**13. سمپلر**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **اسم آزمایشگاه:** | {{LabName}} | |
| **اسم سند:** | **دستورالعمل فنی و کنترل کیفی سمپلر** | |
| **کد سند:** | D-002-0013 | |
| **دسته بندی سند:** | دستورالعمل و کنترل کیفی دستگاه ها و تجهیزات | |
| **شماره ویرایش:** | {{EditeNumber}} | |
| **تاریخ ویرایش:** | {{EditeNumber}} | |
| **تاریخ بازنگری سند:** | {{ReviewDate}} | |
| **تهیه کننده:** | **تایید کننده:** | **امضاء :** |
| شرکت دارا ویرا آزما  دکتر داریوش شکری | {{ConfirmerOneName}} | {{ConfirmerTwoName}} |

**(1) هدف:**

شرح دستورالعمل فنی، تشریح روش کار، نگهداری و کنترل کیفی سمپلر.

**(2) دامنه كاربرد:**

کلیه واحدهای آزمایشگاهی از جمله بخش میکروب شناسی

**(3) مسئولیت ها:**

در دستورالعمل اجرایی استاندارد کلی دستگاهها و تجهیزات آمده است.

**(4) تعاریف و اصطلاحات:**

**سمپلر یا میکروپیپت:** از مهمترین و پرکاربردترین ابزارهای موجود در بخش های مختلف آزمایشگاه می باشد که برای برداشت و انتقال حجم معینی از مایعات و محلول های مورد نظر استفاده می گردد.

* سمپلرها در چند دسته شامل انواع ثابت که فقط حجم معین و تعیین شده ای را جا به جا می نماید و متغیر که قابل استفاده برای برداشت حجمی بین کمترین و بیشترین حجم تعیین شده می باشد و سمپلر چند کاناله تقسیم می شوند.
* اساس کار سمپلرها مکانیکی بوده و با نیروی دست عمل مکش و تخلیه صورت می گیرد که خود نیازمند مهارت و تجربه است و باید به آرامی و مهارت صورت گیرد زیرا در غیر این صورت عملکرد دستگاه دچار مشکل شده و ممکن است اختلاف بین حجم کشیده شده و حجم تعیین شده زیاد باشد.
* دسته بندی سمپلرها بر اساس حجم برداشتی: گروه A: 100-1000 میکرولیتر، گروه B: 10-100 میکرولیتر و گروه C: کمتر از 10 میکرولیتر.

**عمل pre-wetting**: یا مرطوب کردن اولیه نوک سمپلر به این معناست که هر بار كه سر سمپلر عوض مي شود بايد چند بار نمونه يا مايع مورد نظر درون سر سمپلر پر و خالي شود. این عمل باعث خواهد شد تا سطح داخلی نوک سمپلر مرطوب شده و دقت حجم‌برداری افزایش یابد.

**(5) شرح دستورالعمل:**

**روش اجرائی:**

در ابتداي هر روز كاري قبل از شروع به استفاده از سمپلر مورد نظر، شاسي آن را حداقل 20 بار بالا و پايين كنيد. اين كار به روغن كاري اجزاء كمك كرده، موجب افزايش عمر مفيد آن خواهد شد. بعد از این عمل براي برداشتن حجم مورد نياز به ترتيب زير عمل نماييد:

1. سر سمپلر مناسب را به سمپلر محكم متصل نماييد تا به اصطلاح سمپلر هوا نکشد. به منظور حصول بيشترين دقت و صحت از سمپلر مورد استفاده، هر بار كه سر سمپلر را عوض مي كنيد عمل pre-wettingرا 3 بار انجام دهید.
2. از آنجایی که استفاده از سمپلر در بخش میکروب شناسی در اکثر موارد برای عملیات نیازمند استریلیته بودن استفاده می شود، سرسمپلرها اگر استریل نیستند باید قبل از استفاده استریل شوند (اتوکلاو).
3. شاسي سمپلر را تا محل مجاز به سمت پايين فشار دهيد.
4. در همين حال، و بدون رها كردن شاسي سمپلر، سر سمپلر را 3 الی 4 میلی متر داخل نمونه یا مايع فرو کنید.
5. شاسي را آرام رها كنيد تا مايع به داخل سر سمپلر وارد شود. در اين مرحله نبايد حبابي داخل سر سمپلر مشاهده شود. در غير اين صورت بايد مجدداً عمل كشيدن مايع را تكرار كنيد. بيرون سر سمپلر را با گاز یا دستمال کاغذی پاك كنيد یا نوك سمپلر را به لبه ظرف براي حذف قطرات اضافي بکشید.
6. جهت تخليه حجم موجود در سر سمپلر، ابتدا سر سمپلر را به ديواره داخلي ظرف مورد نظر بچسبانيد.
7. یک ثانيه صبر كرده، آنگاه شاسي را تا محل مجاز به آرامي فشار دهيد تا مايع كاملاً خالي شود.
8. در همين حال كه شاسي تا آخرين مرحله به پايين فشرده شده، سمپلر را طوري بيرون آوريد كه سر سمپلر هنگام بالا آمدن به ديواره لوله ماليده شود و سپس شاسي را رها كنيد.
9. سر سمپلر را دور بيندازيد و در صورت عدم نياز به استفاده مجدد از سمپلر، آن را در پايه مناسب قرار دهيد.
10. در صورت كار با محلول ها يا مايعاتي كه ويسكوزيته بالايي دارند، در مراحل مكش و تخليه بيشتر تامل نماييد.

**(6) كنترل كيفي و کالیبراسیون:**

* بررسي دقت و صحت سالی 4 مرتبه به انجام می رسد.
* برای کنترل کیفی و کالیبره کردن سمپلر شرکت هایی تحت عنوان آزمایشگاه کالیبراسیون وجود دارند که توسط مراجع ذیصلاح تأیید صلاحیت شده اند و با بررسی سمپلر، گزارش کالیبراسیون را برای درخواست کنندگان صادر می نمایند. اما اگر آزمایشگاه خود کار کنترل کیفی و کالیبراسیون سمپلر را انجام می دهد روش آن در زیر شرح داده شده است.
* **نکته**: درصورت استفاده از کیت های تجاری کنترل کیفی سمپلر طبق بروشور کیت مراحل را انجام گردد.
* طبق استاندارد، از دو روش وزن سنجی و رنگ سنجی برای کنترل کیفی و کالیبراسیون سمپلر استفاده می شود. از آنجایی که روش وزن سنجی به ترازوهای بسیار دقیق با دقت حداقل 4 صفر نیاز دارد که در اکثر آزمایشگاهها موجود نیست، در اکثر موارد از روش رنگ سنجی استفاده می گردد.
* در کنترل کیفی سمپلر پیش از هر اقدامی باید سرویس مربوطه مانند روغن کاری، استریل کردن و باز کردن انسدادهای احتمالی، نسبت به سرویس سمپلر اقدام نمود. در صورت صحت ساختمان فیزیکی سمپلر، کنترل کیفی انجام می پذیرد.

**روش رنگ سنجی:** در این روش از دو محلول رنگ سبز خوراکی یا محلول پارانیتروفنل استفاده می شود.

**الف: رنگ سبز خوراکی:** برای هر گروه حجمی سمپلرها باید یک محلول ذخیره از رنگ سبز خوراکی تهیه نمود:

* برای گروه A (١٠٠٠ - ١٠٠ میکرولیتر): محلول 5/15 میلی گرم پودر رنگ سبز در 100 میلی لیتر آب مقطر (رقت 11/1).
* برای گروه B (١٠٠ -١٠ میکرولیتر)، محلول ١۵۵ میلی­گرم پودر رنگ سبز در 100 میلی لیتر آب مقطر (رقت 101/1).
* برای گروه C (کمتر از 10 ميکروليتر) : 55/1 گرم (1550 ميلي گرم) از پودر رنگ سبز در 100 ميلی ليتر آب مقطر (رقت 1001/1)

غلظت در محلول های ذخیره به گونه ای انتخاب شده که محلول ١۵۵ میلی گرم در 100 پس از رقیق شدن به نسبت 1 به 101 و محلول 5/15 میلی گرم در 100 پس از رقیق شدن به نسبت 1 به 11، جذبی حدود 410 داشته باشند زیرا فتومترها بهترين عملکرد را در محدوده جذبی 4/0 دارند.

**ب: محلول ذخیره پارانیتروفنل:** در این روش نیز محلول ذخیره با توجه به حجم سمپلر تهیه می شود:

* گروهA : 2/4 میلی گرم در 100 میلی لیتر سود 01/0 نرمال (رقت 11/1).
* گروهB : 42 میلی گرم در 100 میلی لیتر سود 01/0 نرمال (رقت 101/1).
* گروهC : 420 ميلي گرم در 100 ميلي ليتر سود 01/0 نرمال (رقت 1001/1).

جدول 1 میزان حجم آب مقطر برای رنگ سبز خوراکی (یا سود 01/0 نرمال برای پارانیتروفنل) برحسب میلی لیتر و مقدار رنگ مورد نیاز برحسب میکرولیتر برای به دست آمدن رقت های فوق بر حسب حجم سمپلر را نشان می دهد.

مثلاً برای سمپلر 100 لاندا در یک لوله 10 میلی لیتر آب مقطر (برای رنگ سبز خوراکی) و 100 لاندا از ذخیره رنگ اضافه می کنیم و این رقت یک به 101/1 است.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| گروه سمپلر | حجم سمپلر | حجم آب مقطر (یا سود 01/0 نرمال) برحسب میلی لیتر | مقدار رنگ برحسب میکرولیتر | ضریب رقت حاصله |
| گروه C | 5 | 5 | 5 | 1001/1 |
| گروه B | 10 | 1 | 10 | 101/1 |
| 20 | 2 | 20 | 101/1 |
| 25 | 5/2 | 25 | 101/1 |
| 50 | 5 | 50 | 101/1 |
| 100 | 10 | 100 | 101/1 |
| گروه A | 200 | 2 | 200 | 11/1 |
| 500 | 5 | 500 | 11/1 |
| 1000 | 10 | 1000 | 11/1 |

## ارزيابی دقت:

بعد از تهيه محلول ذخيره رنگی مناسب، برای بررسی دقت عملکرد سمپلر (سنجش مقدار عدم دقت يا قابليت تکرار)، تعداد 10 لوله در جا لوله ای چيده و با استفاده از پي پت كلاس A مقدار مشخص آب مقطر در صورت استفاده از رنگ سبز و يا سود 01/0 نرمال در صورت استفاده از پارانيتروفنل، با دقت بسيار زياد در هر لوله ريخته مي شود.

سپس با استفاده از سمپلر مورد كنترل، طبق جدول 1 از محلول ذخيره رنگي برداشت شده و به هر لوله اضافه مي شود. پس از مخلوط كردن، ميزان جذب نوري 10 لوله در مقابل آب مقطر (بلانک) قرائت مي گردد که برای قرائت، جذب نوری رنگ سبز خوراکی 620 يا630  نانومتر و برای پارانيتروفنل 401 يا 405 نانومتر مي باشد. مقدار جذب های نوری به دست آمده به عنوان مشاهده شده (Observed) خواهد بود.

برای مثال برای سمپلر 100 لاندا برای رنگ سبز خوراکی، در 10 لوله میزان 10 میلی لیتر آب مقطر با پي پت كلاس Aو 100 لاندا از ذخیره رنگ با سمپلر 100 لاندا به هر لوله اضافه می کنیم.

اختلاف در جذب نوری لوله ها به اختلاف در حجم رنگ انتقالی توسط سمپلر نسبت داده می شود و با محاسبه ضریب انحراف (CV ٪) میزان عدم دقت یا تکرارپذیری محاسبه می شود که تا 3 درصد عدم دقت قابل قبول است.

**کنترل صحت :(Accuracy)**

در روش رنگ سنجی جهت كنترل صحت عملكرد سمپلر و تهيه معيار سنجش صحت، بايد محلولی با استفاده از ابزار شيشه ای کاليبره و دارای رقت مشابه رقت تهيه شده توسط سمپلر تهيه شود (رقت های 1001/1 يا 101/1 و يا 11 /1). به اين منظور به کمک پي پت کلاسA، مقداري از محلول رنگي ذخيره (متناسب با گروه حجمی سمپلر و طبق روش ذيل)، به بالن ژوژه کلاس A كه تا خط نشانه از آب مقطر پر شده اضافه مي شود.

### روش تهيه محلول های کنترل صحت :

كنترل صحت گروه A (رقت 11/1) :بالن ژوژه 100 ميلي ليتري برای سبز خوراكي با آب مقطر و برای پارانيتروفنل با سود 01/0 نرمال به حجم رسانده و سپس 10 ميلي ليتر از رنگ ذخيره گروه A به آن اضافه و مخلوط مي‌گردد.

كنترل صحت گروهB  (رقت 101 /1) :بالن ژوژه 100 ميلي ليتري، برای سبز خوراكي با آب مقطر و برای پارانيتروفنل با سود 01/0 نرمال به حجم رسانده و سپس 1 ميلي ليتر از رنگ ذخيره گروه B به آن اضافه و مخلوط مي‌گردد.

كنترل صحت گروهC  (رقت 1001/1): بالن ژوژه 1000 ميلي ليتري برای سبز خوراكي با آب مقطر و برای پارانيتروفنل با سود 01/0 نرمال به حجم رسانده و سپس 1 ميلي ليتر از رنگ ذخيره گروه C به آن اضافه و مخلوط مي گردد.

پس از مخلوط نمودن کامل محتويات بالن ژوژه، همه حجم را به بشر اضافه نموده و با محتويات بشر، بالن ژوژه را چند بار شستشو مي دهيم.

پس از اطمينان از يکنواختی  محلول صحت تهيه شده، محلول حداقل در سه لوله ريخته و جذب نوری آن قرائت می‌شود  .

ميانگين خوانده ها بعنوان معيار مقايسه صحت در بررسی صحت عملکرد سمپلر استفاده مي شود .

حال عدم صحت (Bias) سمپلر از فرمول زیر محاسبه می شود و حد آن نبايد از 3 درصد بيشتر باشد:

Bias = (Expected Value - Observed Value) / Expected Value x 100

Expected: ميانگين جذب نوري 3خوانده ازمحلول بالن ژوژه کلاس A

Observed : ميانگين جذب نوري 10 لوله که در مرحله عدم دقت به دست آمده است.

* به منظور به حداقل رساندن عوامل ايجاد خطا بهتر است بررسی دقت و صحت در يک روز انجام گيرد .

**روش وزن سنجی**

در کنترل کیفی سمپلر به روش توزین، ارزیابی دقت و صحت سمپلر با استفاده از یک ترازوی آزمایشگاهی کالیبره انجام می گیرد.

محدوده دمایی قابل قبول آزمایشگاه جهت کنترل کیفی به روش توزین ١۵ تا ٣٠ درجه سانتی گراد می باشد.

تعدادی نوک سمپلر نو و مناسب، مقداری آب مقطر یک بار تقطیر و یک دماسنج کالیبره آماده کرده و به همراه ترازو و سمپلری که قرار است کنترل کیفیت روی آن انجام شود را حداقل یک ساعت قبل از انجام آزمون در کنار یکدیگر قرار دهید تا دمای همگی یکسان شود.

قبل از انجام آزمون ابتدا از صحت فنی سمپلر اطمینان حاصل کرده و سپس ۵ بار با مقدار حجم نامی، نوک سمپلر را با آب مقطر آبکشی کنید. آزمون سمپلر را به ترتیب زیر انجام دهید:

1. در یک ظرف ترجیحاً درب دار مقداری کمی آب مقطر ریخته و روی صفحه ترازو قرار داده و ترازو را صفر کنید.
2. یک نوک سمپلر نو و مناسب به سمپلر متصل کرد، سمپلر را در صورتی که حجم متغیر باشد روی حجم نامی قرار داد و به اندازه حجم نامی آب مقطر کشیده و در ظرفی که روی ترازو قرار دارد تخلیه کنید.
3. جرم خوانده شده از ترازو را ثبت کنید.
4. ترازو را صفر کنید.
5. مراحل ٢ تا 3 را ٩ بار دیگر تکرار کنید تا مقادیر به دست آید.
6. دمای آب مقطر را به وسیله دماسنج به دست آورده و ثبت کنید.
7. مقدار جرم میانگین ١٠ بار توزین را با استفاده از فرمول گفته شده در فوق محاسبه کنید.

مقدار مورد انتظار با توجه به مقدار چگالی آب مقطر هر لیتر، یک کیلوگرام وزن دارد، بنابراین هر میکرولیتر آب مقطر برابر یک میلی گرم وزن خواهد داشت.

برای داده های به دست آمده، مقدار میانگین، CV و SD را محاسبه نمایید و مقدار CV به دست آمده را با مقدار مجاز مقایسه کنید.

در اینجا Observed : مقدار میانگین به دست آمده از توزین وExpected : حجم اسمی سمپلر می باشد.

**كاليبراسيون:** کالیبراسیون خارجی به صورت سالیانه توسط شرکت مورد تأیید و طبق تقویم کالیبراسیون و کنترل داخلی به انجام می گردد. در صورت نقص در عملکرد یا کنترل کیفی سمپلر قبل از کالیبر سالیانه، جهت تعمیر و کالیبراسیون به شرکت مجاز ارسال می گردد.

### تنظيم سمپلر: در صورت وجود Bias غيرقابل قبول برحسب نوع سمپلر در برخی از انواع سمپلرها (سمپلرهای ثابت) با مراجعه به راهنماي آن امکان تصحيح حجم وجود دارد. در مورد تنظيم سمپلرهای متغير بايد توجه داشت که هرگونه تغيير در حجم‌های مختلف، به ميزان ثابت اعمال مي‌شود و کلاً تنظیم کار پیچیده ای است و بنابراین عمل تنظيم کاليبراسيون بهتر است توسط شرکت معتبر انجام شود.

**(7) نگهداری:**

* **نگهداری دوره ای:** شامل شستشو و کنترل کیفی سمپلر است. شستشو سالی دو بار و قبل از انجام مراحل کنترل کیفی انجام می شود و برای تمیزکردن قسمت های داخلی است که بر اساس روش موجود در راهنمای سمپلر انجام می گیرد.
* تميز کردن بخش نگهدارنده نوك سمپلر به كمك ميله همراه يا با سوآپ آغشته به اتانل 70 درصد انجام مي گيرد. بعد آن بايد پيستون با مقدار كمي از روغن مخصوص سمپلر، روغن كاري شود.
* در صورت لزوم تمامی قسمت های خارجی را می توان با محلول آب و صابون تمیز و پس از آب کشی در دمای اتاق خشک کرد.
* برای ضدعفونی کردن سمپلر استفاده از ایزوپروپانل60% پیشنهاد می شود. برخی از سمپلرها نيز قابل اتوكلاو كردن هستند كه آنها را در اتوكلاو استريل مي نمايند.

**(8) سرویس و تعمیرات:**

در دستورالعمل اجرایی استاندارد کلی دستگاهها و تجهیزات آمده است.

**(9) ملاحظات ایمني:**

* ضربه به سمپلر مي تواند اين وسيله را از كاليبراسيون خارج نمايد.
* نبايد مايع وارد قسمت هاي داخلي سمپلر گردد، هميشه از نوك سمپلر مناسب با حجم برداشتي استفاده شود.
* تماس دست با نوك سمپلر آلوده ممنوع مي باشد.
* هرگز نبايد سمپلر حاوي محلول به پهلو به زمين گذاشته شود.
* در صورت مکش محلول های اسیدی و سایر محلول های خورنده باید بخش نگهدارنده سر سمپلر باز شده و پیستون و حلقه پلاستیکی به خوبی با آب مقطر شسته شود.
* هيچگاه در حالتي كه داخل سر سمپلر مايعي كشيده شده، سمپلر را روي ميزكار نگذاريد چون احتمال آلودگی پرسنل و محیط وجود دارد و همچنین محلول وارد شفت دستگاه شده و باعث گرفتگی و عملکرد بد می شود.
* سمپلر را به شدت و با ضربه وارد سرسمپلر نکنید زیرا اینکار باعث کج شدن شفت و یا شکستگی آن می شود.

**(10) محدوديت ها و تداخلات:**

* از سمپلرهای متغیر نمی توان برای کشیدن حجمی خارج از محدوده حجمی ادعایی آن ها استفاده شود.
* استفاده از سمپلر برای مایعات بسیار ویسکوزیته دارای محدودیت می باشد. در صورت كار با مايعات فرار نيز ممكن است خطاي حجمي پيش آيد.
* هر گونه اختلاف دمايي بين سر سمپلر و نمونه يا مايع مورد نظر مي تواند موجب خطاي حجمي گردد.
* در روش های ارزیابی سمپلر بر پایه وزن سنجی، به دلیل متفاوت بودن مقدار جاذبه زمین در ارتفاع های مختلف به دلیل اختلاف فشار هوا و هم چنین تأثیر دما بر فشار، ضریب تصحیح باید اعمال شود و این ضریب بر اساس تغییر فشار هوا و دما متغیر است.

**(11) مستندات و سوابق :**

فرم سوابق یاLog book نگهداری و تمیزکاری، وهمچنینسوابق کنترل کیفی و کالیبراسیون و سوابق عدم انطباق و اقدامات اصلاحی و سرویس دستگاه.

**(12) منابع**

1. مهری علی اصغر پور، مهناز صارمی، راهنمای نگهداشت تجهیزات آزمایشگاهی، انتشارات سازمان بهداشت جهانی، ویرایش دوم (2008).
2. A Guide to Biosafety & Biological Safety Cabinets, ESCO. World Class. Worldwide.
3. CLSI C24: Statistical Quality Control for Quantitative Measurement Procedures: Principles and Definitions.2016.
4. CLSI QMS01: A Quality Management System Model for Laboratory Services. 2019.
5. CLSI QMS14: Quality Management System: Leadership and Management Roles and Responsibilities. 2024.
6. ISO 15189:2022: Medical laboratories — Requirements for quality and competence. Edition 4, 2022.
7. ISO/IEC 17025:2017: General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Edition 3, 2017.