

دستورالعمل استفاده و کنترل کیفیت لوپ های کالیبره میکروبیولوژیک

آزمایشگاه مرجع سلامت

وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی

سال ۱۳۹۷

محل مهر تضمین کیفیت	
تاریخ :	تاریخ :

(۱) اصول

حجم مایع برداشت شده با لوپ کالیبره به حجم و شکل ظرف نگهداری نمونه مایع، جهت و عمق فرو بردن لوپ وابسته است. این تغییر پذیری ناشی از کشش سطحی و سطح مرطوب لوپ می باشد. مایعات در ظروف با قطر کوچک (کمتر از ۱ cm) کشش سطحی بالایی دارند، که موجب برداشت کمتر مایع می شود، زیرا نیروهای مایع-شیشه و مایع-پلاستیک (adhesive) نسبت به نیروهای مایع-مایع (cohesive) بیشتر هستند. زمانی که سیم بالای حلقه با فرو بردن عمیق آن به داخل مایع خیس شود، مایع اضافی از سیم حرکت کرده و حجم انتقال یافته را افزایش می دهد. لوپ های کمی به طور معمول برای کشت های کمی استفاده می شوند، و هنوز یک راه آسان برای ست کردن کشت های نیمه کمی یا رقیق سازی است. خطای قابل قبول برای لوپ های کمی کمتر یا مساوی ۲۰٪ می باشد (برای محاسبه خطای لوپ به صفحه ۵ و ۶ این دستورالعمل مراجعه نمایید).

یکی از روش های کنترل کیفیت لوپ های کالیبره روش رنگ سنجی است، که در این دستورالعمل به آن پرداخته شده است.

(۲) انواع لوپ

- حجم لوپ ها (۰/۰۰۱ ml) یا ۱ μ l (۰/۰۱ ml) می باشد.
- لوپ های چند بار مصرف، که فلزی و معمولاً پلاتینیوم یا نیکروم می باشند.
- لوپ های یک بار مصرف، که پلاستیکی هستند.

(۳) روش استفاده از لوپ

- لوپ های فلزی را، قبل از اولین و بعد از هر بار انتقال سوزانده و خنک کنید. هنگام به کارگیری لوپ های یکبار مصرف برای هر بار انتقال از لوپ جدید استفاده نمایید.
- نمونه مایع باید در ظرفی با دهانه بزرگ (قطر بیش از ۱ cm) ریخته شده باشد.
- نمونه را با حرکات چرخشی تکان دهید، تا سوسپانسیون باکتریایی به صورت یکنواخت مخلوط گردد.
- لوپ را به صورت عمودی نگه داشته و فقط حلقه آن را تا زیر سطح مایع فرو ببرید. از تشکیل هرگونه حباب بر روی مایع خودداری نمایید.
- از نبودن هر گونه حباب در حلقه اطمینان حاصل کنید.
- لوپ را تنها به بالا و پایین به صورت مستقیم داخل نمونه حرکت دهید.
- محتویات لوپ را با فشار دادن مایع به پلیت به سطح آن منتقل کنید، تا زمانی که در لوپ مایعی مشاهده نشود و سپس با لوپ آن را پخش نمایید.

۴) کنترل کیفیت

A. ملاحظات کلی

۱. لوپ های چند بار مصرف

- لوپ های کالیبره را به طور منظم بررسی کنید تا مطمئن شوید گرد بوده و بدون خم شدگی، تو رفتگی، خوردگی یا مواد سوخته شده باشند.
- لوپ ها را ماهانه از نظر اطمینان از صحت حجم برداشت شده بررسی نمایید.

۲. لوپ های یک بار مصرف

- حجم لوپ های یکبار مصرف را بعد از دریافت هر سری ساخت جدید بررسی کنید.

B. کنترل کیفیت لوپ کالیبره به روش رنگ سنجی

I. مواد و تجهیزات مورد نیاز

۱. آب مقطر نوع I یا II

۲. محلول رنگ اوانس بلو (Evans Blue Dye Solution = EBD)

a. محلول ذخیره

- (۱) ۰/۷۵ g پودر اوانس بلو را به ۱۰۰ ml آب مقطر اضافه و کاملاً حل کنید.
- (۲) محلول را با کاغذ صافی واتمن شماره ۴ صاف کنید.
- (۳) این محلول در دمای اتاق و دور از نور به مدت شش ماه پایدار می ماند. ظرف را با نام محلول، تاریخ انقضا و تولید، برچسب گذاری کنید. سری ساخت و تاریخ انقضا را در سوابق کاری درج نمایید.

b. محلول های کاری

- (۱) ۱ ml از محلول ذخیره اوانس بلو را به ۴۹ ml آب مقطر اضافه نمایید. بدین ترتیب رقت ۱:۵۰ به دست می آید.
- (۲) ۴ لوله آزمایش انتخاب کرده، در لوله اول ۹ ml و در سه لوله دیگر ۵ ml آب مقطر بریزید.
- (۳) ۱ ml از رقت ۱:۵۰ برداشته و در لوله اول که حاوی ۹ ml آب مقطر بوده، اضافه کنید.
- (۴) ۵ ml از لوله اول برداشته، در لوله دوم ریخته و کاملاً مخلوط نمایید. سپس ۵ ml از لوله دوم در لوله سوم، ۵ ml از لوله سوم در لوله چهارم و در انتها ۵ ml از لوله چهارم برداشته و دور بریزید. بدین ترتیب چهار محلول با رقت نهایی ۱:۵۰۰، ۱:۱۰۰۰، ۱:۲۰۰۰ و ۱:۴۰۰۰ به دست می آید.
- (۵) چهار رقت فوق را می توانید تا شش ماه ذخیره کنید، ولی اگر قرائت هر یک از رقت ها ۳٪ ± با قرائت قبلی تفاوت داشت، رقت های جدید تهیه نمایید.

۳. تجهیزات

- (۱) کووت های مربع شیشه ای با عبور نور ۱ cm. برای همه اندازه گیری ها از کووت یکسان استفاده شود.
- (۲) ظروف شیشه ای: چند لوله آزمایش ۱۵ ml تمیز، چند پیپت ۱۰ ml کلاس A1
- (۳) اسپکتروفتومتر یا فتومتر با کیفیت خوب و کالیبره با قابلیت تحلیل در طول موج ۶۲۰ nm

II. روش انجام کنترل کیفیت لوپ کالیبره به روش رنگ سنجی

۱. اسپکتروفتومتر یا فتومتر را در حالت جذب با طول موج 620 nm تنظیم کنید.
 ۲. اسپکتروفتومتر یا فتومتر را با آب مقطر صفر نمایید.
 ۳. جذب هر یک از رقت ها را اندازه گیری و ثبت نمایید ($1:4000$ ، $1:2000$ ، $1:1000$ و $1:500$).
 ۴. جذب نوری (محور عمودی) را برابر هر غلظتی از رقت ها (محور افقی) در برگه کاری ۱ (صفحه ۵) ثبت نمایید. یک خط که بیشتر از همه به هر چهار نقطه نزدیک است به منظور تهیه منحنی کالیبراسیون، رسم کنید.
 ۵. لوله دیگری انتخاب کرده، 10 ml آب مقطر در آن بریزید. به وسیله لوپ $1\text{ }\mu\text{l}$ مورد آزمون ده بار از محلول ذخیره اولیه ($0.75\text{ g}/100\text{ ml}$) برداشته، به این لوله منتقل و کاملاً مخلوط نمایید. جذب این محلول را اندازه گیری نمایید، که باید برابر با جذب رقت $1:1000$ روی منحنی کالیبراسیون باشد.
 ۶. محلول فوق را برای سه بار آزمایش دیگر تهیه کرده و جذب هر لوله را اندازه گیری نمایید (در کل چهار خوانده). چهار خوانده را در برگه کاری ۱ ثبت نموده، میانگین آنها را محاسبه نمایید. درصد عدم صحت را بر اساس راهنمای موجود در برگه کاری ۱ به دست آورده و ثبت نمایید.
 ۷. اگر میانگین جذب های خوانده شده بیش از $\pm 20\%$ از جذب محلول ذخیره $1:1000$ اختلاف داشته باشد، صحت لوپ مورد تایید نیست. اقدام اصلاحی انجام دهید.
 ۸. برای کنترل کیفیت لوپ $10\text{ }\mu\text{l}$ ، به وسیله لوپ مورد آزمون ده بار از محلول ذخیره اولیه ($0.75\text{ g}/100\text{ ml}$) برداشته، به 100 ml آب مقطر منتقل کنید. بعد از مخلوط کردن کامل، جذب این محلول را اندازه گیری و ثبت نمایید. محلول فوق را برای سه بار آزمایش دیگر تهیه کرده و جذب هر لوله را اندازه گیری نمایید (در کل چهار خوانده). چهار خوانده را در برگه کاری ۱ ثبت نموده، میانگین آنها را محاسبه نمایید. درصد عدم صحت را بر اساس راهنمای موجود در برگه کاری به دست آورده و ثبت نمایید. اگر میانگین جذب های خوانده شده بیش از $\pm 20\%$ از جذب محلول ذخیره $1:1000$ اختلاف داشته باشد، صحت لوپ مورد تأیید نیست. اقدام اصلاحی انجام دهید.
- **توجه ۱:** برای برداشتن از محلول ذخیره اولیه، لوپ را هر ده بار به صورت عمودی و فقط حلقه آن را تا زیر سطح محلول فرو ببرید. زمانی که سیم بالای حلقه به داخل محلول فرو برده شود، حجم رنگ برداشت شده افزایش می یابد که این امر منجر به افزایش خطا در نتیجه آزمایش می گردد.
- **توجه ۲:** با توجه به خطای بالا در استفاده و یا کنترل کیفیت لوپ های $1\text{ }\mu\text{l}$ مراحل کار باید با دقت بسیار زیاد انجام شود.
- **توجه ۳:** در هنگام استفاده و یا کنترل کیفیت لوپ های کالیبره از پر بودن لوپ و نبودن حباب در آن اطمینان حاصل نمایید.
- **توجه ۴:** برای کنترل کیفیت لوپ $10\text{ }\mu\text{l}$ ، می توانید از محلول ذخیره $0.75\text{ g}/100\text{ ml}$ به روش ذیل نیز استفاده نمایید:

۱. ۲۰ mg از پودر اوانس بلو را به ۱۰ ml آب مقطر اضافه و کاملاً حل کنید. محلول را با کاغذ صافی واتمن شماره ۴ صاف کنید. غلظت این محلول ذخیره، ۰/۲ g/۱۰۰ ml می‌باشد.
۲. ۴ لوله آزمایش انتخاب کرده، در لوله اول ۲ ml و در سه لوله دیگر ۱ ml آب مقطر بریزید. ۲۰ µl از محلول ذخیره اولیه (۰/۲ g/۱۰۰ ml) برداشته، در لوله اول ریخته و کاملاً مخلوط نمایید. سپس ۱ ml از لوله اول برداشته و در لوله دوم بریزید. ۱ ml از لوله دوم برداشته و در لوله سوم و ۱ ml از لوله سوم برداشته و در لوله چهارم ریخته و در انتها ۱ ml از لوله چهارم برداشته و دور بریزید. بدین ترتیب چهار محلول با رقت نهایی ۱:۱۰۰، ۱:۲۰۰، ۱:۴۰۰ و ۱:۸۰۰ به دست می‌آید.
۳. جذب نوری هر یک از رقت‌ها را به وسیله فتومتر یا اسپکتروفتومتر با طول موج ۶۲۰ nm اندازه‌گیری و ثبت نمایید.
۴. جذب نوری (محور عمودی) را برابر هر غلظتی از رقت‌ها (محور افقی) در برگه کاری ۲ (صفحه ۶) ثبت نمایید. یک خط که بیشتر از همه به هر چهار نقطه نزدیک است به منظور تهیه منحنی کالیبراسیون، رسم کنید.
۵. سپس ۱۰ لوله آزمایش دیگر انتخاب کرده و در هر یک ۱ ml آب مقطر بریزید.
۶. لوپ ۱۰ µl مورد آزمون را به طور عمودی و فقط حلقه آن را وارد محلول ذخیره اولیه (۰/۲ g/۱۰۰ ml) نموده، از محلول رنگی برداشته و در لوله آزمایش اول فرو برید. این کار را برای ۹ لوله دیگر تکرار کنید و در فواصل، لوپ را روی کاغذ خشک کن قرار دهید تا کاملاً خشک شود. از سوزاندن لوپ چند بار مصرف خودداری نمایید.
۷. بعد از مخلوط کردن کامل، جذب هر محلول را اندازه‌گیری و در برگه کاری ۲ ثبت نمایید. میانگین آنها را محاسبه کنید. درصد عدم صحت را بر اساس راهنمای موجود در برگه کاری ۲ بدست آورده و ثبت نمایید.
۸. میانگین جذب‌های نوری به دست آمده از لوپ ۱۰ µl مورد آزمون باید برابر با جذب رقت ۱:۱۰۰ روی منحنی کالیبراسیون باشد. اگر میانگین جذب‌های خوانده شده بیش از $\pm 20\%$ از جذب محلول ذخیره ۱:۱۰۰ اختلاف داشته باشد، صحت لوپ مورد تأیید نیست. اقدام اصلاحی انجام دهید.

(۵) محدودیت‌ها

- در صورتی که در نمونه مایع یا حجم برداشته شده با لوپ حباب وجود داشته باشد، لوپ‌های کمی، هم یکبار مصرف و هم چند بار مصرف، بسیار غیر صحیح خواهند بود. برای اجتناب از ایجاد حباب، از تکان دادن مایع خودداری کنید. لوپ پر شده را به دقت از نظر وجود حباب بررسی نمایید. حباب‌ها را با سوزاندن (برای لوپ‌های چند بار مصرف) و جایگزین کردن (برای لوپ‌های یکبار مصرف) یا دوباره فرو بردن در مایع (برای هر دو نوع لوپ) از بین ببرید.

برگه کاری ۱

کنترل کیفیت لوپ کالیبره (۱ μl و ۱۰ μl) به روش رنگ سنجی با استفاده از محلول ذخیره ۰/۷۵ g/۱۰۰ ml

حجم و نوع لوپ:----- تاریخ انجام کنترل کیفیت:----- نام فرد انجام دهنده:-----
 نام شرکت سازنده لوپ:----- سری ساخت لوپ:----- تاریخ شروع به استفاده لوپ:-----

میانگین منهای جذب ۱:۱۰۰۰ (a) = ----- (a) تقسیم بر جذب ۱:۱۰۰۰ (b) = ----- درصد عدم صحت: (b) ضربدر ۱۰۰ = (c) ----- % مقدار (c) باید $\pm 20\%$ باشد: قابل قبول؟ (بله/خیر) -----
--

شماره نمونه جذب

----- ۱

----- ۲

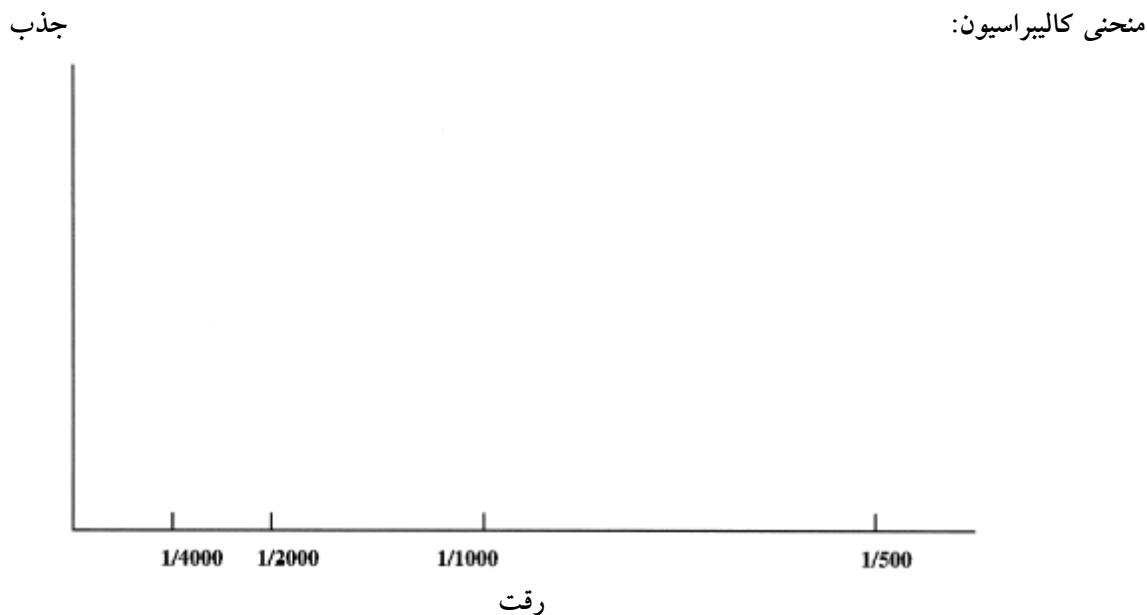
----- ۳

----- ۴

----- مجموع ۴ خوانده

----- میانگین

اقدام اصلاحی:-----



برگه کاری ۲

کنترل کیفیت لوپ ۱۰ µl به روش رنگ سنجی با استفاده از محلول ذخیره ۰/۲ g/۱۰۰ ml

حجم و نوع لوپ:----- تاریخ انجام کنترل کیفیت:----- نام فرد انجام دهنده:-----
 نام شرکت سازنده لوپ:----- سری ساخت لوپ:----- تاریخ شروع به استفاده لوپ:-----

میانگین منهای جذب ۱:۱۰۰ = (a) ----- (a) تقسیم بر جذب ۱:۱۰۰ = (b) ----- درصد عدم صحت: (b) ضربدر ۱۰۰ = (c) ----- % مقدار (c) باید $\pm 20\%$ باشد: قابل قبول؟ (بله/خیر)-----

شماره نمونه	جذب	شماره نمونه	جذب
۱	-----	۶	-----
۲	-----	۷	-----
۳	-----	۸	-----
۴	-----	۹	-----
۵	-----	۱۰	-----

مجموع ۱۰ خوانده -----
 میانگین -----

اقدام اصلاحی:-----

