

کنترل کیفیت رنگ ها، معرف ها، دیسک های تشخیصی و آنتی سرم ها در آزمایشگاه میکروب شناسی

رقیه صبوریان
مرداد ماه ۱۴۰۰

آزمایش رنگ آمیزی گرم

► موارد کاربرد:

- طبقه بندی باکتری ها بر اساس شکل، اندازه، مرفولوژی-آرایش سلول و واکنش گرم آنها در آزمایشگاه میکروب شناسی پزشکی
- به عنوان آزمایش کلیدی و بسیار مهم برای تشخیص احتمالی عوامل عفونت و بررسی کیفیت نمونه های بالینی

► این خصوصیات ممکن است تحت تأثیر عوامل متعددی قرار گیرد، شامل:

- سن کشت
- محیط کشت
- شرایط محیط انکوباسیون
- روش های رنگ آمیزی
- وجود مواد مهارکننده
- برای تفسیر اسمیر تهیه شده از نمونه های بالینی نیز عوامل دیگری مثل وجود انواع سلول های میزبان و فاگوسیتوز نیز مؤثر می باشند.

□ توجه: صحیح ترین نتیجه

- تهیه اسمیر از کشت های تازه (کمتر از ۲۴ ساعت)
- روی محیط های غیر مهار کننده
- نمونه های بالینی تازه
- زمانی که مرفولوژی مهم است (مانند استرپتوکوک ها و باسیل های گرم مثبت)، کشت های مایع ارجحیت دارد.

آزمایش رنگ آمیزی گرم

➤ معرف ها

➤ آماده مصرف تجاري

➤ تهیه شده در آزمایشگاه:

➤ حجم زیادی از معرف ها را تهیه کرده و به اندازه نیاز، محلول کاری آماده نمایید.

➤ برای مصرف روزانه، معرف ها را در بطری های کوچک تر بریزید،

➤ اما برای دوری از ایجاد رسوب روی لام، بطری های کوچک تر کریستال ویوله و رنگ برها باید هر ماه جایگزین شوند.

➤ ثبت مشخصات معرف روی بطری و در برگه کاری:

➤ نام معرف

➤ تاریخ آماده سازی

➤ تاریخ استفاده

➤ شماره ساخت

➤ تاریخ انقضاء

➤ شرایط نگهداری

➤ اگر تاریخ استفاده به طور واضح روی بطری های ذخیره و در برگه های کاری کنترل ثبت شده باشد، نیازی به برچسب گذاری بطری های کاری با این مشخصات نیست، به غیر از نام معرف.

کنترل کیفیت رنگ آمیزی گرم

► (A) معرف ها را از نظر ظاهري، به طور روزانه بررسی کنید.

1. اگر کریستال ویوله رسوب کند یا ته نشین شود، قبل از استفاده آن را صاف کنید.

2. اگر محلول های کاری با مصرف روزانه تمام نمی شوند، باید به طور منظم عوض شوند. تبخیر مواد ممکن است عملکرد معرف ها را تغییر دهد.

3. معرف های کاری را حداقل به صورت ماهانه دور بریزید تا استفاده مکرر آنها محدود شود.

□ توجه: رنگ ها می توانند آلوده شوند. وقتی مشکوک می شوید، باید از سری ساخت جدید معرف استفاده کنید.

کنترل کیفیت رنگ آمیزی گرم (ادامه...)

▶ (B) دفعات آزمایش کنترل کیفیت:

- ▶ قبل از استفاده از هر سری ساخت جدید هر رنگ و معرف رنگ بر
- ▶ و بعد از آن حداقل به صورت هفتگی
- ▶ با یک میکروارگانیزم گرم مثبت و یک گرم منفی
- ▶ کارکنان آزمایشگاه که رنگ آمیزی گرم را به دفعات کم انجام می دهند، باید به صورت روزانه یا با هر بار آزمایش نمونه بیمار، با یک کنترل مثبت و یک کنترل منفی آزمایش کنند.

کنترل کیفیت رنگ آمیزی گرم (ادامه...)

1. تهیه سوسپانسیونی با کدورت کم از *Escherichia coli* (ATCC 25922) و *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) در یک محیط براث (فاز لگاریتمی)
2. دو قطره از براث روی هر لام ریخته و اسمیر تهیه نمایید.
3. آنها را در متانول فیکس کرده و در 20°C - نگهداری کنید.
4. مطابق روش رنگ آمیزی گرم، رنگ آمیزی نمایید.
5. نتایج مورد انتظار:
 - باسیل گرم منفی: صورتی
 - کوکسی گرم مثبت: بنفش پررنگ
6. به طور جایگزین، از بین دندان ها با یک اپلیکاتور چوبی نمونه گیری کرده و در انتهای لامی که برای نمونه استفاده شده است، قرار دهید. این یک روش کنترل Built-in می باشد که شامل سوپیه های گرم مثبت و گرم منفی است.

کنترل کیفیت رنگ آمیزی گرم (ادامه...)

▶ (C) انجام اقدام اصلاحی وقتی که:

- ▶ اسمیرهای رنگ شده کیفیت خوبی نداشته باشند
- ▶ تفسیر رنگ ها مشکل باشد
- ▶ یا تفسیر آنها صحیح نباشد
- ▶ مشخصات رنگ آمیزی نامناسب مانند:
 - ▶ رنگ آمیزی کمرنگ ارگانایسم های گرم مثبت
 - ▶ باقی ماندن کریستال ویوله در ارگانایسم های گرم منفی
 - ▶ رنگ گرفتن فقط کناره های اسمیر
 - ▶ رسوب روی لام و غیره

کنترل کیفیت رنگ آمیزی گرم (ادامه...)

▶ دلایل:

- ▶ نامناسب بودن مراحل آماده سازی نمونه
- ▶ مقدار ناکافی نمونه یا تأخیر در ارسال آن
- ▶ کیفیت نامناسب معرف ها
- ▶ روش انجام رنگ آمیزی (مهارت شخص انجام دهنده آزمایش و مشاهده کننده لام)
- ▶ بعضي عوامل رایج که باعث ایجاد نتایج نامناسب در رنگ آمیزی گرم می شوند، عبارتند از:
 1. استفاده از لام های شیشه ای که تمیز نباشند.
 2. اسمیری که خیلی ضخیم تهیه شده باشد.
 3. حرارت دادن زیاد اسمیر، زمانی که برای فیکس کردن از روش حرارت استفاده می شود.
 4. آبکشی زیاد در طی انجام رنگ آمیزی، به خصوص اگر اسمیر به طور صحیح فیکس نشده باشد.
 5. وجود رسوب در معرف ها

کنترل کیفیت رنگ آمیزی گرم (ادامه...)

► (D) تهیه برنامه ای برای مرور گزارش های رنگ آمیزی گرم برای اطمینان از صحت تفسیر

1. مرور رنگ آمیزی های گرم انتخابی به وسیله سوپروایزر، برای تعیین نیازهای آموزشی و همچنین کمک به یکپارچگی اطلاعات بالینی مربوطه

2. مقایسه نتایج کشت نهایی با گزارش های رنگ آمیزی گرم:

- مرفولوژی های گزارش شده در رنگ آمیزی گرم را که در کشت جدا نشده اند، بررسی کنید.

- زمانی که میکروارگانیسم از کشت جدا شده، اما در رنگ آمیزی گرم میکروارگانیسمی مشاهده نشده است.

- هم رنگ آمیزی و هم کشت را بررسی نمایید.

- توجه: تعداد قابل توجهی از ارگانیسم های تشخیص داده شده روی اسمیر، از کشت جدا می شوند.

- بنابراین تفاوت ها باید برای از بین بردن خطاهای ناشی از مشاهده اسمیر بررسی شوند.

- یا به عنوان نشانه هایی برای به کارگیری سایر روش های کشت (مانند کشت بی هوازی، کشت برای قارچ یا کشت باسیل های اسید فست [AFB])

3. تهیه مجموعه ای از لام های مرجع برای آموزش

فرم ثبت نتیجه کنترل کیفیت رنگ گرم

[illegible]

کنترل کیفیت سایر رنگ ها

رنگ	ارگانیسم کنترل	شماره ATCC	نتیجه مورد انتظار	دفعات انجام آزمایش QC
Acid-Fast (Ziehl-Neelsen)	<i>M. tuberculosis</i> (or BCG) <i>E. coli</i>	25177 25922	باسیل صورتی-قرمز باسیل آبی	هر سری ساخت و خرید، سپس هر روز کاری
Methylene Blue	<i>Corynebacterium</i> spp. <i>E. coli</i> Saline	- 25922	باسیل های پلی مورف آبی رنگ با دانه های متاکروماتیک باسیل آبی مشاهده نشدن باکتری	هر سری ساخت و خرید، سپس هر یک ماه

آزمایش اکسیداز

هدف:

- ▶ افتراق انتروباکتریاسه ها (منفی) از گونه های آئروموناس (مثبت)، پلزیوموناس شیگلوییدس (مثبت) و اکثر گونه های ویبریو (مثبت)
- ▶ افتراق موراکسلا (مثبت) و نیسریا (مثبت) از اسینتوباکتر (منفی)
- ▶ گونه های کمپیلوباکتر اکسیداز مثبت هستند.
- ▶ به عنوان تست تشخیصی مهم برای تشخیص باکتری های میله ای گرم منفی که عضو خانواده انتروباکتریاسه نیستند، به کار می رود.

اصول:

- ▶ آنزیم باکتریایی داخل سلولی سیتوکروم اکسیداز، در حضور اکسیژن محیط، معرف فنیلن دی آمین (پذیرنده الکترون) را به فنل اندول بنفش تیره اکسید می کند. این آزمایش برای تشخیص اولیه باکتری های گرم منفی مفید واقع می شود.

آزمایش اکسیداز

► **معرف ها:** یکی از موارد زیر را می توان استفاده نمود:

► **معرف کوآکس اکسیداز** (تترامیتیل پارافنیلن دی آمین دی هیدروکلراید)

▪ توجه: فرمول های دیگری نیز وجود دارد، اما کوآکس حساس ترین معرف است، پایدارتر بوده و نسبت به مشتق دی متیل آن کمتر سمی است.

► برای تهیه محلول ۱% اکسیداز، ۰/۱ گرم از پودر تترامیتیل پارافنیلن دی آمین دی هیدروکلراید را در ۱۰ml آب مقطر استریل حل کنید. بخوبی مخلوط کرده و به مدت ۱۵ دقیقه آن را در جای ثابتی قرار دهید.

► معرف را بصورت روزانه تهیه کنید.

► همچنین می توانید معرف را داخل لوله های پوشیده شده با فویل به اندازه های مساوی تقسیم کرده و در دمای ۲۰ - درجه سانتیگراد ذخیره نمایید. قبل از استفاده معرف را از فریزر خارج نموده، بگذارید ذوب شود. باقیمانده هر روز را دور بریزید.

► **دیسک ها یا نوارهای کاغذی آغشته به معرف** (آماده مصرف تجاری) نگهداری شده در یخچال

آزمایش اکسیداز (ادامه...)

▶ روش انجام آزمایش

1. مربع کوچکی از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ را در ظرف پتری قرار دهید و با ۱ یا ۲ قطره از معرف اکسیداز کوآکس آماده شده مرطوب نمایید، یا نوار یا دیسک اکسیداز آماده مصرف را در ظرف پتری قرار دهید.
 - توجه: مطابق دستورالعمل سازنده عمل کنید. ممکن است مطابق دستورالعمل بعضی سازندگان نیاز به مرطوب نمودن دیسک باشد.
2. از یک کلنی تک با استفاده از اپلیکاتور برداشته و بر روی کاغذ صافی آغشته به معرف اکسیداز کوآکس پخش کنید. تغییر رنگ کاغذ به بنفش را مشاهده نمایید.
3. برای باکتری های سخت رشد، کلنی را با سوآب پنبه ای سفید برداشته، سوآب را بر روی کاغذ صافی آغشته به معرف بکشید. تغییر رنگ به بنفش را بر روی سوآب مشاهده کنید.

آزمایش اکسیداز (ادامه...)

تفسیر آزمایش

- ▶ واکنش مثبت: ایجاد رنگ آبی تیره تا بنفش در مدت ۱۰ ثانیه
- ▶ واکنش تاخیری: ایجاد رنگ آبی تیره تا بنفش در مدت ۶۰-۱۰۰ ثانیه (باید تست های بیشتری انجام شود، زیرا احتمالاً متعلق به خانواده انتروباکتریاسه نمی باشد.)
- ▶ واکنش منفی: عدم تغییر رنگ معرف یا ایجاد صورتی کمرنگ در مدت ۱۰ ثانیه
- توجه: به دستورالعمل سازنده توجه شود.

آزمایش اکسیداز (ادامه...)

▶ کنترل کیفیت

- ▶ هر سری ساخت و خرید جدید پودر معرف یا دیسک آماده مصرف تجاری
- ▶ و سپس هر روزی کاری
- ▶ هنگامیکه محلول معرف برنگ بنفش کم رنگ تغییر کند یا دیسک کاغذی در حال تیره شدن است، از آن استفاده نکنید.
- سویه کنترل مثبت: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- سویه کنترل منفی: *Escherichia coli* ATCC 25922

آزمایش اکسیداز (ادامه...)

▶ محدودیت ها

▶ برای جلوگیری از ایجاد نتایج مثبت کاذب:

- از لوپ استیل یا نیکروم برای برداشتن کلنی استفاده نکنید. زیرا در اثر استریل کردن لوپ با شعله، اکسیداسیون سطحی ایجاد شده و نتیجه مثبت کاذب بدست می آید.
- از ارگانیسیم هایی که بر روی محیط های حاوی گلوکز یا رنگ (مانند MAC یا EMB) رشد کرده اند، استفاده نکنید.
- اگر معرف یا دیسک کاغذی به بنفش تغییر رنگ داده باشد، از آن استفاده نکنید.

▶ کشت های مخلوط نیسریا و سودوموناس ممکن است نتایج منفی کاذب دهند. زیرا سودوموناس یک سوپسترای مهاری تولید می کند که با تولید اکسیداز توسط نیسریا تداخل ایجاد می نماید.

▶ رعایت زمان قرائت واکنش برای انجام دقیق تست بسیار مهم است.

فرم ثبت نتیجه کنترل کیفیت معرف اکسیداز

[illegible]

آزمایش کاتالاز

هدف:

- افتراق استافیلوکوک ها و میکروکوک ها (مثبت) از استرپتوکوک ها و انتروکوک ها (منفی)
- افتراق کلستریدیوم ها (منفی) از باسیلوس ها (مثبت)
- افتراق لیستریا مونوسیتوژنز و کورینه باکتریوم ها (مثبت) از استرپتوکوک گروه B (منفی)
- افتراق باسیل های گرم منفی سخت رشد از یکدیگر

اصول:

- باکتری هایی که آنزیم کاتالاز تولید می کنند، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) را به آب و گاز اکسیژن هیدرولیز می کنند و منجر به آزاد شدن حباب های گاز می شود. H_2O_2 یکی از محصولات نهایی اکسیداسیون در متابولیسم کربوهیدرات است. این آزمایش در تشخیص اولیه اغلب باکتری ها مفید واقع می شود.

آزمایش کاتالاز (ادامه...)

▶ نمونه:

- کلنی های خالص و تازه (کشت ۲۴-۱۸ ساعته) از باکتری رشد کرده روی محیط آگار مناسب
- برای باکتری های بی هوازی، کلنی ها را به مدت ۳۰ دقیقه قبل از آزمایش در معرض هوا قرار دهید.

▶ ابزار و معرف ها:

- معرف پراکسید هیدروژن ۳۰٪ برای نیسریاها (هشدار: آب اکسیژنه ۳۰٪ به شدت برای پوست سوزاننده است. در صورت تماس با پوست، فوراً با اتیل الکل ۷۰٪، و نه آب، شستشو دهید.)
- معرف پراکسید هیدروژن ۱۵٪ برای میکروارگانیسم های بی هوازی
- معرف پراکسید هیدروژن ۳٪ برای سایر باکتری ها
- ▶ توجه ۱: معرف ۳۰٪ را می توان برای تمام آزمون ها استفاده کرد، اما خطرناک تر است.
- ▶ توجه ۲: معرف ها باید در شیشه های تیره رنگ، دور از نور و در یخچال نگهداری شوند.
- اپلیکاتور چوبی یا شیشه ای یا لوپ پلاتینی
- لام شیشه ای

آزمایش کاتالاز (ادامه...)

روش انجام آزمایش:

1. با يك اپليكاتور از مركز يك كلني ۲۴-۱۸ ساعته به سطح يك لام شيشه اي تميز منتقل كنيد. اطمینان حاصل نماييد كه كلنی روی لام با چشم قابل رویت است. اگر كلنی روی پليت بلاد آگار باشد، دقت شود از خون برداشته نشود.
2. بلافاصله يك قطره معرف را به كلني روی لام اضافه كنيد و فوراً ايجاد حباب روی لام را بررسی نماييد. نتیجه را به صورت مثبت يا منفي گزارش كنيد. برای مشاهده بهتر حباب ها لام را روی زمینه سیاه نگه داريد.
3. لام را داخل Safty Box بيندازيد.

تفسير:

- واكنش مثبت: ظاهر شدن فوری حباب بصورت ماندگار يا حالت جوش زدن (كف)
- واكنش ضعيف: ايجاد يك يا دو حباب
- واكنش منفي: عدم ايجاد حباب يا ظاهر شدن چند حباب بعد از ۲۰ ثانيه (بعضی از باكتري ها دارای آنزیمی غير از کاتالاز هستند كه پراکسید هیدروژن را تجزیه کرده كه تعداد کمی حباب ریز ايجاد می شود).

آزمایش کاتالاز (ادامه...)

▶ کنترل کیفیت:

- ▶ هر سری ساخت و خرید جدید معرف پراکسید هیدورژن
- ▶ و سپس هر روزی کاری
- ▶ با سویه های کنترل مثبت و منفی

▪ سویه کنترل مثبت: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

▪ سویه کنترل منفی: *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615

فرم ثبت نتایج کنترل کیفیت کاتالاز

[illegible]

آزمایش کاتالاز (ادامه...)

محدودیت ها:

- گلبول های قرمز حاوی کاتالاز هستند. برای اجتناب از جواب های مثبت کاذب نباید کلنی ها را از محیط آگار خون دار برداشت. اگر کلنی به آسانی برداشت نمی شود یا خوب رشد نمی کند، آزمایش را از روی محیط شکلات آگار تکرار نمایید، که در آزمایش مداخله ایجاد نمی کند. اما از آنجائی که اکثر نمونه های کلینیکی روی محیط های خون دار کشت داده می شوند، برای انجام تست می توان از قله کلنی ها بدون تماس با محیط برداشت تا واکنش مثبت کاذب ایجاد نشود.
- از محیط مولر هینتون آگار استفاده نکنید.
- از آنجائی که بعضی از باکتری ها دارای آنزیم هایی غیر از کاتالاز هستند که پراکسید هیدروژن را تجزیه می نمایند، ایجاد حباب های ریز به تعداد کم بعد از ۲۰ ثانیه مثبت در نظر گرفته نمی شود.
- بهتر است از يك اپلیکاتور چوبی، لوپ پلاتینی یا پلاستیکی برای برداشتن کلنی استفاده شود. استفاده از لوپ آهنی واکنش مثبت کاذب ایجاد می کند.
- چون این آنزیم فقط در کشت های زنده وجود دارد، کشت های بیشتر از ۲۴ ساعت برای آزمایش مناسب نیستند. کشت های کهنه ممکن است سبب نتیجه منفی کاذب شوند.
- ترتیب اضافه نمودن معرف به کلنی را برعکس نکنید، زیرا می تواند نتایج منفی کاذب رخ دهد.

معرف و کلنی ها را مخلوط نکنید.

دیسک تشخیصی / معرف	ارگانیسم کنترل	شماره ATCC	نتیجه مورد انتظار	دفعات انجام آزمایش QC
Bacitracin, 0.04U	<i>Strep. pyogenes</i>	19615	هاله عدم رشد (بزرگتر از 10mm)	هر سری ساخت و خرید، سپس هر یک ماه
	<i>Strep. agalactiae</i>	12386	بدون هاله یا هاله کمتر از 10mm	
Catalase (3% H₂O₂)	<i>Staph. aureus</i>	25923	مثبت (ایجاد سریع حباب)	هر سری ساخت و خرید، سپس هر روز کاری
	<i>Strep. pyogenes</i>	19615	منفی (بدون حباب)	
Coagulase test	<i>Staph. aureus</i>	25923	مثبت (ایجاد لخته)	هر سری ساخت و خرید پلاسمای خرگوش، سپس هر روز کاری
	<i>Staph. epidermidis</i>	12228	منفی (عدم ایجاد لخته)	
Deoxycholate (10%) (Bile solubility test)	<i>Strep. pneumoniae</i>	6305	مثبت (حل شدن)	هر سری ساخت و خرید، سپس هر ۳ ماه
	<i>Ent. faecalis</i>	29212	منفی (حل نشدن)	
Ferric chloride (10%)	<i>Proteus mirabilis</i>	43071	مثبت (سبز رنگ)	هر سری ساخت و خرید، سپس هر ۳ ماه
	<i>E. coli</i>	25922	منفی (بدون تغییر رنگ)	
Indole (Kovacs)	<i>E. coli</i>	25922	مثبت (ارغوانی رنگ)	هر سری ساخت و خرید، سپس هر ۳ ماه
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13883	منفی (بدون تغییر رنگ)	
Methyl Red	<i>E. coli</i>	25922	مثبت (قرمز رنگ)	هر سری ساخت و خرید، سپس هر ۳ ماه
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13883	منفی (بدون تغییر رنگ)	
Ninhydrin (Hippurate hydrolysis test)	<i>Strep. agalactiae</i>	12386	مثبت (آبی پررنگ)	هر سری ساخت و خرید، سپس هر ۳ ماه
	<i>Strep. pyogenes</i>	19615	منفی (بنفش کمرنگ یا بدون تغییر رنگ)	
Novobiocin, 5µg, on BAP or MH agar	<i>Staph. aureus</i>	25923	≥22 mm	هر سری ساخت و خرید، سپس هر یک ماه
	<i>Staph. saprophyticus</i>	15305	≤15 mm	
ONPG	<i>E. coli</i>	25922	مثبت (زرد رنگ)	هر سری ساخت و خرید، سپس هر ۳ ماه
	<i>Proteus mirabilis</i>	29245	منفی (بدون تغییر رنگ)	

دفعات انجام آزمایش QC	نتیجه مورد انتظار	شماره ATCC	ارگانیسم کنترل	دیسک تشخیصی /معرف
هر سری ساخت و خرید، سپس هر یک ماه	حساس (قطر هاله عدم رشد $\geq 16\text{mm}$ برای دیسک 10mm و قطر هاله عدم رشد $\geq 14\text{mm}$ برای دیسک 6mm) مقاوم (بدون هاله عدم رشد)	6305 19615	<i>Strep. pneumoniae</i> <i>Strep. pyogenes</i>	Optochin, 5μg (in 5 to 10% CO ₂)
هر سری ساخت و خرید، سپس هر روز کاری	مثبت (بنفش) منفی (بدون تغییر رنگ)	27853 25922	<i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i>	Oxidase
هر سری ساخت و خرید، سپس هر ۳ ماه	مثبت (صورتی پررنگ تا قرمز) منفی (صورتی کمرنگ یا بدون تغییر رنگ)	29212 25922	<i>Ent. faecalis</i> <i>E. coli</i>	PYR test
هر سری ساخت و خرید، سپس هر ۳ ماه	مثبت (قرمز) منفی (بدون تغییر رنگ)	13047 25922	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>E. coli</i>	Voges- Proskauer
هر سری ساخت و خرید، سپس هر ۶ ماه	-	-	مطابق دستورالعمل کنترل کیفیت هر آنتی سرم	Antisera

REAGENT: COAGULASE (BBL rabbit plasma)

CONTROL ORGANISMS – Expected results

Year_____

(+) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Slide: clumping when organism is added to plasma

Tube: clotting when incubated for 3 hours or overnight

(-) *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

Slide: no clumping when organism added to plasma

Tube: no clotting overnight

FREQUENCY: As prepared

[illegible]

کنترل کیفیت آنتی سرم

- ▶ هر سری ساخت و خرید، و سپس هر شش ماه یک بار
- ▶ بررسی چشمی یک قطره از آنتی سرم روی لام، آنتی سرم باید شفاف بوده و فاقد هر گونه ذره باشد.
- ▶ آزمایش بروش آگلوتیناسیون بر روی لام
- ▶ آزمایش حداقل یک سویه کنترل مثبت و یک سویه کنترل منفی باید برای **بررسی خصوصیت و شدت آگلوتیناسیون آنتی سرم**
- ▶ آزمون کنترل کیفیت آنتی سرم با سویه های کنترل باید مطابق روش انجام آزمایش و کاملاً منطبق با دستورالعمل شرکت سازنده باشد.
- ▶ ثبت نتایج همه واکنش ها

کنترل کیفیت آنتی سرم

- ▶ یک قطره آنتی سرم (حدود 0.05 ml، اگرچه می توان 10µl هم استفاده نمود) روی یک طرف لام قرار دهید.
- ▶ یک قطره سرم فیزیولوژی روی طرف دیگر لام قرار دهید، برای بررسی اتواگلوتیناسیون یا خشن بودن کلنی ها. (به عنوان کنترل منفی)
- ▶ از کلنی های خالص و ۱۸ تا ۲۴ ساعته سویه کنترل روی محیط **غیر انتخابی** مانند بلاد آگار یا TSA، سوسپانسیون یکنواخت حدود ۲ تا ۳ مک فارلند در هر قطره تهیه نمایید. با اپلیکاتور چوبی یا لوپ آنرا کاملاً مخلوط کنید.
- ▶ لام را به مدت ۳۰ ثانیه یا ۱ دقیقه (مطابق دستورالعمل سازنده) به عقب و جلو بچرخانید.
- ▶ واکنش آگلوتیناسیون را در زیر نور کافی (چراغ مطالعه) با پس زمینه تیره بررسی نمایید.
- ▶ قطره سرم فیزیولوژی باید فاقد آگلوتیناسیون باشد، تا نتیجه قطره آنتی سرم قابل اطمینان محسوب شود.

کنترل کیفیت آنتی سرم

▶ شدت آگلوتیناسیون قرائت و می توان آن را مطابق جدول زیر ثبت نمود:

Percentage of agglutination:

100%

75%

50%

25%

0%

Record reaction as:

4+

3+

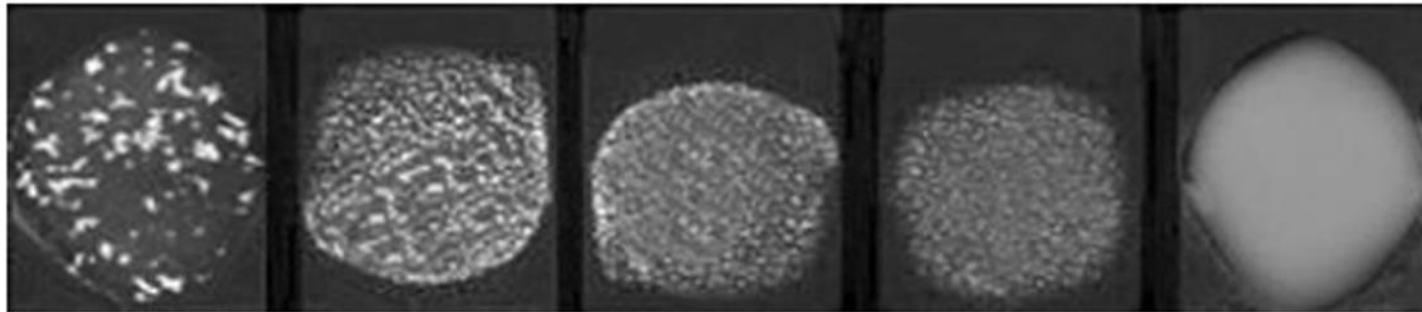
2+

1+

negative

Score and record the results as follows:

4+	All organisms are clumped and the supernatant, or suspending fluid is clear
3+	About 75% agglutination, the supernatant fluid is slightly cloudy
2+	About 50% agglutination, the supernatant fluid is moderately cloudy
1+	About 25% agglutination, the supernatant fluid is cloudy
Tr	Trace amount of agglutination present
Negative	No agglutination apparent and suspension remains homogenous.



4+

3+

2+

1+

Negative

روش تهیه و کنترل استاندارد 0.5 مک فارلند

1. برای تهیه سوسپانسیون با هم زدن مداوم، 0.5 ml از کلرور باریوم (BaCl₂) 0.48 mol/l را به 99.5 ml اسید سولفوریک (0.36 N) 0.18mol/l (1% v/v) اضافه کنید.
 2. صحت غلظت سوسپانسیون را از طریق اندازه گیری جذب نوری با استفاده از اسپکتروفتومتر با طول مسیر 1 cm و کووت همخوان مشخص کنید.
 3. جذب استاندارد نیم مک فارلند در 625nm باید معادل 0.08 تا 0.13 باشد.
 4. سوسپانسیون سولفات باریوم را به مقدار 4-6ml در لوله های در پیچ دار هم اندازه با لوله هایی که برای استاندارد کردن تلقیح باکتریایی استفاده می شود، بریزید.
 5. درپوش لوله ها را محکم ببندید و با پارافیلם درزگیری (seal) نمایید. آنها را در حرارت اتاق و در محل تاریک / در پوششی تیره رنگ نگهداری نمایید.
 6. کدورت استاندارد سولفات باریوم را قبل از هر بار استفاده با ورتکس یا با دست به شدت تکان دهید، تا ظاهری یکنواخت پیدا کند.
 7. **ظاهر آن را از نظر وجود کدورت یکنواخت بررسی کنید. در صورت ظهور ذرات درشت، استاندارد را تعویض نمایید.**
- توجه:** استانداردهای مک فارلند ساخته شده از ذرات لاتکس به صورت تجاری نیز موجود می باشد. هنگام استفاده، درست قبل از انجام آزمایش باید با سر و ته کرن به طور آرام (نه روی ورتکس)، محتویات آنها را مخلوط نمود.
8. **6) لازم است استانداردهای سولفات باریوم به طور ماهانه تعویض گردد یا جذب آن اندازه گیری شود.**

A bouquet of pink and white roses and carnations arranged in a heart shape on a white background. The flowers are vibrant and fresh, with some greenery visible. The arrangement is centered in the upper half of the image.

از توجه شما
سپاسگزارم