. دسترسی عمومی به تست‌های تشخیصی مالاریا. یک کتاب راهنمای قابل استفاده. ژنو:۲۰۱۱

WHO. اصول میکروسکوپی مالاریا. بخش ۱. راهنمای آموزش گیرندگان. ژنو:۲۰۱۰

۸. سوابق مستند

تاریخ (ماه/سال)	ویرایش	توضیحات	فرد مسئول (نام، نام خانوادگی)
۱۳۹۶/۰۴/۱۴	۲	بازنگری و ویرایش فارسی	اعضای کمیته تدوین SOP ۱. دکتر عباس شهبازی ۲. مهندس مسعود یریان ۳. علیرضا صادقی ۴. علی حافظی ۵. فیروزه گوشه

مدیریت پسماندهای تولید شده از تست‌های تشخیصی مالاریا

روش اجرایی استاندارد میکروسکوپی مالاریا MM-SOP-13

۱. هدف

توضیح روش مدیریت پسماندها در آزمایشگاه‌های انجام‌دهنده تست‌های تشخیص سریع یا میکروسکوپی مالاریا

این روش اجرای استاندارد، به عنوان مکملی برای راهنمای مدیریت پسماندهای مراقبت سلامت، درنظر گرفته شده است. این روش در واقع برروی پسماندهای پرمخاطره تولید شده درحین انجام تست‌های تشخیص مالاریا، ازجمله پسماندهای برنده، پسماندهای عفونی، پسماندهای شیمیایی و پسماندهای غیر مخاطره آمیز، تمرکز نموده است. سیاست‌ها و دستورالعمل‌های کشوری بایستی در جهت تکمیل و حمایت این مستند به مشاوره گذاشته شود.

این روش تنها با تایید یک هماهنگ‌کننده کشوری مسئول تضمین کیفیت میکروسکوپی مالاریا قابل تغییر است. تمام روش‌های تخصصی توصیف شده برای همه میکروسکوپیست‌های مالاریا درآزمایشگاه‌های مرجع ملی، آزمایشگاه‌های بیمارستانی یا آزمایشگاه‌های بهداشتی ارائه‌دهنده خدمات سلامت مجری برنامه میکروسکوپی مالاریا، اجباری است.

۲. مقدمه

پسماندهای حاصل از تست‌های تشخیص مالاریا می‌تواند هم به لحاظ عفونی و هم از نظر زیست محیطی آسیب رسان باشد. کلیه مراکز بایستی یک سیستم مدیریت پسماندهای حاصل از مراقبت سلامت را، درجهت حفاظت از کارکنان، جامعه و محیط ساماندهی کنند. درجهت بدست آمدن یک سیستم کارآمد مدیریت پسماند و مقرون به صرفه، پرسنل بهداشتی بایستی، به طور کامل نسبت به نحوه جداسازی و دفع انواع متفاوت پسماندهای حاصل از مراقبت‌های بهداشتی آگاه بوده و آموزش‌های لازم را دیده باشند.

خون ازجمله مهمترین منابع آلودگی با HIV، ویروس هپاتیت B، ویروس هپاتیت C، ودیگر عفونت‌های با منشاء خون در پرسنل بهداشتی است. بنابراین تمام کارکنان بهداشتی بایستی درمورد پیشگیری‌های عمومی مورد استفاده در جمع آوری، حمل، جابجائی، نحوه برخورد و دفع پسماندها تحت آموزش قرارگرفته و قادر به تشخیص و جداسازی پسماندهای پر خطر(اجسام برنده و پسماند عفونی) از پسماندهای بی خطر(غیر عفونی) باشند.

۳. مواد، تدارکات وتجهیزات

- ظرف مخصوص اجسام برنده(Safty box)
- سطل مخصوص باقی مانده اجسام نوک تیز(احتمالا منظور safety box یا ظرف مخصوص قطع سر سوزن است)
- سطل پسماند(شاید منظور سطل زباله باشد)
- سری سطل زباله‌های رنگ‌بندی شده یا کیسه زباله‌های رنگ‌بندی شده(توضیح:هررنگ برای مصرف خاصی)
- دستکش یک بار مصرف
- دستکش مقاوم به سوراخ شدن (دستکش باغبانی)
- یک اتوکلاو

۴. روش

۴-۱- حمل و دفع پسماند عفونی

- اجسام تیز و برنده (نیدل‌های زیر پوستی، لانست‌ها و شیشه شکسته) را در یک ظرف مقاوم به سوراخ شدگی که به این شکل " ظرف اجسام برنده" برچسب نویسی شده باشد با درپوش مخصوص آن قرار دهید. زمانی که سه چهارم آن پرشد، درب آن را ببندید و پیش از آنکه اتوکلاو کنید در یک ظرف "پسماند عفونی" قراردهید. هرگز ظروف حاوی اجسام برنده و عفونی را در مراکز جمع آوری نمونه به حال خود رها نکنید یا آن‌ها را در زیر خاک مدفون نکنید.
- تمام پسماندهای مخاطره آمیز غیر از اجسام برنده را در ظروفی که با عنوان خاصی طراحی شده " سطل پسماند عفونی" و به طور مجزا از پسماندهای غیر عفونی قرار دهید. از ظروف فلزی یا جنس پلاستیک سخت همرا ه با درپوش وبا رنگ‌بندی مناسب که آنها را از ظروف پسماند غیرعفونی مجزا می‌کند استفاده کنید.
- از کیسه‌های رنگ‌بندی شده یک بار مصرف برای پسماندهای عفونی مصرفی استفاده کنید، چنانچه با رنگ‌بندی یا ظاهری متفاوت از ظروف مربوط به پسماندهای غیر عفونی متمایز شوند بسیار عالی است.
- تمام مواد عفونی داخل آزمایشگاه را اتوکلاو(جریان بخار) کنید یا بسوزانید، هرگز آنها را در محل رها نکنید.
- هرگونه اجناس پلاستیکی یا شیشه‌ای قابل استفاده مجدد را درون یک ظرف حاوی محلول ضد عفونی (مانند محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۱ ٪) تازه تهیه شده، که در محل کار قراردارد بگذارید تا زمان شستشوی آن فرا رسد. اجسام ضدعفونی شده را دریک ظرف جهت اتوکلاوکردن یا سوزاندن قرار دهید. ظرف نیز بایستی پیش از استفاده مجدد اتوکلاو و شسته شود.

وسایل قابل استفاده مجدد را با دقت هرچه بیشتر با آب و مایع ضدعفونی‌کننده بشویید، با آب دوبار تقطیر آب کشی کنید، و وپیش از استفاده اتوکلاوکنید.

- فرآورده‌های یک بار مصرف ضد عفونی شده را در ظروف مخصوص پسماند عفونی جهت اتوکلاو کردن یا سوزاندن قرار دهید.
- هرگونه مواد بیولوژیک دورانداختنی را پیش از شستشو درون یک پوشش پارچه‌ای پیچیده ودر محلول هیپوکلریت ۰/۵ ٪ قرار داده و به مدت ۱۵ دقیقه به حال خود رها کنید. پارچه آلوده شده را در ظرف پسماند عفونی بیاندازید.
- همیشه محل کار تمیز و کثیف را از یکدیگر جدا کنید(توضیح: محلی را به کارتمیز و محلی را به کار کثیف اختصاص دهید)

۴-۲- جداسازی ودفع پسماندهای عفونی تولید شده از تست‌های تشخیصی مالاریا

نوع پسماند	علامت‌ها ورنگ بندی	نوع ظرف	نوع دفع و عفونت زدایی
برنده ها: لانست آلوده به خون، نیدل‌های زیرپوستی، اسلاید و شیشه شکسته، پیپت وچاقوی جراحی	کد رنگ مخصوص(رنگ ازپیش تعیین شده وقراردادی)، مشخص شده با متن "برنده" همراه با علامت خطرجانی	ظرف ساخته شده ازجنس پلاستیک سخت مقاوم به پارگی و نفوذ آب	ضدعفونی به روش شیمیایی یا اتوکلاوکردن و در ادامه سوزاندن، خردکردن یا بازیافت
پسماندهای عفونی نظیر. وسایل جمع آوری خون، ظروف و لوله‌های استفاده شده خونی، سواب، بانداژ، دستکش ها، کاست‌های تست سریع، گسترش‌های خونی رنگ نشده	کد رنگ (رنگ از پیش تعیین شده یا قراردادی)، مشخص شده با عبارت"عفونی" همراه با علامت خطر جانی	ظرف یا کیسه پلاستیکی محکم و غیر قابل نشتی که بتوان اتوکلاو کرد	اتوکلاوکردن در محل تولید، و در ادامه به روش سوزاندن یا دفن عمیق
پسماندهای شیمیایی نظیر: الکل ها، متانول، گزیلول، حلال ها، سدیم هیپوکلریت، باطری ها	دارای کد رنگ، مشخص شده با عبارت"شیمیایی " همراه با علامت خطر اختصاصی (خورنده، سمی، قابل اشتعال و غیره)	ظرف محکم غیرقابل نشت برای جمع آوری ودفع ایمن	پسماندهای شیمیایی مایع را هرگز با مخلوط کردن یا ریختن در فاضلاب دفع نکنید بلکه آنها رادر ظروف یا کیسه محکم وغیرقابل نشت نگهداری کنید.
بی خطرها مثل: کاغذ، مقوا، پلاستیک، مواد بسته بندی	عدم نیاز به رنگ‌بندی وعلامت خطر زیستی	کیسه پلاستیکی	آنها را مانندپسماندهای خانگی و جامدات معمولی دفع کنید.

۴-۳- نگهداری اجسام برنده و پسماندهای عفونی غیر برنده پیش از دفع نهایی

- پسماندهای برنده، عفونی غیر برنده و غیر عفونی غیربرنده را با یکدیگر مخلوط نکنید.
- به طور مشخص مکانی را برای نگهداری اجسام برنده وپسماندهای عفونی غیربرنده درنظر بگیرید همراه با علامت هشداردهنده مانند "احتیاط: پسماند عفونی و برنده ". جهت حفاظت عمومی و افراد غیر درگیر.
- پسماندهای برنده و عفونی غیربرنده را در اتاق‌های بیماران و مکان عمومی نگهداری نکنید.

۴-۴- دفع اجسام برنده و پسماندهای عفونی غیر برنده:

- مکان‌های مورد نظر بایستی با راهنمای کشوری مطابقت داشته باشد.

۵- نکات

- مطمئن شود که هیچ پسماندی بدون تیمار(عفونت زدایی)رها نشده است. بسته به شرایط آب و هوایی بیش از ۷۲ – ۴۸ ساعت نگهداری نشده است.
- هنگامی که ظرف نگهداری اجسام نوک تیز به اندازه سه چهارم آن پر شد، بایستی سر آن را بست، در ظرف مشخص شده با عنوان "پسماند عفونی" قرارداده، اتوکلاو کرده (چنانچه اتوکلاو در آزمایشگاه موجود باشد)و سوزاند، اجسام برنده را نباید در محل کار دفع کرد.
- تمام مواد عفونی را بایستی اتوکلاو کرد یا سوزاند و نبایستی آنها را مانند سایر زباله‌ها درمحل دفن زباله به حال خود رها کرد.
- ظروف نقل و انتقال و قابل استفاده مجدد بایستی غیرقابل نشت بوده و با درپوش خود به طور محکم چفت شوند. این ظروف باید پیش از ورود مجدد به آزمایشگاه ضدعفونی و تمیز شسته شوند. چنانچه از هر دو روش اتوکلاو کردن و سوزاندن برای

آلودگی زدایی استفاده می‌کنید، ازظروف مخصوص استفاده کنید به طور مثال: کیسه‌های با قابلیت اتوکلاو کردن که دارای کد رنگ باشد و نشانگر اینکه آیا محتویات آن باید اتوکلاو شود یا سوزانده شود.

- هرگونه ابزار قابل استفاده مجدد (به طور مثال: شیشه آلات) بایستی بلافاصله پس از استفاده در ظروف مخصوص خود که یکی برای ابزار قابل استفاده مجدد و دیگری برای مواد دفعی، حاوی محلول ضدعفونی (۰/۵ ٪ هیپوکلریت سدیم) تازه تهیه شده، قرار داد. این گونه ظروف بایستی در هر محل کاری قرارداده شده باشد، و مواد قابل استفاده مجدد باید در تماس با ماده ضدعفونی‌کننده باقی مانده تا در زمان مناسب شسته اتوکلاو شود.

علت خطاها

- ناکافی بودن مراقبت‌ها و تلاش در ساماندهی، تفکیک و دفع ایمن پسماندها.

۶. منابع

WHO. دستورالعمل ایمنی زیستی در آزمایشگاه. ویرایش سوم. ژنو: ۲۰۰۴

WHO. مدیریت ایمن پسماندهای حاصل از فعالیت‌های مراقبت بهداشتی. ویرایش دوم. ژنو:۲۰۱۴

۷. سوابق مستند

تاریخ (ماه/سال)	ویرایش	توضیحات	فرد مسئول (نام، نام خانوادگی)
۱۳۹۶/۰۴/۱۴	۲	بازنگری و ویرایش فارسی	اعضای کمیته تدوین SOP ۱. دکتر عباس شهبازی ۲. مهندس مسعود یریان ۳. علیرضا صادقی ۴. علی حافظی ۵. فیروزه گوشه