اولین قدم برای استفاده صحیح از تجهیزات آزمایشگاهی، مطالعه کامل کاتالوگها و عمل به دستورالعملهای نگهداری و کنترل کیفیت مندرج در آن می‌باشد. مطالبی که در ذیل آمده است ، جنبه عام داشته و جایگزین دستورالعمل سازنده نمی‌باشد.

میکرو پیپت / سمپلر

چگونگی کاربری

پس از محکم کردن نوک سمپلر مناسب به سمپلر ، ابتدا دکمه کنترل / فشار (Control button/Push button) سمپلر را به آرامی تا توقف اول دکمه، پائین می آوریم ، در همان حال نوک سمپلر را چند میلیمتر(حدود ۳ میلی متر وبسته به حجم سمپلر) در مایع فرو برده و دکمه فشار را به آرامی رها می‌کنیم تا مایع وارد نوک سمپلر شود، برای تخلیه در لوله یا ظرف مورد نظر ، با فشار مجدد دکمه تا توقف اول، محلول را با تماس به جداره ظرف به آرامی خارج کرده و پس از ۳-۱ ثانیه با فشار تا توقف دوم ، باقیمانده محلول را نیز کاملاً خارج می‌نمائیم.

جهت رسیدن به حداکثر دقت و صحت برای سمپلرهای با حجم ۱۰ میکرولیتر و بیشتر ، توصیه می شود قبل از انتقال حجم نمونه ، ۲ الی۳ بار عمل برداشت و تخلیه از نمونه تکرار شده تا کاملا جدار داخلی نوک سمپلر به نمونه آغشته شود و سپس حجم مورد نظر از نمونه منتقل شود.

برای حجم های کمتر از ۱۰ میکرولیتر بهتر است، فقط یکبار برداشت با نوک سمپلر Unwetted Tip که خشک و بدون آغشتگی به نمونه باشد، انجام شده و پس از تخلیه در محل مورد نظر، جهت اطمینان از تخلیه کامل تمامی حجم درون نوک سمپلر، با محلول موجود در ظرف شسته شود.

باید در نظر داشت، عملکرد مطلوب سمپلر فقط با استفاده از سر سمپلر های نو و یکبار مصرف بدست می آید و از شستشو و استفاده مجدد از سر سمپلرها، می‌بایست خودداری نمود.

نکات مهمی که در کار با سمپلر می‌بایست رعایت شود، عبارتند از :

۱- اطمینان از اتصال کامل نوک سمپلر به سمپلر

۲- عمود نگهداشتن سمپلر در زمان مکش

۳- تخلیه محلول با تماس نوک سمپلر به جداره ظرف تحت زاویه ۱۰ تا ۴۰ درجه

۴- رها کردن آرام دکمه در زمان پر یا خالی کردن محتویات نوک سمپلر

۵- کشیدن کناره های خارجی نوک سمپلر پس از انجام مکش به جداره های فوقانی لوله به منظور حذف قطرات خارجی نوک سمپلر یا در صورت نیازخشک کردن قطرات باقی مانده در بخش خارجی آن به کمک پارچه ای بدون پرز(البته باید مطمئن شد که پارچه چیزی از محتویات داخل نوک سمپلر را به خود جذب نکند)

۶- هنگام تخلیه محلول پس از توقف اول (پائین آوردن دکمه کنترل تا مرحله اول) باید کمی تامل کرد (۳-۱ ثانیه) و سپس دکمه را تا توقف دوم پائین آورد.

۷- درسمپلرهای متغیر (قابل تنظیم برای حجم های مختلف) توصیه می شود برای کاهش حجم و تنظیم حجم مورد نظر ، دکمه کنترل به آرامی تارسیدن به حجم انتخابی، چرخانده شود .

برای افزایش حجم بهتر است دکمه کنترل را تا کمی بیش از حجم مورد نظر پیچاند و بعد در خلاف جهت با کم کردن حجم به مقدار مورد نظر رسید.

کنترل کیفیت سمپلر (میکروپیپت)

اطمینان از کالیبراسیون صحیح میکرو پیپتها که ازطریق بررسی دقت و صحت عملکرد میکرو پیپت در برداشت حجم مورد انتظار حاصل میشود ، نقش مهمی در برنامه های تضمین کیفیت ایفامیکند. اگرچه این ارزیابی به دو روش توزین و رنگ سنجی قابل انجام است، ولی تحت شرایط

موجود و به علت عدم دسترسی اغلب آزمایشگاهها به الزامات استفاده از روش توزین مانند ترازوهایی با درجه تفکیک (Resolution) مناسب برای کنترل سمپلر (درجه تفکیک ۰/۰۱ میلی گرم) و کالیبراسیون منظم ترازو ، استفاده از روش رنگ سنجی، توصیه می‌گردد.

بررسی دقت و صحت سمپلر بهتراست ۳ تا ۴ بار در سال انجام شود.

ارزیابی سمپلر (میکروپیپت) به روش رنگ سنجی

در این روش با استفاده از یک محلول رنگی با جذب پایدار، مثل رنگ سبز خوراکی در طول موج ۶۳۰-۶۲۰ نانومتر و یا پارانیتروفنل در طول موجهای ۴۰۱ یا ۴۰۵ نانومتر ، صحت عملکرد سمپلر ونیز قابلیت تکرار آن کنترل می شود.

مواد و ابزار مورد نیاز :

۱- ماده رنگی :

- رنگ سبز خوراکی

یا

- پارانیترو فنل

Paranitrohenol (C6H5NO3), indicator PH (5.4-7.5) MERCK Art. 6798

(جذب نوری بدست آمده از پودر پارانیتروفنل (اندیکاتور) استفاده شده در این دستورالعمل با مقادیر قید شده برای Paranitrophenol High purity- NIST SRM 938 مندرج در کتاب Tietz 1999 قابل انطباق است.)

۲ - هیدروکسید سدیم ۰ / ۰۱ نرمال ،محلول کاری برای رقت سازی پارانیترو فنل .

Sodium hydroxide (NaOH) , Pure … MERCK Art. 6462.

۳- لوازم شیشه ای کلاس A با توجه به حجم مورد نیاز در تهیه غلظت محلول رنگی(از قبیل بالن ژوژه و پیپت)

۴- فتومتر دارای طول موجهای ۴۰۱یا ۴۰۵ برای پارانیترو فنل و ۶۲۰یا ۶۳۰ نانومتر برای رنگ سبز خوراکی

۵- لوله آزمایش

۶- ترازو (کالیبره و تحت کنترل)

۷- نوک سمپلر مناسب

۸- آب مقطر

نکته: طول موج انتخابی برای قرائت محلول پارانیتروفنل ۴۰۱ نانومتر است ولی امکان قرائت در ۴۰۵ نانومتر نیز وجود دارد.

روش کار

همانطور که گفته شد انجام روش رنگ سنجی با استفاده از پودررنگ سبز خوراکی و نیز پارانیتروفنل امکانپذیر میباشد، لذا نحوه تهیه هردومحلول ذخیره (stock) ذیلا بیان شده است . قابل ذکر است درسالهای اخیر رنگ سبز خوراکی بعضا بصورت ناهمگون ویا محلول عرضه شده که در این موارد، دستورالعمل زیر کاربرد نداشته و بهتر است از پارانیترو فنل استفاده شود.

بطور معمول سمپلرها به سه گروه تقسیم می شوند:

الف) ۱۰۰۰-۱۰۰ میکرولیتر

ب) ۱۰۰-۱۰ میکرولیتر

پ) حجمهای کمتر از ۱۰ میکرولیتر

برای هریک از گروههای فوق می‌بایست یک محلول ذخیره از" رنگ "تهیه نمود . از آنجایی که اغلب فتومترها بهترین عملکرد خود را در محدوده جذبی ۴ /۰ نشان میدهند محلول های ذخیره رنگی با غلظتی تهیه میشوند که پس از مرحله رقیق شدن دارای جذبی در حدود ۰/۴ باشند.

۱- طرز تهیه محلول رنگی ذخیره رنگ سبز خوراکی برای هرگروه ازسمپلرها :

سمپلرهای گروه الف (۱۰۰۰-۱۰۰ میکرولیتر): ۱۵/۵ میلی گرم پودر رنگ سبزدر ۱۰۰ میلی لیترآب مقطر حل شود. (غلظت رنگ در محلول ذخیره این گروه، ۱۵/۵میلی گرم درصد است)

سمپلرهای گروه ب (۱۰۰-۱۰ میکرولیتر): ۱۵۵ میلی گرم پودر رنگ سبز در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شود.(غلظت رنگ در محلول ذخیره این گروه، ۱۵۵میلی گرم درصد است)

سمپلرهای گروه پ (سمپلرهای کمتر از ۱۰ میکرولیتر) : ۱/۵۵ گرم از پودر رنگ سبز در ۱۰۰ میلی لیتر آب حل شود. (غلظت رنگ در محلول ذخیره این گروه ۱/۵۵ گرم درصد یا۱۵۵۰میلیگرم درصد است)

۲ - طرز تهیه محلول رنگی ذخیره پارانیتروفنل برای هر گروه از سمپلرها :

سمپلرهای گروه الف (۱۰۰۰-۱۰۰ میکرولیتر): ۴۲ میلی گرم پودر پارانیتروفنل، در یک لیتر آب مقطر، حل می‌شود. (غلظت رنگ در محلول ذخیره این گروه، ۴۲میلی گرم درلیتر است)

سمپلرهای گروه ب (۱۰۰-۱۰ میکرولیتر): ۴۲ میلی گرم پودر پارانیتروفنل، در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر، حل می‌شود. (غلظت رنگ در محلول ذخیره این گروه، ۴۲میلی گرم درصد است)

سمپلرهای گروه پ (سمپلرهای کمتر از ۱۰ میکرولیتر) : ۴۲۰میلی گرم پودر پارانیتروفنل ، در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر، حل می‌شود. .(غلظت رنگ ذخیره این گروه، ۴۲۰میلی گرم درصد است)

ارزیابی دقت

برای بررسی دقت عملکرد سمپلر وبعبارتی سنجش مقدار عدم دقت یا قابلیت تکرار، ابتدا محلول ذخیره رنگی مناسب طبق روش ذکرشده و باتوجه به حجم سمپلر مورد کنترل، تهیه می گردد سپس ده لوله در جالوله ای چیده و با استفاده از پی پت کلاس A و بر مبنای جدول (۱-۱) مقدار مشخص آب مقطر(در صورت استفاده از رنگ سبز) ویا سود ۰/۰۱ نرمال (در صورت استفاده از پارانیتروفنل)، با دقت بسیار زیاد در هر لوله ریخته می شود. سپس با استفاده از سمپلر مورد کنترل، از محلول ذخیره رنگی برداشت شده و به هر لوله اضافه می شود . پس از مخلوط کردن، میزان جذب نوری لوله ها در مقابل بلانک مناسب(آب مقطربرای سبز خوراکی وسود برای پارانیتروفنل) قرائت می‌گردد .همانگونه که قبلا ذکر شد طول موج انتخابی برای قرائت جذب نوری رنگ سبز خوراکی ۶۲۰ یا۶۳۰ نانومتر وبرای پارانیتروفنل ۴۰۱ یا۴۰۵ نانومتر میباشد.

توجه : در صورت استفاده از محلول ذخیره پارانیترو فنل ، رقتهای مورد نیاز طبق جدول ۱ میباید در سود ۰/۰۱ نرمال تهیه شود . در حالیکه برای رنگ سبز خوراکی از آب مقطر استفاده می‌شود.

جدول (۱-۱)

گروه سمپلر	حجم سمپلر مورد کنترل برحسب میکرولیتر	آب مقطر یاسود ۰/۰۱ نرمال برداشتی توسط پی پت برحسب میلی لیتر	حجم رنگ برداشتی از محلول ذخیره توسط سمپلر برحسب میکرولیتر	رقت حاصله
گروه پ	۵	۵	۵	۱/۱۰۰۱
گروه ب	۱۰	۱	۱۰	۱/۱۰۱
گروه ب	۲۰	۲	۲۰	۱/۱۰۱
گروه ب	۲۵	۲/۵	۲۵	۱/۱۰۱
گروه ب	۵۰	۵	۵۰	۱/۱۰۱
گروه ب	۱۰۰	۱۰	۱۰۰	۱/۱۰۱
گروه الف	۲۰۰	۲	۲۰۰	۱/۱۱
گروه الف	۵۰۰	۵	۵۰۰	۱/۱۱
گروه الف	۱۰۰۰	۱۰	۱۰۰۰	۱/۱۱

سپس میانگین و انحراف معیارخوانده های جذب نوری(OD) ۱۰لوله ، محاسبه و ضریب انحراف خوانده‌ها (CV%) بدست می‌آید.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (xi - mean)^2}{n-1}}$$

$$mean = \frac{\sum x_i}{n}$$

$$CV\% = \frac{SD * 100}{mean}$$

CV : ضریب انحراف (Coefficient of variation)

SD : انحراف معیار

$mean$: میانگین جذب نوری لوله‌ها

n : تعداد خوانده‌ها

x_i : جذب نوری هر لوله

در صورت انتقال صحیح حجم آب ویا سود ، اختلاف در جذب نوری لوله هـای حـاوی محلـول رنگی به اختلاف در حجم برداشت شده توسط سمپلر، نـسبت داده شـده و درصـد ضـریب انحـراف خوانده‌ها (CV%) معرف قابلیت تکرارپذیری و مقدار عدم دقت سمپلر خواهد بود.

ارزیابی صحت

جهت کنترل صحت عملکرد سمپلر و تهیه معیار سنجش صحت در روش رنگ سنجی ، باید با استفاده از ابزار شیشه ای کالیبره، محلولی دارای رقت مشابه با رقت تهیه شده توسط سمپلر تهیه شود. (۱/۱۰۰۱) یا (۱/۱۰۱) و یا (۱۱ /۱)

بدین منظور با پی پت کلاس A، مقـداری از محلـول رنگـی ذخیـره (متناسـب بـا گـروه حجمی سمپلرو طبق روش ذیل)، به بالن ژوژه کلاس A ای که تا خط نشانه از آب مقطر پر شده اضافه میشود .

روش تهیه محلولهای کنترل صحت :

کنترل صحت گروه پ (سمپلرهای کمتر از ۱۰ میکرولیتر) رقت ۱/۱۰۰۱:

بالن ژوژه یک لیتری را برای سبز خوراکی با آب مقطر و برای پارانیتروفنـل بـا سـود ۰/۰۱ نرمال به حجم رسانده سپس با پی پت کلاس A ، ۱ میلی لیتر از رنگ ذخیره (گـروه پ) بـه آن اضافه و مخلوط نمائید.

کنترل صحت گروه ب (سمپلرهای ۱۰۰- ۱۰) رقت ۱/۱۰۱ :

بالن ژوژه ۱۰۰ میلی لیتری را برای سبز خوراکی با آب مقطر و برای پارانیتروفنل بـا سـود ۰/۰۱ نرمال به حجم رسانده سپس با پی پت کلاسA ، ۱میلی لیتر از رنگ ذخیره (گروه ب) به آن اضافه و مخلوط نمائید .

کنترل صحت گروه الف (سمپلرهای ۱۰۰۰-۱۰۰) رقت ۱/۱۱ :

بالن ژوژه ۱۰۰ میلی لیتری را برای سبز خوراکی با آب مقطر و برای پارانیتروفنل بـا سـود ۰/۰۱ نرمال به حجم رسانده سپس با پی پت کلاس A ، ۱۰میلی لیتر از رنگ ذخیره (گروه الف) به آن اضافه و مخلوط نمائید.

پس از اطمینان از یکنواختی محلول صحت تهیه شده ، محلول حداقل در سه لوله ریخته و جذب نوری هر سه لوله قرائت می‌شود . میانگین خوانده ها بعنوان معیار مقایسه صحت دربررسی صحت عملکرد سمپلر استفاده میشود .

شاخصه صحت (Bias) است که از فرمول زیر بدست می آید:

$$Bias\,\% = \frac{\exp ected - observed}{\exp ected} \times 100$$

expected : میانگین جذب نوری ۳خوانده ازمحلول تهیه شده در بالن ژوژه

observed : میانگین جذب نوری ۱۰ لوله که در مرحله ارزیابی عدم دقت بدست آمده است.

توجه : به منظور به حداقل رساندن عوامل ایجاد خطا بهتر است بررسی دقت و صحت در یک روز انجام گیرد .

مقادیر مجاز عدم دقت و عدم صحت

اولین معیار مقایسه برای کنترل کیفیت سمپلرها، میزان ادعا شده توسط سازندگان سمپلر برای Inaccuracy (Bias) و Imprecision (CV%) میباشد . چرا که بدنبال ارتقای فنآوری ابزار آزمایشگاهی و بهبود کیفیت عملکرد ابزار ، مقادیر عدم صحت و عدم دقت ادعائی سازندگان میکرو پیپتها نیز بسیار کاهش یافته است .

با توجه به مختصات کیفیتی بسیاری از میکرو پیپتها ، حداکثر میزان قابل قبول عدم دقت CV% = ٪۲ و حداکثر میزان قابل قبول عدم صحت Bias% = ٪۳ پیشنهاد میشود .

نکته: معیارهای یاد شده که با توجه به تنوع سمپلرهای مورد استفاده آزمایشگاهها انتخاب شده است، اگرچه از معیارهای مجاز اعلام شده قبلی کوچکتر میباشد ولی هنوز با میزان قابل قبول برخی مراجع بین المللی فاصله زیادی دارد.

تنظیم

در برخی از انواع سمپلرها که حجم ثابتی را برداشت می‌نمایند (سمپلرهایFixed Volume) در صورت وجود Bias غیرقابل قبول، می‌توان با استفاده از اطلاعات مندرج درراهنمای سمپلر، حجم برداشتی را تصحیح نمود.

در مورد تنظیم سمپلرهای متغیر باید توجه داشت که هرگونه تغییر در حجمهای مختلف ، به میزان ثابت اعمال میشود . بدین معنی که تغییر ۱ میکرو لیتر در حجم ۱۰۰میکرولیتر (۱٪ تغییر) ، در حجم۱۰ میکرولیترنیز باعث ۱ میکرو لیتر تغییر، (یعنی۱۰٪ تغییر) خواهد شد. لذا بهتر است عمل تنظیم کالیبراسیون توسط شرکت معتبر انجام شود.

نحوه نگهداری سمپلر

نگهداری سمپلر بر اساس دستورالعمل سازنده انجام می‌پذیرد ولی مطالب ذیل در موردبیشتر انواع سمپلر صادق می‌باشد.

- کلیه قسمت های خارجی اغلب سمپلرها را می توان با محلول صابون تمیز کرد و پس از آبکشی با آب مقطر در دمای اتاق خشک نمود.
- برای ضدعفونی کردن ، محلول ۶۰٪ ایزوپروپانل توصیه می شود. برخی از انواع سمپلر نیز قابل اتوکلاو هستند.
- پس از شستشوی سطوح خارجی و تمیزکردن بخش نگهدارنده نوک سمپلر "Tip holder" (که به کمک میله همراه یا با سوآب آغشته به اتانل ۷۰ درجه انجام می گیرد) باید پیستون با مقدار کمی از روغن همراه سمپلر،که اغلب Silicone grease میباشد ، روغن کاری شود.
- برای تمیز کردن قسمتهای داخلی سمپلر باید به راهنمای همراه سمپلر مراجعه شود.

نکات مهم

۱- ضربه به سمپلر می تواند این وسیله را از کالیبراسیون خارج نماید.

۲- با انتخاب سر سمپلر مناسب، حجم محلول برداشتی باید در حدی باشد که مایع وارد قسمتهای داخلی نگردد.

۳- تماس دست با نوک سمپلر آلوده ممنوع است.

۴- در صورت مکش محلول های اسیدی و سایر مواد با خاصیت خورندگی باید بخش نگهدارنده نوک سمپلر (Tip-holder) باز شده و پیستون و حلقه پلاستیکی (O-ring) بخوبی با آب مقطر شسته شود.

۵- هرگز نباید سمپلر حاوی محلول به پهلو روی میز گذاشته شود.

۶- هرگز نباید سمپلرهای متغیر را بر روی حجمی خارج از محدوده حجم ادعائی آن تنظیم کرد.

اسپکتروفتومتر و فتومتر

مهمترین مواردی که در اسپکتروفتومترها مورد ارزیابی قرار می‌گیرند عبارتند ازخطی بودن ، صحت فتومتریک، صحت طول موج ، رانش و نورهای ناخواسته

۱ - خطی بودن Linearity

هدف از این آزمون تعیین محدوده ای است که در آن ارتباط خطی بین نور جذب شده و خوانش فتومتر وجود دارد. در این آزمایش میزان عدم صحت جذب نوری در هر رقت بررسی می شود.

برای این ارزیابی از محلولهای مختلفی می توان استفاده نمود که می بایست تا حد امکان پایدار باشند. بعلت تاثیر متغیرهایی از قبیل خطای رقت ، کاهش پایداری ، تغییراتpH و تاثیرات دما در محلولها، باید در استفاده از این روش ، عوامل یاد شده را تحت کنترل گرفت.

در صورت امکان، استفاده از فیلترهای شیشه‌ای solid glass filter مانند دیدمیوم، جایگزینی برای روش قبل میباشد (این فیلترها از طریق شرکتهای پشتیبان قابل دستیابی است).

بررسی خطی بودن با استفاده از محلول در طول موجهای مختلف:

برای بررسی خطی بودن در طول موج ۵۴۰ نانومتر از محلول HiCN ، در طول موج ۴۰۵ نانومتر از محلول پارانیتروفنل ۰/۰۸ میلی مول در لیتر و در طول موج ۳۴۰ نانومتر از محلول دی‌کرومات پتاسیم استفاده می گردد.

جهت بررسی خطی بودن طول موج ۵۴۰ نانومتر ، می بایست با مخلوط نمودن خون با درابکین ، ذخیره ای (Stock) از محلول سیان مت هموگلوبین با جذب نوری حدود ۲ تهیه شود . (بطور مثال از اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر خون با هموگلوبین g/l ۱۷۰ به ۵ میلی لیتر درابکین ، محلولی با جذب نوری حدود ۲/۰۹ بدست می آید .) اگر میزان هموگلوبین نمونه کم باشدحجم بیشتری از خون ، می بایست به درابکین اضافه شود. سپس از این محلول ذخیره ، حداقل ۴ رقت تهیه می شود (بطور مثال ۱/۲ ، ۱/۴، ۱/۸ و۱/۱۶) و جذب نوری محلول ذخیره و رقتهای تهیه شده در طول موج یاد شده در مقابل بلانک درابکین، قرائت می‌گردد تا ۵ خوانده بدست آید . جذبهای نوری قرائت شده به عنوان مقدار مشاهده شده (Observed) در نظر گرفته می‌شود .

برای محاسبه میزان خطا در هر رقت ،جذب نوری (OD) رقتی از محلول که در حدود ۰/۴ باشد به عنوان مبنا انتخاب و میزان خطای سایر رقتها با توجه به آن محاسبه می شود تا جذب مورد انتظار بدست بیاید .

بطور مثال اگر جذب نوری نمونه با رقت ۱/۴ ، حدود ۰/۴ باشد .جذب نوری مورد انتظار برای رقت ۱/۲ بصورت زیر محاسبه می شود :

جذب نوری	رقت
۰/۴	۱/۴
x	۱/۲

مقدار X بدست آمده ، مقدار مورد انتظار (Expected) جذب نوری نمونه در رقت ۱/۲ می باشد. بدین ترتیب پس از محاسبه جذب نوری مورد انتظار برای رقتهای مختلف ، میزان عدم صحت هر رقت با استفاده از فرمول Bias تعیین می‌گردد .

$$Bias = \frac{\exp ected - obsereved}{\exp ected} * 100$$

مثال زیر ، میزان عدم صحت جذب نوری رقتهای مختلف نمونه سیان مت هموگلوبین در یک دستگاه فتومتررا نشان می دهد .

جدول۲-۱

(OD expected) جذب مورد انتظار	(OD observed) جذب نوری بدست آمده	%Bias
2.075	2.094	0.91
1.66	1.663	0.18
1.245	1.259	1.12
1.037	1.017	1.97
0.83	0.826	0.48
-	0.415	-
0.207	0.212	2.1

برای بررسی خطی بودن در طول موج ۴۰۵ نانومتر از محلول پارانیتروفنل ۰/۰۸ میلی مول در لیتر استفاده می‌گردد . طرز تهیه این محلول:

وزن یک مول پارانیتروفنل = ۱۳۹/۱۱ گرم

یک میلی مول =۰/۱۳۹۱۱ گرم

برای تهیه پارانیتروفنل ۰/۰۸ میلی مول در لیتر ، با استفاده از محاسبه زیر ، می بایست ۱۱/۱۱۲۸۸ پارانیتروفنل (بطور تقریبی ۱۱/۱ میلی گرم) در یک لیتر هیدروکسید سدیم (Na OH) ۰/۰۱ نرمال حل شود.

میلی‌گرم11.1 ~ میلی‌گرم 11.11288 = گرم 0.13911 × 0.08 = 0.0111288

این محلول جذبی در حدود ۲ خواهد داشت و با تهیه رقتهای مختلف در سود(Na OH) ۰/۰۱ نرمال می‌توان خطی بودن در محدوده جذب 0.1 تا 2 را در طول موج ۴۰۵نانومتر و در مقابل بلانک سود، بررسی نمود.بطور مثال با تهیه محلولهایی با غلظت 0.06 ، 0.04 ، 0.02 ، 0.01 و 0.005 میلی مول در لیتر نتایج زیر بدست آمده و Bias محاسبه گردیده است.

همانطور که قبلا گفته شد جذب نوری حدود 0.4 را ملاک قرار داده و با تناسب مانند مثال زیر جذب نوری مورد انتظار هر غلظت را محاسبه نمایید.

غلظت	جذب نوری
0.02	0.463
0.04	x

جدول۳-۱

غلظت محلول پارانیتروفنل µmol/L	جذب نوری مورد انتظار	جذب نوری بدست آمده	Bias %
0.08	1.852	1.908	3
0.06	1.389	1.418	2
0.04	0.926	0.937	1.2
0.02	-	0.463	-
0.01	0.231	0.225	2.6
0.005	0.116	0.113	2.6

برای بررسی خطی بودن درطول موج ۳۴۰نانومتر از محلول دی‌کرومات پتاسیم استفاده می‌شود.

برای تهیه محلول، پودر دی‌کرومات پتاسیم را در oven با حرارت ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یکساعت خشک کرده و 200 میلی‌گرم آن را با اسید سولفوریک ۰/۰۱ نرمال به حجم ۱ لیتر برسانید. این محلول را بعنوان ذخیره در شیشه تیره نگهداری نمائید. محلول ذخیره جذبی در حدود ۲ خواهد داشت و با تهیه رقتهای مختلف در اسید سولفوریک ۰/۰۱ نرمال، می‌توان خطی بودن در محدوده جذب 0.1 تا 2 را در مقابل بلانک اسید سولفوریک، درطول موج ۳۴۰ نانومتر بررسی نمود. بطور مثال با تهیه محلولهایی با غلظت 200 ، 150 ، 100 ، 50 ، 25 و 10 میلی گرم در لیتر نتایج زیر بدست آمده و Bias محاسبه گردیده است.

مشابه مثال قبل جذب نوری حدود 0.4 را ملاک قرار داده و با تناسب مانند مثال زیر جذب نوری مورد انتظار هر غلظت را محاسبه نمایید.

غلظت	جذب نوری
50	0.493
25	x

جدول۴-۱

غلظت محلول دی‌کرومات پتاسیم mg/L	جذب نوری مورد انتظار	جذب نوری بدست آمده	Bias %
200	1.972	2.007	1.8
150	1.479	1.486	0.5
100	0.986	0.991	0.5
50	-	0.493	-
25	0.247	0.245	0.8
10	0.099	0.095	4

میزان عدم صحت مجاز در هر رقت حداکثر ۵٪ پیشنهاد می‌شود . ولی بهتر است این مقدار را براساس دستورالعمل سازنده تعیین نمود.

۲-صحت فتومتریک

بررسی صحت فتومتری با استفاده از محلول دی کرومات پتاسیم : بیش از ۵۰ میلی گرم از دی کرومات پتاسیم را به مدت یکساعت در درجه حرارت ۱۱۰ درجه سانتی گراد قرارداده تا خوب خشک شود. سپس با ترازوی کالیبره، دقیقاً ۵۰ میلی گرم از ماده فوق برداشته و در یک لیتر اسید سولفوریک ۰/۰۱ نرمال حل میگردد . سپس اسپکتروفتومتر توسط بلانک اسید سولفوریک ۰/۰۱ نرمال در طول موج ۳۵۰ نانومتر صفر شده و جذب نوری محلول دی کرومات پتاسیم در اسید سولفوریک قرائت می‌گردد . جذب نوری در محدوده ۰/۰۰۵ ± ۰/۵۳۶ نشاندهنده صحت فتومتریک دستگاه می‌باشد.

نکته : بررسی صحت فتومتری با استفاده از روش گفته شده برای فتومتر امکانپذیر نمی‌باشد(بعلت عدم دسترسی به طول موج ۳۵۰ نانومتر). این بررسی می‌بایست با استفاده از محلولها یا فیلترهای مناسب و توسط شرکتهای پشتیبان ، انجام گردد.

(مواد استاندارد مرجعSRM جهت کالیبراسیون و تائیدیه عملکرد اسپکتروفتومتر و فتومتر توسط انستیتوی مواد مرجع و روشها در اروپا IRMM و انستیتوی ملی استاندارد و تکنولوژی امریکامعرفی شده است. (www.irmm.jrc/bc و www.nist.gov)

۳-صحت طول موج

ارزیابی صحت طول موج به منظور ارزیابی ادعای سیستم درتاباندن طول موجی است که دستگاه برای آن تنظیم شده است .

راحتترین و قابل دسترس ترین روش برای اسپکتروفتومترهایی که با نور مرئی کار می کنند، استفاده از محلول سیان‌مت‌هموگلوبین (۲۰ میکرولیتر خون و ۵ میلی لیتر درابکین) بوده که دارای حداکثر جذب نوری در طول موج ۵۴۰ نانومتر است .ابتدا با محلول درابکین به عنوان بلانک دستگاه را صفر کرده و سپس جذب نوری نمونه در طول موج ۵۳۰ ، ۵۳۵، ۵۴۰ ، ۵۴۵ و ۵۵۰ نانومتر قرائت می‌گردد.(لازم بذکر است پس از هر تغییر طول موج ، باید جذب نوری دستگاه با محلول بلانک صفرگردد .) بر اساس طول موج و میزان جذب ،یک منحنی رسم می‌گردد که در صورت وجود صحت طول موج ، حداکثر جذب نوری را در ۵۴۰ نانومترنشان خواهد داد.

نکته : بررسی صحت طول موج با استفاده از روش گفته شده برای فتومتر امکانپذیر نمی‌باشد. این بررسی می‌بایست با استفاده از محلولها یا فیلترهای مناسب و توسط شرکتهای پشتیبان ، انجام گردد.

۴-آزمون رانش فوتومتری (Drift)

یکی از منابع اصلی خطا در اسپکتروفتومتری ، که به علت فرسودگی شدید منبع نوری رخ می‌دهد، عدم پایداری مقدار جذب خوانش شده درطول زمان می‌باشد.

برای بررسی ، ابتدا دستگاه را با درابکین صفر نموده و پس از ریختن محلول سیان مت هموگلوبین در کووت و بستن درب آن با پارافیلم ، جذب نوری این محلول هر۵ تا ۱۵ دقیقه یکبار (بمدت یکساعت) قرائت می گردد. حداکثر تغییر مجاز در جذبهای نوری قرائت شده طی این مدت $0.005 \pm$ می‌باشد .

بعنوان مثال اگرجذب محلولی در ابتدا 1.259باشد در مدت یکساعت می‌تواند در محدوده 1.259 ± 0.005 تغییر نماید.

۵-نورهای ناخواسته (Stray light)

نورهای ناخواسته ، نورهایی هستند که غیر از نور عبور داده شده از منوکروماتور ، به نمونه تابیده می شوند. برای اینکار محلولی که نور را بطور کامل جذب می‌کند (مثل استن یا نیتریت سدیم در طول موجهای خاص) در مسیر عبور نور قرار داده می‌شود . در این حالت می‌بایست ترانس‌میتانس ٪ 0 (جذب بی‌نهایت و غیر قابل خوانش) باشد زیرا نور از محلول عبور نکرده و به دتکتور نمی‌رسد.

برای بررسی انوار ناخواسته محلول آبی ۵۰گرم در لیتر سدیم نیتریت تهیه و در مقابل بلانک آب مقطر در طول موج ۳۰۰ تا ۳۸۵ نانومتر خوانش می شود. ترانس میتانس میباید T=٪ 0 باشد.

توجه : آزمایشگاههایی که از فتومتر استفاده می‌نمایند ، ازبین پارامترهای گفته شده تنها می‌توانند خطی بودن، رانش فتومتری و انوار ناخواسته را بررسی نمایند. سایر موارد ذکر شده و همچنین دمای محفظه باید از طریق شرکت پشتیبان بررسی شود.

سانتریفوژ

سانتریفوژ نمودن یکی از روشهای جدا سازی است که در آن با استفاده از نیروی گریز از مرکز، قسمتهای سبکتر یک محلول ، مخلوط ویا سوسپانسیون ، از قسمتهای سنگینترآن جدا میشود .

اساس عمل سانتریفوژ، حرکت دورانی حول یک محور ثابت است . نیروی سانتریفوژ یا Relative Centrifugal Force(RCF) بستگی به شعاع و و سرعت دوران داشته ، با فرمول زیر محاسبه و واحد آن نیز بر اساس ضریبی از g (gravity) بیان میشود . (بطور مثال g ×۵۰۰)

$$RCF= 1.118 \times 10^{-5} \times r \times (rpm)^2$$

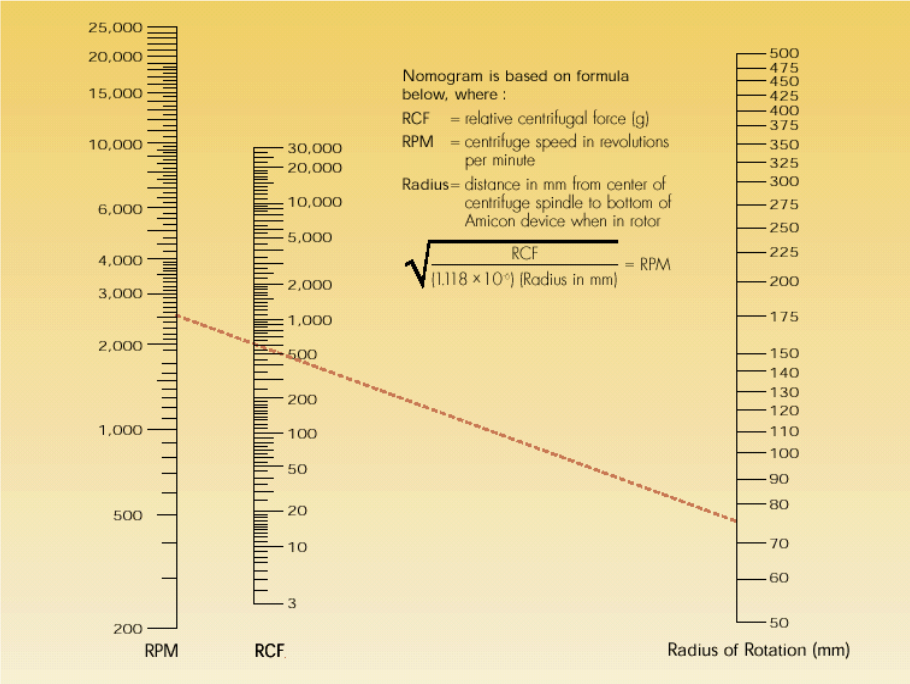
1.118×10^{-5} مقدارتجربی قراردادی

r = شعاع سانتریفوژ برحسب سانتیمتر

مقدارشعاع، از مرکز چرخش سانتریفوژ (محور) تا انتهای لوله درون سانتریفوژاندازه گیری میشود.

rpm = سرعت چرخش برحسب دور در دقیقه

نیروی سانتریفوژ RCF را میتوان به وسیله نموگرام نیز تعیین نمود.



در این حالت با کشیدن خطی که از شعاع سانتریفوژ و g مورد انتظار عبور می‌کند و ادامه آن، سرعت بدست می‌آید. بعنوان مثال در شکل فوق برای بدست آوردن قدرت 500g در سانتریفوژی که شعاع آن ۷۵ میلی‌متر است، لازم است سرعت روی ۲۵۰۰ دور در دقیقه تنظیم گردد.

انواع سانتریفوژ

سانتریفوژ های شناور (Horizontal- head /Swinging- bucket) و سانتریفوژ های زاویه ثابت ، انواعی از سانتریفوژ هستند که بیشتر در آزمایشگاههای تشخیص طبی استفاده میشوند .

در سانتریفوژ های شناور، لوله هـا در حالـت توقـف وضـعیت عمـودی و در حـال حرکـت وضعیت افقی دارند.

در سانتریفوژهای زاویه ثابت ، لوله ها در همه حـال دارای زاویـه ثابـت نـسبت بـه محـور سانتریفوژ می‌باشند. سرعت این نوع سانتریفوژ ، می‌تواند نسبت به مورد قبلی بیشترباشد ولـی در زمان چرخش بعلت مقاومت به هوا ، درون آن گرمای بیشتری ایجاد شده و دما بالا می‌رود.

انتخاب سانتریفوژ در آزمایشگاه باید با توجه به نـوع مـصرف (ماننـد سـرعت مـورد نیـاز، حداکثر دمای قابل قبول و...) و نیز مختصات فنی مندرج در کاتالوگ دستگاه صورت گیرد.

نکات مهم در استفاده از سانتریفوژ :

- در کار روزانه نباید سانتریفوژ را با درب باز به کار انداخت .
- استفاده از لوله های مناسب و توصیه شده سازنده و رعایت تـوازن لولـه‌هـا و حجـم نمونه‌ها هنگام استفاده از سانتریفوژ از نکات اساسی در استفاده صحیح سانتریفوژ میباشد . بطور معمول وزن لوله های حاوی نمونه که مقابل هم قرار گرفته‌اند نباید بیش از ۱٪ متفاوت باشند. وزن مجموع لوله‌های حاوی نمونه نباید از وزن تعیین شده سازنده برای سرعت خـاص ، تجـاوز نماید .
- لازم است درب لوله‌های حاوی خون قبل از سانتریفوژ بسته شود تا از پخش آئروسل در محیط جلوگیری گردد . از استفاده از اپلیکاتورهای چوبی جهت خارج کردن لخته قبل از عمـل سانتریفوژ به علت افزایش احتمال همولیز باید خودداری شود .

نگهداری و کنترل کیفیت سانتریفوژ

تمیز نگهداشتن سانتریفوژ در کاهش انتشار آلودگی ها بسیار مهم است و باید در فواصـل زمانی مشخص انجام شود .

برای کنترل کیفیت سانتریفوژ لازم است موارد زیر بررسی گردد:

سرعت سانتریفوژ : ابزار سنجش سرعت سانتریفوژ، تاکومتر است .سرعت سـانتریفوژ بایـد حداقل هر سه ماه یکبار بررسی شده و میزان سرعت اندازه گیری شـده نبایـد بـیش از ۵٪ بـا

سرعت مورد انتظار (سرعت انتخابی هنگام کار با سانتریفوژ) متفاوت باشد . برای بررسی سرعت سانتریفوژ با تاکومتر مراحل زیر انجام میشود :

- قفل سانتریفوژ را در حالتی قرار دهید که در حال باز بودن در ، چرخش انجام شود.
- کاغذ مخصوص همراه تاکومتر را نزدیک مرکز محور سانتریفوژ (نه در روی مرکز محور) بچسبانید. این کار باعث می‌شود در هر بار چرخش ، نور یکبار از کاغذ مخصوص به تاکومتر باز تابیده شود.
- سانتریفوژ را با دور مورد نظر تنظیم نموده و روشن کنید.
- تاکومتر را در فاصله مناسب نسبت به کاغذ نشاندار نگهداشته و آنرا روشن کنید.
- هنگامیکه عدد نمایش داده شده روی تاکومتر ثابت ماند ، آن را یادداشت نموده با سرعت انتخاب شده اولیه مقایسه نمائید .

زمان سنج سانتریفوژ: بهتر است زمان سنج بصورت هفتگی در مقابل زمان سنج کالیبره مورد بررسی قرار گیرد. برای این امر زمان‌سنج را در زمانهای مختلف تنظیم وبا کرونومتر مقایسه کنید . اعداد حاصله نباید بیش از ۱۰٪ با زمان مورد انتظار متفاوت باشد.

کنترل دما : برخی سانتریفوژ ها هنگام کار ایجاد حرارت زیاد در محفظه داخل سانتریفوژ مینمایند و این دما میتواند بر کیفیت نمونه و غلظت کمیت های آن تاثیر گذار باشد لذا هنگامی که اندازه‌گیری کمیتی مورد نظر است که به دما حساس میباشد، بهتر است از سانتریفوژ یخچال دار استفاده شود . برای کنترل دما ،می‌توان در لوله آزمایش ، آب مقطر ریخته و دمای آنرا تعیین نمود. سپس لوله در سانتریفوژ قرار گرفته و دستگاه با دور مشخص روشن می‌شود . پس از مدت مقرر ، دمای آب داخل لوله مجددا اندازه گیری می شود . دمای سانتریفوژهای یخچال دار میباید هر ماه بررسی شده و میزان دمای اندازه گیری شده نباید بیش از ۲ درجه سانتی گراد با دمای مورد انتظار متفاوت باشد .

بن ماری

برای انجام آزمایش در محیط مرطوب و دمای خاص از بن ماری استفاده می‌شود. برای استفاده مناسب از بن‌ماری باید به موارد زیر توجه داشت.

۱- سطح آب در بن ماری باید بالاتر از سطح مایعات انکوبه شده باشد.

۲- آب بن‌ماری باید مرتبا تعویض گردد تا از رشد میکروبها جلوگیری بعمل آید.

۳- برای جلوگیری از ایجاد رسوب بهتر است از آب مقطر برای پر کردن بن‌ماری استفاده شود. در صورت ایجاد رسوب می توان از اسید کلریدریک رقیق برای ازبین بردن رسوبها استفاده نمود.

۴- برای اطمینان از دمای بن‌ماری می‌بایست دمای آب، روزانه بوسیله دماسنجی غیر از دماسنج درون بن‌ماری، کنترل گردد.

۵- در مورد بن‌ماری هایی که فاقد سیرکولاتور آب می‌باشند ، لازم است در چهار گوشه بن‌ماری دماسنجهای دقیق قرار گرفته و نتایج آن با دماسنج درون بن‌ماری مقایسه گردد.

۶- میزان خطای مجاز دما برای آزمایشهای نقطه پایانی(end point) 0.5± می‌باشد.

یخچال

برای استفاده صحیح از یخچال باید به موارد زیر توجه داشت :

۱- یخچالها باید طوری قرار گیرند که هوای کافی از مبرد که عموما در پشت یخچال است ، عبور نماید.

۲- دمای یخچال باید روزانه دو بار در ساعات مشخص، اندازه‌گیری و ثبت شود. با توجه به امکان وجود اختلاف دما، درجه حرارت بخشهای مختلف یخچال باید بررسی گردد.

۳- محفظه یخ باید هرماه بررسی و در صورت وجود یخ تمیز شود.

۴- غبار روی مبرد ماهانه پاک شود.

۵- لاستیک دور در، مرتبا بررسی شود.

ترازو

عواملی مانند دما، رطوبت ، نیروی جاذبه و هوا می‌توانند در اندازه‌گیری صحیح وزن مواد تداخل نمایند.

برای نگهداری و برای استفاده صحیح از ترازو باید به موارد زیر توجه داشت :

۱- ترازو باید در محلی دور از جریان هوا ، دقیقا در وضعیت افقی و در مکانی ثابت و بدون ارتعاش قرار گیرد .

۲- ترازو باید پیش از هر اندازه‌گیری صفر شود.

۳- ظرفی که برای توزین استفاده شود باید تا حد امکان کوچک باشد (با توجه به حجم ماده مورد توزین) از بکار بردن ظروف پلاستیکی باید خودداری شود.

۴- ظرف و ماده مورد توزین باید قبل از توزین به حرارت اتاق رسانده شوند.

۵- دست را نباید وارد محفظه توزین نمود زیرا باعث گرم شدن محفظه می‌شود. بهتر است از پنس استفاده شود.

۶- ماده مورد توزین را باید وسط کفه قرار داد.

۷- ترازو باید تمیز نگه داشته شود. در صورت ریختن مواد شیمیایی باید سریعا محل را تمیز نمود . برای پاکسازی عوامل بیولوژیک از الکل ۷۰ درصد استفاده می‌شود.

۸- برای اطمینان از صحت اندازه‌گیری لازم است علاوه برکالیبراسیون داخلی ، در فواصل زمانی مشخص با استفاده از وزنه‌های کالیبره با وزن معین، صحت عملکرد را بررسی کرد یا از طریق مراجع کالیبراسیون معتبر ، اقدام به کالیبراسیون دستگاه نمود.

سیستم‌های تخلیص آب

آب خالص یکی از ارکان ضروری بسیاری از فعالیتهای آزمایشگاهی می‌باشد . درجه خلوص مورد نیاز آب به مورد مصرف آن بستگی دارد.

برای تهیه آب از روشهای تقطیر ، اسموز معکوس و دیونیزه کردن استفاده می‌شود.از آنجائیکه هیچیک از این روشها به تنهایی ، معیارهای NCCLS (کمیته ملی استانداردهای آزمایشگاهی امریکا که به CLSI تغییر نام داده است) برای آب نوع ۱ را تامین نمی‌نمایند ، در صورت نیاز به این نوع آب باید دو روش تخلیص را با هم استفاده نمود.

توانایی روشهای مختلف تخلیص آب در برداشت ناخالصیها به تفکیک نوع روش براساس دستورالعمل NCCLS در جدول۵-۱ آمده است.

جدول۵-۱

Purification Process	Major Classes of Contaminants					
	Dissolved Ionized Solids	Dissolved Ionized Gases	Dissolved Organics	Particulate Matter	Micro-organisms	Pyrogens/ Endotoxins
Distillation	E	G/P	G	E	E	E
Deionization	E	E	P	P	P	P
Reverse osmosis	G	P	G	E	E	E
Carbon adsorption/absorption	P	P	E/G	P	P	P
Filtration (0.22 mm)	P	P	P	E	E	P
Ultrafiltration	P	P	P	E	E	P

E : Excelent G : Good P : Poor

موارد استفاده از انواع آب بشرح زیر می‌باشد.

نوع III : برای شستشوی ظروف شیشه‌ای و آزمایشهای کیفی مانند تجزیه ادرار

نوع II : در روشهای معمول آزمایشگاهی که به آب نوع I احتیاج ندارد .

نوع I : مواردی که کمترین تداخلات و بیشترین صحت مورد نیاز است مانند اندازه‌گیری عناصر کمیاب

جدول۶-۱

TABLE 1-9 NCCLS Specifications for Reagent Grade Water

	Type I	Type II	Type III
Microbiological content,* colony forming units per mL, cfu/mL (maximum)	10	10^3	N.A.
pH	N.A.	N.A.	5.0-8.0
Resistivity,† MΩ per centimeter (MΩ-cm), 25 °C	10 (in line)	2.0	0.1
Silicate, mg SiO_2/L (maximum)	0.05	0.1	1.0
Particulate matter‡	Water passed through 0.2-µm filter	N.A.	N.A.
Organics	Water passed through activated carbon	N.A.	N.A.

From National Committee for Clinical Laboratory Standards: Preparation and Testing of Reagent Water in the Clinical Laboratory. 3rd ed. Approved Standard. NCCLS Document C03-A3. Wayne, PA, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997.

**Microbiological content.* The microbiological content of viable organisms, as determined by total colony count after incubation at 36 ± 1 °C for 14 hr, followed by 48 hr at 25 ± 1 °C, and reported as colony forming units per mL (cfu/mL).

†*Specific resistance or resistivity.* The electrical resistance in ohms measured between opposite faces of a 1-cm cube of an aqueous solution at a specified temperature. For these specifications, the resistivity will be corrected for 25 °C and reported in MΩ/cm. The higher the amount of ionizable materials, the lower the resistivity and the higher the conductivity.

‡*Particulate matter.* When water is passed through a membrane filter with a mean pore size of 0.2 µm, it is considered to be free of particulate matter. *Organic material.* When water is passed through a bed of activated carbon, it is considered to contain minimum organic material.

نگهداری انواع آب : آب نوع I امکان نگهداری نداشته و باید بلافاصله بعد از تهیه مصرف گردد. آب نوع II و III را می‌توان در ظروف بوروسیلیکات یا پلی‌اتیلن با درب محکم برای مدت کوتاهی نگهداری نمود.

پیشنهاد می‌گردد برای اطمینان از کیفیت آب حداقل ۳ شاخص مقاومت آب ، آلودگی میکروبی و در مورد آب نوع III ، PH بررسی گردد.

برای بررسی مقاومت آب از هدایت سنج یا کنداکتومتر استفاده می‌شود که میزان هدایت آب را اندازه می‌گیرد. هدایت با مقاومت نسبت عکس دارد (Conductivity = 1/ resistance) . مقاومت برای آب نوع I ، II و III به ترتیب MΩ/cm ۱۰، ۲ و ۰/۱ می‌باشد پس هدایت به ترتیب معادل µS/cm ۰/۱ ، ۰/۵ و ۱۰ خواهد بود. اندازه‌گیری هدایت آب باید پس از اندازه‌گیری دما با دماسنج کالیبره و براساس دستورالعمل هدایت سنج صورت گیرد.

برای بررسی آلودگی میکروبی می‌بایست اجازه داد آب برای حداقل یک دقیقه براحتی از دستگاه خارج شود .سپس در یک ظرف استریل ۱۰ میلی لیتر آب جمع آوری می‌شود. آزمایش باید در مدت یکساعت از جمع‌آوری آب انجام شود در صورت عدم امکان کشت در مدت یکساعت، نگهداری برای ۶ ساعت در دمای ۸-۲ درجه امکانپذیر است. بعد از مخلوط کردن آب (که با ۱۰ بار سروته کردن بدست می‌آید) ، ۱ میلی‌لیتر از آب در پتری دیش ریخته می‌شود. سپس محیط کشت ذوب شده تا دمای ۵۰-۴۶ درجه سرد و در پتری دیش ریخته می‌شود (از محیط کشت های TSA، BHI یا هر محیط کشتی که از رشد باسیلهای گرم منفی پشتیبانی کند، می‌توان استفاده نمود). با چرخاندن پتری‌دیش، آب را با محیط کشت مخلوط نمائید . پس از سرد شدن و جامد شدن آگار، دیش بطور وارونه و بمدت ۲۴ ساعت در دمای 36±1 درجه سانتی‌گراد و سپس ۲۴ ساعت در دمای23±3 درجه سانتی‌گراد قرار می‌گیرد(مدت انکوباسیون مجموعا ۴۸ ساعت می‌باشد) رشد میکروبی بصورت cfu/mL گزارش می‌شود.

نکته: استفاده از لوپ برای کشت آب مجاز نمی‌باشد.

اندازه‌گیری pH برای آب نوع ۳ با استفاده از pH meter و بر اساس دستورالعمل pH meter انجام می‌شود.

در صورت خرید آب ، می‌بایست مشخصات آب از طرف تولیدکننده ارائه گردد. پیشنهاد می‌شود آزمایشگاه در فواصل معین نسبت به کنترل آب خریداری شده اقدام نماید.

باید در نظر داشت انواعی از آب استریل که بصورت ویال عرضه می‌شود، الزاما از کیفیت مورد نیاز آزمایشگاه برخودار نبوده و باید قبل از استفاده ، میزان هدایت آن بررسی شود.

نکته: حجم ادعاشده ویالهای آب، نباید مبنایی برای به حجم رساندن کنترلها، کالیبراتورها،معرفها و... باشد. آزمایشگاه می‌بایست صرف نظر از حجم مندرج روی ویال، با استفاده وسایل حجمی مناسب مانند پیپت اقدام به انتقال حجم مورد نیاز نماید.

میکروسکوپ

برای حفظ کیفیت عملکرد میکروسکوپ آگاهی از نحوه صحیح نگهداری آن از اهمیت ویژه ای برخوردار می باشد که در زیر به نکاتی در این مورد اشاره می شود:

۱- هنگامی که از میکروسکوپ استفاده نمی‌شود، لامپ آن خاموش و با روکش مناسب پوشانده شود.

۲- بلافاصله پس از استفاده، روغن ایمرسیون از روی عدسی‌های شیئی پاک شود.

۳- قبل و بعد از استفاده از میکروسکوپ، قسمتهای نوری با دستمال مخصوص لنز ،کاغذهای جاذب یا پارچه نرم آغشته به محلولی متشکل از یک حجم اتر و یک حجم ایزوپروپیل الکل، پاک شود.

۴- برای پاک کردن لنزها نباید از گزیلل استفاده شود. لنزها نمی‌بایست در الکل خیسانده شوند.

۵- در حال مشاهده لام ، برای وضوح تصویر ، هیچگاه عدسی‌های شیئی را خیلی پائین نبرید زیرا ممکن است منجر به خراشیدگی اسلاید و صدمه به لنز شود.

۶- عدسی‌های شیئی نباید از میکروسکوپ جدا شوند.

۷- در هوای گرم و مرطوب به منظور جلوگیری از رشد قارچ بر روی لنزها ، می‌توان میکروسکوپ را هر عصر در محفظه‌ای که با یک یا دو لامپ ۴۰ وات گرم شده و محیط خشکی فراهم آورده ، قرار داد. باید توجه داشت دمای ان محفظه نمی‌بایست بیش از ۵ درجه از دمای آزمایشگاه بالاتر باشد.

۸- در هوای گرم و خشک که مشکل اصلی گرد و غبار است ، علاوه بر پوشاندن میکروسکوپ در ساعات غیر کاری، در پایان روز می‌بایست گرد و غبار لنزها را با دمیدن هوا از وسیله‌ای مانند پوار یا با استفاده از برس مخصوص لنز یا قلم موی نقاشی و در صورت لزوم کاغذ مخصوص لنز(Lense paper) تمیز نمود.

اتومیشین وتجزیه گر خودکار در آزمایشگاه بیوشیمی

اصطلاح اتومیشین در بیوشیمی بالینی توصیف کننده ابزارهایی است که بررسی بیوشیمیایی کمیت ها را با حداقل دخالت تکنولوژیست انجام میدهد.

انواع تجزیه گر خودکار

تجزیه‌گرهای خودکار براساس ماهیت معرف مورد استفاده به تجزیه‌گرهای با معرف مایع و بدون معرف مایع مانند سیستمهای Opus، Vitros ، Kodak Ektachem تقسیم بندی میشوند . سیستمهای با معرف مایع در ایران رایجتربوده و بهمین جهت در این دستورالعمل مورد بحث قرار گرفته‌اند.

ساختمان کلی تجزیه گرهای خودکاربا معرف مایع، شامل قسمتهای زیر میباشد :

منبع نوری، منوکروماتور، محفظه کووت، انکوباتوربرای ایجاد دمای مناسب واکنش، بازوی مکنده معرف، بازوی مکنده نمونه Sample / Reagent probe، دتکتور و واحد اطلاعات و پردازش.

این سیستمها براساس روش انتقال نمونه به دو دسته Continuous- flow و Discrete Analyzer تقسیم میشوند. در تجزیه گرهای خودکار Continuous - flow نمونه از طریق بازوی مکنده نمونه (Sample probe) به جریان مداوم معرف وارد میشود ولی در سیستمهای Discrete نمونه توسط Probe به محفظه واکنش خاص انتقال می‌یابد.

نکات مهم در استفاده از تجزیه گر خودکار بیوشیمی

- آشنائی کامل با دستگاه قبل از شروع به کار
- ایجاد شرایط الزامی برای عملکرد صحیح دستگاه بطور مثال برق مناسب ویا آب با خلوص خاص

- استفاده از برنامه اختصاصی ارائه شده سازنده کیت برای دستگاه مورد استفاده
- عدم استفاده از کنترل به جای کالیبراتور در عمل کالیبراسیون، در کالیبراسیون کمیتها باید به غلظت مناسب کالیبراتور نیز توجه داشت بطور مثال برای کالیبراسیون HDL میباید از کالیبراتورمخصوص همین کمیت استفاده کرد نه از کالیبراتور کلسترول توتال.
- استفاده ازکالیبراتوروکنترل های مورد توصیه سازنده کیت یا استفاده از کالیبراتوروکنترلهای هماهنگ
- عدم تغییر فاکتور اعلام شده سازنده کیت برای آنزیم ،این عمل که ممکن است به منظور تصحیح کنترل قرائت شده صورت گیرد مشکلات احتمالی از قبیل عدم کفایت، ناپایداری معرف و امکان تداخل زمینه سرم کنترل با معرف ویا اشکال در دمای انکوباتور سیستم را پوشانده و مانع یافتن خطای واقعی میگردد .

نگهداری و کنترل کیفیت تجزیه گر خودکار

- برای حفظ کیفیت عملکرد تجزیه گر خودکار لازم است کلیه موارد یاد شده در دستورالعمل همراه جهت نگهداری و سرویس دستگاه رعایت گردد.

برای سرویس و کالیبراسیون سیستم برنامه زمانبندی شده تهیه و سوابق مکتوب اجرای آن نگهداری گردد.

- برای بررسی عملکرد دستگاه پس از هر سرویس و کالیبراسیون انجام تستهای زیر توصیه میشود :

سنجش عملکرد پروبها : تستی انتخاب میشود که برای انجام آن کمترین حجم نمونه و بیشترین حجم معرف برداشت می‌شود . مانند پروتئین در سیستم های RA . سپس یک نمونه کنترل ۳۰ بار مورد اندازه گیری پروتئین قرار میگیرد .پراکندگی نتایج حاصله برحسب CV% نباید بیش ازمقدار خطای مجاز اندازه گیری پروتئین ویا میزان خطای مجاز ادعا شده سازنده کیت باشد .

دمای انکوباتور : برای بررسی پایداری دمای انکوباتور دستگاه، تستی انتخاب میشود که به تغییرات دما حساس است مانند اندازه گیری آنزیم ALT . سپس یک نمونه کنترل ۳۰ بار

مورد سنجش ALT قرار میگیرد. پراکندگی نتایج حاصله برحسب CV% نباید بیش از مقدار خطای مجاز اندازه گیریALT ویا میزان خطای مجاز ادعا شده توسط سازنده کیت باشد .

انتقال ناخواستهCarry Over : در دستگاه تجزیه‌گر خودکار ممکن است نمونه یا معرف بطور ناخواسته انتقال یابند.

برای بررسی انتقال ناخواسته معرف، پیشنهاد میگردد از دوتستی که NADH را اندازه گیری می‌نمایند، استفاده شود. بطور مثال آزمایشهای LDHو ALT که یکی افزایش NADH و دیگری کاهش آنرا اندازه گیری میکند .

بدین ترتیب که برروی یک نمونه کنترل دریک سری کارو به ترتیب زیر، ۳۰بار آزمایش LDH و ۱۰ بار ALT انجام میشود .

1. LDH
2. LDH
3. LDH – ALT
4. LDH
5. LDH
6. LDH – ALT
7. ….

30 LDH-ALT

میزان پراکندگی نتایج اندازه‌گیری LDH برحسبCV اندازه گیری میشود.

سپس در یک سری کاری ۳۰بار LDH به تنهایی (بدون همراهی با ALT) اندازه گیری و پراکندگی نتایج حاصله برحسبCV محاسبه میشود.

CV% در حالت اول (آزمایش LDHو ALT) باید معادل یا کمتر از حالت دوم (اندازه‌گیری LDH به تنهایی) باشد.

انتقال ناخواسته نمونه با انجام آزمایش برروی نمونه های با غلظت بالا و پایین کمیت های انتخابی، بطور متوالی بررسی میشود .به طور مثال گلوکز با غلظتهای ۵۰ و ۵۰۰ میلیگرم درصد ویا ALT در غلظتهای بالا و پایین انتخاب شده بطور متناوب هریک ازنمونه‌های با غلظتهای پایین(L) و بالا (H) سه بار مورد آزمایش قرار می‌گیرند

H-H-H -L-L-L-H-H-H-L-L-L-…

پراکندگی نتایج غلظتهای پایین مورد محاسبه قرار میگیرد .

سپس در یک سری کاری مجزا، نمونه با غلظت پایین به تنهایی و به دفعات اندازه گیری و پراکندگی نتایج حاصله برحسب CV% محاسبه میشود.

پراکندگی برحسب CV% در حالت اول نباید بیش از پراکندگی حاصله از تکرار همین نمونه به تنهایی و در سری کاری مجزا باشد.در غیر این صورت تداخل در برداشت نمونه وجود داشته است .

- اجرای برنامه کنترل داخلی کیفیت Internal Quality Control برای کلیه کمیت های اندازه‌گیری شده با دستگاه جهت بررسی قابلیت تکرار و عضویت در برنامه ارزیابی خارجی کیفیت EQAS جهت بررسی صحت عملکرد دستگاه تجزیه گر خودکار الزامی است .

- برای بررسی کاملتر عملکرد تجزیه گرهای خودکارمیتوان به دستورالعمل های ECCLSو CLSI رجوع نمود.