

بسمه تعالی			
شماره سند فرم: DI-LA-11		❖ عنوان سند : کنترل کیفی در آزمایشگاه میکروب شناسی ❖ نوع سند: دستورالعمل	
تاریخ بازنگری:	تاریخ ابلاغ :	تعداد صفحات	دامنه کاربرد:
_____	مهر ۱۴۰۳	۸	پرسنل واحد آزمایشگاه
هدف : تضمین کیفیت تست های میکروب شناسی			
تعاریف:			

بسمه تعالی

کنترل کیفی در آزمایشگاه میکروب شناسی شامل دو بخش است:

۱- کنترل وسایل و تجهیزات

۲- کنترل محیط و محلول ها

۱) کنترل وسایل

۱-۱) کنترل و روش کار با اتوکلاو به شرح زیر میباشد:

الف: روش کار با اتوکلاو به شرح زیر میباشد:

طریقه استفاده از اتوکلاو ۷۵ لیتری شرکت کاووش مگا

طریقه اتصال به برق شهری

پس از حصول اطمینان از برق شهر سیم دوشاخه دستگاه را به پریز وصل نمایید . اتوکلاو شما با برق ۲۲۰ ولت و فرکانس ۵۰ هرتز کار می کند و نوسانات بر ۱۸۰ تا ۲۲۰ ولت هیچ مشکلی در کارکرد اتوکلاو ایجاد نخواهد کرد . اگر تغییرات ولتاژ بیش از حد فوق - این سند بدون وجود همه صفحات فاقد ارزش می باشد ۱

باشد بایستی حتماً از یک ترانسفورماتور مناسب استفاده نمایید . باید توجه داشته باشید که در سیم کشی مربوط به دستگاه حداقل از سیم الکتریکی به قطر ۲ میلی متر استفاده شود .

طریقه باز و بسته کردن درب اتوکلاو

- ۱- برای باز و بسته کردن اتوکلاو ابتدا ۳ عدد برای اتوکلاو ۱۰ لیتری ، ۵ عدد برای اتوکلاو ۲۵ لیتری و ۷ عدد برای اتوکلاو ۵۰ و ۷۵ لیتری فلکه متحرک را باز کنید سپس فلکه ثابت با پولک قرمز رنگ را به اندازه ای باز کنید تا درب بالا آمده و به اندازه ۵/۱ تا ۲ سانتیمتر از دهنه اتوکلاو فاصله بگیرد .
- ۲- برای بستن درب اتوکلاو ابتدا فلکه ثابت با پولک قرمز رنگ (لولا) را ببندید تا اندازه ای که بر روی دهنه اتوکلاو بنشیند سپس بقیه فلکه ها را جا بزنید و ببندید .

طریقه آبیگری

ابتدا درب دستگاه را باز نمایید سینی دستگاه را بیرون آورده و سپس تا لبه پلیت max درون دستگاه آب بریزید سپس سینی را درون دستگاه قرار داده و وسایل را درون اتوکلاو بگذارید و سپس درب دستگاه را ببندید . اگر دستگاه به اندازه کافی آب نداشته باشد بر روی صفحه نمایشگر ۱-error دیده می شود و LED مربوط به آب WATER خاموش است . در صورتیکه آب کافی باشد LED مربوط به آب WATER روشن خواهد بود.

طریقه استفاده

در این زمان اتوکلاو به اندازه کافی آبیگری شده و شما می توانید مطابق توضیحات ذیل مدت زمان استریل را تنظیم کرده و استفاده نمایید . (قابل ذکر است که برنامه های تنظیم شده بر روی اتوکلاو و جواب کار شما را می دهد) ابتدا کلید ON/OFF را ON کنید . در این حالت چون دستگاه به اندازه کافی آبیگری شده LED مربوط به آب روشن شده و بر روی صفحه نمایشگر ، دمای داخلی دستگاه نمایان می شود . در این وضعیت برنامه های تنظیم شده بر روی برد الکترونیکی دستگاه ادامه مراحل را به صورت خودکار انجام می دهد. فقط کلید Start را فشار دهید تا دستگاه شروع به کار نماید در صورتی که نیاز به تغییر زمان استریل داشتید به صورت زیر عمل نمایید : ابتدا کلید POWER را در حالت روشن قرار دهید ، کلید SET را بزنید تا صفحه نمایشگر به صورت ۱۵:۰۰ درآید . با زدن یکبار دیگر کلید SET دقیقه را می توانید با کلید های UP/DOWN تنظیم نمایید . پس از تنظیم تایم مورد نظر کلید SET را ۳ بار فشار می دهید تا نمایشگر به حالت دما بازگردد و آماده START شود و مدت تایم در حافظه ذخیره گردد. بعد از تنظیم برنامه های موردنظر کلید START را فشار دهید ابتدا نمایشگر به صورت — در می آید و سپس المنت دستگاه شروع به کار می نماید ، در حال روشن بودن اتوکلاو چراغهای HEATER و WATER روشن و با رسیدن دمای دستگاه به ۵/۱۲۱ درجه سانتی گراد چراغ گرمکن HEATER خاموش شده و چراغ STERILL ST روشن شده و تایم استریل به صورت معکوس شروع به کار می نماید و اگر نیاز به دیدن مدت زمان استریل باشد ، کلید TIME / DOOR را فشار دهید تا مدت زمان باقی مانده از استریل را به شما نشان دهد و بعد از ۱۵ ثانیه خود به خود به حال اول بر می گردد و مقدار دمای اتوکلاو را نشان می دهد . با پایان یافتن زمان استریل LED گرمکن خاموش شده و بر روی صفحه نمایشگر همراه با شنیده شدن بوق منقطع - این سند بدون وجود همه صفحات فاقد ارزش می باشد ۲

جمله ENDOFSTERILE دیده می شود و چراغ STERILE END روشن می شود. در این حالت کلید POWER را خاموش کنید. شیر تخلیه بخار روی درب را باز نمایید تا بخار کاملاً تخلیه شود و درجه فشار روی درب به صفر برسد. سپس اقدام به باز کردن درب اتوکلاو نمایید.

:

ب: کنترل کیفی اتوکلاو به شرح زیر میباشد:

استفاده از برچسب اتوکلاو و نشانگر شیمیایی در هر بار انجام **کنترل کیفی** اتوکلاو الزامی است. معمولاً از دو نوع نشانگر شیمیایی استفاده می شود

۱- نوار TST

عامل فشار و دما را نظارت می کند

برچسب **steri_record**

امکان ثبت تاریخ سترون سازی، تاریخ انقضا، سری ساخت، نام فرد استفاده کننده و نام محیط کشت بر روی این برچسب وجود دارد.

برای ثبت کردن نام محیط کشت از علائم اختصاری باید استفاده شود.

۲- نشانگر بیولوژیک

استفاده از نشانگر بیولوژیک به طور هفتگی و برحسب روزهای کاری اتوکلاو توصیه می شود.

باید از نشانگر بیولوژیک شامل یک ویال حاوی ۱۰^۶ اسپور باسیلوس استئاروترموفیلوس استفاده و صحت دماسنج را کنترل نمود. این ویال دربردارنده کپسول شیشه ای محتوی محیط کشت مایع، نشانگر PH، و کاغذ عاشق آغشته به اسپور باسیلوس است. پس از خروج مواد بیولوژیک از اتوکلاو بایستی منتظر ماند تا خنک شود سپس کناره های ویال پلاستیکی را فشار داده تا کپسول شیشه ای داخل آن شکسته شود و محیط کشت با کاغذ آغشته به اسپور باسیلوس در قرار گیرد. ویال پلاستیکی را باید به مدت ۲ تا ۳ روز در داخل انکوباتور ۵۶ درجه سانتی گراد قرارداده و هر روز رنگ آن را کنترل کرد. چنانچه درون ویال از بنفش به زرد تغییر رنگ دهد باکتری در آن رشد کرده و عدم صحت فرایند سترون سازی را نشان می دهد.

برچسب اتوکلاو به تنهایی جهت فرآیند **کنترل کیفی** کاربرد ندارد و فقط نشانه ای است از اینکه آیا بسته مورد نظر داخل دستگاه قرار گرفته است یا خیر.

کالیبراسیون اتوکلاو بایستی طبق کتابچه راهنمای دستگاه انجام گیرد.

ملاحظات ایمنی

- حتماً از دستکش مقاوم به حرارت و محافظ چشم استفاده شود. بعد از آنکه فشار اتاقک اتوکلاو به صفر رسید و دما تا حد ۶۰ درجه سانتیگراد پایین آمد در کنار اتوکلاو و نه در جلوی آن بایستید و درب را به آرامی باز کنید. ۲۰ دقیقه منتظر بمانید تا ظروف کمی خنک شوند. مواد را با آرامی جابه جا کنید تا از بیرون ریختن مایعات داغ جلوگیری شود.
- هیچ گاه در هنگام روشن بودن دستگاه اقدام به بارگذاری یا خارج نمودن وسایل ننمایید.

- هیچ گاه در هنگام روشن بودن دستگاه و اتصال آن به پریز برق اقدام به تمیز نمودن دستگاه نکنید. در صورت سهل انگاری و ریختن آب بر روی تابلوی برق دستگاه را فوراً از پریز جدا نموده و سپس اقدام به خشک کردن روی تابلو نمایید و بعد آن را بدون استفاده رها کرده تا مواد ریخته شده کاملاً خشک شوند.
- هیچگاه پیچ های محکم کننده درب اتوکلاو را در هنگام کار دستگاه شل یا سفت ننمایید.

۱-۲) کنترل انکوباتور : قرار دادن دما سنج دقیق در داخل انکوباتور و کنترل روزانه دما و حفظ دمای آن در حد ۳۵-۳۷ درجه

۳-۱) لوپ استاندارد: جهت بررسی لوپهای استاندارد از تعیین حجم یا ضریب رقت با استفاده از رنگ اوانس بلو در طول موج ۶۲۰ نانومتر استفاده میشود که روش انجام آن به روش زیر میباشد:

کنترل کیفی لوپ میکروبیشناسی

روش محاسبه حجم لوپ توسط روش اسپکتروفتومتری

روش اسپکتروفتومتری : در این روش از یک ماده رنگی که دارای جذب نوری در طول موج خاص است استفاده می گردد . معمولاً از ماده رنگی اوانس بلو برای این آزمایش استفاده میشود اما با توجه به کمبود و گران بودن ماده مزبور در این بررسی از متیلن بلو که از نظر اقتصادی به صرفه بوده و در اکثر آزمایشگاه ها موجود است استفاده شد.

مواد مصرفی و معرف ها شامل موارد زیر بود :

پودر متیلن بلو - الکل طبی ۹۶٪ (اتانول) - آب مقطر - لوپ های ۰.۰۱ و ۰.۰۰۱ و لوپ های دست ساز - لوله آزمایش - پی پت - سمپلر ۲۰ لاند - اسپکتروفتومتر

ابتدا ۰.۲ - ۰.۱ گرم از پودر متیلن بلو را در حلالی که از مخلوط کردن آب مقطر و الکل ۹۶٪ به نسبت ۵۰ به ۵۰ تهیه شده حل می کنیم . پس از حل شدن کامل متیلن بلو در حلال مزبور ۸ لوله آزمایش انتخاب کرده در لوله اول ۲ میلی لیتر و در بقیه لوله ها ۱ میلی لیتر از حلال ساخته شده را می ریزیم . سپس مقدار ۰.۰۲ میلی لیتر از محلول متیلن بلو را به کمک سمپلر کالیبره شده به محلول اضافه کرده و پس از مخلوط کردن ۱ میلی لیتر از محلول مزبور را به لوله دوم انتقال می دهیم و این عمل را تا لوله هشتم پی می گیریم (رقت های سریالی). پس از تهیه رقت های مزبور جذب نوری هر یک از لوله ها را در طول موج ۶۶۳ نانومتر قرائت کرده و ثبت می کنیم .

با توجه به کاهش تصاعدی رقت لوله ها از کاغذ لگاریتمی برای تهیه منحنی استاندارد استفاده میشود . پس از ترسیم منحنی برای کالیبره کردن لوپ ۱۵-۱۰ لوله برداشته و در هر یک از آنها ۱ میلی لیتر از حلالی که تهیه کرده بودیم می ریزیم و به کمک لوپ از محلول رنگی (متیلن بلو) در لوله ها وارد می کنیم . پس از خواندن جذب نوری آنها در طول موج ۶۶۳ نانومتر و به دست آوردن میانگین جذب نوری و انتقال آن بر روی منحنی مقدار حجم برداشته شده توسط لوپ به راحتی به دست می آید.

- این سند بدون وجود همه صفحات فاقد ارزش می باشد؛

از آنجا که مقدار کلنی بر اساس (CFU/ml (colong forming unit گزارش می گردد اگر ۱ میلی لیتر را که برابر با ۱۰۰۰ لاندای می باشد بر حجم به دست آمده تقسیم کنیم ضریب لوپ مجهول به دست خواهد آمد.

(هود بیولوژیک : تعویض فیلتر در زمان معین ،بررسی لامپ- کنترل کیفی هود از نظر میکروبی ۱-۴

جهت کنترل کیفی هود از نظر میکروبی اقدامات ذیل انجام گیرد:

۱ / تمیز کاری داخل هود به غیر از طلق جلویی بوسیله الکل ۷۰٪

۲ / روشن کردن چراغ UV دستگاه به مدت ۲۰ دقیقه.

۳ / روشن کردن فن دستگاه به مدت ۲۰ دقیقه.

۴ / محیط کشت های بلاد آگار و EMB را بصورت در باز داخل هود به مدت ۲۰ دقیقه قرار می دهیم .

۵ / بعد از انکوبه ۲۴ ساعته محیط کشتها در انکوباتور، رشد ۳ کلنی مجاز میباشد و اگر بیشتر از این مقدار باشد دستگاه دوباره کنترل شود.

۲) کنترل کیفی محیط و محلول ها :

(۲-۱) محیط های کشت :

طبق توصیه NCCLS محیط های کشت می بایست از نظر موا زیر بررسی گردند :

الف (خصوصیات ظاهری :

محیط کشت ساخته و تقسیم شده در پلیت را بایستی از نظر وجود ترک در آگار ، پرشدن غیر متشابه پلیت ها ، همولیز خون اضافه شده بررسی کنید . ظاهر قارچ گونه محیط های کش نشانه یخ بستن محیط کشت می باشد . وجود حباب های هوای اضافی و آلودگی محیط های کشت باید بررسی شود .

ب) استریل محیط کشت :

- این سند بدون وجود همه صفحات فاقد ارزش می باشد

برای اطمینان از استریل بودن محیط های کشت ، باید تعدادی پلیت بصورت تصادفی قبل از مصرف انتخاب شده و ۲۴ ساعت انکوبه شوند .

ج) خصوصیات رشد باکتری ها بوسیله تلقیح ارگانیسم های شناخته شده :

از ارگانیسم مورد نظر یک ساب کالچر تازه تهیه کنید سپس سوسپانسیونی از چند کلنی میکروب مورد نظر در سرم فیزیولوژی استریل تهیه نمائید بطوریکه غلظت آن معادل نیم مک فارلند باشد این سوسپانسیون استوک می باشد از سوسپانسیون استوک رقت ۱/۱۰۰ تهیه کرده و با لوپ کالیبره شد ۱۰ میکرولیتری در محیط کشت تلقیح کنید ، بصورتی محیط را استریل کنید که کلنی ها قابل شمارش باشند . رشد خوب میکروارگانیسم ها و مشاهده مورفولوژی کلنی تیپیک آنها نشان دهندهی قابل قبول بودن محیط می باشد .

۲-۲) محلول ها و دیسک های تشخیصی :

جهت این کار بایستی سویه های میکروبی خاصی در آزمایشگاه ذخیره و در دسترس باشد :

استاف اورئوس ATCC۲۵۹۲۳ :

کاتالاز (+) کوآگولاز اسلایدی (+) کوآگولاز لوله ای (+) DNase (+)
اکسیداز (-) باسیتراسین (مقاوم) تست رنگ آمیزی گرم تست کمپ

پروتئوس :

اوره از قوی و تولید H₂S در محیط TSI

اشر شیاکلی ATCC۲۵۹۲۲ :

ایندول (+) MR (+) استفاده از گلوکز و لاکتوز در TSI (اسید / اسید گاز مثبت)
حرکت (+) اکسیداز (-) O/F گلوکز (+/+) چک رنگ آمیزی گرم

پسودو موناس آئروژینوزا ATCC۲۷۸۵۳ :

اکسیداز (+) O/F گلوکز (- / + اکسیداتیو)

پنوموکوک :

اپتوچین (حساس)

استرپ پیوژنز یا آگلاکتیه :

- این سند بدون وجود همه صفحات فاقد ارزش می باشد ۶

باسیترا سین (+) کاتالاز (-)

۲-۳) کنترل دیسک های آنتی بیوگرام :

الف- از سه سویه استاندارد ذخیره شده (استاف اورئوس ATCC۲۵۹۲۳ ، اشرشیاکلی ATCC۲۵۹۲۲ و سودو مونس آئروژینوزا ATCC۲۷۸۵۳) کشت ایزوله در محیط بلاد آگار تهیه گردد .

ب- برای هر سویه ۱۰ لوله انتخاب و مطابق روش معمول نیم مک فارلند در محیط مولر هینتون برات تهیه گردد .

پ - بعد از انتقال به مولر هینتون آگار دیسک های مطابق جدول (۱) انتخاب گردد و بعد از ۱۸-۲۴ ساعت قطر آنتی بیوتیک ها تعیین و برای هر سویه میانگین محاسبه شود .

ت- میانگین قطر حاصله بایستی در محدوده مجاز قطر دیسک ها باشد .

آنتی بیوتیک	دیسک بر حسب میکروگرم	Staph.aureus ATCC۲۵۹۲۳	Esch.coli ATCC۲۵۹۲۲	P.aeruginosa ATCC۲۷۸۵۳
آمیکاسین	۳۰	۲۶-۲۰	۲۶-۱۹	۲۶-۱۸
آمپی سیلین	۱۰	۳۵-۲۷	۲۲-۱۶	---
سفتریا کسون	۳۰	۲۸-۲۲	۳۵-۲۹	۲۳-۷
سفالوتین	۳۰	۳۷-۲۹	۲۱-۱۵	---
کلرامفنیکل	۳۰	۲۶-۱۹	۲۷-۲۱	---
سیپروفلوکساسین	۵	۳۰-۲۲	۴۰-۳۰	۳۳-۲۵
کلیندامایسین	۲	۳۰-۲۴	---	---
اریترومایسین	۱۵	۳۰-۲۲	---	---
جنتامایسین	۱۰	۲۷-۱۹	۲۶-۱۹	۲۱-۱۶

*تذکر: اگر قطر حاصله در محدوده مجاز قطر دیسک ها نباشد بایستی :

- این سند بدون وجود همه صفحات فاقد ارزش می باشد۷

قطر محیط مولر هینتون آگار و PH آن ، محلول نیم مک فارلند استاندارد و تاریخ انقضاء محیط ها و دیسک ها و نحوه نگهداری آنها بررسی شود .

امکانات و ملزومات و منابع :		
منابع ومراجع:	صاحبان فرایند: مسئول فنی آزمایشگاه ،کارکنان آزمایشگاه -مسئول فنی بیمارستان	
	ذینفعان :	
ابلاغ کننده : دکتر ثمانه میرزاحسینی سمت : رئیس بیمارستان	تایید کننده :دکتر امیرحسین محمودی سمت : مدیر بیمارستان	تهیه کننده : دکتر منصوره توکلی (مسئول فنی آزمایشگاه) امیرهانی کریمی پور (سوپروایزر آزمایشگاه)