برای کنترل کیفیت در آزمایشگاه میکروب شناسی باید به موارد زیر توجه داشت:

کنترل کیفیت آزمایشهای تعیین حساسیت میکروبی، محیط های کشت، رنگها ومعرفها، ابزار و دستگاهها(لوپ، فور، اتوکلاو وانکوباتور).

نظر به اینکه هدف نهایی کلیه فعالیت های آزمایشگاه میکروب شناسی انتخاب مناسبترین آنتی‌بیوتیک جهت درمان بیمار مبتلا به عفونت میباشد ، بعد ازمبحث شیوه نگهداری و استفاده ازسویه‌های باکتریایی که برای کنترل کیفیت کلیه مواد در آزمایشگاه میکروب شناسی مورد نیازهستند در ابتدا نحوه کنترل کیفیت محیط های کشت و سپس طرز تهیه کدورت۰/۵ مک فارلند برای استانداردسازی سوسپانسیون میکروبی لازم، جهت تلقیح در محیط مولر هینتون آگار و نیز روش انجام آزمایشهای تعیین حساسیت میکروبی و کنترل کیفی آنها ذکر گردیده است.

سپس به دلیل قرار داشتن آزمایش های ادراری در زمره شایعترین آزمایشهای روتین، کنترل کیفیت لوپ ادراری آورده شده است.

نگهداری و استفاده از سویه‌های باکتریایی

برای نگهداری سویه‌های باکتریایی می‌توان از روشهای طولانی مدت و کوتاه مدت استفاده نمود.

نگهداری طولانی مدت

نگهداری طولانی‌مدت باکتریها این امکان را می‌دهد که کلیه سویه‌های میکروبی اعم از هوازی (بارشد سریع ویا سخت رشد) ونیز بیهوازی ، ماهها و حتی سالها به صورت زنده نگهداری شوند. بهترین روشهای نگهداری طولانی مدت شامل لیوفیلیزاسیون (Freeze drying) و نگهداری در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد یا پایین تر (در دیپ فریز یا در نیتروژن مایع) می‌باشد.

۱- نگهداری در دیپ فریز (۵۰- تا۷۰- درجه سانتی‌گراد یا پایینتر) ویا نیتروژن مایع :

باکتری مورد نظر را روی محیط مغذی مانند پلیت (Trypticase Soy Agar) TSA حاوی ۵٪ خون گوسفند و در مورد میکروارگانیسمهای سخت رشد روی محیط آگار شکلاته کشت دهید. پلیتها را به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۲±۳۵ درجه سانتی‌گراد و در صورت نیاز تحت شرایط CO_2 برای هر باکتری انکوبه نمائید.

بعد از انکوباسیون، خالص بودن و مورفولوژی کلنی‌ها را بررسی نموده و در صورت نیاز، تستهای بیوشیمیایی آنرا انجام دهید. سپس از باکتری رشد یافته ، سوسپانسیون غلیظی در ۱۰۰-۵۰ میلی‌لیتر از یک محیط محافظت‌کننده از سرما (Cryoprotective) تهیه نمائید. این محیط برای جلوگیری از تخریب سلولهای باکتری در شرایط انجماد مورد استفاده قرار می‌گیرد. محیط محافظت‌کننده از سرما می‌تواند Skim milk ، خون گوسفند یا خرگوش دفیبرینه استریل یا Tryptic Soy Broth (TSB) حاوی گلیسرول با غلظت نهایی ۱۵-۱۰٪ باشد.

سپس از سوسپانسیون باکتریایی فوق به حجم mL ۱- ۰/۵ در ویالهای شیشه‌ای یا پلاستیکی کوچک استریل توزیع کنید . ویال های ذخیره خود را به مقدار مصرف یکسال، آماده نمائید.

ویالهای حاوی سویه‌ها را می‌توان در برودت ۵۰- تا ۷۰- درجه سانتی‌گراد به مدت یکسال نگهداری نمود. در صورت عدم دسترسی به فریزر ۷۰- درجه می توان سویه‌های با رشد سریع را در فریزر ۲۰- درجه نیز نگهداری نمود. در این شرایط توجه به نکات زیر ضروری است:

- سویه‌های سخت رشد مانند هموفیلوس انفلوآنزا و نیسریا گنوره در این دما قابل نگهداری نمی‌باشند و باید در فریزر ۷۰- درجه نگهداری شوند.
- سویه‌های بارشد سریع در این دما عمر کوتاه تری دارند. بنابراین توصیه می‌شود برای اطمینان از حیات سویه‌ها، هر چند ماه یکبار ، طبق روش زیر کشت داده شوند:

یک ویال از فریزر بیرون آورده و آنرا سریعاً زیر آب جاری ولرم، ذوب نمائید. سوسپانسیون ذوب شده را روی محیط آگار خوندار یا شکلاته (در مورد باکتریهای سخت رشد) تلقیح کرده و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۲±۳۵ درجه ودر صورت نیاز در شرایط CO_2 انکوبه نمایید. این باکتری برای تهیه کنترل کاری working control بکار می رود. قبل از هر اقدام باید از خالص بودن نمونه ، اطمینان حاصل کرد. **ویال مورد استفاده بعد از ذوب شدن باید دور انداخته شده و بهیچوجه مجددا فریز نگردد.**

کشتهای working control : عبارتست ازکشت مجدد از کشت ذخیره فریز شده که برای کنترل کیفیت محیط کشت و.. استفاده می‌شود.

از کشت ذخیره تا ۳ پاساژ پشت سر هم می‌توان انجام داد . پس از آن ، نمونه باید دور انداخته شده و از یک کشت ذخیره فریز شده دیگر برای تهیه کشتهای working control استفاده شود. پاساژهای مکرر(بیش از ۳ پاساژ)، احتمال تغییر فنوتیپی سویه‌ها را افزایش می‌دهد.

برای تهیه working control ، از کشت ذخیره فریز شده ، روی پلیت یا آگار شیبدار تلقیح و آنرا به مدت یک شبانه‌روز تا زمانی که رشد مناسبی بدست آید، انکوبه نمائید. در مورد ارگانیسمهای با رشد سریع، این پلیت یا آگار شیبدار را می‌توان در ۸-۲ درجه سانتیگراد یا در دمای اتاق تا مدت ۴ هفته نگهداری نمود. بعد از هر پاساژ، خالص بودن و مورفولوژی کلنی‌ها را بررسی نمائید.

۲- استفاده از روغن معدنی در دمای اتاق :

۱- محیط کشت Brain Heart Infusion Agar (BHIA) را با شیب کم در لوله تهیه نمایید. برای باکتریهای مشکل‌پسند مانند گونوکک ، مننگوکک ، استرپتوکوکوس پنومونیه و هموفیلوس آنفلوانزا ، محیط شکلات آگار را پس از خروج محیط BHIA از اتوکلاو و رسیدن به دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد با افزودن ۵٪ خون گوسفند و سپس قرار دادن آن در بن‌ماری ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه تهیه نمائید.

۲- روغن معدنی (یا پارافین مایع) را در حرارت خشک (۱۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یکساعت) استریل نمائید.

۳- میکروب مورد نظر را روی محیط ، کشت دهید.

۴- بعد از بدست آوردن کشت کافی ، روغن استریل را به مقدار cc ۱ روی سطح محیط بریزید.

۵- در صورت نیاز به کشت مجدد ، نمونه از سطح آگار (زیر روغن) برداشته می‌شود.

۶- بعد از ۱۲-۶ ماه تجدید کشت نمایید.

۳- کشت عمقی و نگهداری در دمای اتاق :

این روش فقط برای باکتریهایی که مشکل‌پسند نیستند مانند استافیلوککها وخانواده انتروباکتریاسه بکار می‌رود.

۱- یک محیط کشت آگار بدون کربوهیدرات مانند TSA را باعمق زیاد در لوله تهیه نمایید.

۲- باکتری را بصورت کشت عمقی در این محیط تلقیح نمایید.

۳- این محیط را ۲۴ ساعت در اتو ۳۵ درجه انکوبه نمائید.

۴- در لوله را، با درپیچ یا چوب پنبه ببندید.

۵- لوله در پیچ‌دار را در پارافین مایع فرو ببرید به گونه‌ای که کاملا در لوله را بپوشاند.

۶- کشتها را در حرارت اتاق نگهداری نمائید.

۷- هرساله سوش موردنظر را تجدید کشت نمائید.

۴- کشت عمقی در محیط سیستئین تریپتیکیس آگار (CTA) برای نیسریا و استرپتوکک :

۱- محیط CTA را در لوله تهیه نمایید .

۲- باکتری را به طور عمقی در این محیط کشت دهید.

۳- محیط را بمدت ۲۴ ساعت در اتو ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.

۴- در لوله را با چوب‌پنبه یا در پیچ ببندید.

۵- لوله در پیچ‌دار را در پارافین مایع فرو ببرید به گونه‌ای که کاملا در لوله را بپوشاند.

۶- برای نیسریا لوله را در ۳۵ درجه نگهداری و هر دو هفته کشت را تجدید نمائید . برای استرپتوکک لوله را در حرارت اتاق نگهداری کرده و هر ماه تجدید کشت کنید.

۵- محیط کشت Cooked meat برای باکتریهای بیهوازی :

۱- باکتری را در لوله‌های حاوی محیط Cooked meat کشت دهید.

۲- محیط را بمدت ۲۴ ساعت در اتو ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.

۳- در لوله را با چوب‌پنبه یا در پیچ ببندید.

۴- کشتها را در حرارت اتاق نگهداری نمائید.

۵- هردو ماه کشت را تجدید نمائید.

نگهداری کوتاه مدت

کشتهای working control که برای کارهای روتین روزانه استفاده می‌شوند ، به روشهای زیر تهیه می‌شوند:

- **باکتریهای با رشد سریع**

۱- سوش مورد نظر را در سطح محیط TSA لوله‌ای درپیچدار کشت دهید.

۲- محیط را بمدت ۲۴ ساعت در اتو ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.

۳- پس از رشد کامل، لوله را در یخچال نگهداری کنید.

۴- هر ماه کشت را تجدید نمائید.

- **استرپتوککها**

۱- سوش مورد نظر را در سطح آگار خوندار شیبدار(لوله‌ای درپیچدار) کشت دهید.

۲- محیط را بمدت ۲۴ ساعت در اتو ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.

۳- پس از رشد کامل، لوله را در یخچال نگهداری کنید. (جهت استرپتوکک پنومونیه ، محیط را در دمای اتاق نگهداری کنید.)

۴- هر ماه کشت را تجدید نمائید.

- **منننگوکک و هموفیلوس**

۱- سوش مورد نظر را در سطح محیط آگار شکلاته لوله‌ای یا پلیت کشت دهید.

۲- محیط را بمدت ۲۴ ساعت در اتو ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.

۳- پس از رشد کامل، لوله را در حرارت اتاق نگهداری کنید.

۴- هر۲ هفته کشت را تجدید نمائید.

- **گونوکک**

۱- سوش مورد نظر را در سطح محیط آگار شکلاته کشت دهید.

۲- محیط را بمدت ۲۴ ساعت در اتو ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.

۳- نمونه را در دمای ۳۵ درجه نگهداری نمایید.

۴- هر۲ روز یکبار کشت را تجدید نمائید.

کنترل کیفیت محیط های کشت

مقدمه

محیط های کشت نقش اساسی را در آزمایشگا ه میکـروب شناسـی ایفـا مـی کننـد و بطـور گسترده ای جهت جداسازی، تعیین هویت و آنتی بیوگرام میکروارگانیسم های بیماریزا بکار میروند. بسیاری از آزمایشگاهها بطور روتـین محـیط هـای کـشت مـورد نیـاز بـرای مـصارف تشخیـصی و تحقیقاتی را خودشان تهیه می نمایند. با این همه جهت اطمینان از اینکه محیط های کـشت، کیفیـت خوب و نتایج مطلوبی داشته باشند بایـستی روشـهای کنتـرل کیفـی مناسـبی بکـار گرفتـه شـود. برای رسیدن به این هدف بایستی در تهیه و مصرف محیط های کشت معیارهای زیر را در نظر گرفت.

مواد خام

کیفیت محیط ها بطور مستقیم بستگی به کیفیت مواد خام مورد اسـتفاده در تهیـه آنهـا دارد. آب یکی از مهمترین مواردی است که در تهیه محیط های کشت بکار میرود. سـه معیـار مهم آب مورد استفاده در تهیه محیط ها ی کشت شامل وجود یونهای مـس، قـدرت هـدایت الکتریکی و pH می باشد. در شرایط ایده آل نباید یون مس، در آب مورد استفاده جهت تهیـه محیط های کشت وجود داشته باشد چون خاصیت مهار کنندگی برای میکـرو ارگانیـسم هـا را دارد. قدرت هدایت الکتریکی آن باید کمتر از ۱۵میکروزیمنس بوده، pH آب مورد استفاده بهتر است کمی اسیدی باشد ولی در هر حال نباید کمتر از ۵/۵ باشد.

پتری دیش

کیفیـت پتـری دیـش هـای مـورد اسـتفاده در تهیـه محـیط نیـز اهمیـت دارد. معمـولا پتری دیـش هـا را بـا اتـیلن اکـساید و یـا اشـعه گامـا اسـتریل مـی کننـد. درصـورت اسـتفاده از پتری دیش هایی که با اتیلن اکساید استریل شده باشند بایستی به روش کروماتوگرافی وجود یا عدم وجود بقایای این ماده بررسی شـود. اتـیلن اکـساید دارای خاصـیت مهـار کننـدگی بـرای میکروارگانیسم ها میباشد. در صورت استفاده از پتری دیش های شیـشه ای بایـستی از پتـری دیش هایی از جنس بوروسیلیکات استفاده کرد. استفاده از پتری دیش هـایی از جـنس قلیـائی ممکن است موجب آزاد سازی قلیا در داخل محیط کشت گردد.

استریل کردن محیط های کشت

استریل کردن، یک مرحله اساسی در تهیه محیط های کشت است. معمولا برای استریل کردن محیط های کشت از اتوکلاو استفاده می کنند. با این همه ارتباط نزدیکی بین مدت زمان لازم جهت استریل کردن و حجم محیط وجود دارد. حرارت بیش از حد ممکن است منجر به تخریب محیط های کشت گردد. بنابراین تنظیم دما و مدت زمان آن اهمیت ویژه ای دارد. در شرایط معمولی دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه برای استریل کردن یک لیتر محیط کشت کافی است. در صورتیکه حجم محیط کشت بیش از یک لیتر باشد ممکن است مدت زمان بیشتری لازم باشد. کنترل کیفی اتوکلاو، کنترل دما و فشار اتوکلاو بایستی بطور مداوم انجام گیرد. برای کنترل اتوکلاو از اندیکاتورهای شیمیائی استفاده می کنند. از اندیکاتورهای بیولوژیک که جهت کنترل کارآرائی اتوکلاو استفاده می‌کنند اسپور Bacillus stearothermophilus را می توان نام برد که بصورت تجاری قابل دسترس می‌باشد.

پارامتر های فیزیکی

محیط کشت های تهیه شده باید از لحاظ فیزیکی و ظاهری بررسی شوند. معیارهای ظاهری قابل بررسی شامل وجود حباب، حفره، ناصافی سطح محیط، ترک خوردگی، یخ زدگی می باشد. ضخامت محیط نیز اهمیت دارد. ضخامت محیط های کشت پلیتی ۴ میلی متر است. pH نیز از مهمترین معیارهای فیزیکی میباشد که باید قبل ازاتوکلاو کردن و پس از آن با pH متر کالیبره شده اندازه گیری گردد.

نگهداری محیط های کشت تهیه شده

طول عمر محیط های کشت تهیه شده بستگی به نوع اجزا تشکیل دهنده محیط، نحوه نگهداری و انبار کردن آنها دارد. تمامی محیط های کشت باید دور از نور نگهداری شوند. تابش نور به محیط های کشت موجب تشکیل مواد باکتریواستاتیک و باکتریساید مانند پراکسیداز می گردد. اغلب محیط های کشت که در پلیت تهیه می شوند در دمای ۴ درجه سانتیگراد حداقل طول عمر آنها یک هفته می باشد ولی اگر در در داخل کیسه های پلاستیکی بسته بندی شوند بطوریکه هوا داخل آنها نفوذ نکند تا ۳-۴ هفته قابل مصرف هستند. طول عمر محیط های کشت حاوی آنتی بیوتیک بستگی به پایداری آنتی بیوتیک موجود در آن دارد. در

مجموع محیطهای حاوی آنتی بیوتیک را در عرض یک هفته باید مصرف کرد. از سوی دیگر با گذشت زمان اینگونه محیط های کشت رطوبت خود را از دست داده، بدلیل افزایش غلظت آنتی بیوتیک قدرت انتخابی آنها افزایش می یابد. دمای پلیت ها را باید قبل از مصرف به دمای اتاق رساند. اگر پلیت محیط کشت بیش از ۸ ساعت در دمای اتاق باقی بماند برای مصرف مناسب نمی باشد. محیط های کشت تهیه شده در لوله در مقایسه با محیط های کشت پلیتی عمر طولانی تری دارند. اغلب این محیط های کشت اگر در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شوند ۶-۳ ماه قابل مصرف می باشند.

جدول شماره ۱-۴ : علل اشکالات رایج در محیط های کشت

اشکال	علت
نرم بودن آگار	حرارت بیش از حد، pH پائین که موجب هیدرولیز آگار می گردد. توزین غلط، مخلوط نکردن خوب و عدم حل شدن
pH نامناسب	استفاده از شیشه های قلیائی، آب ناخالص، حرارت بیش از حد، آلودگی شیمیائی، اندازه گیری pH در حرارت نامناسب، استفاده از pH متر استاندارد نشده و استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده
رنگ نامناسب	ناخالص بودن آب، استفاده از شیشه آلات کثیف، استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده، حرارت دادن بیش از حد و pH نامناسب
تیره شدن محیط	حرارت دادن بیش از حد، استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده
سمیت	حرارت دادن بیش از حد (سوزاندن محیط)، استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده
رشد ضعیف میکرو ارگانیسم	استفاده از آب و یا شیشه آلات آلوده، استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده، توزین غلط و عدم به هم زدن کافی محیط و حرارت بیش از حد.
داشتن خاصیت ضعیف انتخابی و یا افتراقی	استفاده از آب و یا شیشه آلات آلوده، استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده ، توزین غلط و عدم به هم زدن کافی محیط و حرارت بیش از حد.

کنترل کیفی محیط های کشت

برای کنترل کیفی محیط های کشت از سویه های کنترل کیفی استفاده می کنند. سویه های کنترل کیفی از منابع مختلف مانند American Type Culture Collection (ATCC) قابل تهیه می باشند[۱].

روش انجام آزمون کنترل کیفیت میکروبیولوژیکی محیط های کشت

یک کشت از ارگانیسم کنترل را روی پلیت تهیه کنید. بعد از انکوباسیون ۵-۳ کلنی ایزوله را در مقدار کمی TSB و BHI استریل سوسپانسیون کرده وآن را برای چهار یا پنج ساعت انکوبه نمائید. کدورت را با استاندارد نیم مک فارلند تنظیم کنید (استاندارد نیم مک فارلند در طول موج ۶۲۵nm دارای جذب ۰/۰۸ تا ۰/۱۳ می باشد). به این روش می توان یک سوسپانسیون در سرم فیزیولوژی از کلنی های ۲۴ ساعته تهیه و کدورت آن را مطابق روش فوق تنظیم نمود.

برای آزمایش ظرفیت مغذی بودن (Nutritional activity) یک محیط کشت پلیتی، سوسپانسیون اولیه را به نسبت ۱ به ۱۰۰ در نرمال سالین رقیق نموده و به هر پلیت ۱۰میکرولیتر از سوسپانسیون رقیق شده را تلقیح می نمائیم. تعداد کلنی های مورد انتظار در هر پلیت $۱۰^{۴}\times۲-۱$ عدد می باشد. اگر برای محیط های خاصی کلنی های ایزوله بدست نیاید سوسپانسیون باید ده بار رقیق تر تهیه شود.

برای آزمایش ظرفیت مهارکنندگی (Inhibitory activity) محیط های کشت انتخابی، سوسپانسیون اولیه را به نسبت ۱ به ۱۰ در نرمال سالین یا آب تخلیص شده رقیق نموده و در هر پلیت ۱۰ میکرولیتر یا ۰/۰۱ میلی لیتر سوسپانسیون رقیق شده تلقیح می کنیم. تعداد کلنی های مورد انتظار در هر پلیت $۱۰^{۵}\times ۲-۱$ می باشد. جهت اجتناب از رشد زیاد باکتری در بعضی از محیط های کشت انتخابی ممکن است نیاز باشد که سوسپانسیون ده بار رقیق تر شود. برای آزمایش محیط های کشت لوله ای، هر لوله باید با ۱۰ میکرولیتر یا ۰/۰۱ میلی لیتر از

۱- در حال حاضر باکتری های فوق را می توان از مرکز کلکسیون قارچها و باکتری های صنعتی ایران تهیه نمود .
http://www.irost.org/persian/ptcc
http://ptcc.irost.org

سوسپانسیون اولیه مطابق با نیم مک فارلند تلقیح شود. گاهی ممکن است به تلقیح کمتر یا بیشتر نیاز باشد.

محیط کشت مورد کنترل کیفی را بعد از تلقیح تحت شرایطی که در جدول ۲-۴ آمده است انکوبه نمائید. به طور نرمال مدت زمان انکوباسیون ۲۴- ۱۸ ساعت یا ۴۸-۲۴ ساعت در ۲ ± ۳۵ درجه سانتی گراد می باشد. شکلات آگار و محیط های کشت برای جداسازی انتخابی گونه های نیسریای بیماریزا باید در ۱۰-۵٪ Co_2 انکوبه شوند و در ۲۴-۱۸ ساعت و ۴۸-۲۴ ساعت بررسی شوند. برای بی هوازی ها، کشتها عموما به حداقل ۴۸ ساعت انکوباسیون در شرایط بی هوازی نیاز دارند. برای کمپیلوباکترآگار، پلیتها باید در۴۲ درجه سانتی گراد در شرایط میکروآئروفیلیک غنی از Co_2 به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شوند.

تفسیر نتایج

یک محیط کشت زمانی قابل قبول می باشد که با همه سویه های آزمون پیشنهادی برای محیط کشت در جدول ۲- ۴ ، رشد کافی داشته و خصوصیات رشد و مورفولوژی کلنی ها بارز باشد. در محیط های انتخابی، رشد بعضی از ارگانیسمهای خاص مهار می شود، در ضمن اینکه اجازه رشد کافی به ارگانیسم های دیگر می دهد. در بعضی موارد واکنشهای رنگی خاص یا همولیز همچنانکه در جدول ۲-۴ آمده است باید ایجاد شود.

جدول شماره ۲-۴ کنترل کیفیت محیطهای کشت باکتریولوژیک متداول

محیط کشت	شرایط ومدت زمان انکوباسیون	ارگانیسم های کنترل	نتایج مورد انتظار
ژلوزخون دار Sheep Blood Agar	هوازی و یا CO2 ۱۸-۲۴ ساعت دمای ۳۵° C	استرپتوکوکوس پایوژن ۱۹۶۱۵	رشد همولیز بتا
		استرپتوکوکوس پنومونیه ۶۳۰۵	رشد همولیز آلفا
		استافیلوکوکوس اورئوس۲۵۹۲۳	رشد
		اشریشیا کولی۲۵۹۲۲	رشد
شکلات آگار	CO2 ۴۸ و ۲۴ ساعت دمای ۳۵° C	نیسریا گونوره آ ۴۳۰۶۹	رشد
		هموفیلوس آنفلوانزا ۱۰۲۱۱	رشد

محیط غنی کننده برای باسیلهای انتریک (GN)broth	هوازی ۲۴-۱۸ ساعت دمای C ۳۵°	سالمونلا تیفی موریوم ۱۴۰۲۸	رشد پس از کشت مجدد
		شیگلا سونئی ۹۲۹۰	رشد پس از کشت مجدد، ممکن است بوسیله محیط سلنیت مهار شود
		اشریشیا کولی۲۵۹۲۲	مهار (نسبی - کامل) پس از کشت مجدد - رشد پس از کشت مجدد از GN Broth
ائوزین متیلن بلو EMB	هوازی ۲۴-۱۸ ساعت دمای C ۳۵°	سالمونلا تایفی موریوم ۱۴۰۲۸	رشد، کلنی های بیرنگ تاکهربایی
		اشریشیا کولی۲۵۹۲۲	رشد، کلنی های آبی-سیاه، جلای سبز فلزی
		انتروکوکوس فکالیس ۲۹۲۱۲	عدم رشد (رشد جزئی)
هکتون انتریک آگار HE	هوازی ۲۴-۱۸ ساعت دمای C ۳۵°	سالمونلا تایفی موریوم ۱۴۰۲۸	رشد، کلنی های آبی تا آبی متمایل به سبز با مرکز سیاه
		شیگلا فلکسنری ۱۲۰۲۲	رشد و کلنی های سبزتا سبز متمایل به آبی با مرکز سیاهرنگ
		انتروکوکوس فکالیس ۲۹۲۱۲	مهار نسبی رشد، کلنی های زرد
		اشریشیا کولی۲۵۹۲۲	مهار رشد کامل و یا نسبی، در صورت رشد، کلنی برنگ زرد تا صورتی مایل به نارنجی
مکانکی آگار	هوازی ۲۴-۱۸ ساعت دمای C ۳۵°	اشریشیا کولی ۲۵۹۲۲	رشد، کلنی های صورتی
		پروتئوس میرابیلیس ۱۲۴۵۳	رشد، کلنی های بیرنگ، ممانعت از سوارمینگ (تا اندازه ای)
		سالمونلا تایفی موریوم ۱۴۰۲۸	رشد، کلنی های بیرنگ
		انتروکوکوس فکالیس۲۹۲۱۲	مهار رشد نسبی

مانیتول سالت آگار	هوازی ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت دمای C ۳۵°	استافیلوکوکوس اورئوس ۲۵۹۲۳	رشدکلنی های با هالهٔ زرد پس از ۴۸ ساعت
		استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس۱۲۲۲۸	رشد کلنی های با هالهٔ قرمز رنگ پس از ۴۸ساعت
		پروتئوس میرابیلیس ۱۲۴۵۳	عدم رشد (نسبی)
سالمونلا شیگلا آگار	هوازی ۲۴ ساعت دمای C ۳۵°	سالمونلا تایفی موریوم ۱۴۰۲۸	رشد،کلنی های بیرنگ با و یا بدون رنگ سیاه در مرکز
		شیگلا فلکسنری۱۲۰۲۲	رشد، کلنی‌های بیرنگ
		انتروکوک فکالیس۲۹۲۱۲	مهار رشد (کامل)
		اشریشیا کولی۲۵۹۲۲	مهار رشد (کامل و یا نسبی، در صورت رشد کلنی های صورتی تا قرمز گل سرخ همراه با رسوب)
تیو گلیکولات با و یا بدون معرف	هوازی ۴۸ ساعت (درپوش محکم شده) دمای C ۳۵°	باکتروئیدوس فراژیلیس۲۵۲۸۵	رشد
		استافیلوکوکوس اورئوس۲۵۹۲۳	رشد
محیط کشت های لوله‌ای مانند BHI و TSB	هوازی ۲۴-۴۸ ساعت دمای C ۳۵°	اشریشیا کولی ۲۵۹۲۲	رشد
		استافیلوکوکوس اورئوس ۲۵۹۲۳	رشد
زایلوز لیزین دکربوکسیلاز XLD	هوازی ۲۴ ساعت دمای C ۳۵°	سالمونلا تایفی موریوم ۱۴۰۲۸	رشد- کلنی های قرمز- مرکز سیاه
		شیگلا فلکسنری۱۲۰۲۲	رشد-کلنی های قرمز
		انتروکوک فکالیس ۲۹۲۱۲	مهار رشد (نسبی)
		اشریشیا کولی ۲۵۹۲۲	مهار رشد (نسبی تا کامل- کلنی های زرد تا قرمز متمایل به زرد)

تهیه کدورت نیم‌مک‌فارلند

برای استاندارد کردن غلظت سوسپانسیون تلقیحی برای آزمایش تعیین حساسیت، باید از استاندارد سولفات باریم (BaSo4) که برای تهیه آن به روش زیر عمل می‌شود ، استفاده نمود.

۰/۵ میلی‌لیتر از کلرور باریم (1.175% W/V $Balc_2.2H_2O$) 0.048 mol/l ($Bacl_2$) را به ۹۹ /۵ میلی‌لیتراسید سولفوریک 0.18 mol/L (1% V/V) اضافه کرده و با هم زدن مداوم سوسپانسیون تهیه نمائید.

چگالی صحیح استاندارد با تعیین جذب این سوسپانسیون توسط اسپکتروفتومتر در کووت به قطر ۱ سانتی‌متر تعیین می‌شود. جذب در ۶۲۵ نانومتر باید بین ۰/۰۸ تا۰/۱۳ باشد.

از سوسپانسیون حاصله ۶-۴ میلی لیتر در لوله‌های درپیچدار هم اندازه با لوله‌های سوسپانسیون باکتریایی ریخته می‌شود.

در لوله‌ها محکم بسته شده و در دمای اتاق نگهداری می‌شوند.

قبل از هر بار استفاده ، استاندارد با ورتکس مکانیکی به شدت همزده می‌شوند تا کدورت یکنواختی بدست آید. در صورت مشاهده ذرات بزرگ ، باید استاندارد تازه‌ای جایگزین شود.

استاندارد سولفات باریم ، باید بصورت ماهانه جایگزین گردیده یا جذب آن اندازه‌گیری شود.

کنترل کیفیت دیسک های آنتی بیوتیکی جهت انجام آزمایش تعیین حساسیت میکروبی به روش *disk diffusion agar*

هدف

هدف از برنامه کنترل کیفی، پایش و ارزیابی موارد زیر می باشد :

- صحت و دقت روش انجام آزمایش تعیین حساسیت
- مواد و وسایل به کار برده شده در این آزمایش
- عملکرد افرادی که آزمایش را انجام داده و نتایج بدست آمده را قرائت می نمایند.

به منظور دست یابی بهینه به این اهداف در دسترس داشتن سویه های کنترل کیفی تهیه شده از مراکز معتبر ضروری است .

سویه های کنترل کیفی پیشنهادی توسط CLSI عبارتند از:

Enterococcus faecalis ATCC 29212
Escherichia coli ATCC 25922
Escherichia coli ATCC 35218
Haemophilus influenzae ATCC 49247
Haemophilus influenzae ATCC 49766

Klebsiella pneumoniae ATCC 700603
Neisseria gonorrhoeae ATCC 49226
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853
Staphylococcus aureus ATCC 25923
Streptococcus pneumoniae ATCC 49619

E.coli ATCC 35218 فقط به عنوان یک میکروارگانیسم کنترلی برای ترکیبات ممانعت کننده بتالاکتاماز، مثل ترکیبات حاوی کلاولانیک اسید، سولباکتام یا تازوباکتام پیشنهاد می شود .

Enterococcus faecalis ATCC 29212 (یا E.faecalis ATCC 33186) برای ارزیابی محیط مولر هینتون آگار با دیسک تری متوپریم / سولفامتوکسازول استفاده می شود. درمحیط کشت قابل قبول ، هاله عدم رشد واضحی به قطر *mm* ۲۰ یا بزرگتر ایجاد می شود در حالیکه در محیطهای کشت غیر قابل قبول ، هاله عدم رشد ایجاد نمی شود یا در داخل هاله ، رشد کم مشاهده می شود و یا هاله ای با قطر کمتر از *mm* ۲۰ ایجاد میگردد. این کار به منظور بررسی مقادیر غیر قابل قبول تیمیدین در محیط کشت مزبور است .

Enterococcus faecalis ATCC 29212 همچنین برای کنترل دیسکهای آمینو گلیکوزید با دوز بالا به کار می رود.

Klebsiella pneumoniae ATCC 700603 به عنوان یک سویه کنترلی برای آزمایشات *ESBL* به کار برده می شود .

کنترل کیفیت قطر هاله عدم رشد سویه کنترلی/ دیسک آنتی بیوتیکی

سویه های کنترل کیفی را باید به روش استاندارد آزمایش *disk diffusion* و با استفاده از همان مواد و روشی که برای سویه های جدا شده از نمونه های کلینیکی استفاده می شود آزمایش و نتایج را با جداول CLSI (ضمیمه ۳) مقایسه و بررسی نمود . محدوده قطر هاله عدم رشد قابل قبول برای هر سویه کنترلی نسبت به یک دیسک آنتی بیوتیکی در جداول فوق فهرست شده است .

چنانچه تغییر در میانگین قطر هاله عدم رشد ناشی از خطا در روش انجام آزمایش نباشد ، احتمالا" ناشی از تغییر در حساسیت ذاتی باکتری نسبت به آن آنتی بیوتیک می باشد. در این صورت لازم است کشت تازه از سوش کنترل تهیه شود .

آزمایش کنترل کیفیت را باید درچه فواصل زمانی انجام داد ؟

الف _ انجام آزمایش روزانه

برای هر سویه کنترلی با یک دیسک آنتی بیوتیکی باید ۳۰ روز متوالی آزمایش تعیین حساسیت انجام و نتایج با مقادیر قابل قبول اشاره شده در جداول فوق مقایسه گردد. چنانچه بیشتر از ۳ مورد خارج از محدوده کنترل باشد نیاز به اقدامات اصلاحی خواهد بود ، که در ادامه توضیح داده می شود.

ب _ انجام آزمایش هفتگی

- آزمایش را برای ۲۰، یا ۳۰ روز متوالی انجام دهید. در صورتیکه تنها یک مورد از ۲۰ و یا حداکثر ۳ مورد از ۳۰ نتیجه قطر هاله عدم رشد برای هر سویه کنترلی/ دیسک آنتی بیوتیکی خارج از محدوده قابل قبول مندرج در جداول قرار گیرد ، کنترل کیفی روزانه را به هفتگی تغییر دهید.

- آزمایش کنترل کیفی هفتگی را یکبار در هفته و هم چنین زمانیکه یکی از عوامل آزمایش (مانند سری ساخت آگار یا دیسکهای تهیه شده از یک سازنده) تغییر کند، انجام دهید .

اگر هر یک از نتایج کنترل کیفی هفتگی، خارج از محدوده قابل قبول باشد ، انجام اقدامات اصلاحی مورد نیاز است .

اگر دیسک جدیدی خریداری شده یا محیط مولرهنتیون آگار از سازنده دیگری تهیه گردیده قبل از ورود به برنامهٔ هفتگی می بایستی بر اساس برنامهٔ ۲۰ یا ۳۰ روزه مورد کنترل کیفی قرار بگیرد.

اقدامات اصلاحی (Corrective actions)

الف _ نتایج خارج از محدوده قابل قبول به دلیل خطاهای مشهود و واضح شامل:

- استفاده از دیسک اشتباه
- استفاده از سویه کنترلی اشتباه
- آلودگی واضح سویه
- استفاده غیرعمدی از دما و شرایط اشتباه انکوباسیون

دراین حال باید دلیل ایجاد خطا ، مکتوب و پس از اصلاح آزمایش ، دوباره تکرار شود . اگر نتایج گزارش شده در محدوده مورد نظر قرار گرفت ، عملیات اصلاحی بیشتری مورد نیاز نمی باشد .

ب _ عامل ایجاد نتایج خارج از محدوده کنترل نامشخص است. در این حال باید اقدامات اصلاحی فوری بشرح زیر انجام شود.

- آزمایش را جهت یک سویه کنترلی / دیسک آنتی بیوتیکی ، برای ۵ روز متوالی تکرار و همه نتایج را ثبت کنید .
- اگر اندازه هر ۵ قطرهاله مطابق جداول و در محدوده قابل قبول باشد ، عملیات اصلاحی بیشتری مورد نیاز نمی باشد .
- اگر اندازه هر یک از ۵ قطر هاله عدم رشد ، خارج از محدوده قابل قبول باشد ، به عملیات اصلاحی اضافی نیاز است .
- آزمایشهای کنترلی روزانه باید ادامه داده شود تا به دلیل نهایی مشکل پی برده شود .

عملیات اصلاحی اضافی

وقتی عملیات اصلاحی فوری مشکل را حل نکرد ، احتمالا" خطای مشاهده شده بعلت بروز یک اشکال کلی در سیستم و نه یک خطای تصادفی ایجاد شده است . در این حالت باید موارد بیشتری بررسی شوند.مانند:

- اندازه گیری و ثبت صحیح قطر هاله های عدم رشد
- رعایت تاریخ انقضا و شرایط نگهداری دیسکها و مواد مورد استفاده (دور از رطوبت و در دمای مناسب)
- رعایت تاریخ انقضا و شرایط نگهداری تور بیدیتی نیم مک فارلند (در محل تاریک و حرارت اتاق) و تکان دادن قبل از مقایسه با سوسپانسیون میکروبی
- مناسب بودن دما و اتمسفر انکوباتور
- تغییرنیافتن یا آلوده نبودن سویه های کنترل
- مطابقت صحیح سوسپانسیون تلقیح با استاندارد نیم مک فارلند
- استفاده از پلیت کشت تازه برای تلقیح (پلیت کشت باید تازه بوده و مدت زمان انکوباسیون آن بیشتر از ۲۴ ساعت ، نباشد.)

وقتی مشکل بر طرف شد ، می‌توان کنترل کیفی هفتگی را برقرار کرد.

جوابدهی نتایج بیماران زمانی که نتایج کنترل کیفیت خارج از محدودهٔ قابل قبول است: اگر به نظر می رسد که منبع خطا نتایج آنتی بیوگرام با دیسک مورد نظر و باکتری استخراج شده از بیمار را متأثر خواهد کرد ، نتایج آنتی بیوگرام با دیسک فوق قابل گزارش نمی باشد . در این شرایط نتایج قبلی آنتی بیوگرام برای باکتری جدا شده از همین بیمار را مورد بررسی قرار دهید. در صورت لزوم باکتری را جهت تشخیص به یک آزمایشگاه ارسال نمائید.

نگهداری دیسکهای آنتی بیوتیکی

- دیسکها باید در یخچال$^{\circ}C$ ۸ و پایین تر ، یا در فریزر$^{\circ}C$ ۱۴- و پایین تر تا زمان مصرف نگهداری شوند.

- تمامی دیسکهای گروه بتالاکتام مانند پنی سیلین ، آمپی سیلین ، کربنی سیلین ، تیکارسیلین ، اگزاسیلین و نسل اول ، دوم و سوم سفالوسپورین ها و ... باید در فریزر نگهداری شوند ، و فقط می توان مقداری از آنها را بر اساس کار روزانه آزمایشگاه ، حداکثر به مدت یک هفته در یخچال نگهداری نمود .

- بعضی آنتی بیوتیکهای حساس مثل ایمیپنم ، سفاکلر و ترکیبات حاوی کلاولانیک اسید یا سولباکتام اگر تا هنگام مصرف در فریزر نگهداری شوند ، پایداری بیشتری خواهند داشت .

- دیسکها باید در ظروف دارای درپوش محکم و حاوی مواد جاذب رطوبت نگهداری شوند .

- ظروف حاوی دیسکهای آنتی بیوتیکی باید یک تا دو ساعت قبل از استفاده ، از یخچال یا فریزر خارج شوند تا به درجه حرارت اتاق برسند .

روش تعیین حجم لوپ

برای شمارش کلنی‌های بدست آمده از کشت نمونه‌های بالینی بویژه ادرار به منظور تشخیص عفونت لازم است از لوپهای استاندارد با حجم معین استفاده شود. آزمایشگاه می‌بایست همواره از لوپهای کالیبره جهت کشت نمونه‌های ادراری استفاده وتعداد کلنی‌های موجود در هر میلی‌لیتر ادرار (CFU/ml) را گزارش نماید.

برای بررسی حجم لوپ از روشهایی مانند رنگ‌سنجی و توزین استفاده می‌شود. ساده ترین روش برای بررسی حجم لوپ استفاده از روش رنگ‌سنجی از طریق اسپکتروفتومتر یا فتومتر به کمک مواد رنگی مانند متیلن بلو ، کریستال ویوله و اوانس بلو می‌باشد. در این دستورالعمل روش رنگ‌سنجی با استفاده از اوانس بلو توضیح داده شده است.

ابزار و مواد مورد نیاز تعیین حجم لوپ با استفاده از ماده رنگی اوانس بلو

۱- پودر اوانس بلو (Evans Blue) .این ماده به صورت پودر تجاری قابل‌دسترس بوده و به آسانی در آب حل می‌شود.

۲- آب مقطر

۳- لوله آزمایش

۴- پیپت یا سمپلر

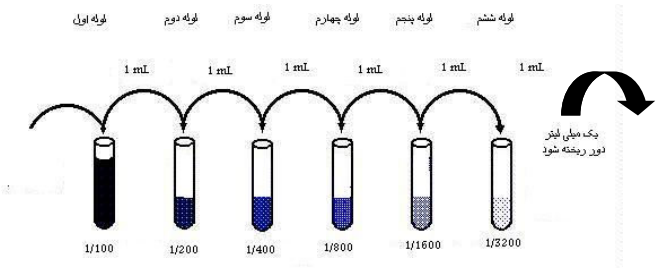
۵- اسپکتروفتومتر یا فتومتر کالیبره

۶- کاغذ میلیمتری

روش انجام

۱- 20mg از پودر رنگی اوانس بلو را در ۱۰ میلی لیترآب حل نمایید. غلظت این محلول 0.2g/100 می‌باشد.

۲- ۶ لوله آزمایش انتخاب کرده ، در لوله اول 2ml ودر هر یک از لوله‌های باقیمانده 1ml آب مقطر بریزید. 20 لاندا (0.02 ml) از محلول ذخیره اولیه (0.2g/100) برداشته در لوله اول ریخته و کاملا مخلوط نمایید. سپس 1ml از لوله اول برداشته و در لوله دوم بریزید ، از لوله دوم ، در لوله سوم و این عمل را تا آخر ادامه دهید. در انتها یک میلی لیتر از لوله ششم را برداشته و دور بریزید . به این ترتیب ۶ محلول خواهید داشت که رقت نهایی بدست آمده در هر یک و میزان ماده رنگی موجود در آن بشرح زیر خواهد بود.



20λ **از محلول ذخیره** 0.2g/100 **رقت**

مقدار ماده رنگی	10λ	5 λ	2.5λ	1.25λ	0.625λ	0.3125λ

۳- میزان جذب نوری (OD) هر یک از۶ محلول حاصله را به کمک اسپکتروفتومتر در طول موج 620nm بدست آورید.

۴-جهت تعیین حجم لوپ مورد بررسی ، ۱۰ لوله آزمایش برداشته و در هر یک ۱ میلی‌لیتر آب مقطر بریزید.

۵- لوپ تحت کنترل را بطور کاملا عمودی وارد محلول ذخیره اولیه نموده ، از محلول رنگی برداشته و در لوله‌های آزمایش فرو برید . این کار را ۱۰ بار تکرار و در فواصل لوپ را روی کاغذ خشک کن قرار دهید تا کاملا خشک شود. از سوزاندن لوپ خودداری نمایید.

۶- بعد از مخلوط کردن ، جذب هریک از لوله‌ها را در طول موج 620nm قرائت نمائید.

۷-بر روی کاغذ میلی‌متری نموداری ترسیم نمایید که در آن ، محور افقی نشانگر رقتهای تهیه شده و محور عمودی نمایانگر جذب نوری هر رقت باشد.

۸-با قرار دادن میانگین جذب بدست آمده از لوپ کنترلی، روی محور عمودی می‌توان ضریب رقت لوپ کنترلی را از روی محور افقی بدست آورد.

جهت تعیین تعداد کلنی در هر میلی‌لیتر ادرار ، باید تعداد کلنی‌های بدست آمده از کشت روی پلیت را در عکس ضریب رقت لوپ ، ضرب کرد. بطور مثال اگر ضریب رقت لوپ مجهول ۱/۱۰۰ و تعداد کلنی‌های روی پلیت ۵۰۰ عدد باشد ، باید ۵۰۰ را در ۱۰۰ ضرب و نتیجه را بصورت cfu/ml ۵۰/۰۰۰ گزارش نمود.

روشهای دیگری نیز برای بررسی میزان حجم برداشتی توسط لوپ باکتریولوژی وجود دارد که از بین آنها می‌توان به روش توزینی مندرج در کتاب

Elmer W.koneman, Color Atlas and text book of Diagnostic microbiology, 5th edition, Wiliams & Wilkins 1996, page 96

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 می‌گردد.

اتوکلاو

اگر چه اتوکلاو بهترین وسیله برای استریلیزاسیون است، باید تصدیق کنیم که طولانی شدن مرحلهٔ گرمایی، سبب کاهش کیفیت مواد مغذی در محیط های کشت کمپلکس محتوی قند، مواد معدنی و فلزی می شود و در نتیجه به محیط های کشت زیان وارد می کند. بنابراین در چرخهٔ استریلیزاسیون باید از زمان کوتاهتر و دمای بالاتر استفاده کنیم تا علاوه بر آنکه آسیب کمتری به محیط کشت وارد می شود، برای میکرو ارگانیسم نیز کشنده تر باشد.

چرخهٔ استریلیزاسیون

- مرحلهٔ ۱ : زمان بالا رفتن دما در محفظهٔ اتوکلاو (۲۰ °C-۱۲۱°C)
- مرحلهٔ ۲ : زمان نفوذ گرما به داخل ظرف محیط کشت (<۱۰۰°C -۱۲۱°C)
- مرحلهٔ ۳ : زمان نگهداری در دمای مقرر (۱۲۱°C)
- مرحلهٔ ۴ : زمان پایین آمدن دمای محفظه (۸۰°C-۱۲۱°C)

انواع استریلیزاسیون

- استریلیزاسیون محیط های کشت و محلول ها
- استریلیزاسیون مواد مصرفی آلوده
- استریلیزاسیون مواد خشک بسته بندی شده

استریلیزاسیون محیط های کشت و محلولها

- بهتر است از لوله و ارلن درپیچ دار استفاده شود. بیشتر از ۲/۳ آنها را پر نکنید. درپیچ آنها را شل کنید.
- از قرار دادن اشیاء بر روی یکدیگر بپرهیزید. باید فاصلهٔ اشیاء از یکدیگر و از دیواره های اتوکلاو حداقل ۵ سانتی متر باشد تا بخار جریان یابد.
- درب اتوکلاو را ببندید. زمان و دما را طبق دستور شرکت سازنده (معمولاً ۱۵ دقیقه در ۱۲۱°C) تنظیم کنید.
- زمان لازم برای رسیدن به دمای استریلیزاسیون بایستی تا حد امکان کوتاه باشد.
- چرخهٔ استریلیزاسیون باید متناسب با زمان نفوذ گرما در نظر گرفته شود. برای مثال محتویات یک ظرف یک لیتری محیط کشت باید طی ۱۵ دقیقه از زمان رسیدن محفظه به دمای ۱۲۱°C، به این دما برسد.

استریلیزاسیون مواد مصرفی آلوده

- مواد مصرفی آلوده را جدا نموده و در کیسه های قابل اتوکلاو شدن قرار دهیدو بر روی آنها برچسب Biohazard نصب کنید.
- برای اطمینان از نفوذ بخار به همهٔ قسمتهای کیسه، گرهٔ آنرا شل کرده یا قبل از محکم کردن گره، یک پیمانه (۰/۳ لیتر) آب به آن اضافه کنید. بیش از ۳/۴ کیسه را پر نکنید.
- برای جلوگیری از مسدود شدن آبگذر اتاقک اتوکلاو توسط آگار مذاب، کیسه ها را داخل سطل قرار دهید.
- زمان لازم برای استریلیزاسیون زباله، ۶۰-۳۰ دقیقه در ۱۲۱°Cیا ۳۰-۱۵ دقیقه در ۱۳۴ °Cمی باشد.
- وقتی آگار ذوب شده، سفت شد آنرا مثل زبالهٔ عادی دور بریزید. اما محیط کشت محتوی سلنیت را باید بصورت زبالهٔ مخصوص منهدم کنید.

استریلیزاسیون مواد خشک بسته بندی شده

- بسته ها را طوری در اتوکلاو قرار دهید که حداکثر چرخش بخار در بین آنها ایجاد شود و با دیواره های اتوکلاو نیز تماسی نداشته باشند.
- زمان لازم برای استریلیزاسیون مواد خشک بسته بندی شده ، ۲۵ دقیقه با خروج سریع بخار یا ۳۰ دقیقه بدون خروج بخار در دمای $121^{\circ}C$ می باشد.

نحوهٔ نگهداری

- روزانه: صفحهٔ کف اتوکلاو را از سوراخ آبگذر اتاقک جدا کرده، تمیز کنید. لوازم فرعی مثل طبقات و سینی ها را با آب و صابون بشویید. سطح آب ژنراتور را کنترل کنید.
- هفتگی: آبگذر و درزها را تمیز کنید. سوپاپ اطمینان را بررسی کنید.
- ماهانه: آب دستگاه را تعویض نمایید.
- هر ۳ ماه: داخل و خارج دستگاه و قسمت بیرونی آبگذر را تمیز کنید.
- هر ۶ ماه: دستگاه توسط شرکت پشتیبان، بازرسی شود.

کنترل کیفیت

تست شیمیایی

– نوار کاغذی TST: سه عامل زمان، بخار و دما را کنترل می کند و از زرد به بنفش تغییر رنگ می دهد. در هر سری کاری از این نوار استفاده کنید.

– برچسب Sterility-Record: علاوه بر سنجش استریلیتی، امکان ثبت تاریخ استریلیزاسیون، نام فرد استریل کننده و نام محیط کشت بر روی این برچسب وجود دارد. در هر سری کاری از این برچسب استفاده کنید.

تست بیولوژیک

استفاده از ویال حاوی اسپور باسیلوس استئاروترموفیلوس ATCC 7953 بطور هفتگی توصیه می شود.

ایمنی

- از دستکش مقاوم به حرارت و محافظ چشم استفاده کنید.
- بعد از آنکه فشار اتاقک اتوکلاو به صفر و دمای آن به حدود ۶۰ °C رسید کنار درب اتوکلاو بایستید و آنرا باز کنید. منتظر بمانید تا ظروف کمی خنک شوند، سپس آنها را حمل کنید.
- هرگز در هنگام روشن بودن دستگاه اقدام به بارگذاری یا خارج نمودن وسایل و مواد ننمایید.
- هرگز در هنگام روشن بودن دستگاه و اتصال آن به پریز اقدام به تمیز نمودن آن نکنید.
- هرگز پیچ های محکم کنندهٔ درب را در هنگام کار دستگاه شل و سفت نکنید.

فور(اون)

اون برای استریل کردن موادی که نمی توانند بطور کامل تحت نفوذ بخار قرار گیرند، اما می توانند دمای بالای مورد نیاز مثل ۱۸۰°C - ۱۶۰ را تحمل کنند، به کار می رود. اون بویژه برای ظروف شیشه ای مثل لوله آزمایش، پتری دیش، پی پت و نیز برای آلات فلزی مثل پنس، اسکالپل و قیچی به کار می رود.

اون باید دارای فن (جهت چرخش هوای متراکم در سراسر اتاقک)، نشانگر درجه حرارت، ترموستات و تایمر، طبقات مشبک، قفل داخلی درب و عایق بندی مناسب جداره ها باشد.

استریلیزاسیون در اون

۱- برای بسته بندی وسایل فوق‌الذکر جهت استریل نمودن آنها در اون ، میتوان از فویل آلومینیومی یا کاغذ کرافت و سربطریهای پنبه ای استفاده نمود.

۲- باید دقت شود که کاغذ و پنبه نسوزند چون پنبهٔ نیم سوز مواد ضد باکتری فرّاری را متصاعد می کند.

۳- حدود ۲ سانتی متر از انتهای فوقانی پی پتها را با پنبهٔ غیر جاذب بسته و آنها را در ظروف فلزی قرار داده، درب آنها را ببندید.

۴- درپوش لوله های آزمایش را با کاغذ آلومینیومی پوشانده و آنها را بطور عمودی در جا لوله ای قرار دهید. درپوش، لبهٔ لوله را از آلودگی از طریق هوا در طی ذخیره سازی حفظ می کند.

۵- در صورتی می توان بطری های درپیچ دار را در اون استریل نمود که درپوش و آستری آنها از موادی مثل فلز، پلی‌پروپیلن یا لاستیک سیلیکون ساخته شده باشد تا در دمای استریلیزاسیون از شکل طبیعی خارج نشود.

۶- پودر، روغن، چربی و گریس مثل Petroleum Jelly را در ظروف شیشه ای یا فلزی ودر اندازه های کوچک که از وزن ۱۰ گرم یا عمق یک سانتی متر تجاوز نکند، استریل نمایید.

۷- قبل از قرار دادن ظروف شیشه ای در اون، از خشک بودن آنها مطمئن شوید. مواد را به گونه ای در اون قرار دهید که هوای داغ در اطراف و مابین آنها در جریان باشد.

۸- زمان نگهداری استریلیزاسیون از زمانی آغاز می شود که اتاقک به دمای استریل انتخابی برسد بهتر است مدت زیادتری در نظر گرفته شود تا همهٔ قسمتهای اتاقک و مواد داخل آن به دمای مورد نظر برسند($۱۶۰-۱۸۰^{\circ}C$ به مدت ۲ ساعت).

۹- به دلیل عایق بودن دستگاه، چند ساعت طول می کشد تا اشیاء داخل آن خنک شوند، مگر آنکه مجهز به فن باشد. درب اون را تا زمانی که اتاقک، ظروف و مواد داخل آن تا دمای حدود $۶۰^{\circ}C$ خنک شوند باز نکنید. اگر هوای سرد ناگهان وارد دستگاه شود ممکن است ظروف شیشه ای ترک بخورند.

نحوهٔ نگهداری

بطور ماهانه داخل آن تمیز وهر ۶ ماه توسط شرکت پشتیبان، بازرسی شود.

کنترل کیفیت

تست شیمیایی: ویال شیشه ای Browne و مشاهدهٔ تغییر رنگ مناسب از قرمز به سبز. از این ویال در هرسری کاری استفاده کنید.

تست بیولوژیک: استفاده از نوار کاغذی حاوی اسپور باسیلوس سوبتیلیس واریتهٔ نایجر ATCC 9372 بطور هفتگی توصیه می شود.

ایمنی

استفاده از دستکش مقاوم به حرارت و محافظ چشم.

انکوباتور

انکوباتور محفظه عایق بندی شده ایست که برای نگهداری دما و رطوبت کنترل شده محیط برای رشد میکروارگانیسم ها بکار می رود . بعضی انکوباتورها برای نگهداری میزان دلخواه از CO_2 برای میکروارگانیسم هایی که دی اکسید کربن دوست (Capnophilic) هستند ، تجهیز شده اند .

الف _ انکوباتورهای بدون CO_2 :

- تنظیم کننده دما را روی دمای مورد نظر قرار دهید.
- وقتی درجه حرارت به دمای مورد نظر رسید ، دما را در هر روزکاری که از انکوباتور استفاده می‌شود، روی برگه QC ثبت کنید.
- نمونه ها را به طور ایمن روی سینی ها یا قفسه ها قرار دهید .
- می توانید با قراردادن یک تشتک پر از آب متناسب با اندازه اتاقک در کف انکوباتور ، محیط مرطوب ایجاد نمایید .

ب _ انکوباتورهای CO_2 دار :

- سطح دما و CO_2 را در برگه QC در هر روز استفاده ثبت کنید .

نکته :

در صورت اتمام کپسول گاز CO_2 ، تا زمان شارژ مجدد آن می توان از جار محتوی شمع جهت انکوباسیون نمونه های نیازمند CO_2 استفاده کرد

نحوه نگهداری

- همه انکوباتورها باید به طورماهانه با محلول صابون ملایم تمیز شوند .
- به منظور رعایت موارد ایمنی ، کپسولهای CO_2 باید به صورت ایستاده با زنجیر سنگین به دیوار محکم شوند. زمانیکه از سیلندرها استفاده نمی شود ، سوپاپها و درپوشها باید ، به طور محکم بسته شوند . سیلندرهای خالی را روی حمل کننده سیلندر گازبه طور محکم با زنجیر نگهداری کنید . هرگز سیلندرهای گاز را در دمای بالاتر از (۵۲^{O}C) ۱۲۵^{O}F نگهداری نکنید . سیلندرها را در وضعیت افقی قرار ندهید .

الف _ انکوباتورهای بدون CO_2 :

زمانیکه دمای انکوباتور خارج از محدوده قابل قبول برای واحد مورد نظر باشد ، می بایستی اقدامات اصلاحی مطابق موارد ذیل انجام شود :

- منبع برق ، پریز برق و کلید های روشن، خاموش را بررسی کنید .
- دمای تنظیمی (Set Point) را بررسی کنید .
- اگر دستگاه هنوز درست کار نمی کند ، به شرکت پشتیبان اطلاع دهید .

ب _ انکوباتورهای CO_2 دار :

یک کشت از نیسریا گونوره در انکوباتور قرار دهید . هر روز آن را پاساژ داده و رشدش را بررسی نمایید . این میکرو ارگانیسم به CO_2 ، نیاز کامل دارد .

نکات مهم کنترل کیفیت در آزمایشهای انگل‌شناسی

برای اطمینان از درستی آزمایشهای انگل‌شناسی باید مراحل جمع‌آوری نمونه ، آماده‌سازی، نگهداری معرفها و ارائه گزارش نهایی تحت کنترل بوده و آزمایش به روش استاندارد انجام شود. برای دستیابی به موارد ذکر شده رعایت نکات ذیل ضروری می‌باشد :

- مراحل جمع‌آوری نمونه باید به روش استاندارد انجام شود.
- انجام آزمایش کامل مدفوع و گزارش کامل از نظر رنگ، قوام، خون، موکوس، غذای هضم نشده ، WBC، RBC و...ضروری می‌باشد.
- کیفیت معرفها باید در موقع استفاده یا بصورت هفتگی بررسی گردد. محلولها باید عاری از هر گونه آلودگی باکتریایی یا قارچی باشند.
- محلول ید به رنگ چای پررنگ بوده و در صورت کمرنگ شدن باید دور ریخته شود.

برای کنترل کیفیت محلول ید می‌بایست نمونه مدفوع حاوی گلبول سفید و عاری از انگل را با محلول ید مورد آزمون، رنگ‌آمیزی نمود. اگر گلبولهای سفید توانایی جذب رنگ ید را داشته باشند، تک‌یاخته‌ها نیز قادر به جذب محلول ید خواهند بود. در رنگ آمیزی با محلول ید، سیتوپلاسم تک‌یاخته باید به رنگ زرد طلایی و مواد نشاسته‌ای به رنگ قهوه‌ای و کروماتین هسته به رنگ قهوه‌ای روشن تا تیره مشاهده شود.

- جهت کنترل کیفیت آزمایش تغلیظ با فرمالین- اتیل استات (اتر) و روش سولفات روی باید به نکات زیر توجه داشت :

۱. برداشت نمونه از قسمتهای مناسب مدفوع (قسمتهای حاوی موکوس ، خون ، ...) انجام پذیرد.
۲. مواد و محلولها به‌روش استاندارد تهیه شوند.
۳. سرعت و زمان سانتریفوژ رعایت شود.
۴. گسترش با غلظت مناسب تهیه شود.
۵. لوله محتوی رسوب تا پایان مراحل انجام آزمایش و گزارش نهایی نگهداری شود.

معرفهای مورد استفاده باید در زمان آزمایش، بررسی گردند. محلول سرم فیزیولوژی ، سولفات روی و فرمالین باید شفاف و بدون آلودگی مرئی باشند.

برای کنترل کیفیت آزمایش تغلیظ، باید نمونه‌های مثبت شناخته شده تغلیظ و کیفیت مطلوب ارگانیسمها بررسی گردد. این اقدام می‌بایست حداقل هر سه ماه (خصوصا پس از کنترل سرعت سانتریفوژ) انجام پذیرد.

وزن مخصوص سولفات روی ، باید بطور ماهانه بررسی شود. وزن مخصوص در نمونه‌های تازه ۱/۱۸و در نمونه‌های نگهداری شده در فرمالین ۱/۲۰ می‌باشد. در غیر اینصورت با اضافه کردن سولفات روی یا آب مقطر تنظیم می‌شود. در صورت خرید سولفات روی، باید نمونه‌های شناخته شده حاوی انگل ، مورد آزمایش قرار گرفته و کیفیت مطلوب انگلها بررسی گردد.

- در مرحله گزارش نهایی باید تمامی سطح لامل با عدسی با بزرگنمایی ۱۰* بررسی گردد. در صورت عدم مشاهده مورد مشکوک در بزرگنمایی ۱۰* ، حداقل ۱/۳ لام با بزرگنمایی ۴۰* بررسی گردد.

از آنجائیکه تک‌یاخته‌ها باعث انعکاس نور می‌شوند، نباید برای بررسی، از نور زیاد استفاده شود.

توجه :نظر به اهمیت کیفیت عملکرد سانتریفوژ و میکروسکوپ در آزمایشهای انگل‌شناسی باید به نگهداری و کنترل کیفیت این تجهیزات توجه ویژه داشت.