**17. لوپ میکروب**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **اسم آزمایشگاه:** | {{LabName}} | |
| **اسم سند:** | **دستورالعمل فنی و کنترل کیفی لوپ میکروب** | |
| **کد سند:** | D-002-0017 | |
| **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:**

تشریح روش استفاده از لوپ و شمارش کلنی ها و کنترل کیفی لوپ به منظور انجام کشت های بخش میکروب شناسی.

**(2) دامنه كاربرد:**

واحد آنالیز ادرار و میکروب شناسی.

**(3) مسئولیت ها:**

بررسی روزانه کیفیت ظاهری لوپ ها و مسئولیت کنترل کیفی بر عهده تمامی پرسنل بخش می باشد.مسئولیت نظارت بر کنترل کیفی لوپ و تأیید مستندات آن بر عهده مسئول بخش و واحد کنترل کیفی و تضمین کیفیت می باشد.

**(4) تعاریف و اصطلاحات:**

**لوپ کمّی** یک راه آسان برای انجام کشت های کمّی، نیمه کمّی یا رقیق سازی است. لوپ ها به طور معمول برای کشت های کمّی به منظور انتقال نمونه حاوی میکروب احتمالی به محیط کشت استفاده می شوند، به نحوی که بتوان کلنی های رشد یافته را شمارش کرد.

* براي شمارش کلني هاي به دست آمده از کشت نمونه هاي بالينی به ويژه ادرار و نمونه تنفسی تهاجمی از جمله نمونه BAL به منظور تشخيص بار میکروبی عفونت نیاز به لوپ هاي استاندارد با حجم معين می باشد.
* آزمايشگاه باید همواره از لوپ هاي کاليبره استفاده نمایید.
* حتی المقدور سعی گردد تا لوپ های پلاستیکی و یک بار مصرف تهیه شود. اما به علت گرانی و عدم صرفه اقتصادی اکثر آزمایشگاهها از لوپ های فلزی چند بار مصرف استفاده می کنند.
* لوپ فلزی از جنس های متفاوت ساخته می شود و معمول ترین آنها پلاتینیوم یا نیکروم است. به طور کلی لوپ باید از فلزی باشد که به سادگی شکل پذیر بوده و بر اثر سرد وگرم شدن مکرر خراب نشود. سر لوپ باید به شکل دایره پیچیده شود و در محل تماس شروع دایره و میله نباید فاصله ایجاد شود. استفاده از لوپ فلزی معمولی غیر نیکروم يا غیر پلاتینیوم مجاز نمی باشد و در بازرسی ها امتیازی به آن تعلق نمی گیرد.
* در حال حاضر لوپ های با حجم مشخص به صورت آماده نیز وجود دارد که می تواند مورد استفاده قرار گیرد.

**(5) شرح دستورالعمل:**

**روش استفاده از لوپ و شمارش کلنی ها:**

* لوپ های فلزی را، قبل از اولین و بعد از هر بار انتقال نمونه جدید سوزانده و خنک کنید.
* هنگام به کارگیری 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 1 سانتی متری) ریخته شده باشد تا برداشت نمونه با لوپ راحت و بدون زحمت باشد و کشش سطحی باعث برداشت کمتر مایع نشود.
* نمونه را با حرکات چرخشی تکان دهید، تا به صورت یکنواخت مخلوط گردد و برداشت با لوپ از هر قسمت آن معرف کل نمونه شود.
* لوپ را به صورت عمودی نگه داشته و فقط حلقه آن را تا زیر سطح مایع و فقط در جهت بالا و پایین به صورت مستقیم فرو ببرید. از تشکیل هرگونه حباب بر روی مایع خودداری و اطمینان حاصل کنید.
* 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.
* **نکته:** دقت شود در هر روش، لوپ را باید به طور عمودی وارد محلول کرد زیرا به علت کشش سطحی مایعات در صورت غیرعمود بودن حجم مایع حلقه به طور کاذب تغییر می کند.

**تعیین تعداد کلنی در هر میلی لیتر**: باید تعداد کلنی های به دست آمده از کشت روی پلیت را در عکس ضریب رقت لوپ ، ضرب کرد. به طور مثال اگر ضریب رقت لوپ مجهول 100/1 و تعداد کلنی های روی پلیت 500 عدد باشد، باید 500 را در 100 ضرب و نتیجه را به صورت CFU/ml000/50 گزارش نمود.

**(6) کنترل کیفی و کالیبراسیون :**

علاوه بر قطر دایره سر لوپ عوامل دیگری همچون جنس لوپ و قطر میله مورد استفاده در تعیین گنجایش حلقه موثر می باشند و بنابراین اندازه گیری ظرفیت حجمی لوپ (کنترل صحت آن) لازم است.

* همچنین با توجه به تغییر قطر لوپ در استفاده های بعدی، در فواصل زمانی مناسب باید نسبت به تعویض آن اقدام شود .
* خطای قابل قبول برای لوپ های کمّی، کمتر یا مساوی20% می باشد.
* لوپ هایی که تحت عنوان 01/0 و 001/0 به صورت تجاری به فروش می رسند استاندارد نبوده و هر آزمایشگاه می باید نسبت به کالیبراسیون و تعیین ضریب دقیق لوپ مصرفی اقدام کند.

**فواصل کنترل کیفی**:

* **لوپ های چند بار مصرف (فلزی):** لوپ ها را در اولین استفاده از آن و سپس ماهانه یا اگر بار کاری بالا می باشد هر دو هفته یک بار از نظر اطمینان از صحت حجم برداشت شده بررسی نمایید. می توان تمام لوپ های مورد استفاده را در همان شروع استفاده کالیبره نمود و بعد از یک ماه (یا اگر بار کاری بالاست بعد از دو هفته) سر لوپ همگی آنها را تعویض و مجدد سری جدید را کنترل کیفی و کالیبره نمود.
* **لوپ های یک بار مصرف**: حجم لوپ های یک بار مصرف را بعد از دریافت هر سری ساخت جدید بررسی کنید. از هر بسته مورد استفاده یک عدد را می توان انتخاب و کنترل کیفی نمود.
* برای بررسی حجم لوپ از روش هایی مانند رنگ سنجی و توزین استفاده می شود. ساده ترین روش برای بررسی حجم لوپ استفاده از روش رنگ سنجی از طریق اسپکتروفتومتر یا فتومتر به کمک مواد رنگی مانند متیلن بلو، کریستال ویوله و اوانس بلو می باشد.
* در این دستورالعمل روش رنگ سنجی با استفاده از اوانس بلو توضیح داده شده است .

**کنترل کیفی لوپ کالیبره به روش رنگ سنجی**

**I. مواد وتجهیزات مورد نیاز**

**1.آب مقطر نوع I یا II ، 2. تجهیزات شامل:**

* کووت های مربع شیشه ای با عبور نور 1 سانتی متر. برای همه اندازه گیری ها از کووت یکسان استفاده شود.
* ظروف شیشه ای: چند لوله آزمایش 15 میلی متری تمیز، چند پیپت 10 میلی متری کلاسA1
* اسپکتروفتومتر یا فتومتر با کیفیت خوب وکالیبره با قابلیت تحلیل در طول موج nm۶20

**3. محلول رنگ اوانس بلو: a. محلول ذخیره (**ذخیره mL100/g 75/0**):**

1) 75/0 گرم پودر اوانس بلو را به 100 میلی لیتر آب مقطر اضافه و کاملاً حل کنید.

2) محلول را با کاغذ صافی واتمن شماره 4 صاف کنید.

3) این محلول در دمای اتاق و دور از نور به مدت شش ماه پایدار می ماند. ظرف را با نام محلول، تاریخ انقضاء و تولید، برچسب گذاری کنید. سری ساخت و تاریخ انقضاء را در سوابق کاری درج نمایید.

**b. محلول های کاری**

1) 1 میلی لیتر از محلول ذخیره اوانس بلو را به 49 میلی لیتر آب مقطر اضافه نمایید. بدین ترتیب رقت1:۵0به دست می آید.

2) 4 لوله آزمایش انتخاب کرده، در لوله اول 9 میلی لیتر و در سه لوله دیگر 5 میلی لیتر آب مقطر بریزید.

3) 1 میلی لیتر از رقت1:۵0 برداشته و در لوله اول که حاوی 9 میلی لیتر آب مقطر بوده، اضافه کنید.

4) 5 میلی لیتر از لوله اول برداشته، در لوله دوم ریخته و کاملاً مخلوط نمایید. سپس 5 میلی لیتر از لوله دوم در لوله سوم، 5 میلی لیتر از لوله سوم در لوله چهارم و در انتها 5 میلی لیتر از لوله چهارم برداشته و دور بریزید. بدین ترتیب چهارمحلول با رقت نهایی 1:۵00 ،1:1000 ،1:2000 و1:4000 به دست می آید.

۵) چهار رقت فوق تا شش ماه قابل ذخیره اند، ولی اگر قرائت هر یک از آنها3%± با قرائت قبلی تفاوت داشت، رقت های جدید تهیه نمایید.

**II. روش انجام کنترل کیفی لوپ کالیبره به روش رنگ سنجی**

1. اسپکتروفتومتر یا فتومتر را در حالت جذب با طول موج nm۶20 تنظیم کنید.

2. اسپکتروفتومتریا فتومتر را با آب مقطر صفر نمایید.

3. جذب هر یک از رقتها را اندازه گیری و ثبت نمایید (1:4000،1:2000،1:1000 و1:۵00).

4. جذب نوری (محور عمودی) را برابر هر غلظتی از رقت ها (محور افقی) در برگه کاری1 ثبت نمایید. یک خط مستقیم که بیشتر از همه به هرچهار نقطه نزدیک است به منظورتهیه منحنی کالیبراسیون، رسم کنید. می توانید در برنامه اکسل این نمودار را رسم کنید.

۵. لوله دیگری انتخاب کرده،10 میلی لیتر آب مقطر در آن بریزید. به وسیله لوپ 1 میکرونی مورد آزمون ده بار از محلول ذخیره اولیه (75/0 گرم در 100 میلی لیتر) برداشته، به این لوله منتقل و کاملاً مخلوط نمایید. جذب این محلول را اندازه گیری نمایید، که باید برابر با جذب رقت1:1000 روی منحنی کالیبراسیون باشد.

۶. محلول فوق را برای سه بار آزمایش دیگر تهیه و جذب هر لوله را اندازه گیری نمایید (در کل 4 خوانده). چهار خوانده را در برگه کاری 1 ثبت و میانگین آنها را محاسبه نمایید. درصد عدم صحت را بر اساس راهنمای موجود در برگه کاری 1 به دست آورده و ثبت نمایید.

7. اگر میانگین جذب های خوانده شده بیش از20%± از جذب محلول ذخیره 1:1000 اختلاف داشته باشد، صحت لوپ مورد تأیید نیست. اقدام اصلاحی انجام دهید.

8. برای کنترل کیفی لوپ 10 میکرومتری، به وسیله لوپ مورد آزمون ده بار از محلول ذخیره اولیه برداشته، به100 میلی لیتر 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 چهارخوانده). چهار خوانده را در برگه کاری 1 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 از20%± از جذب محلول ذخیره1:1000 اختلاف داشته باشد، صحت لوپ مورد تأیید نیست و باید اقدام اصلاحی انجام دهید.

**توجه1:** 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.

**توجه2:** با توجه به خطای بالا در استفاده و یا کنترل کیفیت لوپ های 1 میکرومتری مراحل کار باید با دقت بسیار زیاد انجام شود.

**توجه3:** در هنگام استفاده و یا کنترل کیفیت لوپ های کالیبره از پر بودن لوپ و نبودن حباب در آن اطمینان حاصل نمایید.

**برای کنترل کیفیت لوپ μL10، می توانید از محلول ذخیره mL100/g 2/0 به روش زیر استفاده نمایید:**

1. میزان 20 میلی گرم از پودر اوانس بلو را به 10 میلی لیتر آب مقطر اضافه و کاملاً حل کنید. محلول را با کاغذ صافی واتمن شماره 4 صاف کنید. غلظت این محلول ذخیره، mL100/g 2/0 می باشد.

2. تعداد 4 لوله آزمایش انتخاب کرده، در لوله اول 2 میلی لیتر و در سه لوله دیگر 1 میلی لیتر آب مقطر بریزید. مقدار μl20 از محلول

ذخیره اولیه (mL100/g 2/0) برداشته، در لوله اول ریخته و کاملاً مخلوط نمایید. سپس 1 میلی لیتر از لوله اول برداشته و در لوله دوم بریزید. 1 میلی لیتر از لوله دوم برداشته و در لوله سوم و1 میلی لیتر از لوله سوم برداشته و در لوله چهارم ریخته و در انتها 1 میلی لیتر از لوله چهارم برداشته و دور بریزید. بدین ترتیب چهار محلول با رقت نهایی1:400،1:200،1:100و1:800 به دست می آید.

3. جذب نوری هر یک از رقتها را به وسیله فتومتر یا اسپکتروفتومتر با طول موج nm۶20 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.

۵. سپس10 لوله آزمایش دیگر انتخاب کرده و در هر یک 1 میلی لیتر آب مقطر بریزید.

۶. لوپ μl10 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 دیگرتکرارکنید 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 به دست آورده و ثبت نمایید.

8. میانگین جذب های نوری به دست آمده از لوپ μl10 مورد آزمون باید برابر با جذب رقت1:100روی منحنی کالیبراسیون باشد. اگر میانگین جذب های خوانده شده بیش از20%± ازجذب محلول ذخیره1:100 اختلاف داشته باشد، صحت لوپ مورد تأیید نیست و اقدام اصلاحی باید انجام شود.

برگه کاری1: کنترل کیفیت لوپ کالیبره (μl1 و μl10) به روش رنگ سنجی با استفاده از محلول ذخیره mg 75/0 در 100 میلی لیتر.

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

|  |  |
| --- | --- |
| شماره نمونه | جذب |
| 1 |  |
| 2 |  |
| 3 |  |
| 4 |  |
| مجموع 4 خوانده |  |
| میانگین |  |

|  |
| --- |
| میانگین منهای جذب 1:1000 = (a) |
| (a) تقسیم بر جذب 1:1000 = (b) |
| (b) ضرب در100 = درصد عدم صحت (c) |
| مقدار(c) باید20%± باشد: قابل قبول؟ (بله/خیر) |
| اقدام اصلاحی در صورت غیرقابل قبول : |

**منحنی کالیبراسیون**

**جذب**

**رقت**

**غلظت 500/1 غلظت 1000/1 غلظت 2000/1 غلظت 4000/1**

برگه کاری2: کنترل کیفیت لوپ کالیبره μl10 به روش رنگ سنجی با استفاده از محلول ذخیره mg 2/0 در 100 میلی لیتر.

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

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| شماره نمونه | جذب | شماره نمونه | جذب |
| 1 |  | 6 |  |
| 2 |  | 7 |  |
| 3 |  | 8 |  |
| 4 |  | 9 |  |
| 5 |  | 10 |  |
| مجموع 10 خوانده | | | |
| میانگین | | | |

|  |
| --- |
| میانگین منهای جذب 1:100 = (a) |
| (a) تقسیم بر جذب 1:100 = (b) |
| (b) ضرب در100 = درصد عدم صحت (c) |
| مقدار(c) باید20%± باشد: قابل قبول؟ (بله/خیر) |
| اقدام اصلاحی در صورت غیرقابل قبول : |

**منحنی کالیبراسیون**

**جذب**

**رقت**

**غلظت 100/1 غلظت 200/1 غلظت 400/1 غلظت 800/1**

**کنترل کیفی لوپ کالیبره به روش توزین**

روش های دیگری نیز برای بررسی میزان حجم برداشتی توسط لوپ باکتریولوژی وجود دارد که از بین آنها می توان به روش توزینی اشاره کرد که در آن با استفاده از ترازوی بسیار حساس تغییرات وزن دیسک کاغذی بعد از افزودن یک لوپ آب مقطر روی آن محاسبه می گردد.

**روش توزین**: در این روش ترازوی حساس با دقت 001/0گرم مورد نیاز است و از آنجا که وزن و حجم آب مقطر خالص مساوی هستند می توان به کمک لوپ از آب مقطر برداشت کرد و بر روی یک دیسک آنتی بیوگرام قرار داد و با توزین توسط ترازو مقدار حجم برداشتی را محاسبه کرد. در این روش ابتدا دیسک آنتی بیوگرام توزین می شود، سپس مقدار افزایش وزن بر اثر برداشت آب مقطر توسط لوپ محاسبه می گردد. اگر این عمل را 15-10 بار تکرار کرده و میانگین افزایش وزن را ثبت کنیم حجم برداشتی توسط لوپ به دست خواهد آمد.

**کالیبراسیون :**در صورتی که نتایج کنترل کیفی قابل قبول نبود، باید لوپ تعویض شود و مجدداً بر روی لوپ جدید، کنترل صورت پذیرد.

**(7) نگهداری:**

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.

**(8) سرویس و تعمیرات:**

به محض مشاهده سوختگی، شکاف یا تغییر قطر سیم لوپ باید آن را تعویض کرد.

**(9) ملاحظات ایمنی:**

* در موقع سترون کردن لوپ باید از قرار دادن سریع آن بر روی شعله به علت ایجاد ذرات آئروسل خودداری نمود.
* بهتر است ابتدا لوپ به قسمت قاعده شعله (که پایین ترین درجه حرارت شعله را داراست) وارد شده و تدریجاً به نوک شعله انتقال یابد .
* همچنین از داخل کردن لوپ داغ به داخل سوسپانسیون میکروبی نیز باید اجتناب نمود.

**(10) محدودیت ها و تداخلات:**

* حجم مایع برداشت شده با لوپ کالیبره به حجم و شکل ظرف نگهداری نمونه مایع، جهت و عمق فرو بردن لوپ وابسته است. این تغییرپذیری ناشی از کشش سطحی و سطح مرطوب لوپ می باشد.
* مایعات در ظروف با قطر کوچک (قطر کمتر از 1 سانتی متری) کشش سطحی بالایی دارند،که موجب برداشت کمتر مایع می شود. 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. بنابراین باید سعی شود فقط قسمت حلقه لوپ به طور کامل وارد مایع شود.
* برای کالیبراسیون لوپ به علت مجهز نبودن اکثر آزمایشگاه ها به ترازوی حساس روش اسپکتروفتومتری پیشنهاد می شود.
* اگر در نمونه مایع یا حجم برداشته شده با لوپ حباب وجود داشته باشد، حجم لوپ به شدت دارای خطا خواهد بود. برای اجتناب از ایجاد حباب، از تکان دادن مایع خودداری کنید و 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 یکبار مصرف) یا دوباره فرو بردن در مایع (برای هر دو نوع لوپ) از بین ببرید.

**(11) مستندات و سوابق:**

فرم سوابق یاLog book و تعویضوهمچنینسوابق کنترل کیفی و کالیبراسیون.

**(12) منابع**

1. مهری علی اصغر پور، مهناز صارمی، راهنمای نگهداشت تجهیزات آزمایشگاهی، انتشارات سازمان بهداشت جهانی، ویرایش دوم (2008).
2. دستورالعمل استفاده و کنترل کیفیت لوپ های کالیبره میکروب شناسی. آزمایشگاه مرجع سلامت وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی سال 1397.
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.