

لوپ میکروپ شناسی

محمدرضا یزدانی، کارشناس ارشد ایمنی شناسی دانشگاه علوم پزشکی شیراز

دستورالعمل فنی لوپ:

لوپ میکروپ شناسی از جنس‌های متفاوت ساخته می‌شود و معمول‌ترین آن‌ها پلاتین، نیکل، کروم و پلاستیک می‌باشد. به‌طور کلی لوپ باید فلزی باشد تا به‌سادگی شکل‌پذیر بوده و بر اثر سرد و گرم شدن مکرر خراب نشود. سر لوپ باید به شکل دایره پیچیده شود و در محل تماس شروع دایره و میله نباید فاصله ایجاد شود. لوپ معمولاً برای انتقال سوسپانسیون حاوی میکروب به محیط کشت به کار می‌رود، به‌نحوی که بتوان کلنی‌های رشد یافته را شمارش کرد. استفاده از لوپ استاندارد با حجم معین جهت شمارش کلنی‌های به‌دست‌آمده از کشت نمونه‌های بالینی به‌ویژه ادرار به‌منظور تشخیص عفونت واقعی ضروری است، لذا آزمایشگاه‌ها همواره باید از لوپ کالیبره جهت کشت نمونه‌های ادراری استفاده نمایند و به کمک آن تعداد کلنی‌های موجود در هر میلی‌لیتر ادرار (Cfu/ml) را محاسبه و گزارش نمایند. ماکزیمم تفاوت قابل‌قبول در شمارش کلنی‌ها با لوپ‌های متفاوت ۱۰٪ است.



تصویر مربوط به یک لوپ

کنترل کیفی لوپ:

با توجه به اینکه علاوه بر قطر دایره سر لوپ، عوامل دیگری همچون جنس لوپ و قطر میله مورد استفاده در تعیین گنجایش حلقه مؤثر می‌باشد، اندازه‌گیری ظرفیت حجم لوپ (کنترل صحت آن) در شروع و ادامه کار لازم است.

کنترل صحت لوپ یا روش تعیین حجم لوپ:

برای بررسی حجم لوپ از روش‌هایی مانند رنگ سنجی، توزین و روش ریاضی بهره می‌گیرند.

الف) روش ریاضی:

در این روش اگر قطر سیم مورد استفاده در ساخت لوپ را توسط میکرومتر اندازه‌گیری کرده و قطر داخلی حلقه لوله را توسط کولیس محاسبه کنیم، حجم برداشتی از طریق محاسبه حجم استوانه به دست می‌آید. این روش برای محاسبه مقدار برداشتی توسط لوپ چندان دقیق نیست زیرا حجم برداشتی توسط لوپ در مقایسه با روش‌های استاندارد حجم بیشتری را نشان می‌دهد ولی در عمل از آنجایی که کشش سطحی باعث می‌شود مقدار کمتری از محلول در مرکز لوپ قرار گیرد، میزان برداشت نهایی کمتر خواهد بود.

ب) روش توزین:

در این روش ترازوی حساس با دقت 0.001 گرم مورد نیاز است و از آنجاکه حجم و وزن آب مقطر خالص مساوی هستند می‌توان به کمک لوپ از آب مقطر برداشت کرد و بر روی یک دیسک آنتی‌بیوگرام قرار داد و با توزین توسط ترازو حجم برداشتی را محاسبه کرد. اگر این عمل را ۱۰ تا ۱۵ بار تکرار کرده و میانگین افزایش وزن را ثبت کنیم، حجم برداشتی توسط لوپ به دست خواهد آمد.

ج) روش رنگ‌سنجی:

مقایسه حجم منتقله توسط لوپ با سمپلر استاندارد و واریسی شده به روش رنگ‌سنجی: در پنج لوله تمیز و خشک 3ml آب مقطر ریخته و با لوپ مجهول از یک محلول رنگی با رعایت نکات ذکر شده، رنگ مورد نظر را به هر یک از لوله‌ها اضافه می‌کنیم. با همین روش نیز با کمک سمپلر هم‌حجم لوپ در پنج لوله حاوی 3ml آب مقطر محلول رنگی فوق را اضافه می‌کنیم. حال با اندازه‌گیری میانگین جذب نوری آن‌ها در طول موج مشخص (مثلاً 630nm برای رنگ سبز خوراکی) و استفاده از رابطه زیر حجم لوپ را به دست می‌آوریم.

$$\text{میانگین جذب لوپ} / \text{حجم لوپ} = \text{میانگین جذب سمپلر} / \text{حجم سمپلر}$$

د) تعیین حجم لوپ با استفاده از ماده رنگی اوانس بلو

- 20mg از پودر اوانس بلو تجاری را در 10ml آب مقطر حل می‌کنیم. غلظت این محلول $2\text{gr}/100$ است.
- ۶ لوله آزمایش انتخاب کرده، در لوله اول 2ml و در هر یک از لوله‌های باقیمانده 1ml آب مقطر می‌ریزیم. ۲۰ لانداز محلول ذخیره اولیه برداشته و در لوله اول حل می‌کنیم و سپس 1ml از لوله اول برداشته و به لوله دوم می‌ریزیم و به همین ترتیب تا لوله ۶ پیش می‌رویم (پاساژ می‌دهیم) و 1CC از لوله ۶ دور می‌ریزیم، سپس OD یا جذب نوری هر ۶ لوله را در طول موج 620nm با اسپکتروفتومتر کالیبره می‌خوانیم.
- جهت تعیین حجم لوپ مورد بررسی، به ازای هر محلول ذخیره (۶ محلول) در ۱۰ لوله آزمایش آب مقطر بریزید. در مجموع ۶۰ لوله آب مقطر).
- لوپ تحت کنترل را به‌طور کاملاً عمودی وارد محلول ذخیره مربوطه نموده و در لوله آزمایش اول فرو برید. سپس لوپ را (بدون سوزاندن) با کاغذ خشک‌کن کاملاً خشک کنید و این عمل را برای ۱۰ لوله انجام دهید و جذب هر لوله را بعد از مخلوط کردن در طول موج 620nm بخوانید (مجموعاً ۶۰ خوانش).
- میانگین نتایج را به تفکیک محلول ذخیره به دست آورید.

○ بر روی کاغذ میلی‌متری نموداری ترسیم نمایید که محور افقی نشانگر رقت‌های تهیه‌شده و محور عمودی نمایانگر جذب نوری هر رقت باشد.

○ با قرار دادن میانگین جذب هر رقت (که به‌وسیله لوپ کنترلی به‌دست‌آمده) روی محور عمودی می‌توان ضریب رقت لوپ کنترلی را روی محور افقی به دست آورد.

ج) **تعیین حجم لوپ با متیلن‌بلو:** با توجه به کمبود و گران بودن ماده اوانس‌بلو می‌توان از متیلن‌بلو که از نظر اقتصادی مقرون‌به‌صرفه بوده و در همه آزمایش‌ها در دسترس است، استفاده نمود. اساس کار شبیه روش اوانس‌بلو است ولی با دو تفاوت:

(۱) طول موج خوانش به‌جای ۶۲۰ نانومتر، ۶۶۳ نانومتر می‌باشد.

(۲) به‌جای استفاده از آب مقطر برای تهیه محلول ذخیره اولیه و سریال دایلووشن، از آب مقطر و الکل ۹۶٪ به نسبت ۵۰ به ۵۰ استفاده می‌کنیم؛ یعنی برای ساختن محلول ذخیره اولیه ۲۰ mg پودر متیلن‌بلو را در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر و الکل (۵CC آب مقطر و ۵CC الکل) حل می‌کنیم و در ۶ لوله هم از همین محلول استفاده می‌کنیم.

جهت تعداد کلنی در هر میلی‌لیتر ادرار باید تعداد کلنی به دست آمده از کشت را در عکس ضریب رقت لوپ ضرب نمود، مثلاً اگر ضریب رقت لوپ ۱/۱۰۰ بود و تعداد کلنی پلیت ۵۰۰ عدد باشد نتیجه را به‌صورت ۵۰۰۰۰ ml/cfu گزارش می‌کنند.

کنترل کیفی عدم دقت لوپ:

در ۱۰ لوله تمیز و خشک ۳ میلی‌لیتر آب خالص ریخته و با لوپ موردنظر به هرکدام رنگ اضافه می‌کنیم (دقت شود که فقط حلقه لوپ وارد رنگ و آب شود و به‌صورت عمودی گرفته شود) و با طول موج موردنظر برای رنگ موردنظر، جذب نوری لوله‌ها را اندازه گرفته و C.V را محاسبه می‌کنیم. عدم دقت مجاز برای لوپ ۵٪ می‌باشد. **خطای توتال: $\text{total error} = \% \text{bias} + \% \text{c.v}$**

ماکزیمم خطای توتال مجاز لوپ از ۱۰-۷٪ می‌باشد.

استریل شدن لوپ:

جهت کنترل استریل شدن لوپ پس از قرار دادن شعله، لوپ را با سوسپانسیون میکروبی تماس داده و پس از قرار دادن در شعله استریل می‌کنیم، سپس لوپ را سرد کرده و در محیط غنی کشیده و روز بعد رشد یا عدم رشد باکتری‌ها را مشاهده می‌کنیم.

تعمیرات و نگهداری:

■ به‌محض مشاهده شکاف یا تغییر قطر سیم لوپ، باید آن را تعویض کرد.

▪ بهتر است از لوپ استاندارد و یکبار مصرف پلاستیکی استفاده نمود.

ایمنی:

در موقع سترون کردن لوپ باید از قرار دادن سریع لوپ روی شعله به علت ایجاد آئروسول خودداری کرد و ابتدا آن به قسمت قاعده شعله (که پائین‌ترین درجه حرارت را دارد) وارد شده و تدریجاً به نوک شعله انتقال یابد.

منابع:

کنترل کیفیت در آزمایشگاه پزشکی، دکتر فریده رضی

مستندات سیستم مدیریت کیفیت در آزمایشگاه پزشکی، دکتر حسین دارآفرین

کتاب جامع تجهیزات آزمایشگاهی و فرآورده‌های تشخیصی، دکتر حمیدرضا سقا و همکاران