

استفاده و کنترل کیفیت لوپ های کالیبره میکروبیولوژیک

رقیه صبوریان

مرداد ماه ۱۴۰۰

اصول

- ▶ لوپ های کمی برای کشت های کمی استفاده می شود.
- ▶ حجم مایع برداشت شده با لوپ کالیبره وابسته است به:
 - ▶ حجم و شکل ظرف نگهداری نمونه مایع
 - ▶ مایعات در ظرف با قطر کوچک (کمتر از ۱ سانتیمتر) کشش سطحی بالایی دارند که موجب برداشت کمتر می شود.
 - ▶ جهت فرو بردن لوپ
 - ▶ عمق فرو بردن لوپ
- ▶ زمانی که سیم بالای لوپ به وسیله فرو بردن عمیق آن به داخل مایع خیس شود، مایع اضافی از سیم حرکت کرده و حجم انتقال یافته را افزایش می دهد.

انواع لوپ

حجم

1 μ l (0.001 ml)

10 μ l (0.01 ml)

جنس

فلزی چند بار مصرف: پلاتینیوم یا نیکروم

پلاستیکی یک بار مصرف

روش استفاده از لوپ

- لوپ های فلزی را، قبل از اولین و بعد از هر بار انتقال سوزانده و خنک کنید. هنگام بکارگیری لوپ های یک بار مصرف برای هر بار انتقال از لوپ جدید استفاده نمایید.
- نمونه مایع باید در ظرفی با دهانه بزرگ (قطر بیش از 1cm) 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 لوپ 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 محیط منتقل کنید تا زمانی که در لوپ مایعی مشاهده نشود و سپس با لوپ آن را پخش نمایید.

کنترل کیفیت ملاحظات کلی

لپ های چند بار مصرف

- لپ 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.
- لپ ها را بعد از دریافت هر سری ساخت جدید و سپس ماهانه از نظر اطمینان از صحت حجم برداشت شده بررسی نمایید.

لپ های یک بار مصرف

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

کنترل کیفیت مواد و تجهیزات مورد نیاز

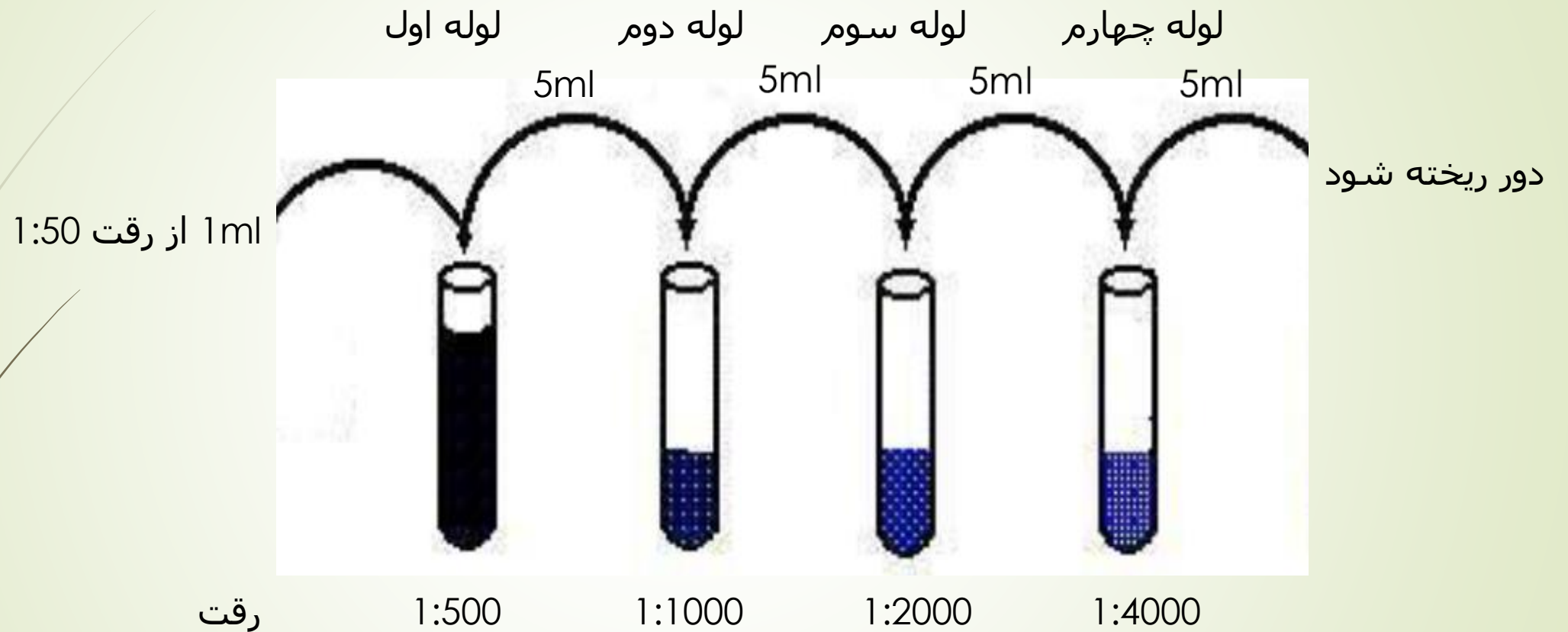
- آب مقطر نوع ۱ یا ۱۱
- محلول رنگ اوانس بلو (Evans Blue Dye Solution = EBD)
- ذخیره: 0.75 g پودر اوانس بلو در 100 ml آب مقطر
- صاف کردن محلول با کاغذ صافی واتمن شماره 4
- برچسب گذاری ظرف با نام، غلظت و تاریخ ساخت محلول
- ذخیره سازی در دمای اتاق دور از نور، پایدار به مدت 6 ماه
- کووت های مربع شیشه ای با عبور نور 1cm (برای همه اندازه گیری ها از کووت یکسان استفاده شود.)
- ظروف شیشه ای: چند لوله آزمایش 15 میلی لیتری تمیز، چند پیپت 10ml کلاس A1
- اسپکتروفتومتر یا فتومتر با کیفیت خوب و کالیبره با قابلیت تحلیل در طول موج 620 nm

کنترل کیفیت به روش رنگ سنجی

❖ آماده سازی محلول های کاری

1. 1ml از محلول ذخیره را به 49ml آب مقطر اضافه نمایید. (رقت 1:50)
2. 4 لوله آزمایش انتخاب کرده، در لوله اول 9ml و در سه لوله دیگر 5ml آب مقطر بریزید.
3. 1ml از رقت 1:50 برداشته و به لوله اول (9ml) اضافه کنید. (رقت 1:500)
4. 5ml از لوله اول برداشته، در لوله دوم ریخته و کاملاً مخلوط نمایید، 5ml از لوله دوم در لوله سوم و 5ml از لوله سوم در لوله چهارم. در انتها 5ml از لوله چهارم را برداشته و دور بریزید. به این ترتیب 4 محلول خواهید داشت که رقت نهایی بدست آمده در هر یک مطابق شکل خواهد بود.
5. 4 رقت فوق را می توانید تا 6 ماه ذخیره کنید، ولی اگر قرائت هر یک از رقت ها $\pm 3\%$ از قرائت قبلی تفاوت داشت، رقت های جدید تهیه نمایید.

آماده سازی محلول های کاری ...



کنترل کیفیت به روش رنگ سنجی

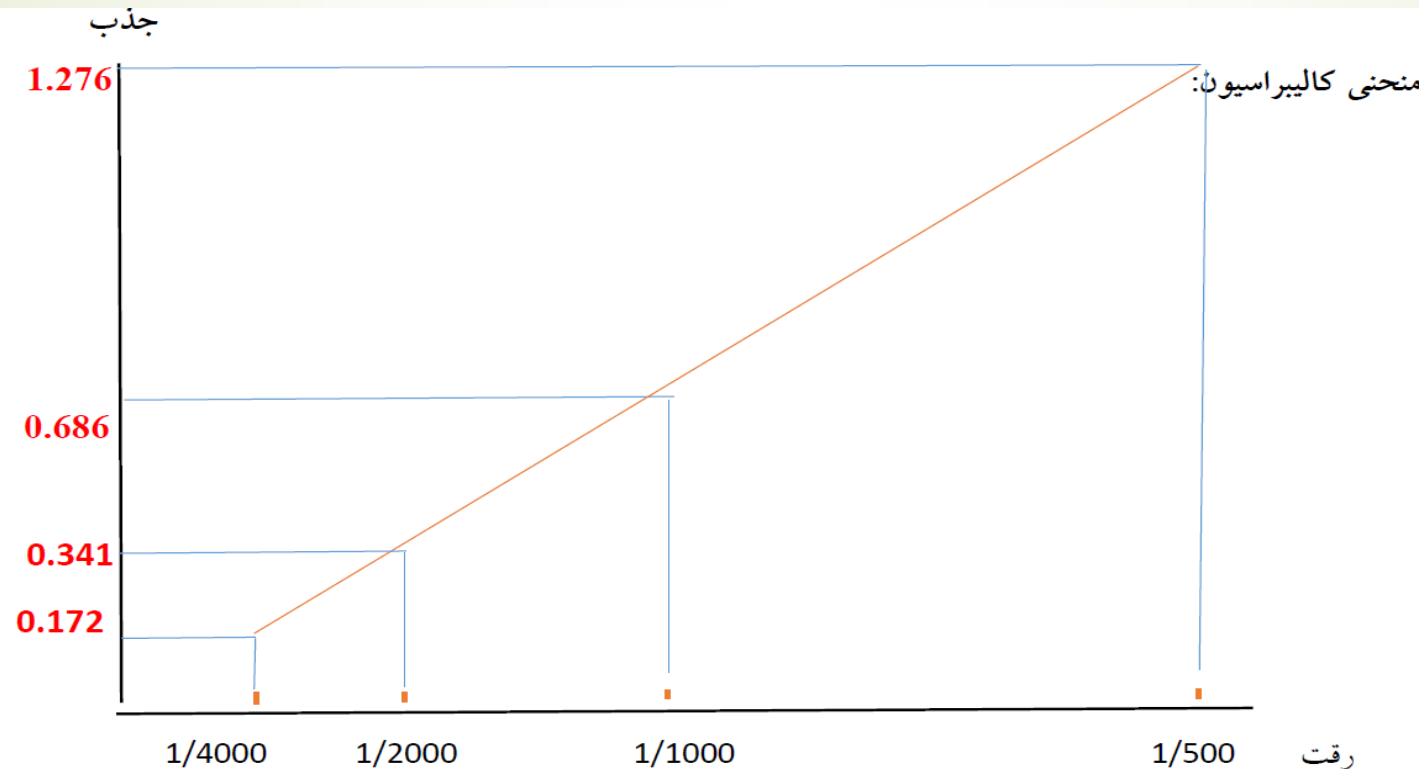
آماده سازی محلول های کاری

4. اسپکتروفتومتر یا فتومتر را در حالت جذب با طول موج 620nm تنظیم کنید.

5. اسپکتروفتومتر یا فتومتر را با آب مقطر صفر نمایید.

6. جذب هر ۴ رقت فوق را اندازه گیری و ثبت نمایید.

7. جذب نوری (محور عمودی) را برابر هر غلظتی از رقت ها (محور افقی) در برگه کاری ثبت نمایید. یک خط که بیشتر از همه به هر 4 نقطه نزدیک است به منظور ساختن منحنی کالیبراسیون، رسم کنید.



کنترل کیفیت به روش رنگ سنجی

لوپ 1μ

1. لوله دیگری انتخاب کرده، 10ml آب مقطر در آن بریزید.
2. با استفاده از لوپ 1μ مورد آزمون ده بار از محلول ذخیره اولیه را به این لوله منتقل و کاملاً مخلوط نمایید.
3. جذب این محلول را اندازه گیری نمایید، که باید برابر با جذب رقت 1:1000 روی منحنی کالیبراسیون باشد.
4. محلول فوق را برای سه بار آزمایش دیگر تهیه و جذب هر لوله را اندازه گیری نمایید. (در کل 4 خوانده).
5. ۴ خوانده را در برگه کاری ۱ ثبت نموده، میانگین آنها را محاسبه نمایید.
6. درصد عدم صحت را بر اساس راهنمای موجود در برگه کاری بدست 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 تایید نیست. اقدام اصلاحی انجام دهید.

کنترل کیفیت به روش رنگ سنجی

لوپ 10μ

1. برای کنترل کیفیت لوپ 10μ ، لوله ای انتخاب کرده، 100ml آب مقطر در آن بریزید.
2. با استفاده از لوپ 10μ مورد آزمون ده بار از محلول ذخیره اولیه را برداشته، به این لوله منتقل و کاملاً مخلوط نمایید.
3. جذب این محلول را اندازه گیری و ثبت نمایید.
4. محلول فوق را برای سه بار آزمایش دیگر تهیه و جذب هر لوله را اندازه گیری نمایید (در کل 4 خوانده).
5. خوانده ها را در برگه کاری ۱ ثبت نموده، میانگین 4 خوانده را محاسبه نمایید.
6. درصد عدم صحت را بر اساس راهنمای موجود در برگه کاری بدست آورده و ثبت نمایید. اگر میانگین جذب های خوانده شده بیش از $\pm 20\%$ از جذب محلول ذخیره 1:1000 باشد، صحت لوپ مورد تایید نیست. اقدام اصلاحی انجام دهید.

برگه کاری ۱

کنترل کیفیت لوپ کالیبره ($1\text{ }\mu\text{l}$ و $10\text{ }\mu\text{l}$) به روش رنگ سنجی با استفاده از محلول ذخیره $0.75\text{ g}/100\text{ ml}$

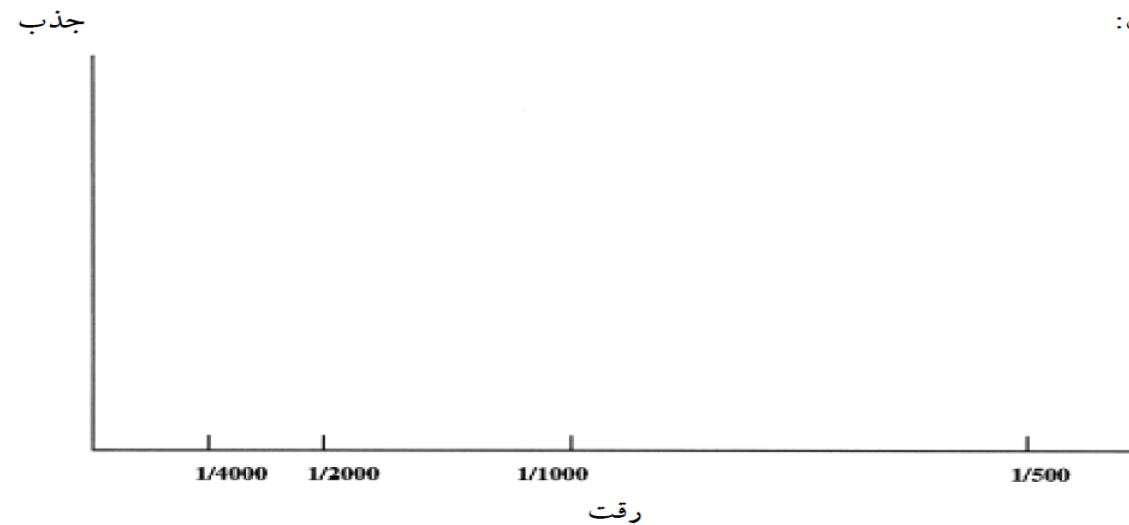
حجم و نوع لوپ:----- تاریخ انجام کنترل کیفیت:----- نام فرد انجام دهنده:-----
نام شرکت سازنده لوپ:----- سری ساخت لوپ:----- تاریخ شروع به استفاده لوپ:-----

میانگین منهای جذب $1:1000 = (a)$ -----
(a) تقسیم بر جذب $1:1000 = (b)$ -----
درصد عدم صحت: (b) ضربدر $100 = (c)$ ----- %
مقدار (c) باید $\pm 20\%$ باشد: قابل قبول؟ (بله/خیر) -----

شماره نمونه جذب
----- ۱
----- ۲
----- ۳
----- ۴
مجموع ۴ خوانده
----- میانگین

اقدام اصلاحی:-----

منحنی کالیبراسیون:



برگه کاری ۱

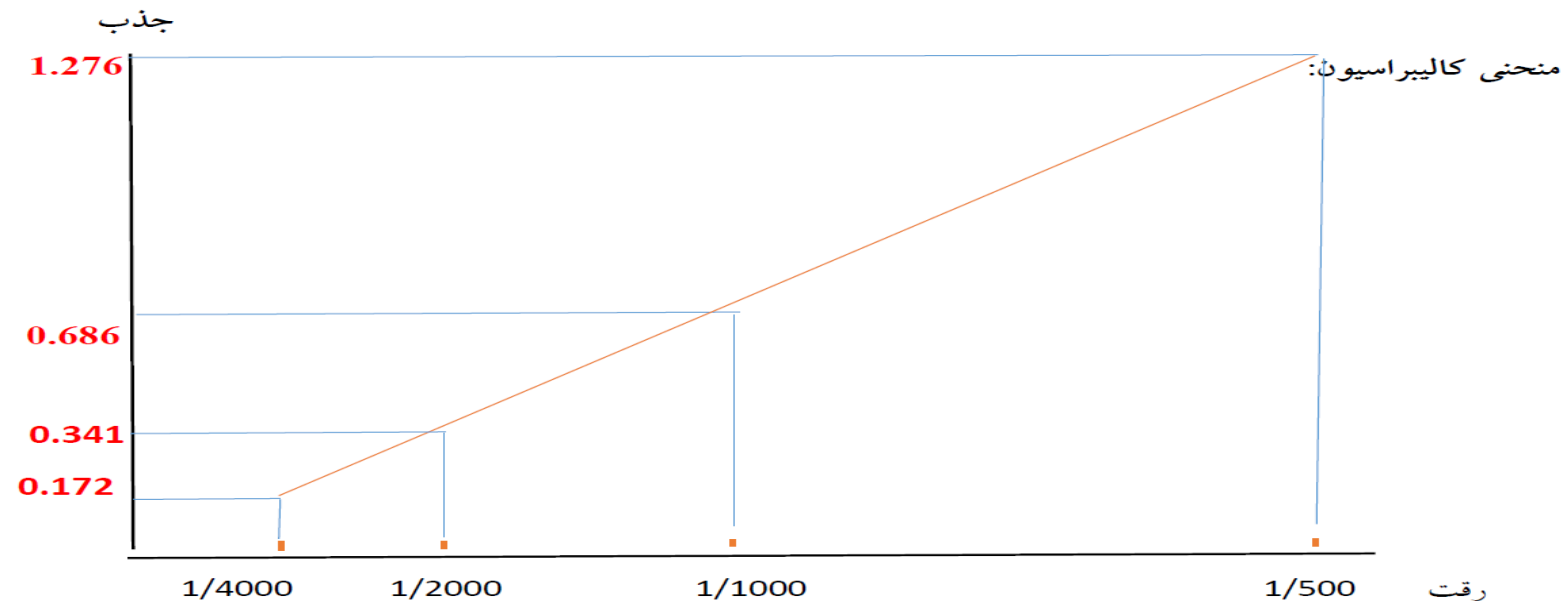
کنترل کیفیت لوپ کالیبره (1 µl و 10 µl) به روش رنگ سنجی با استفاده از محلول ذخیره 0.75 g/100 ml

حجم و نوع لوپ: **لوپ یکبار مصرف 1 µl** تاریخ انجام کنترل کیفیت: نام فرد انجام دهنده:-----
نام شرکت سازنده لوپ:----- سری ساخت لوپ:----- تاریخ شروع به استفاده لوپ:-----

$$\begin{aligned} \text{میانگین منهای جذب } (a) &= 1:1000 \quad 0.806 - 0.686 = 0.12 \\ \text{تقسیم بر جذب } (b) &= 1:1000 \quad 0.12 / 0.686 = 0.174 \\ \text{درصد عدم صحت: } (b) \text{ ضربدر } 100 &= 100 \quad 0.174 \times 100 = 17\% \\ \text{مقدار } (c) \text{ باید } \pm 20\% &\text{ باشد: قابل قبول؟ (بله/خیر) بله} \end{aligned}$$

شماره نمونه	جذب
1	0.755
2	0.811
3	0.821
4	0.837
مجموع 4 خوانده	3.224
میانگین	0.806

اقدام اصلاحی:-----



توجه

- **توجه 1:** 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 2:** با توجه به خطای بالا در استفاده و یا کنترل کیفیت لوپ های 1μ مراحل کار باید با دقت بسیار زیاد انجام شود.
- **توجه 3:** در هنگام استفاده و یا کنترل کیفیت لوپ های کالیبره از پر بودن لوپ و نبودن حباب در آن اطمینان حاصل نمایید.
- **توجه 4:** برای کنترل کیفیت لوپ 10μ ، می توانید از محلول ذخیره $0.2\text{ g}/100\text{ ml}$ به روش زیر نیز استفاده نمایید:

کنترل کیفیت لوپ کالیبره $10\mu\text{l}$ با استفاده از محلول ذخیره $0.2\text{ g}/100\text{ ml}$

1. 20mg از پودر اوانس بلو را به 10ml آب مقطر اضافه و کاملاً حل کنید. محلول را با کاغذ صافی واتمن شماره 4 صاف کنید. غلظت این محلول ذخیره، $0.2\text{ g}/100\text{ ml}$ میباشد.
2. 4 لوله آزمایش انتخاب کرده، در لوله اول 2ml و در سه لوله دیگر 1ml آب مقطر بریزید. $20\mu\text{l}$ از محلول ذخیره اولیه ($0.2\text{ g}/100\text{ ml}$) برداشته، در لوله اول ریخته و کاملاً مخلوط نمایید. سپس 1ml از لوله اول برداشته و در لوله دوم بریزید. 1ml از لوله دوم برداشته و در لوله سوم و 1ml از لوله سوم برداشته و در لوله چهارم ریخته و در انتها 1ml از لوله چهارم برداشته و دور بریزید. بدین ترتیب چهار محلول با رقت نهایی $1:100$ ، $1:200$ ، $1:400$ و $1:800$ به دست می آید.
3. جذب نوری هر یک از رقت ها را به وسیله فتومتر یا اسپکتروفتومتر با طول موج 620 nm اندازه گیری و ثبت نمایید.
4. جذب نوری (محور عمودی) را برابر هر غلظتی از رقت ها (محور افقی) در برگه کاری 2 ثبت نمایید. یک خط که بیشتر از همه به هر چهار نقطه نزدیک است به منظور تهیه منحنی کالیبراسیون، رسم کنید.
5. سپس 10 لوله آزمایش دیگر انتخاب کرده و در هر یک 1 ml آب مقطر بریزید.

ادامه ...

6. لوپ 10µl مورد آزمون را به طور عمودی و فقط حلقه آن را وارد محلول ذخیره اولیه نموده، از محلول رنگی برداشته و در لوله آزمایش اول فرو برید. این کار را برای 9 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.

7. بعد از مخلوط کردن کامل، جذب هر محلول را اندازه گیری و در برگه کاری 2 ثبت نمایید. میانگین آنها را محاسبه کنید. درصد عدم صحت را بر اساس راهنمای موجود در برگه کاری 2 بدست آورده و ثبت نمایید.

8. میانگین جذب های نوری به دست آمده از لوپ 10µl مورد آزمون باید برابر با جذب رقت 1:100 روی منحنی کالیبراسیون باشد. اگر میانگین جذب های خوانده شده بیش از 20% ± از جذب محلول ذخیره 1:100 اختلاف داشته باشد، صحت لوپ مورد تأیید نیست. اقدام اصلاحی انجام دهید.

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 $\pm 0.2\%$ باشد: قابل قبول؟ (بله/خیر)-----

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

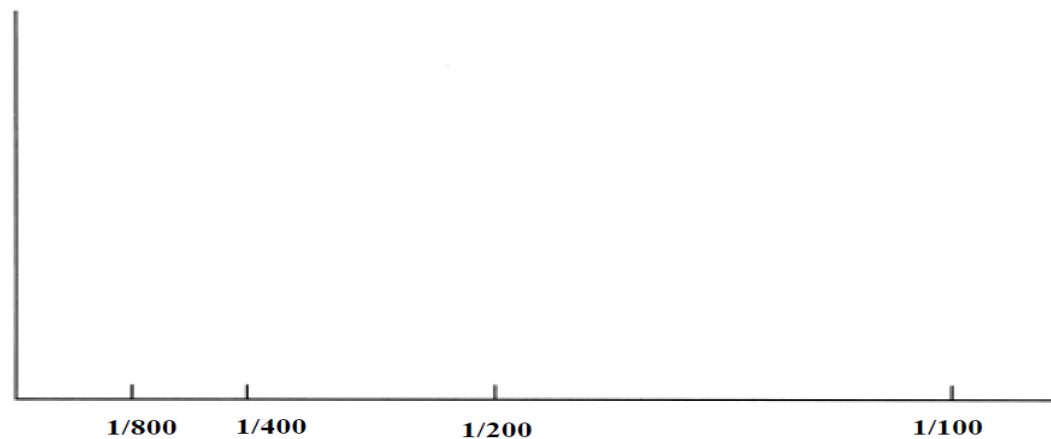
مجموع ۱۰ خوانده -----

میانگین -----

اقدام اصلاحی:-----

منحنی کالیبراسیون:

جذب



رقعت

محدودیت ها

- در صورتی که در نمونه مایع یا حجم برداشته شده با لوپ حباب وجود داشته باشد، لوپ های کمی، هم یک بار 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.
- حباب ها را با سوزاندن (برای لوپ های چند بار مصرف) و جایگزین کردن (برای لوپ های یک بار مصرف) یا دوباره فرو بردن در مایع (برای هر دو نوع لوپ) از بین ببرید.

مرجع

- Clinical Microbiology Procedures Handbook, fourth edition, Leber A.I., 2016



از توجه شما
سپاسگزارم