

In The Name Of God

Shaheed Beheshti University of
Medical sciences and Health Services

Collaborating Center for Tuberculosis
East Mediterranean Region

Mycobacteriology Research Center
مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی

National Research Institute
Tuberculosis and Lung Disease

Collaborating Center for Tuberculosis
Laboratory IUATLD

اسمیر و دید میکروسکوپی

Smear Examination

Mycobacteriology Research Center (MRC)

Dr. P. Farnia	دکتر پریسا فرنیا
Dr. M. Varahram	دکتر محمد ورهرام
Dr. M. Doraghi	دکتر معصومه دورقی
Dr. F. Mohammadi	دکتر فروزان محمدی
Dr. S. J. Tabatabaee	دکتر سید جواد طباطبایی
Dr. A. Zia Zarifi	دکتر ابوالحسن ضیاء ظریفی
Dr. M. Bahadori	دکتر مسلم بهادری
Dr. M. R. Masjedi	دکتر محمدرضا مسجدی
Dr. A. A. Velayati	دکتر علی اکبر ولایتی

Contence

فهرست

Introduction	7	۷	مقدمه
Smear microscopy	9	۹	تهیه اسمیر برای بررسی میکروسکوپی
Direct - Smear preparation	11	۱۱	تهیه گسترش به روش مستقیم
Indirect - Smear preparation	15	۱۵	تهیه گسترش به روش غیر- مستقیم
Ziehl-Neelsen staining	17	۱۷	رنگ آمیزی زیل- نلسن
Staining	23	۲۳	مراحل رنگ آمیزی
Smear reporting	31	۳۱	گزارش نتایج
Fluorochrome Staining	35	۳۵	رنگ آمیزی فلوروکروم
Staining procedures	41	۴۱	مراحل رنگ آمیزی
Fluorochrome smears reading	45	۴۵	قرائت فلوروکروم
Sensitivity	47	۴۷	حساسیت
Maintenance of smeared slides	49	۴۹	نگهداری اسمیر

مقدمه

آزمایشگاه رفرانس سل روزانه بین ۸۰ تا ۱۲۰ عدد نمونه ریوی و خارج ریوی دریافت می نماید. این نمونه ها توسط روش پتروف هضم و آلوده زدایی می گردد. سدیمان بدست آمده برای تهیه اسمیر و همچنین تلقیح به لوله های محیط لوین – اشتاین مورد استفاده قرار می گردد. در این کتابچه روش انجام کار به طور کامل نوشته شده است.

Introduction

The Iranian Reference TB Laboratory receives 80 to 120 pulmonary and Extra-Pulmonary specimens per day.
The specimens were digested and decontaminated by petroff's (using 4% NAOH) method.
The procedures written in this manual based on procedures that performed in this laboratory.

تهیه اسمیر برای بررسی میکروسکوپی
Smear microscopy

محلول رنگ بر اسیدکلریدریک
Hydrochloric – acid

گزارش گسترش
Smear reporting

رنگ آمیزی
Staining

حساسیت
Sensitivity

مشاهده گسترش
Smear reading

نگهداری لامها
Maintenance of smeared slides

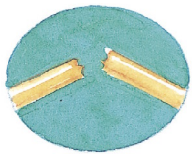
تهیه گسترش به روش مستقیم
Direct - Smear preparation

ابتدا روی لام نو و تمیز کد مشخصی گذاشته شود.

Label a new and clean slide with the relevant code number

بوسیله آنس یا چوب سواپی که از وسط شکسته شده است.

Using the rough end of a broken bamboo stick, select and pick up the yellowish purulent particles of sputum.



قسمت ضخیم و چرکی خلط را برداشته و روی لام گسترده ای به ابعاد ۱–۲ سانتی متر در عرض و ۲–۳ سانتی متر در طول تهیه نمایید.

Spread the sputum on the glass slide evenly by smearing, repeatedly in coil-like patterns with approximately 1-2 cm in width and 2-3 cm in length.

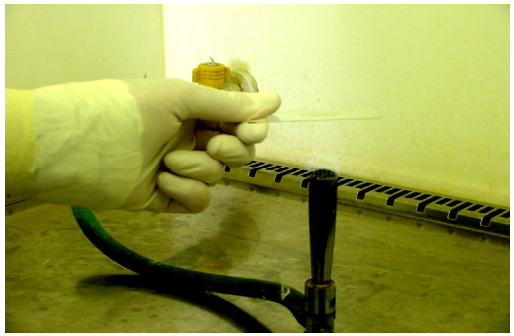


پس از تهیه گسترش باید حداقل ۳۰ دقیقه صبر کرد تا لامها کاملا خشک گردد.

Allow the smear to dry completely at room temperature (for at least 30 minutes)

گسترشهای خشک شده را با قرار دادن در انکوباتور (دمای ۷۵- ۶۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ تا ۶۰ دقیقه) فیکس نمایید. همچنین می توانید از چراغ – الکلی استفاده نمایید.

Allow the slide to fix on an incubator (65-75 ºC for 45 to 60 minute) or pass slide through burner flame as for other bacteriological smears.



تهیه گسترش به روش غیر- مستقیم
Indirect - Smear preparation

ابتدا روی لام نو و تمیز کد مشخصی گذاشته شود.

Label a new and clean slide with the relevant code number.

پس از هضم و آلودگی زدایی، از ته نشین نمونه با استفاده از پی پت پاستور شیشه ای استریل روی سطح لام گسترشی به ابعاد ۱-۲ سانتی متر در عرض و ۲-۳ سانتی متر در طول تهیه نمایید.

After digestion and decontamination, prepare the smear from sediment. Spread the sputum on the glass slide evenly by smearing, repeatedly in coil-like patterns with approximately 1-2 cm in width and 2-3 cm in length.

پس از تهیه گسترش باید حداقل ۳۰ دقیقه صبر کرد تا لامها کاملا خشک گردد.

Allow the smear to dry completely at room temperature. (For at least 30 minutes)

گسترشهای خشک شده را با قرار دادن در انکوباتور (دمای ۷۵- ۶۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ تـا ۶۰ دقیقـه) فـیکس نمایید. همچنین می توانید از چراغ – الکلی استفاده نمایید.

Allow the slide to fix on an incubator (65-75 ºC for 45 to 60 minute) or pass slide through burner flame as for other bacteriological examination.



پی پت پاستور را پس از تهیه گسترش در ظرف حاوی محلول ضد عفونی کننده (فنل ۵٪) قرار دهید.

Discard the pasture pipette in disinfectant solution. (5%Phenol)

رنگ آمیزی زیل- نلسن
Ziehl-Neelsen staining

محلول رنگ کننده: کربول - فوشین
Carbol fuchsin

محلول رنگ بر: اسید- الکل ۳٪
Decolorizing agent 3% acid-alcohol

رنگ زمینه: متیلن بلو
Counter stain Methylene blue

✍ معرفها

فوشین محلول ۱ (Stock)		فنل محلول ۲(stock)	
فوشین بازی	۳ گرم	کریستال فنل	۵ میلی لیتر
اتانول ۹۵٪	۱۰۰ میلی لیتر	آب مقطر	۹۵ میلی لیتر

* (ابتدا کریستال فنل در حرارت ۴۱ سانتیگراد ذوب گردد و سپس به آب مقطر افزوده گردد)

۱۰۰ میلی لیتر محلول کربول ـ فوشین: محلول ۱ (۱۰ میلی لیتر) + محلول ۲ (۹۰ میلی لیتر)

✍ **Reagents**

Stock -Solution 1		Stock -Solution 2	
Fuchsin		**Phenol**	
Basic fuchsin	3.0g	Phenol Melted *	5 ml
Ethanol, 95%	100 ml	Distilled water	95ml

* (First melt phenol in 41 ºC incubator and then add it to distilled water)

Carbol fuchsin mix solution: 10 ml from Stock solution 1+ 90 ml of solution 2

✍ محلول رنگ بر: اسید- الکل ۳٪

(اسید کلریدریک غلیظ، ۳ میلی لیتر ـ اتانول ۹۵٪ ، ۹۷ میلی لیتر)

به آرامی و دقت ۳ میلی لیتر از اسید کلریدریک غلیظ به ۹۷ سی سی اتانول ۹۵٪ افزوده شود. همیشه اسید به الکل افزوده شود (نه الکل به اسید). پس از تهیه محلول رنگ بر باید آنرا در ظروف مخصوص قرار داده و نام محلول و تاریخ تهیه محلول نوشته شود.

✍ **Decolourising agent: 3% acid-alcohol**

(Concentrated hydrochloric acid 3 ml, 95% ethanol 97 ml)

Carefully add 3ml of concentrated hydrochloric acid to 97 ml of 95% ethanol. Always add acid slowly to alcohol, not vice versa. Store the solution in bottle. Label bottle with name of reagent and dates of preparation the solution can be stored at room temperature for six to twelve months.

✍ محلول رنگ زمینه : متیلن بلو

متیلن بلو کلراید	۰/۳گرم
آب مقطر	۱۰۰ میلی لیتر

متیلن بلو کلراید را در آب مقطر حل کرده و در ظرف مخصوص نگهداری نمایید. نام محلول و تاریخ تهیه محلول نوشته شود؛ محلول فوق را می توان ۶ تا ۱۲ ماه در دمای اتاق نگهداری نمود.

✍ Counter stain: Methylene blue

Methylene blue chloride	0.3g
Distilled water	100 ml

Dissolve 0.3 g of methylene blue chloride in 100 ml of distilled water and store in an amber bottle. Label bottle with name of reagent and dates of preparation and expiry.

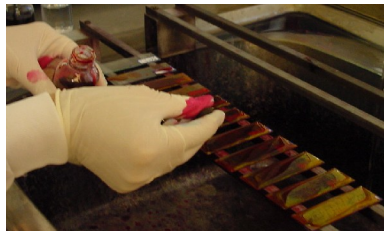
مراحل رنگ آمیزی
Staining

لامها را روی یک پایه فلزی قرار دهید (حداکثر ۱۲ لام). باید توجه داشت که لامها با یکدیگر تماس نداشته باشند.

Place the slides on a staining rack (maximum 12). Ensure that slides do not touch each other.

تمام سطح گسترش را با محلول کربول فوشین صاف شده بپوشانید.

Flood entire slide with carbol fuchsin, which has been filtered prior to use.



لام ها را به آرامی حرارت دهید تا هنگامی که بخار متصاعد گردد (حرارت ملایم یا متناوب به مدت ۵– ۳ دقیقـه)؛ بـه هنگـام حرارت دادن باید از جوشاندن فوشین یا خشک شدن سطح لام خودداری نمود.

Heat the slide too slowly until it is steaming (Low or intermittent heat for three to five minutes); avoid boiling or drying of stain during heating.

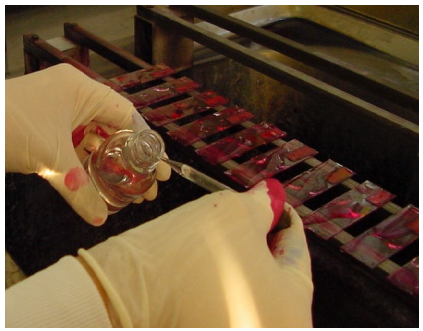


هر لام به آرامی شسته شود تا زمانی که رنگ آن پاک شود.

Rinse each slide individually in a gentle stream of running water until all free stain is washed a way.

تمام سطح گسترش را با محلول رنگبر (اسید – الکل ۳٪) برای حداکثر ۳ دقیقه بپوشانید.

Flood the slide with the decolourising solution (3% acid-alcohol) for maximum of three minutes.



لام ها را به آرامی بشویید و مراقب باشید که جریان آب در حدی نباشد که باعث شود گسترده از روی لام کنده شود.

Rinse the slide thoroughly with water. Drain excess water from the slide.

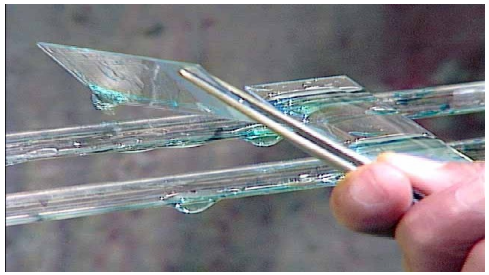
تمام گسترش را با رنگ زمینه (متیلن بلو) به مدت ۶۰ ثانیه بپوشانید.

Flood the slide with counter- stain for 60 seconds.



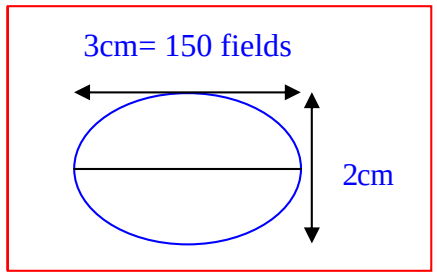
سطح لام را به آرامی با آب شسته، لام را کمی بچرخانید تا آب اضافی آن ریخته شود؛ سپس لام را در حرارت اتاق خشک کنید.

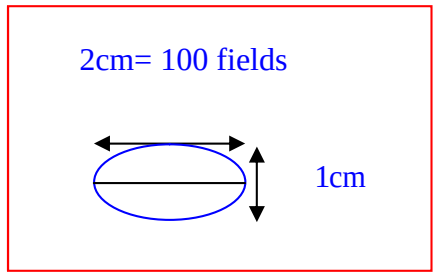
Rinse the slide thoroughly with water. Drain excess water from the slide; Allow smear to air dry.

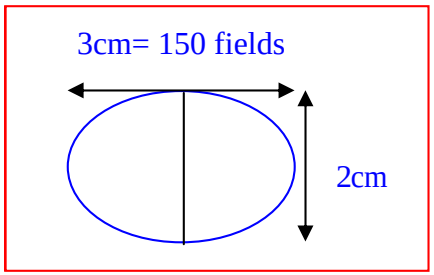


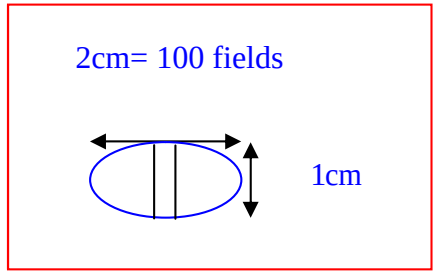
ابتدا یک تا دو قطره روغن ایمرسیون به سمت چپ گسترش رنگ آمیزی شده بیافزایید.

Add one or two drops of immersion oil to the left edge of the stained smear.









If a smear is 2 × 3 cm in size
One (1) horizontal line is equivalent to 150 fields.
Two (2) vertical line equivalent to 100 fields.

If a smear is 1 × 2 cm in size
One (1) horizontal line is equivalent to 100 fields.
Two (2) vertical line equivalent to 100 fields.

بمنظور خواندن و بررسی لام از نظر وجود باسیل اسید _ فاست حداقل ۱۰۰ میدان میکروسکوپی با یک روش (از بالا به پائین یـا از چپ به راست) با عدسی شیئی (بزرگنمایی ۱۰۰) بررسی گردد.

گزارش نتایج
Smear reporting

نتایج را به ترتیب زیر گزارش نمایید:

گزارش یافته ها

* هیچ باسیل اسید – فاست مشاهده نشد — منفی
* ۱ تا ۹ باسیل اسید – فاست در ۱۰۰ میدان میکروسکوپی — تعداد باسیل مشاهده شده
* ۱۰ تا ۹۹ باسیل اسید – فاست در ۱۰۰ میدان میکروسکوپی — +
* تا ۱۰ باسیل اسید – فاست در هر میدان میکروسکوپی — ++
* بیش از ۱۰ باسیل اسید – فاست در هر میدان میکروسکوپی — +++
* به منظور گزارش باکتری بعنوان باسیل اسید فاست به مرفولوژی و رنگ آن باید دقت نمود.
* چنانچه نتایج آزمایش نمونه های خارج –ریوی مثبت گردید، باید گسترش دیگری از همان نمونه تهیه گردد و پس از بررسی گسترش دوم نتایج هر دو نمونه با هم گزارش گردد.

Reporting the results*

Recording

* No acid-fast bacilli found in at least **100** fields — **Negative**
* **1** to **9** acid-fast bacilli per **100** fields — **Exact number of bacilli**
* **10** to **99** acid-fast bacilli per **100** fields — +
* **1** to **10** acid-fast bacilli per field — ++
* **More** than **10** acid-fast bacilli per field — +++
* Consider basic morphology and color to accept a bacterium as a true acid-fast bacilli.
* If the smear preparations of fluid specimens are positive, prepare another smear from the same specimen and after careful examination report the final result.

لام را پس از ثبت نتایج برداشته و با استفاده از ethyl ether-alcohol یا گزیلول عدسی میکروسکوپ را کاملاً تمیز کنید.

At the end of examination, take the slide from the microscopic stage then clean the objective lens with lens paper moistened with ethyl ether-alcohol. Petroleum benzene or xylene could be used instead of ethyl ether –alcohol.

لامها را بمنظور کنترل کیفی داخلی نگهداری نمایید.

Keep the slides for quality control.

چنانچه نتیجه بررسی میکروسکوپی مثبت باشد ؛کد بیمار ، نام آزمایش کننده ، تاریخ آزمایش و نتیجه آن روی برچسب نوشته شود و پس از چسباندن برچسب، لامها به ترتیب شماره در جعبه لامها نگهداری شود.

If the result of smear microscopy is positive, record the code number, reader name, date and result on the label; stick the label on the slide; then store the slides in slide storage box in the sequence of code number.

در صورت منفی بودن نتیجه، لام را دور بیندازید.

Discard negative slides.



رنگ آمیزی فلوروکروم
Fluorochrome Staining

محلول رنگ کننده: اورامین – او
Auramine-O

محلول رنگ بر: اسیدکلریدریک
Hydrochloric –acid

محلول رنگ زمینه: پتاسیم – پرمنگنات
Potassium permanganate

معرفها

اورامین: محلول ۱

اورامین – او	۰/۱ گرم
اتانول ۹۵٪	۱۰ میلی لیتر

فنل: محلول ۲

کریستال فنل *	۳ گرم
آب مقطر	۸۷ میلی لیتر

* (ابتدا کریستال فنل در حرارت ۴۱ سانتیگراد ذوب گردد و سپس به آب مقطر افزوده گردد)

محلول شماره ۱ و ۲ را با هم مخلوط کنید و در شیشه رنگی (تیره) درپوش دار قرار دهید.

Reagents

Solution 1

Auramine O

Auramine O	0.1 g
Ethanol, 95%	10 ml

Solution 2

Phenol

Phenol Melted *	3 g
Distilled water	87 ml

* (First melt phenol in 41 ºC incubator and then add it to distilled water)

Auramine O mix solution: Mix solution 1 and 2, store in a tightly stopper amber bottle away from heat and light.

محلول رنگ بر: اسید- الکل۰/۵

(اسید کلریدریک غلیظ، ۰/۵ _ اتانول ۷۰٪ ، ۱۰۰ میلی لیتر)

به آرامی و دقت ۰/۵ میلی لیتر از اسید کلریدریک غلیظ به ۱۰۰ سی سی اتانول ۷۰٪ افزوده شود. همیشه اسید به الکل افزوده شود (نه الکل به اسید). پس از تهیه محلول رنگ بر باید آنرا در ظروف مخصوص قرار داده و نام محلول و تاریخ تهیه محلول نوشته شود.

Decolourising agent: 0.5 % acid-alcohol

(Concentrated hydrochloric acid 0.5 ml, 70% ethanol 100 ml)

Carefully add 0.5 ml of concentrated hydrochloric acid to 100 ml of 70% ethanol. Always add acid slowly to alcohol, not vice versa. Store the solution in bottle. Label bottle with name of reagent and dates of preparation the solution can be stored at room temperature for six to twelve months.

✍ محلول رنگ زمینه : پتاسیم – پرمنگنات

پتاسیم _ پرمنگنات	۰/۵ گرم
آب مقطر	۱۰۰ میلی لیتر

پتاسیم _ پرمنگنات را در آب مقطر حل کرده و در ظرف مخصوص نگهداری نمایید. نام محلول و تاریخ تهیه محلول نوشته شود؛ محلول فوق را می توان ۱ تا ۳ ماه در دمای اتاق نگهداری نمود.

✍ Counter stain: Potassium permanganate

Potassium permanganate	0.5g
Distilled water	100 ml

Dissolve 0.5 g of Potassium permanganate in 100 ml of distilled water and store in an amber bottle. Label bottle with name of reagent and dates of preparation and expiry. Store at room temperature for 3 months

مراحل رنگ آمیزی
Staining procedures

لامها را روی یک پایه فلزی قرار دهید (حداکثر ۱۲ لام). باید توجه داشت که لامها با یکدیگر تماس نداشته باشند.

Place the slides on a staining rack (maximum 12). Ensure that slides do not touch each other.

تمام سطح گسترش را با محلول اورامین بپوشانید و بگذارید برای ۱۵ دقیقه در این حالت بماند.

Flood entire slide with auramine O and allow to stain for 15 minutes,ensuring that stainig solution remains on smears. Do not heat and do not use filter paper strips

لام ها را به آرامی بشویید. در این روش حتما باید از آب مقطر استفاده نماید چون کلرین موجود در آب جاری در خاصیت فلورسانس تداخل می کند.

Rinse the slide thoroughly with distilled water. Tap water contains chlorine which may interfere with fluorescence

لام ها را با اسید الکل برای ۲ دقیقه بپوشانید و سپس با آب مقطر استریل بپوشانید.

Decolourise with acid-alcohol for two minutes, Rinse with distilled water and drain.

لام ها را با پتاسیم – پرمنگنات برای ۲ دقیقه بپوشانید. در این مرحله زمان از ۲ دقیقه نباید تجاوز کند.

Flood smears with either potassium permanganate and allow counterstain for two minutes. Time is critical with potassium permanganate because counterstaining for longer may quench the fluorescence of acid –fast bacilli

اجازه بدهید لامها خشک شود و بلافاصله آن را قرائت نمایید.

Allow smears to air – dry. Do not blot. Read as soon as possible after staining.

قرائت فلوروکروم
Fluorochrome smear reading

Carbol-Fuchsin	Report	Flurorechent Microscopy Magnification		
1000 X		250X	450X	630X
0	No acid-fast bacilli seen	0	0	0
1-9/100 fields	Report exact count	Divide Observed count by 10	Divide Observed count by 4	Divide Observed count by 2
10-99/100 fields 1-10 /field > 10 field	1+ 2+ 3+	با بزرگ نمایی ۲۵۰ تعداد باسیلها دیده شده تقسیم بر ۱۰ می شوند.	با بزرگ نمایی ۴۵۰ تعداد باسیلها دیده شده تقسیم بر ۴ می شوند.	با بزرگ نمایی ۶۳۰ تعداد باسیلها دیده شده تقسیم بر۲ می شوند.

Example: Suppose 20 acid - fast bacilli are observed per field using the 450X magnification. If this number is divided by the magnification factor of 4 according to table, the comparable number of bacilli that would have been observed under 1000X is 5 per field. The laboratory result should therefore read 2+

حساسیت
Sensitivity

برای مشاهده گسترش مثبت باید حداقل ۵۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰ باسیل در یک میلی لیتر از نمونه مورد بررسی وجـود داشـته باشـد. بـا بررسی بیش از یک نمونه بیمار می توان حساسیت روش بررسی میکروسکوپی را افزایش داد. از آنجا که دفع باسـیل از ضـایعات ناشی از توبرکلوزیس در ریه ها بطور متناوب رخ می دهد و ممکن است نمونه از نظر وجود باسـیل اسـید ـ فاسـت در یـک روز مثبت و در روز دیگر منفی باشد؛ ***سه نمونه*** برای تشخیص درخواست می شود.

The minimum number of acid-fast bacilli necessary to produce a positive smear result has been estimated to be between 5000 and 10000 per milliliter. The sensitivity can further be improved by examination of more than one smear from a patient. Because tuberculosis lesions in the lungs may drain intermittently, it is possible for a specimen to be negative on one day and positive the next; we collected **three specimens** for diagnosis.

نگهداری اسمیر
Maintenance of smeared slides

Removal of immersion oil from the slide
Prepare two jars of xylene
Dip the examined slide in the first jar for 30 minutes to remove the immersion oil and dip the slide again in the second jar to remove any remaining oil.
If xylene is not available, careful sweep using soft tissue paper can be done to remove oil from smear slide. Keep them in the slide box for confirmation or for quality check



Address: Mycobacteriology Research Centre, Iranian National Reference TB Laboratory, National Research Institute of Tuberculosis & Lung Disease (NRITLD), Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Shaheed Bahonar Ave, Darabad, 19556, P.O 19575/154, Tehran, Iran.
Tel: (0098-21) 20105555 or 20109505
Fax: (0098-21) 20109484 or 20109505
E-mail: mrc @ nritld.ac.ir, pfarnia @ hotmail.com, pfarnia @ nritld.ac.ir, Website: www.mrc.ac.ir

This document was created with Win2PDF available at http://www.daneprairie.com.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.