**2. معرف ها و محلول ها**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **اسم آزمایشگاه:** | {{LabName}} | |
| **اسم سند:** | **دستورالعمل ساخت و کنترل کیفی معرف ها و محلول ها** | |
| **کد سند:** | D-003-0002 | |
| **دسته بندی سند:** | دستورالعمل و کنترل کیفی مواد و تست های تشخیصی | |
| **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:**

تشريح روند ساخت و کنترل کیفی معرف ها و محلول های مورد نیاز برای انجام تست های شناسایی باکتری ها در بخش میکروب شناسی.

**(2) دامنه كاربرد:**

واحد میکروب شناسی.

**(3) مسئولیت ها:**

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

**(4) تعاریف و اصطلاحات:**

**معرف‌ها** در میکروب شناسی، ترکیباتی هستند که برای تشخیص و شناسایی میکروارگانیسم‌ها، یا برای انجام تست‌های بیوشیمیایی استفاده می‌شوند و نقش مهمی در شناسایی، تشخیص و مطالعه میکروارگانیسم‌ها دارند. معرف‌ها شامل دو دسته اصلی هستند:

**الف) معرف‌های بیوشیمیایی:** این معرف‌ها برای انجام و تفسیر آزمایش‌های بیوشیمیایی استفاده می‌شوند.

**ب) معرف‌های رنگی:** این معرف‌ها برای رنگ‌آمیزی میکروارگانیسم‌ها به منظور تشخیص و شناسایی آنها استفاده می‌شوند. به عنوان مثال، معرف کلرورفریک برای رنگ‌آمیزی محیط‌های کشت خاص استفاده می‌شود.

استفاده از معرف‌ها در آزمایش‌های میکروب شناسی شامل سه مرحله می باشد:

* 1. **آماده سازی معرف:** معرف‌ها معمولاً در فرم آماده تجاری موجود هستند، اما گاهی ممکن است نیاز به آماده‌سازی داشته باشد.
  2. **اضافه کردن معرف به محیط کشت:** معرف‌ها معمولاً به محیط کشت یا نمونه اضافه می‌شوند تا یک واکنش شیمیایی انجام شود که نشان‌دهنده حضور یا عدم حضور یک ویژگی خاص در میکروارگانیسم است.
  3. **مشاهده و تفسیر نتایج:** پس از اضافه کردن معرف، نتایج واکنش بررسی می‌شوند و با توجه به تغییرات رنگی یا سایر علائم، تشخیص میکروارگانیسم انجام می‌شود.

**(5) شرح دستورالعمل:**

* در اغلب آزمایشگاهها از کیت های آماده به مصرف شرکتی معرف ها و محلول ها استفاده می گردد ولی در صورت عدم وجود طبق دستورهای آمده در جلوتر ساخته می شوند.
* معرف ها و محلول ها باید از نظر محتویات، غلظت، شرایط ذخیره سازی، تاریخ آماده سازی (یا دریافت)، تاریخ قرارگیری در سرویس (تاریخ باز شدن)، تاریخ انقضاء، منبع (سازنده تجاری یا کاربر آماده شده) و شماره سری ساخت برچسب گذاری شوند.
* تمام معرف ها و محلول ها باید طبق توصیه های سازنده نگهداری شوند و قبل از استفاده با کنترل های مثبت و منفی آزمایش شوند.
* معرف ها و محلول هایی که حتی پس از آزمایش مجدد با ارگانیسم های تازه، QC را از دست می دهند، باید فوراً دور ریخته شوند.
* نمونه های بیمار نباید با استفاده از شماره سری ساخت مورد نظر آزمایش شوند تا زمانی که مشکل حل نشده باشد. در صورت تکرار شکست، باید از روش جایگزین استفاده شود، یا نمونه بیمار باید به آزمایشگاه مرجع ارسال شود.
* معرف ها در ظروف تیره و در یخچال نگهداری می شوند.
* معرف ها چون دارای پایداری متغیر هستند لازم است به طور هفتگی بر حسب میزان کار کنترل کیفی گردند.

**لیست معرف ها و محلول ها:**

معرف ارلیخ (ارلیش) و معرف کواکس**،** متیل رد (MR)، ﻣﻌﺮف VP، محلول KOH 10 درصد، الکل اتانول 70%، سرم فیزیولوژی، معرف کلرور فریک، آب اکسیژنه (H2O2)، معرف های احیاء نیترات، معرف نین هیدرین

**طرز تهیه معرف ارلیخ (ارلیش) و معرف کواکس:**

* **معرف ارلیخ:** برای تست ارلیخ و معرف کواکس برای تست ایندول به کار می روند.
* دی متیل آمینو بنزالدهید (2 گرم)، الکل اتیلیک (اتانول) 96 درصد (190 میلی لیتر)، اسید کلریدریک غلیظ (40 میلی لیتر).
* برای ساخت **معرف کواکس** به جای الکل اتیلیک از آمیل الکل یا ایزوآمیل استفاده می شود. دي ﻣﺘﯿﻞ آﻣﯿﻨﻮ ﺑﻨﺰآﻟﺪﺋﯿﺪ را ﺑﻪآﻣﯿﻞ الکل اﺿﺎﻓﻪ ﻧﻤﻮده و ﺑﻪ آرامی اﺳﯿﺪ کلریدریک را ﺑـﻪ آﻧﻬـﺎ اﺿـﺎﻓﻪ ﻧﻤﺎﯾﯿﺪ. ﺑﺮاي ﺗﻬﯿﻪ اﯾﻦ ﻣﻌﺮف از ﻫﻮد اﺳﺘﻔﺎده ﻧﻤﺎﯾﯿﺪ.
* ﻣﻌﺮف در ﻇﺮوف ﺗﯿﺮه و در ﯾﺨچال نگه داری ﻣـیﺷﻮد. چون داراي پاﯾﺪاري ﻣﺘﻐﯿﺮ اﺳﺖ، ﻻزم اﺳﺖ ﺑﻪ ﻃﻮر هفتگی (بر حسب حجم کار) کنترل کیفی شوند.

**طرز تهیه متیل رد (MR):**

متیل رد (01/0 گرم)،اتانول 96 درصد (30 میلی لیتر)، 50 میلی لیتر آب دیونیزه.

پودر ﻣﺘﯿﻞرد را در اﺗﺎﻧﻮل ﺣﻞ کرده سپس ﺑﺎ آب ﻣﻘﻄﺮ ﺣﺠﻢ آﻧﺮا ﺑﻪ 50 میلی لیتر ﺑﺮﺳﺎﻧﯿﺪ. ﻣﻌﺮف در ﻇـﺮف ﺗﯿﺮه و در یخچال نگه داری می شود. چون داراي پاﯾﺪاري ﻣﺘﻐﯿـﺮ اﺳـﺖ، ﻻزم اﺳـﺖ ﺑﻪﻃﻮر هفتگی (بر حسب حجم کار) کنترل کیفی شود.

**روش ﺗﻬﯿﻪ ﻣﻌﺮف VP**

**-ﺗﻬﯿﻪآﻟﻔﺎ ﻧﻔﺘﻮل (ﻣﻌﺮفA):**پودرآﻟﻔﺎ ﻧﻔﺘﻮل: 5 گرم و اﺗﺎﻧﻮل 100 میلی لیتر

**- ﺗﻬﯿﻪKOH (پتاس) (ﻣﻌﺮفB):** KOH 40 گرم، کراتین 3/0 گرم، آب مقطر 100 میلی لیتر

ﻣﻌﺮفﻫﺎ باید در ﻇﺮوفﺗﯿﺮه و در ﯾخچال نگه­داری شوند. چون داراي پایداری ﻣﺘﻐﯿﺮ ﻫﺴﺘﻨﺪ ﻻزم اﺳـﺖ ﺑﻪ ﻃﻮر هفتگی (بر حسب حجم کار) کنترل کیفی شوند.

**طرز تهیه محلولKOH 10 درصد**

10 گرم KOH را در مقداری آب مقطر حل کرده و حجم را به 1000 میلی لیتر برسانید (در بالن ژوژه یک لیتری)

**تهیه KOH 1 درصد:** 1 میلی لیتر KOH 10 درصد را با 9 میلی لیتر آب مقطر رقیق کنید آن را در قطره چکان بریزید و دور آن را فویل بپوشانید (در صورتی که شیشه قهوه ای بود به فویل نیازی نیست).

**تهیه** **الکل اتانول70% از الکل غلیظ تر**

در صورت استفاده از الکل اتانول 96%: 600 میلی لیتر (یک شیشه الکل) را با 222 میلی لیتر آب مقطر رقیق کنید.

در صورت استفاده از الکل اتانول 90%: 600 میلی لیتر (یک شیشه الکل) را با 171 میلی لیتر آب مقطر رقیق کنید.

**طرز تهیه** **سرم فیزیولوژی:**

9 گرم NaCl را در یک بالن ژوژه یک لیتری بریزید. با کمی آب آن را حل کنید و سپس به حجم یک لیتر برسانید.

**روش تهیه** **معرف کلرور فریک:**

**روش غیر اسیدی:** 10 گرم کلرور فریک در 100 میلی لیتر آب مقطر حل می شود.  
**روش اسیدی:** روش دیگر تهیه این معرف شامل 12 گرم کلرور فریک، اسید کلریدریک غلیظ 5/2 میلی لیتر و آب مقطر ۱۰۰ میلی لیتر می باشد. معرف در ظروف تیره و در یخچال نگهداری می شود چون دارای پایداری متغیر است و لازم است به طور هفتگی (بر حسب میزان کار) کنترل کیفی گردد.

**روش تهیه آب اکسیژنه 3 درصد:**محلول آب اکسیژنه ۳۰ درصد را به نسبت 10:1 با آب مقطر رقیق نمایید، یعنی 1 میلی لیتر آب اکسیژنه ۳۰ را به 9 میلی لیتر آب مقطر اضافه نمایید. محلول در ظرف تیره و در یخچال نگهداری می شود.

**روش تهیه** **معرف های احیاء نیترات:**

**تهیه معرفA:** ماده N- N-دی متیل آلفا نفتيل آمين به میزان 6 گرم در 1000 میلی لیتر اسید استیک گلاسیال 5 نرمال 30 درصد حل کرده و کمی حرارت ملایم دهید تا حل شود، حجم را به یک لیتر رسانیده و محلول را از صافی رد کنید.  
**تهیه معرفB :** مقدار 8 گرم سولفانیلیک اسید آمینو بنزن سولفونیک اسید در 1000 میلی لیتر اسید استیک گلاسیال 5 نرمال 30 درصد حل کرده و سپس حجم را به یک لیتر برسانید. معرفها در ظروف تیره و در یخچال نگهداری می شوند.

**روش تهیه** **معرف نین هیدرین:**پودر نین هیدرین 5/3 گرم، استن 50 میلی لیتر، بوتانول 50 میلی لیتر. استن و بوتانل را مخلوط کرده و سپس پودر نین هیدرین را اضافه نمایید. معرف در ظرف تیره و در دمای اتاق نگهداری می شود و درب آن باید کاملاً محکم بسته شود.

**(6) کنترل کیفی معرف ها**

* هر زمان محلول با معرف جدیدی تهیه می شود کنترل محلول و معرف ها باید انجام شوند.
* در موارد زیر باید معرف دور ریخته شود:

1-تاریخ انقضاء آن تمام شده است.

2-علائم خرابی (تغییر رنگ، رسوب یا کدورت) در آن ظاهر شده است.

* در پایان فصل کنترل کیفی رنگ ها و معرف ها آمده است.

**(7) محدودیت ها و تداخلات:**

ساخت معرف ها در آزمایشگاه وقت گیر بوده و دارای خطرات ایمنی است به توصیه می شود از معرف های تجاری آماده استفاده گردد.

**(8) ملاحظات ایمنی:**

* محلول آب اکسیژنه، اسیدها و بازها سوزاننده هستند و باید با دستکش و ماسک با آن کار شود و از تماس با بدن جلوگیری شود.
* اسیدها و بازها باید به آب به آرامی اضافه شوند چون اضافه کردن آب به آنها احتمال پاشیدن بالایی دارد.
* آلفا نفتيل آمین موجود در معرف های احیاء نیترات سرطان زا است.

**(9) مستندات و سوابق:**

فرم سوابق یاLog book ساخت معرف هاوهمچنینسوابق کنترل کیفی، عدم انطباق ها و اقدامات اصلاحی.

**(10) منابع:**

1. کتاب آزمایشگاه باکتری شناسی پزشکی. جلد اول: تشخیص. دکتر داریوش شکری و همکاران. انتشارات تیمورزاده نوین و کیا. 1402.
2. کتاب آزمایشگاه باکتری شناسی پزشکی. جلد دوم: تفسیر کشت. دکتر داریوش شکری و همکاران. انتشارات تیمورزاده نوین و کیا. 1402.
3. Isenberg D. Henry: *Clinical Microbiology Procedures Handbook*، American Society for Microbiology. 2007.
4. Koneman، Elmer W، et al. Color Atlas and Text book of Diagnostic Microbiology. *Philedelphia: Lippincott-Raven Publishers. Seventh edition.* 2021.
5. Tille، Patricia. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology-e-book*. Elsevier Health Sciences، fifteenth edition. 2021.