مرکز آموزشی درمانی ولیعصر(عج)
بهبود کیفیت و اعتباربخشی
دستورالعمل داخلی

عنوان دستورالعمل: کنترل کیفیت آزمایش های مختلف در بخش میکروب شناسی
مخاطبین: کلیه پرسنل آزمایشگاه
هدف: اطمینان از کیفیت نتایج آزمایشات و کاهش خطاهای تشخیصی و در نتیجه ارتقای ایمنی بیماران در مراحل تشخیص و درمان های متعاقب آن

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 کیفی:

هدف از برنامه کنترل کیفی پایش و ارزیابی موارد ز یر 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.

ج: سویه های کنترل کیفی پیشنهادی توسط CLSIعبارتند 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 یک میکروارگانیسم کنترلی برای ترکیبات ممانعت کننده بتالاکتاماز، مثل ترکیبات حاوی کلاولانیک اسید، سولباکتام یا تازوباکتام پیشنهاد می شود.
- nterococcus faecalis ATCC 29212 (یا E.faecalis ATCC 33186) برای ارزیابی محیط مولرهینتون آگار با دیسک تری متوپریم/سولفامتوکسازول استفاده می شود. در محیط کشت قابل قبول، هاله عدم رشد واضحی به قطر mm ۲۰ یا بزرگتر ایجاد می شود درحالیکه در محیط های کشت غیرقابل 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 ایجادمی گردد. این کار به منظور بررسی مقادیر غیرقابل قبول تیمیدین در محیط کشت مزبور است.
- Enterococcus faecalis ATCC 29212 همچنین برای کنترل دیسکهای آمینوگلیکوزید با دوز بالا به کار می رود.
- Klebsiella pneumonia ATCC 700603 به عنوان یک سویه کنترلی برای آزمایشات ESBL به کار برده می شود.

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

سویه های کنترل کیفی را باید به روش استاندارد آزمایش disk diffusionو 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 ۳ و CLSI3A مقایسه و بررسی نمود.

محدوده قطر هاله عدم رشد قابل قبول برای هر سویه کنترلی نیست به یک دیسکم آنتی بیوتیکی در جداول فوق فهرست شده است.

چنانچه تغییر در میانگین قطر هاله عدم رشد ناشی از خطا در روش انجام آزمایش نباشد، احتمالاً 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 در چه فواصل زمانی انجام داد؟

روزانه. برای هر سویه کنترلی با یک دیسک آنتی بیوتیکی باید ۲۰ روز متوالی آزمایش تعیین حساسیت انجام و نتایج با مقادیر قابل قبول اشاره شده در جداول فوق مقایسه 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.

عنوان دستورالعمل: کنترل کیفیت آزمایش های مختلف در بخش میکروب شناسی
مخاطبین: کلیه پرسنل آزمایشگاه
هدف: اطمینان از کیفیت نتایج آزمایشات و کاهش خطاهای تشخیصی و در نتیجه ارتقای ایمنی بیماران در مراحل تشخیص و درمان های متعاقب آن

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 قرارمیگیرد.

الف) 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 – ۱.۰ 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
از آنجا که مقدار کلنی بر اساس (colong forming unit) CFU/ml گزارش می گردد، اگر ۱ میلی لیتر را که برابر با ۱۰۰۰ لاندا می باشد بر حجم به دست آمده تقسیم کنیم ضریب لوپ مجهول به دست خواهد آمد

ب) 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 برداشت کرد و بر روی یک دیسک آنتی بیوگرام قرار داد و با توزین

عنوان دستورالعمل: کنترل کیفیت آزمایش های مختلف در بخش میکروب شناسی
مخاطبین: کلیه پرسنل آزمایشگاه
هدف: اطمینان از کیفیت نتایج آزمایشات و کاهش خطاهای تشخیصی و در نتیجه ارتقای ایمنی بیماران در مراحل تشخیص و درمان های متعاقب آن

توسط ترازو مقدار حجم برداشتی 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

ج) 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 صورت تجاری به فروش می رسند استاندارد نبوده و هر آزمایشگاه می باید نسبت 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 .

تهیه کننده/ تهیه کنندگان		
دکتر فرامرز دارابی (مسئول کمیته علمی آزمایشگاه)	مهرداد نحوی (سوپروایزر آزمایشگاه)	دکتر احسان ا... غزنوی راد (مسئول فنی میکروبشناسی)
تأیید کننده	**تصویب کننده**	**ابلاغ کننده**
دکتر احسان ا... غزنوی راد (مسئول فنی میکروبشناسی)	دکتر مرضیه میرزائی (مسئول فنی آزمایشگاه)	دکتر سید محمد جمالیان (ریاست بیمارستان)