بنام خدا

کنترل کیفی در باکتری شناسی

تعریف تضمین کیفیت

مجموعه فعالیتهایی است برای اطمینان از کیفیت نتایج و ارتقاء سطح کار آزمایشگاه.

تضمین کیفیت به عوامل زیر اشاره دارد:

- کیفیت فضا وامکانات
- مجموعه فعا لیتهای پزشک وآزمایشگاه
- میزان رضایتمندی بیماران

کنترل کیفی در هر بخش شامل:

- فضا و تاسیسات
- تجهیزات و ملزومات
- نیروی انسانی
- بکار گیری روشهای استاندارد
- انجام به موقع ودقیق کار
- تنظیم دقیق وشفاف نتایج

فضا و تاسیسات در میکرب شناسی

- فضا:
  - مساحت
  - مستقل بودن
  - واجد کف شوی
  - قابل شستشو
- تاسیسات:
  - نور وتهویه مناسب- فشار منفی
  - سیستم گرمایش وسرمایش
  - کابینت بندی استاندارد
  - هود مناسب

تجهیزات

- میکروسکوپ
- انکوباتور ۳۵-۳۷درجه
- فور
- اتوکلاو
- ترازو وسانتریفوژ
- جاربی هوازی
- یخچال ۲-۸ درجه

کنترل کیفی تجهیزات

- میکروسکوپ:
  - شفافیت میدان دید
  - حرکت دیافراگم
  - کندانسور مناسب
  - سلامت پیچ تنظیم
  - منبع نور مناسب
- نگهداری:
  - نظافت در پایان کار:
    - نظافت بد نه
    - نظافت لنزها

کنترل کیفی اتو

«کنترل دما (۲+- ۳۵)

- نحوه نظافت:
  - زمان آلوده شدن

«درشرایط معمولی : حداقل هر دو هفته یکبار

- کنترل فنی دستگاه:
  - هرشش ماه

کنترل کیفی سانتریفوژ

- کنترل دور :۳ماه یکبار– دو ثانیه ثابت-اختلاف ۵%+- قابل قبول
- کنترل تایمر: ۶ماه یکبار – اختلاف ۵ %+- قابل قبول
- کنترل دما : ماهانه - افزایش ۵ درجه اصلاح شود
- نظافت:
  - در صورت آلودگی
  - درشرایط معمولی
- کنترل فنی:
  - در صورت افزایش صدا
  - در صورت بروز لرزش
  - عدم تنظیم دور و زمان
  - سالانه گردگیر موتور عوض شود

کنترل کیفی اتوکلاو

- کنترل صحت عملکرد:
  - استفاده از مواد بیولوژیکی
  - استفاده از مواد رنگی
  - استفاده از کشت میکرب
- کنترل عملکرد تایمر
- نظافت:
  - درصورت پخش مواد
  - در شرایط معمولی (آب هر ماه عوض شود)
- کنترل فنی: هر ۶ماه

Efficacy testing of autocla

Chemical indicators (EN 867):

- Results directly after the process
- For 121°C and 134°
- Cheap and easy
- Treatment control / endpoint control
- Disadvantage: only limited temperature and time details

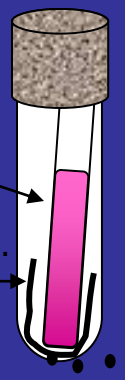
Color change integrator

Efficacy testing of autoclaves

Biological indicators

Media with colour indicator

Spore strip with Bac. stearothermophilus (ca. 10^6)



positive control

unprocessed

processed

b-safe GmbH

کنترل کیفی فور

- کنترل دما
- کنترل تایمر
- کنترل صحت عملکرد:
  - ۱۶۰درجه به مدت یک ساعت
  - ۱۸۰درجه به مدت ۴۰ دقیقه
- نظافت داخل: هر ماه
- کنترل فنی: در شرایط عادی هر شش ماه

کنترل جار بی هوازی

- کنترل عملکرد:
  - فعال کردن کاتالیست بعد از هر بار استفاده:
    - در ۱۶۰درجه به مدت ۲ ساعت
    - تعویض کاتالیست هر سه ماه
- تمیز کردن:
  - زمان آلوده شدن- با ضد عفونی کننده
  - شرایط عادی- هر هفته
- کنترل جار: هر هفته سرپوش آن چک شود

کنترل کیفی یخچال

- کنترل دما: روزانه ۲بار صبح و عصر درساعات مشخص
- کنترل قسمتهای مختلف (۵)
- نظافت در شرایط عادی: هر دو ماه
- کنترل فنی : هر شش ماه
- کارکرد بهتر: درر محل سرد-سایه-حفظ فاصله بالا و پشت
- ضخامت یخ بیشتر از ۱۰-۶ میلیمتر نشود
-

کنترل کیفی ترازو

- کنترل صحت:حداقل هر ماه یا قبل از کارهای دقیق با وزنه کلاس S و F
- کنترل دقت
- نظافت
- کالیبراسیون: توسط شرکتهای مجاز یا وزنه های کالیبره
- مکان:دور از ارتعاش-درمحل ثابت-دور از جریان شدید هوانور و سیستمهای برودتی حرارتی-مواد مستقیم روی آن قرار نگیرد.

ملزومات ومواد مورد نیاز

- انواع شیشه آلات
- لوپ ونیدل
- شعله گاز
- انواع رنگهای روتین
- انواع محیط های کشت
- انواع دیسکهای تشخیصی
- انواع دیسکهای انتی بیوتیک
- سواپ-سرنگ-گیره و...

کنترل کیفی ملزومات

- کنترل کیفی لوازم حجمی
- کنترل کیفیت شستشوی شیشه آلات
- کنترل عملکرد شعله گاز
- کنترل کیفی لوپ:
  - تهیه محلول نیم گرم درصد متیلن بلو در آب مقطر
  - تهیه رقتهای سریال از ماده رنگی در ۶لوله
  - خواندن جذب نور هر یک از رقتها در۷۰۰ نانو متر
  - رسم جذب نور مقابل رقت
  - تهیه ماده رنگی در شش لوله با لوپ به نحوی که حجم هر لوله به اندازه حجم لوله های مرحله رسم منحنی باشد(یک لوپ ماده رنگی درهر لوله+آب مقطر)
  - جذب لوله ها در ۷۰۰نانو مترو محاسبه گیانگین جذب
  - محاسبه رقت لوپ

کنترل کیفی لوپ

- محلول نیم گرم در صد بلودو متیلن میسازیم
- ۶ لوله ابتخاب کرده و در هریک ۲ سی سی آب مقطر ولی در لوله اول ۴ سی سی آب مقطر میریزیم
  - ازمحلول رنگی ۴۰میکرولیتردر لوله اول ریخته و خوب مخلوط میکنیم
- از لوله اول ۲سی سی به لوله دوم و از دوم ۲ سی سی به سوم ... واز لوله ششم ۲ سی سی دور میریزیم
- رقت لوله ها از یک صدم شروع شده وبه یک سه هزارو دویستم میرسد
- غلظت ماده رنگی در لوله ها:
- ۴۰ لاندا- ۲۰ لاندا- ۱۰ لاندا- ۵ لاندا- ۵/۲ لاندا- ۲۵/۱ لاندا
- جذب هریک از لوله ها را در ۷۰۰ نانو متر میخوانیم و منحنی جذب را مقابل رقت رسم میکنیم

رقت لوپ مجهول

- در ۶ لوله ۴سی سی آب مقطر میریزیم (در هر لوله)
- با استفاده از لوپ مجهول از محلول رنگی یک بار در هر لوله میریزیم
- در هر فاصله لوپ را کاملا تمیز میکنیم(یا میسوزانیم)
- خوب مخلوط کرده و جذب هر لوله را در ۷۰۰ نانومتر میخوانیم
- از جذب ها میانگین گرفته روی منحنی میبریم
- رقت لوپ را میخوانیم و در یک سی سی(۱۰۰۰ لاندا) محاسبه میکنیم
- تفسیر:
- اگر رقت لوپ یک هشتصدم بخواند(لوله ۴) مقدار ماده رنگی ۵ لاندا خواهد بود در حالیکه مقدار نمونه را در یک سی سی (۱۰۰۰ لاندا) گزارش میکنیم پس با تنا سبی ضریب حقیقی را به دست می آوریم

ضریب نهایی

- ۵ تعداد کلنی
- ۱۰۰۰ X
- X= تعداد کلنی ضربدر ۲۰۰
- اگر جذ ب لوپ مجهول بین لوله های ۴و ۵ یعنی یک هزارم باشد ضریب رقت چند خواهد بود؟
- اگر حجم نهایی هر لوله یک سی سی باشد ضریب رقت چگونه محا سبه میشود

نکات مهم در رابطه با محیطهای کشت

- دقت در خرید
- دقت در نگهداری پودرها
- دقت درتهیه محیط در آزمایشگاه
- دقت در نگهداری محیطهای تهیه شده
- کنترل عملکرد محیط کشت

نکات مورد توجه در خرید

- به میزان نیاز شش ماه تا یک سال خریده شود
- از شرکتهای معتبر خریداری شود
- حتما تاریخ دار باشند
- نام کارخانه و تاریخ خرید و سریال پودر ثبت شود

نکات مهم در نگهداری پودرها

- در جای خشک نگهداری شوند
- در دمای کمتر از ۲۵درجه نگهداری شوند
- محیطهای حاوی رنگ در فضای تاریک قرار گیرند
- محل نگهداری نباید رطوبت داشته باشد
- میزان مصرف دو ماه از ذخیره در دسترس باشد

نکات مهم در تهیه محیط کشت

- از محیط تغییر رنگ داده و به هم چسبیده استفاده نشود
- از ترازوی مناسب استفاده شود
- از یک سریال تهیه گردد
- ظروف تهیه محیط باید عاری از دترجنت باشد(آبکشی شود)
- موقع حرارت سر نرود
- به شکل مناسب استریل شوند(محیط اوره یا قند با فیلتراسیون)
- محیط انتخابی نیاز به اتوکلاو ندارند(سلنیت یاs.s)
- در حرارت مناسب خون اضافه شود(۴۵-۵۰برای بلادآگار و ۸۰درجه برای شکلات)
- مقدار و نوع خون مناسب باشد
- ۷درصد برای بلاد آگار
- خون گوسفند استفاده شود
- <u>آنتروککها و استرپتوککهای گروه dدر بلاد آگار با خون گوسفند همولیز آلفا میدهند در حالیکه در خون انسان وخرگوش واسب همولیز بتا میدهند</u>

دلایل عدم استفاده از خون انسان

- ضد انعقاد اکسالات ویا سیترات در کیسه خون برای استرپها سمی اند
- امکان وجود انتی بیوتیک در خون
- امکان وجود آنتی استرپتولیزین o در خون انسان و در نتیجه ممانعت از فعالیت همولیزی استرپ بتا همولیتیک
- وجود گلوکز در خون باعث افزایش اسید و در نتیجه مانع تولید همولیزین توسط استرپ میشود

تقسیم محیط

- اجازه دهید محیط خنک شود-حدود ۴۰ درجه
- شرایط استریل رعایت شود
- به مقدار مناسب در پلیت یا لوله ریخته شود
- هنگام ریختن، کف ایجاد نشود
- در محلی آرام و بدور از کوران هوا(باد کولر) تقسیم شود

نگهداری محیطهای کشت تهیه شده

- محیطها در ۲تا۸درجه نگهداری شوند
- محیط تایو در حرارت اتاق نگهداری شود
- محیطها در کیسه پلاستیکی تا ۴ هفته قابل مصرفند
- لوله های در پیچ دار حاوی محیط تا سه ماه قابل مصرفند
- لوله های حاوی محیط با در پنبه ای تا دو هفته قابل مصرفند
- اگر درب لوله های پیچ دار شل باشد تا دو هفته قابل مصرفند

کنترل کیفیت سلامت محیط کشت

- کنترل PH(درشرایط عادی لازم نیست)
- کنترل استریل بودن محیط:
  - قرار دادن ۳ تا۵درصد از محیطهای تهیه شده در ۳۵ درجه به مدت ۳-۵ روز
  - قرار دادن تعدادی از محیطها در حرارت اتاق
- تفسیر:
- اگر روی هر محیط بیش از دو کلنی رشد کند همه باید دور ریخته شوند
- اگر به محیطهای انتخابی مشکوک بودیم(به آلودگی):
- حجم کمی از آن به حجم زیادی از محیط برات استریل اضافه شده و رشد ارگانیسم را کنترل میکنیم

کنترل کیفی عملکرد محیط کشت

- استفاده از باکتری های مرجع تجارتی- باکتری های برنامه کنترل کیفی خارجی
- استفاده از باکتری های مرجع آزمایشگاهی: در صورت داشتن امکانات می توان باکتری های جدا شده از میان نمونه های کلینیکی را حفظ کرده و استفاده نمود
- باکتری های فوق رفتار مشخصی روی محیطها وبا ریجنتها ویا دیسکها داشته و به این طریق میتوان محیطها و ریجنتهای تهیه شده را از نظر کیفیت بررسی نمود

کنترل کیفی محیط کشت

- E.coli ATCC25922
  - E.M.B-Macconkey-T.S.I-XLD-KCN-MA/VP
  - Gram staine
- Staph.ATCC 25923
  - Coagolase-indol-catalase-DNase
- Staph.epidermitis
  - Control negative of coagolase and DNase
- Strep pyogenes
  - Beta hemolyse-Bacitracin
- Strep.groupB
  - CAMP-sodium hyporate- and negative control for Bacitracine
- Strep. Group D
  - Bile sculin and negative control for starch hydroysis
- ,.

نگهداری باکتریها

- نگهداری طولانی مدت باکتریها: در این روشها باکتری به مدت طولانی(ماههاو یا سالها) زنده خواهد ماند از بهترین روشها می توان روش لیوفیلیزه یا فریز در ۷۰ – درجه ویا نیتروژن مایع را نام برد
- نگهداری کوتاه مدت: در این روش می توان باکتری هایی که مشگل پسند نبوده ودر کارهای روتین استفاده می شوند را نگهداری نمود

نگهداری طولانی مدت باکتری ها

- استفاده از گلیسرول در ۲۰ – درجه:
- کشت خالص روی محیط جامد
- بعد از رشد کامل برداشت توده کوچک از آن با لوپ
- تهیه سوسپانسیونی از کلنی های فوق در گلیسرول استریل
- به میزان ۱-۲ سی سی در لوله های در پیچ دار
- نگهداری در ۲۰- درجه
- خودداری از ذوب و فریز مکرر
- تجدید کشت بعد از ۱۲تا ۱۸ماه

استفاده از روغن معدنی در دمای اتاق

- محیط هارت اینفیوژن آگار با سطح کم در لوله تهیه شود
- برای باکتری سخت پسند از خون تازه یا خون حرارت دیده استفاده شود
- روغن معدنی(یا پارافین مایع) را در ۱۷۰درجه به مدت یکساعت استریل نمایید
- بر روی سطح محیط، باکتری کشت شود
- بعد از رشد کافی باکتری ،روغن استریل به اندازه یک سی سی روی سطح محیط ریخته شود
- در کشت مجدد از قسمت زیرین روغن برداشت شود
- در حرارت اتاق نگهداری شود
- بعد از ۶تا ۱۲ ماه تجدید کشت انجام گیرد

کشت عمقی و نگهداری در اتاق

- این روش برای باکتری هایی که مشگل پسند نیستند مانند استاف و انتروباکتریاسه ها کاربرد دارد
- محیط تریپتی کیس سوی آگار ویا سوی بین کازئین دایجست آگار بدون قند در لوله و بدون سطح شیب دار پیشنهاد میشود
- کشت عمقی باکتری در محیط
- ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه
- درب لوله با درپیچ یا چوب پنبه بسته شود
- درب لوله یا چوب پنبه درپارافین ذوب شده فرو برده تا بعد از بسته شدن، کاملا مسدود گردد
- محیط کشت در اتاق نگهداری شود
- بعد از یک سال کشت مجدد صورت گیرد

کشت عمقی در محیط سیستین تریپتیکیس آگار

- برای نیسریا و استرپها استفاده میشود
- کشت عمقی در محیط
- ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه
- بستن کامل در لوله
- در مورد نیسریا ها نگهداری در ۳۵ درجه و تجدید کشت هر دو هفته
- در مورد استرپها نگهداری در اتاق و تجدید کشت در هر ماه

نگهداری بی هوازی ها

- استفاده از محیط کوکد میت -cooked-meat
- باکتری روی محیط در لوله کشت داده شود
- ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه
- در لوله محکم بسته شود
- در اتاق نگهداری شود
- هر دو ماه تجدید کشت شود

نگهداری کوتاه مدت باکتری

- باکتری سریع الرشد:
- کشت روی تریپتی کیس سوی آگار سطح دار،در لوله در پیچ دار
- ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه
- نگهداری در یخچال
- هر دو هفته تجدید کشت

کشت کوتاه مدت استرپها

- کشت روی بلاد آگار سطح دار در لوله درپیچ دار
- ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه
- هر دو هفته تجدید کشت

نگهداری استرپ ها(۲)

- کشت روی هارت اینفیوژن برات حاوی ۱۰ درصد خون گوسفند (در لوله)
- انکوبه در ۳۶ درجه به مدت یک شب
- نگهداری در یخچال
- تجدید کشت هر ۳-۴ ماه

کشت هموفیلوس ومننگوکک(کوتاه مدت)

- کشت روی سطح محیط شکلات آگار یا روی پلیت
- ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه
- در دمای اتاق نگهداری شود
- هر دو هفته تجدید کشت

کشت کوتاه مدت گونوکک

- کشت روی شکلات آگار
- ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه
- نگهداری در ۳۵ درجه
- تجدید کشت هر دو روز
- در صورت جداسازی باکتری جدید با قبلی جایگزین شود

نگهداری ویبریو کلرا

- کشت در سطح اسلنت هارت اینفیوژن آگار حاوی یک و نیم درصد کلرور سدیم
- ریختن روغن استریل روی آن
- بستن در لوله
- نگهداری در اتاق
- تجدید کشت زمانی که ظاهر کلنی ذلیل یا پژمرده به نظر آید

نگهداری قارچ ها

- کشت در سطح اسلنت محیط سابورو
- ریختن روغن استریل روی محیط
- بستن محکم در لوله کشت
- نگهداری در اتاق و شرایط تاریک
- تجدید کشت هر ۲تا ۳ ماه

کنترل کیفی رنگها-معرفهاوآنتی سرمها

- معرفهای کاتالاز-کوآگولاز-اندول-متیل رد-نیترات-اکسیدازو وی پی باید هر روزی که مورد استفاده قرار میگیرند با کنترل مثبت و منفی چک شوند
- رنگ گرم هنگام تهیه و نیزهر هفته با باکتری گرم مثبت و گرم منفی کنترل شوند
- آنتی سرمها اولین بار که باز می شوند باید با کنترلهای مثبت و منفی چک شده و ماهانه کنترل مجدد شوند
- جهت کنترل معرفها باکتری های خاصی معرفی شدند که در جدول ذکر شده است

سایر عواملی که باید در کنترل کیفی مورد توجه قرار گیرد

- نیروی انسانی توانمند
- بکار گیری روشهای استاندارد
- تنظیم دقیق و به موقع و شفاف نتایج

کنترل کیفی در آنتی بیوگرام

- اهمیت موضوع
- انتخاب محیط: مولر هینتون
- علت انتخاب مولر هینتون:

– کم بودن میزان مهار کننده سولفانامیدهاوتری متوپریم ها وتتراسیکلین ها

– کم بودن و تنظیم دقیق کلسیم یونیزه و منیزیم که ااثر مهاری روی پلی میکسین و تتراسیکلین وآمینوگلیکوزیدها دارند

نکاتی در مورد تهیه مولر هینتون

- Ph محیط ۲/۷ تا۴/۷
- حجم محیط در پلیت:
  - پلیت با قطر ۹ سانتیمتر: ۲۵تا ۳۰ سی سی
  - پلیت با قطر ۱۴سانتیمتر: ۶۰تا ۷۰ سی سی
- عمق مناسب محیط : حدود ۴ میلی متر
- از استریل بودن محیط مطمئن شوید ۳تا۵درصد از محیطهای تازه تهیه شده در۳۵درجه
- سطح محیط قبل از دیسک گذاری مرطوب نباشد ۱۰تا۳۰ دقیقه دراتو قرار دهید

انجام دقیق آزمایش

- انتخاب محیط مناسب
- تهیه سوسپانسیون میکربی طبق استاندار نیم مک فارلند
- پخش مناسب روی پلیت
- انتخاب دیسک مناسب
- کاشتن صحیح د یسکها
- قراردادن در ۳۵درجه بدون co2(بجز هموفیلوس ونایسریا)
- قرائت دقیق
- گزارش صحیح

منابع خطا در آزمایش آنتی بیوگرام

- تاریخ گذشته بودن یا خراب بودن محیط
- تهیه نا درست محیط
  - عمق کمترو یا بیشتر از ۴ میلیمتر
  - آلوده بودن محیط
- مرطوب بودن سطح محیط هنگام کاشتن دیسک(آنتی بیوتیک شسته میشود)
- خالص نبودن باکتری
- تهیه نادرست سوسپانسیون(رقیق یا غلیظ باشد)
- افزایش co2 که باعث کاهش ph محیط شده و همین باعث زون وسیع برای تتراسیکلین و زون کوچک برای سایر انتی بیوتیکها میشود
- کاهش co2 که باعث افزایش ph محیط شده که عکس حالت فوق ایجاد میکند
- نگهداری نا مناسب دیسکها(باعث کاهش قدرت آنتی بیوتیک میشود)

منابع خطا در آنتی بیوگرام (ادامه)

- عدم پخش یکنواخت سوسپانسیون میکربی در محیط
- به درجه اتاق نرساندن دیسکها قبل از کاشت
- افزایش کاتیون محیط که باعث کاهش زون آمینو گلیکوزیدها مثل جنتا مایسین میشود
- کاشت نا مناسب دیسکها
- انتخاب نا مناسب دیسکها
- عدم قرائت دقیق و صحیح نتایج

کنترل صحت عملکرد محیط و دیسکها

- استفاده از میکربهای مشخص
- میکربهایی که برای این منظور استفاده میشوند:
  - E.coli A.T.C.C 25922 –
  - S.aureus A.T.C.C 25923 –
  - P.aeruginose A.T.C.C 27853 –
- در روی E.coli دیسک آمیکاسین زون بین ۱۹ تا۲۶ میلی متر قابل قبول است
- در هر سری ساخت محیط مولرهینتون باید از انتروکک فکالیس(A.T.C.C 29212) و دیسک کوتریموکسازول به عنوان کنترل استفاده کرد
- در محیط مطلوب قطر زون باید به اندازه ۲۰ میلیمتر باشد