

استفاده و کالیبراسیون لوپ های میکروبیولوژیک

رقیه صبوریان

آبان ۱۳۹۶

اصول

- ▶ لوپ های کمی برای کشت های کمی استفاده می شود.
- ▶ حجم مایع برداشت شده با لوپ کالیبره وابسته است به:
 - ▶ حجم و شکل ظرف نگهداری نمونه مایع
 - ▶ مایعات در ظرف با قطر کوچک (کمتر از ۱ سانتیمتر) کشش سطحی بالایی دارند که موجب برداشت کمتر می شود.
 - ▶ جهت فرو بردن لوپ
 - ▶ عمق فرو بردن لوپ
- ▶ زمانی که سیم بالای لوپ به وسیله فرو بردن عمیق آن به داخل مایع خیس شود، مایع اضافی از سیم حرکت کرده و حجم انتقال یافته را افزایش می دهد.
- ▶ خطای قابل قبول برای لوپ های کمی: $\geq 20\%$

انواع لوپ

حجم

1 μ l (0.001 ml)

10 μ l (0.01 ml)

جنس

فلزی چند بار مصرف: پلاتینیوم یا نیکروم

پلاستیکی یک بار مصرف

روش استفاده از لوپ

- ▶ لوپ های فلزی را، قبل از اولین و بعد از هر بار انتقال سوزانده و سرد کنید. در لوپ های یک بار مصرف برای هر بار انتقال از لوپ جدید استفاده نمایید.
- ▶ نمونه مایع باید در ظرفی با دهانه بزرگ (قطر بیش از 1cm) باشد.
- ▶ نمونه را با حرکات چرخشی تکان دهید تا سوسپانسیون باکتریایی به صورت یکنواخت مخلوط گردد.
- ▶ لوپ را به صورت عمودی نگه داشته و آن را فقط تا زیر سطح مایع فرو ببرید. از تشکیل هرگونه حباب بر روی مایع خودداری نمایید.
- ▶ از نبودن هر گونه حباب در لوپ اطمینان حاصل کنید.
- ▶ لوپ را تنها به بالا و پایین به صورت مستقیم حرکت دهید.
- ▶ محتویات لوپ را با فشار دادن مایع به پلیت به سطح محیط منتقل کنید تا زمانی که در لوپ مایعی مشاهده نشود و سپس با لوپ آن را پخش نمایید.

کنترل کیفیت ملاحظات کلی

- ▶ لوپ های چند بار مصرف
- ▶ لوپ های کالیبره را به طور منظم بررسی کنید تا مطمئن شوید گرد بوده و بدون خم شدگی، تورفتگی، خوردگی، یا مواد سوخته شده باشند.
- ▶ ماهانه لوپ ها را از نظر اطمینان از صحت حجم برداشتی شان بررسی نمایید.
- ▶ لوپ های یک بار مصرف
- ▶ حجم لوپ های یکبار مصرف را بعد از دریافت هر سری ساخت جدید بررسی کنید.
- ▶ عملکرد رضایت بخش از سری ساخت های متعدد و گواهی کنترل کیفیت داخلی سازنده، نیاز به کالیبراسیون روتین را کم می کند.

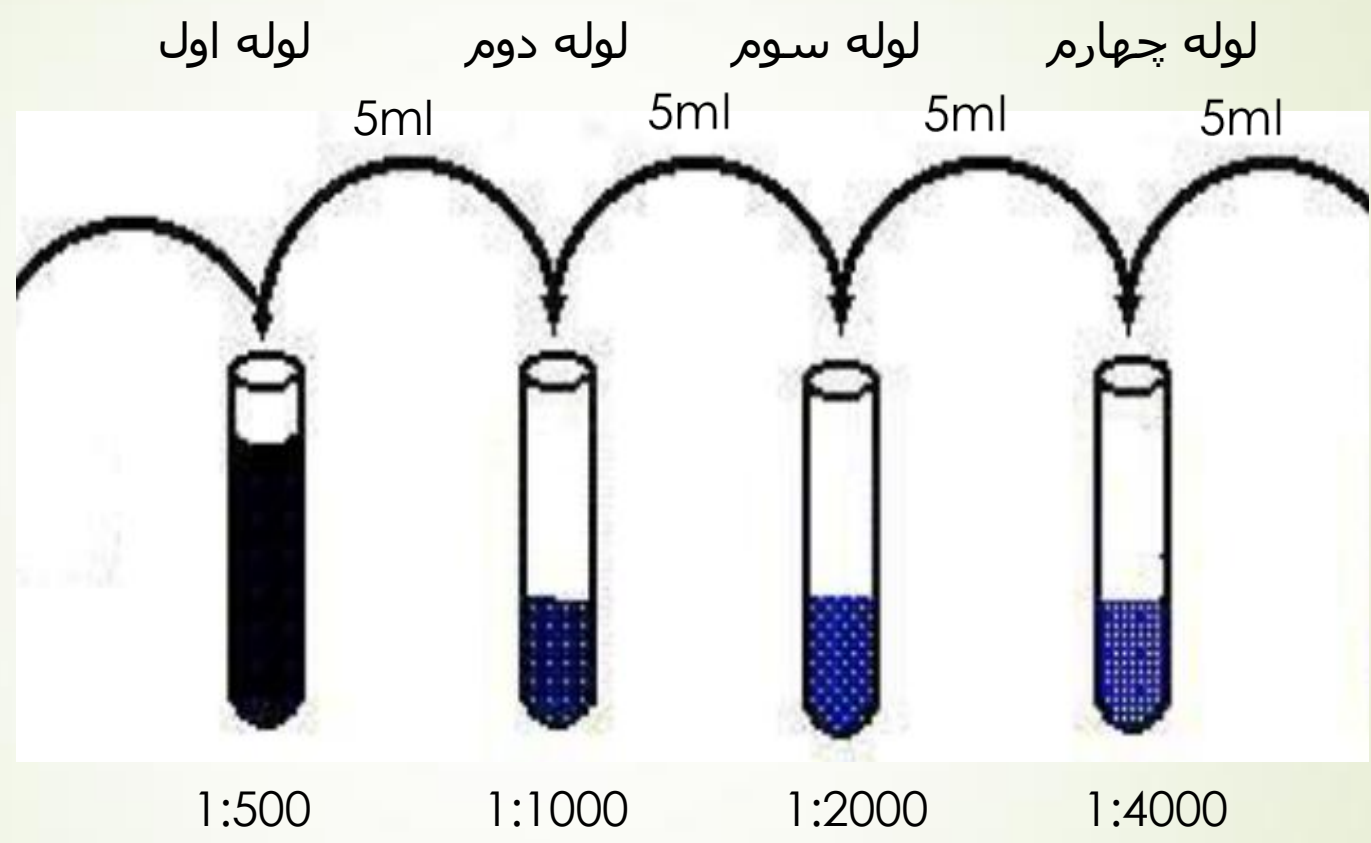
کنترل کیفیت مواد و وسایل مورد نیاز

- آب مقطر نوع ۱ یا ۱۱
- محلول اوانس بلو (Evans Blue Dye Solution = EBD)
- ذخیره: 0.75 g در 100 ml آب مقطر
- صاف کردن محلول با کاغذ صافی واتمن شماره 4
- برچسب گذاری ظرف با نام، غلظت و تاریخ ساخت محلول
- ذخیره سازی در دمای اتاق دور از نور، پایدار به مدت ۶ ماه
- کووت های مربع شیشه ای با عبور نور 1cm (برای همه اندازه گیری ها از کووت یکسان استفاده شود.)
- ظروف شیشه ای: چند لوله آزمایش ۱۵ میلی لیتری تمیز، چند پیپت 10ml کلاس A1
- اسپکتروفتومتر با کیفیت خوب و کالیبره

کنترل کیفیت کالیبراسیون به روش رنگ سنجی

□ آماده سازی محلول های کاری

- a. 1ml از محلول ذخیره را به 49ml آب مقطر اضافه نمایید. (رقت 1:50)
 - b. ۴ لوله آزمایش انتخاب کرده، در لوله اول 9ml و در سه لوله دیگر 5ml آب مقطر بریزید.
 - c. 1ml از رقت 1:50 برداشته و به لوله اول (9ml) اضافه کنید. (رقت 1:500)
 - d. 5ml از لوله اول برداشته، در لوله دوم ریخته و کاملاً مخلوط نمایید، از لوله دوم در لوله سوم و از لوله سوم در لوله چهارم.
 - e. در انتها 5ml از لوله چهارم را برداشته و دور بریزید.
 - f. به این ترتیب 4 محلول خواهید داشت که رقت نهایی بدست آمده در هر یک مطابق شکل خواهد بود.
- 4 رقت فوق را می توانید تا 6 ماه ذخیره کنید، ولی اگر قرائت هر یک از رقت ها 3% از قرائت قبلی تفاوت داشت، رقت های تازه تهیه نمایید.



1ml از رقت 1:50

رقت

دور ریخته شود

کنترل کیفیت (ادامه...)

کالیبراسیون به روش رنگ سنجی

f. اسپکتروفتومتر را در حالت جذب با طول موج 620nm تنظیم کنید.

g. اسپکتروفتومتر را با آب مقطر صفر نمایید.

h. جذب 4 رقت فوق را اندازه گیری و ثبت نمایید. جذب نوری (محور عمودی) را برابر هر غلظتی از رقت ها (محور افقی) در کاغذ میلی متری ثبت نمایید. یک خط که بیشتر از همه به هر ۴ نقطه نزدیک است را به منظور ساختن منحنی کالیبراسیون، رسم کنید.

i. لوله دیگری انتخاب کرده، 10ml آب مقطر در آن بریزید. با استفاده از لوپ 1µl مورد آزمون ده بار از محلول ذخیره اولیه را به این لوله منتقل و کاملا مخلوط نمایید. جذب این محلول را اندازه گیری نمایید، که باید برابر با جذب رقت 1:1000 روی منحنی کالیبراسیون باشد.

j. محلول های کاری دیگری برای سه بار آزمایش دیگر تهیه و بررسی نمایید. (در کل ۴ خوانده)

k. خوانده ها را بر روی برگه کاری ثبت نموده، میانگین ۴ خوانده را محاسبه نمایید.

l. درصد صحت را بر اساس راهنمای موجود در برگه کاری بدست آورده و ثبت نمایید.

m. اگر میانگین جذب های خوانده شده بیش از $\pm 20\%$ از رقت محلول ذخیره ۱:۱۰۰۰ باشد، لوپ غیر دقیق می باشد. اقدامات اصلاحی انجام دهید.

کنترل کیفیت (ادامه...)

کالیبراسیون به روش رنگ سنجی

n. برای کالیبراسیون لوپ 10μ لوله ای انتخاب کرده، 100ml آب مقطر در آن بریزید. با استفاده از لوپ 10μ مورد آزمون ده بار از محلول ذخیره اولیه را به این لوله منتقل و کاملاً مخلوط نمایید. جذب این محلول را اندازه گیری نمایید، که باید برابر با جذب رقت $1:10000$ روی منحنی کالیبراسیون باشد. محلول های کاری دیگری برای سه بار آزمایش دیگر تهیه و بررسی نمایید (در کل ۴ خوانده). خوانده ها را بر روی برگه کاری ثبت نموده، میانگین ۴ خوانده را محاسبه نمایید. درصد صحت را بر اساس راهنمای موجود در برگه کاری بدست آورده و ثبت نمایید. اگر میانگین جذب های خوانده شده بیش از $\pm 20\%$ از رقت محلول ذخیره $1:10000$ باشد، لوپ غیر دقیق می باشد. اقدامات اصلاحی انجام دهید.

**Worksheet 1
Colorimetric Quantitative Loop Calibration**

Loop size: _____ Date: _____ Scientist initials _____

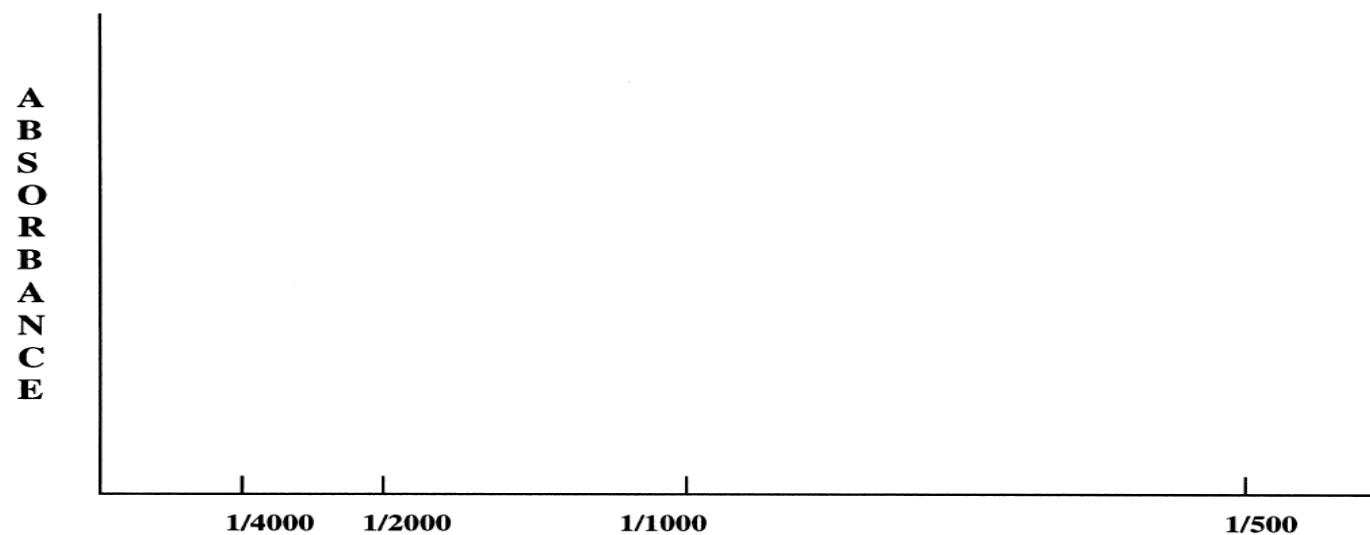
Loop manufacturer and Lot No. _____ Date put into use _____

Sample No.	Absorbance	Average minus the 1:1000 absorbance std. (a) _____
1	_____	Divide (a) by the 1:1000 absorbance std. (b) _____
2	_____	% inaccuracy: Multiply (b) by 100 (c) _____%
3	_____	Value (c) must be $\pm 20\%$: Acceptable? Yes/No
4	_____	
Sum of 4 readings	_____	
Average (divide by 4)	_____	

Corrective action:

Reviewed by: _____ Date: _____

Calibration curve:



محدودیت ها

- ▶ در صورتی که در نمونه مایع یا حجم برداشته شده با لوپ حباب وجود داشته باشد، لوپ های کمی، هم یک بار مصرف و هم قابل استفاده مجدد، بسیار غیر دقیق خواهند بود.
- ▶ از ایجاد حباب با تکان ندادن مایع اجتناب نمایید.
- ▶ لوپ پر شده را به دقت از نظر حباب بررسی نمایید.
- ▶ حباب ها را با سوزاندن (لوپ های قابل استفاده مجدد) و جایگزین کردن (لوپ های یک بار مصرف) یا دوباره برداشتن (هر لوپی) از بین ببرید.