	دانشگاه علوم پزشکی اراک **مرکز آموزشی درمانی ولیعصر(عج)** **عنوان دستورالعمل: کنترل کیفیت آزمایش های مختلف در بخش میکروب شناسی**	**تاریخ اولین ابلاغ :** **تاریخ آخرین بازنگری** **تاریخ بازنگری بعدی:** **کد سند :**	**1395/10/26** **1404/02/27** **1405/02/27** **IN/LS/15/03**

عنوان:

دستورالعمل کنترل کیفیت آزمایش های مختلف در بخش میکروب شناسی

دامنه:

واحد آزمایشگاه

تعاریف و اصطلاحات:

هدف:
اطمینان از کیفیت نتایج آزمایشات و کاهش خطاهای تشخیصی و در نتیجه ارتقای ایمنی بیماران در مراحل تشخیص و درمان های متعاقب آن

فرد پاسخگو: روش ارزیابی:
مسئول فنی آزمایشگاه، سوپروایزر و کارکنان آزمایشگاه، ارزیابی از طریق مشاهده، مصاحبه و مستندات

روش اجرا:

نحوه کنترل کیفیت انجام آزمایشهای مختلف در بخش میکروب شناسی و تفسیر نتایج آنها

الف: اصول کلی کنترل کیفی در بخش میکروب شناسی
کنترل و سرویس دوره ای تجهیزات شامل انکوباتور، هود، میکروسکوپ و... که جهت مشاهده سوابق به فایل تجهیزات مراجعه شود.
کنترل کیفی روزانه، هفتگی تجهیزات که پرسنل جهت آشنایی با آن به کتاب مدیریت و کنترل کیفی تجهیزات در آزمایشگاه های پزشکی مراجعه می کنند.
شرکت در برنامه کنترل کیفیت خارجی
تهیه کیت های مرغوب و مورد تأیید اداره امور آزمایشگاه ها
استفاده از روش های نوین در بخش میکروب شناسی برای مثال استفاده از دستگاه Bactec روش های تکمیلی آنتی بیوگرام مثل MIC
استفاده از روش های تکمیلی جهت کنترل روش های روتین انجام شده در آزمایشگاه جهت تأیید جواب های بدست آمده. برای مثال استفاده از کیت های API

ب: اهداف کنترل کیفي
هدف از برنامه کنترل کیفي پایش و ارزیابي موارد ز یر مي باشد:
صحت و دقت روش انجام آزمایش تعیین حساسیت
مواد و وسایل به کار برده شده در این آزمایش
عملکرد افرادي که آزمایش را انجام داده و نتایج بدست آمده را قرائت مي نمایند.به منظور دست یابي بهینه به این اهداف در دسترس داشتن سویه هاي کنترل کیفي تهیه شده از مراکز معتبر ضروري است.

ج: سویه هاي کنترل کیفي پیشنهادي توسط CLSI عبارتند از:
Enterococcus faecalis ATCC 29212
Escherichia coli ATCC 25922
Escherichia coli ATCC 35218
Haemophilus influenza ATCC 49247

Haemophilus influenza ATCC 49766
Klebsiella pneumonia ATCC 700603
Neisseria gonorrhoeae ATCC 49226
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853
Staphylococus aureus ATCC 25923
Streptococcus pneumonia ATCC 49619
E.coli ATCC 35218 فقط به عنوان يك ميكروارگانيسم كنترلي براي تركيبات ممانعت كننده بتالاكتاماز، مثل تركيبات حاوي كلاولانيك اسيد، سولباكتام يا تازوباكتام پيشنهاد مي شود.
nterococcus faecalis ATCC 29212 (يا E.faecalis ATCC 33186) براي ارزيابي محيط مولرهينتون آگار با ديسك تري متوپريم/سولفامتوكسازول استفاده مي شود. در محيط كشت قابل قبول، هاله عدم رشد واضحي به قطر mm 20 يا بزرگتر ايجاد مي شود درحاليكه در محيط هاي كشت غيرقابل قبول، هاله عدم رشد ايجاد نمي شود يا در داخل هاله، رشد كم مشاهده مي شود و يا هاله اي با قطر كمتر از mm 20 ايجادمي گردد. اين كار به منظور بررسي مقادير غيرقابل قبول تيميدين در محيط كشت مزبور است.
Enterococcus faecalis ATCC 29212 همچنين براي كنترل ديسكهاي آمينوگليكوزيد با دوز بالا به كار مي رود.
Klebsiella pneumonia ATCC 700603 به عنوان يك سويه كنترلي براي آزمايشات ESBL به كار برده مي شود.

د:كنترل كيفيت قطر هاله عدم رشد سويه كنترلي/ديسك آنتي بيوتيكي:
سويه هاي كنترل كيفي را بايد به روش استاندارد آزمايش disk diffusionو با استفاده از همان مواد و روشي كه براي سويه هاي جدا شده از نمونه هاي كلينيكي استفاده مي شود آزمايش و نتايج را با جداول 3 و CLSI3A مقايسه و بررسي نمود. محدوده قطر هاله عدم رشد قابل قبول براي هر سويه كنترلي نيست به يك ديسكم آنتي بيوتيكي در جداول فوق فهرست شده است.
چنانچه تغيير در ميانگين قطر هاله عدم رشد ناشي از خطا در روش انجام آزمايش نباشد، احتمالاً ناشي از تغيير در حساسيت ذاتي باكتري نسبت به آن آنتي بيوتيك مي باشد. در اين صورت لازم است كشت تازه از سوش كنترل تهيه شود.
- آزمايش كنترل كيفيت را بايد در چه فواصل زماني انجام داد؟
روزانه. براي هر سويه كنترلي با يك ديسك آنتي بيوتيكي بايد 20 روز متوالي آزمايش تعيين حساسيت انجام و نتايج با مقادير قابل قبول اشاره شده در جداول فوق مقايسه گردد .

ر: کنترل کیفی لوپ میکروبشناسی

از بین وسایل مورد استفاده در بخش میکروب شناسی لوپ میکروب شناسی از جمله ابزارهای مهم و اصلی است. در بررسی انجام شده دو روش محاسبه حجم توسط روش اسپکتروفتومتری و روش استفاده از ترازو مورد ارزیابی قرار گرفته اند.

روش بررسی : در این تحقیق حجم برداشت شده توسط دو نوع لوپ مورد مصرف که تحت عنوان لوپ های تجاری در بازار موجود بوده و به عنوان لوپ ۰/۰۱ و لوپ ۰/۰۰۱ استفاده میشوند مورد بررسی قرار گرفت و نیز با توجه به اینکه برخی از آزمایشگاه های تشخیص پزشکی لوپ های دست ساز را که با استفاده از پیچیدن سیم به دور دسته فلزی لوپ تهیه می شوند مورد استفاده قرار می دهند این نوع لوپ ها نیز به دو روش اسپکتروفتومتری و توزین مورد ارزیابی قرار میگیرد. همچنین مقدار حجم برداشتی توسط لوپ ها به صورت تخمینی و از طریق ریاضی مورد بررسی قرار میگیرد.

1) روش اسپکتروفتومتری : در این روش از یک ماده رنگی که دارای جذب نوری در طول موج خاص است استفاده می گردد . معمولا 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:

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 لاندا – 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 هشـــتم 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 برداشـــته 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 دســـت آوردن میانگین جذب نوری و انتقال آن بر روی منحنی مقدار حجم برداشته شده توسط لوپ به راحتی به دست می آید.

از آنجا که مقدار کلنی بر اسـاس (colony forming unit) CFU/ml گزارش می گردد، اگر ۱ میلی لیتر را که برابر با ۱۰۰۰ لاندا می باشـد بر حجم به دست آمده تقسیم کنیم ضریب لوپ مجهول به دست خواهد آمد
2) روش توزین : در این روش ترازوی حساس با دقت ۰/۰۰۱ گرم مورد نیاز است و از آنجا که وزن و حجم آب مقطر خالص مساوی هستند می توان به کمک لوپ از آب مقطر برداشـت کرد و بر روی یک دیسـک آنتی بیوگرام قرار داد و با توزین توسـط ترازو مقدار حجم برداشـتی را محاسبه کرد . در این روش ابتدا دیسک آنتی بیوگرام توزین می شود سپس مقدار افزایش وزن بر اثر برداشت آب مقطر توسط لوپ محاسبه می گردد . اگر این عمل را ۱۵- ۱۰ بار تکرار کرده و میانگین افزایش وزن را ثبت کنیم حجم برداشتی توسط لوپ به دست خواهد آمد
3) روش محاسبه ریاضی : در این روش اگر قطر سیم مورد استفاده در ساخت لوپ را توسط میکرومتر اندازه گیری کرده و قطر داخلی حلقه لوله را توسط کولیس محاسبه کنیم حجم برداشتی از طریق محاسبه حجم استوانه به دست می آید . این روش برای محاسبه مقدار برداشتی توسط لوپ چندان دقیق نیست زیرا حجم برداشتی توسط لوپ در مقایسه با روش های استاندارد حجم بیشتری را نشان می دهد و در عمل از آنجا که کشش سطحی بافت باعث می شود مقدار کمتری از محلول در مرکز لوپ قرار گیرد میزان برداشتی نهایی کمتر خواهد بود .
نتیجه بررسی : مقایسه نتایج حاصل از بررسی ۳ روش فوق نشان می دهد که حجم برداشت شده توسط لوپ هایی که به عنوان لوپ تجاری عرضه میشوند استاندارد نیست برای مثال با لوپ تجاری ۰/۰۰۱ مقدار برداشتی لوپ ۰/۶ لاندا می باشد و در مورد لوپ ۰/۰۱ مقدار برداشتی ۲/۴ لاندا است . در نهایت ضریب لوپ ۰/۰۰۱ برابر با ۱۶۶۶/۶۶ و لوپ ۰/۰۱ برابر با ۴۱۶/۶۶ و لوپ دست ساز تقریبا معادل ۳۳۸ است که با مقادیر ادعا شده تفاوت دارند.
نتیجه گیری : با توجه به بررسی های مزبور موارد زیر پیشنهاد میشود :
۱ -لوپ هایی که تحت عنوان ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ به صـــورت تجاری به فروش می رســـند اســـتاندارد نبوده و هر آزمایشـــگاه می باید نســـبت به کالیبراسیون و تععین ضریب دقیق لوپ مصرفی اقدام کند.
۲ -در صورت عدم کالیبراسیون لوپ مصرفی شمارش کلنی در کشت ادرار به صورت تخمینی گزارش شود. (کمتر از ۱۰۰۰ یا ۱۰۰۰۰-۱۰۰۰ یا بیشتر از ۱۰۰۰۰)
۳ -برای کالیبراسیون لوپ به علت مجهز نبودن اکثر آزمایشگاه ها به ترازوی حساس روش اسپکتروفتومتری پیشنهاد می شود
۴ -حتی المقدور سعی گردد تا لوپ ها به صورت پلاستیکی و یک بار مصرف تهیه شود.

امکانات و تسهیلات مورد نیاز:

تجهیزات آزمایشگاه

منابع:

راهنمای جامع استانداردهای اعتباربخشی ملی بیمارستان های ایران، ویرایش پنجم، 1401

جزوات منتشر شده و الزامات مربوط به مستندسازي آزمایشگاه مرجع سلامت

الزامات مستندسازي و کتاب جامع آزمایشگاهی

	دانشگاه علوم پزشکی اراک **مرکز آموزشی درمانی ولیعصر(عج)** **عنوان دستورالعمل: کنترل کیفیت آزمایش های مختلف در بخش میکروب شناسی**	**تاریخ اولین ابلاغ :** 1395/10/26 **تاریخ آخرین بازنگری** 1404/02/27 **تاریخ بازنگری بعدی:** 1405/02/27 **کد سند :** IN/LS/15/03

تهیه کننده/ تهیه کنندگان		
دکتر احسان ا... غزنوی راد (مسئول فنی میکروبشناسی آزمایشگاه)	مهرداد نحوی (سوپروایزر آزمایشگاه)	حمید عبدی (کارشناس بخش بیوشیمی)
تأیید کننده	**تصویب کننده**	**ابلاغ کننده**
دکتر فرامرز دارابی (مسئول فنی بیوشیمی و مسئول آموزش آزمایشگاه)	دکتر فرزانه داداشی قرتکلائی (مسئول فنی آزمایشگاه)	دکتر رضا شجاعی (ریاست بیمارستان)