نکات مهم کنترل کیفیت در آزمایشهای میکروب شناسی

برای کنترل کیفیت در آزمایشگاه میکروب شناسی باید به موارد زیر توجه داشت:

کنترل کیفیت آزمایشهای تعیین حساسیت میکروبی، محیط های کشت، رنگها ومعرفها، ابزار و دستگاهها(لوپ، فور، اتوکلاو وانکوباتور)

نظر به اینکه هدف نهایی کلیه فعالیت های آزمایشگاه میکروب شناسی انتخاب مناسبترین آنتی‌بیوتیک جهت درمان بیمار مبتلا به عفونت میباشد ، بعد ازمبحث شیوه نگهداری و استفاده ازسویه‌های باکتریایی که برای کنترل کیفیت کلیه مواد در آزمایشگاه میکروب شناسی مورد نیازهستند در ابتدا طرز تهیه کدورت۰/۵ مک فارلند برای استانداردسازی سوسپانسیون میکروبی لازم جهت تلقیح در محیط مولر هینتون آگار و نیز روش انجام آزمایشهای تعیین حساسیت میکروبی و کنترل کیفی آنها ذکر گردیده است.

سپس به دلیل قرار داشتن آزمایش های ادراری در زمره شایعترین آزمایشهای روتین، کنترل کیفیت لوپ ادراری آورده شده است.

جزوه حاضر شامل مهم ترین اجزای کنترل کیفیت برای کلیه آزمایشگاههادر هر سطح می‌باشد و سایر مباحث درنوبتهای بعدی ارائه خواهند شد.

نگهداری و استفاده از سویه‌های باکتریایی

برای نگهداری سویه‌های باکتریایی می‌توان از روشهای طولانی مدت و کوتاه مدت استفاده نمود.

نگهداری طولانی مدت

نگهداری طولانی‌مدت باکتریها این امکان را می‌دهد که کلیه سویه‌های میکروبی اعم از هوازی (بارشد سریع ویا سخت رشد) ونیز بیهوازی ، ماهها و حتی سالها به صورت زنده نگهداری شوند. بهترین روشهای نگهداری طولانی مدت شامل لیوفیلیزاسیون (Freeze drying) و نگهداری در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد یا پایین تر (در دیپ فریز یا در نیتروژن مایع) می‌باشد.

۱- <u>نگهداری در دیپ فریز (۵۰- تا ۷۰- درجه سانتی‌گراد یا پایینتر) ویا نیتروژن مایع</u> :

باکتری مورد نظر را روی محیط مغذی مانند پلیت (TSA (Trypticase Soy Agar حاوی ۵٪ خون گوسفند و در مورد میکروارگانیسمهای سخت رشد روی محیط آگار شکلاته کشت دهید. پلیتها را به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۲±۳۵ درجه سانتی‌گراد و در صورت نیاز تحت شرایط CO_2 برای هر باکتری انکوبه نمائید.

بعد از انکوباسیون، خالص بودن و مورفولوژی کلنی‌ها را بررسی نموده و در صورت نیاز، تستهای بیوشیمیایی آنرا انجام دهید. سپس از باکتری رشد یافته ، سوسپانسیون غلیظی در ۱۰۰-۵۰ میلی‌لیتر از یک

محیط محافظت‌کننده از سرما (Cryoprotective) تهیه نمائید. این محیط برای جلوگیری از تخریب سلولهای باکتری در شرایط انجماد مورد استفاده قرار می‌گیرد. محیط محافظت‌کننده از سرما می‌تواند Skim milk ، خون گوسفند یا خرگوش دفیبرینه استریل یا Tryptic Soy Broth (TSB) حاوی گلیسرول با غلظت نهایی ۱۵-۱۰٪ باشد.

سپس از سوسپانسیون باکتریایی فوق به مقدار mL ۱- ۰/۵ در ویالهای شیشه‌ای یا پلاستیکی کوچک استریل توزیع کنید . تعداد ویال ذخیره خود را برای مصرف یکسال آماده نمائید.

ویالهای حاوی سویه‌ها را می‌توان در برودت ۵۰- تا ۷۰- درجه سانتی‌گراد به مدت یکسال نگهداری نمود. در صورت عدم دسترسی به فریزر ۷۰- درجه می توان سویه‌های با رشد سریع را در فریزر ۲۰- درجه نیز نگهداری نمود. در این شرایط توجه به نکات زیر ضروری است.

سویه‌های سخت رشد مانند هموفیلوس انفلوآنزا و نیسریا گنوره در این دما قابل نگهداری نمی‌باشند و باید در فریزر ۷۰- درجه نگهداری شوند.

سویه‌های بارشد سریع در این دما عمر کمی دارند و تعداد زیادتری از آنها از بین می‌روند. بنابراین توصیه می‌شود برای اطمینان از حیات سویه‌ها هر چند ماه ، طبق روش زیر کشت داده شوند.

یک ویال از فریزر بیرون آورده و و سریعا زیر آب جاری ولرم محتویات آنرا ذوب نمائید. نمونه را روی محیط آگار خوندار یا شکلاته (در مورد باکتریهای سخت رشد) تلقیح کرده و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۲±۳۵ درجه ودر صورت نیاز در شرایط CO_2 انکوبه نمایید. این باکتری می‌تواند برای آزمایشهای کنترل داخلی کیفیت در آزمایشگاه یا برای تهیه working control بکار رود. قبل از هر اقدام باید از خالص بودن نمونه ، اطمینان حاصل کرد. **ویال مورد استفاده بعد از ذوب شدن باید دور انداخته شده و بهیچوجه مجددا فریز نگردد.**

کشتهای working control : عبارتست ازکشت مجدد از کشت ذخیره فریز شده که برای کنترل کیفیت محیط کشت و.. استفاده می‌شود.

از کشت ذخیره تا ۳ پاساژ پشت سر هم می‌توان انجام داد . پس از آن ، نمونه باید دور انداخته شده و از یک کشت ذخیره فریز شده دیگر برای تهیه کشتهای working control استفاده شود. پاساژهای مکرر(بیش از ۳ پاساژ)، احتمال تغییر فنوتیپی سویه‌ها را افزایش می‌دهد.

برای تهیه working control ، از کشت ذخیره فریز شده ، روی پلیت یا آگار شیبدار تلقیح و آنرا به مدت یک شبانه‌روز تا زمانی که رشد مناسبی بدست آید، انکوبه نمائید. در مورد ارگانیسمهای با رشد سریع این پلیت یا آگار شیبدار را می‌توان در ۸-۲ درجه سانتیگراد یا در دمای اتاق تا مدت ۴ هفته نگهداری نمود. بعد از هر پاساژ، خالص بودن و مورفولوژی کلنی‌ها را بررسی نمائید.

۲- استفاده از روغن معدنی در دمای اتاق :

۱- محیط کشت Brain Heart Infusion Agar (BHIA) را با شیب کم در لوله تهیه نمایید. برای باکتریهای مشکل‌پسند مانند گونوکک ، منتگوکک ، استرپتوکک پنومونیه و هموفیلوس آنفلوانزا ، لازم است محیط شکلات آگار را با افزودن ۵٪ خون گوسفند به محیط فوق پس از خروج از اتوکلاو و رسیدن به دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و قرار دادن در بن‌ماری ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه تهیه نمود.

۲- روغن معدنی (یا پارافین مایع) را در حرارت خشک (۱۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یکساعت) استریل نمائید.

۳- میکروب مورد نظر را روی محیط کشت دهید.

۴- بعد از بدست آوردن کشت کافی ، روغن استریل را به مقدار cc ۱ روی سطح محیط بریزید.

۵- در صورت نیاز به کشت مجدد ، نمونه از سطح آگار (زیر روغن) برداشته می‌شود.

۶- بعد از ۱۲-۶ ماه تجدید کشت نمایید.

۱- کشت عمقی و نگهداری در دمای اتاق :

این روش فقط برای باکتریهایی که مشکل‌پسند نیستند مانند استافیلوکک وخانواده انتروباکتریاسه بکار می‌رود.

۱- یک محیط کشت آگار بدون کربوهیدرات مانند TSA را باعمق زیاد در لوله تهیه نمایید.

۲- باکتری را بصورت کشت عمقی در در این محیط تلقیح نمایید.

۳- این محیط را ۲۴ ساعت در اتو ۳۵ درجه انکوبه نمائید.

۴- در لوله را با درپیچ یا چوب پنبه ببندید.

۵- لوله در پیچ‌دار را در پارافین مایع فرو ببرید به گونه‌ای که کاملا در لوله را بپوشاند.

۶- کشتها را در حرارت اتاق نگهداری نمائید.

۷- هرساله سوش موردنظر را تجدید نمائید.

۲- کشت عمقی در محیط سیستین تریپتیکیس آگار (CTA) برای نیسریا و استرپتوکک :

۱- محیط CTA را در لوله تهیه نمایید .

۲- باکتری را بطو عمقی در این محیط کشت دهید.

۳- محیط را بمدت ۲۴ ساعت در اتو ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.

۴- در لوله را با چوب‌پنبه یا در پیچ ببندید.

۵- لوله در پیچ‌دار را در پارافین مایع فرو ببرید به گونه‌ای که کاملا در لوله را بپوشاند.

۶- برای نیسریا لوله را در ۳۵ درجه نگهداری و هر دو هفته کشت را تجدید نمائید . برای استرپتوکک لوله را در حرارت اتاق نگهداری کرده و هر ماه تجدید کشت کنید.

۳- محیط کشت Cooked meat برای باکتریهای بیهوازی :

۱- باکتری را در لوله‌های حاوی محیط Cooked meat کشت دهید.

۲- محیط را بمدت ۲۴ ساعت در اتو ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.

۳- در لوله را با چوب‌پنبه یا در پیچ ببندید.

۴- کشتها را در حرارت اتاق نگهداری نمائید.

۵- هردو ماه کشت را تجدید نمائید.

نگهداری کوتاه مدت

کشتهای working control که برای کارهای روتین روزانه استفاده می‌شوند ، به روشهای زیر تهیه می‌شوند:

§ باکتریهای با رشد سریع

۱- سوش مورد نظر را در سطح محیط TSA لوله‌ای درپیچ‌دار کشت دهید.

۲- محیط را بمدت ۲۴ ساعت در اتو ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.

۳- پس از رشد کامل، لوله را در یخچال نگهداری کنید

۴- هر ماه کشت را تجدید نمائید.

§ استرپتوککها

۱- سوش مورد نظر را در سطح آگار خوندار شیبدار(لوله‌ای درپیچ‌دار) کشت دهید.

۲- محیط را بمدت ۲۴ ساعت در اتو ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.

۳- پس از رشد کامل، لوله را در یخچال نگهداری کنید. (جهت استرپتوکک پنومونیه ، محیط را در دمای اتاق نگهداری کنید.)

۴- هر ماه کشت را تجدید نمائید.

§ منتگووکک و هموفیلوس

۱- سوش مورد نظر را در سطح محیط آگار شکلاته لوله‌ای یا پلیت کشت دهید.

۲- محیط را بمدت ۲۴ ساعت در اتو ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.

۳- پس از رشد کامل، لوله را در حرارت اتاق نگهداری کنید

۴- هر۲ هفته کشت را تجدید نمائید.

§ گونوکک

۱- سوش مورد نظر را در سطح محیط آگار شکلاته کشت دهید.

۲- محیط را بمدت ۲۴ ساعت در اتو ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.

۳- نمونه را در **دمای ۳۵ درجه** نگهداری نمایید.

۴- هر۲ روز یکبار کشت را تجدید نمائید.

تهیه کدورت نیم‌مک‌فارلند

برای استاندارد کردن غلظت تلقیح برای آزمایش تعیین حساسیت، باید از استاندارد سولفات باریم (BaSo4) که برای تهیه آن به روش زیر عمل می‌شود ، استفاده نمود.

۰/۵ میلی‌لیتر از کلرور باریم (BaCl2) 0.048 mol/L (W/V $BaCl_2/H_2O$ 1.175%) را به ۹۹/۵ میلی‌لیتراسید سولفوریک 0.18 mol/L (1% V/V) اضافه کنید و با هم زدن مداوم یک سوسپانسیون تهیه نمائید.

چگالی صحیح استاندارد با تعیین جذب این سوسپانسیون توسط اسپکتروفتومتر در کووت به قطر ۱ سانتی‌متر تعیین می‌شود. جذب در ۶۲۵ نانومتر باید بین ۰/۰۸ تا۰/۱۳ باشد.

از سوسپانسیون حاصله ۶-۴ میلی لیتر در لوله‌های درپیچ‌دار هم اندازه با لوله‌های سوسپانسیون باکتریایی ریخته می‌شود.

در لوله‌ها محکم بسته شده و در دمای اتاق نگهداری می‌شوند.

قبل از هر بار استفاده ، استاندارد با ورتکس مکانیکی به شدت همزده می‌شوند تا کدورت یکنواختی بدست آید. در صورت مشاهده ذرات بزرگ ، باید استانداردتازه‌ای جایگزین شود.

استاندارد سولفات باریم ، باید بصورت ماهانه جایگزین گردیده یا جذب آن اندازه‌گیری شود.

کنترل کیفیت دیسک های آنتی بیوتیک جهت انجام آزمایش تعیین حساسیت میکروبی به روش *disk diffusion agar*

هدف

هدف از برنامه کنترل کیفی پایش و ارزیابی موارد زیر 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 .

سویه های کنترل کیفی پیشنهادی توسط CLSI عبارتند از:

Enterococcus faecalis ATCC 29212

Escherichia coli ATCC 25922

Escherichia coli ATCC 35218

Haemophilus influenzae ATCC 49247

Haemophilus influenzae ATCC 49766

Klebsiella pneumoniae ATCC 700603

Neisseria gonorrhoeae ATCC 49226

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Streptococcus pneumoniae ATCC 49619

E.coli ATCC 35218 فقط بـه عنـوان یـک میکروارگانیسـم کنترلـی بـرای ترکیبـات ممانعـت کننـده بتالاکتاماز، مثل ترکیبات حاوی کلاولانیک اسید، سولباکتام یا تازوباکتام پیشنهاد می شود .

Enterococcus faecalis ATCC 29212 (یا *E.faecalis ATCC 33186*) برای ارزیابی محـیط مولر هینتون آگار با دیسک تری متوپریم / سولفامتوکسازول استفاده می شود. درمحیط کشت قابل قبـول ، هالـه عدم رشد واضحی به قطر *mm* ۲۰ یا بزرگتر ایجاد می شود در حالیکه در محیطهای کشت غیر قابـل قبـول ، هالـه عدم رشد ایجاد نمی شود یا در داخل هاله ، رشد کم مشاهده می شود و یا هاله ای با قطر کمتر از *mm* ۲۰ ایجـاد میگردد. این کار به منظور بررسی مقادیر غیر قابل قبول تیمیدین در محیط کشت مزبور است .

Enterococcus faecalis ATCC 29212 همچنین برای کنترل دیسکهای آمینـو گلیکوزیـد بـا دوز بالا به کار می رود.

Klebsiella pneumoniae ATCC 700603 به عنوان یک سویه کنترلی برای آزمایشات *ESBL* به کار برده می شود .

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

سویه های کنترل کیفی را باید به روش استاندارد آزمایش *disk diffusion* و با استفاده از همان مـواد و روشی که برای سویه های جدا شده از نمونه های کلینیکی استفاده می شود آزمایش و نتایج را بـا جـداول ۳ و CLSI ۳A (ضمیمه ۳) مقایسه و بررسی نمود . محدوده قطر هاله عدم رشد قابل قبول بـرای هـر سـویه کنترلـی نسبت به یک دیسک آنتی بیوتیکی در جداول فوق فهرست شده است .

چنانچه تغییر در میانگین قطر هاله عدم رشد ناشی از خطـا در روش انجـام آزمـایش نباشـد ، احتمـالا" ناشی از تغییر در حساسیت ذاتی باکتری نسبت به آن آنتی بیوتیک می باشـد. در ایـن صـورت لازم اسـت کشـت تازه از سوش کنترل تهیه شود .

آزمایش کنترل کیفیت را باید درچه فواصل زمانی انجام داد ؟

الف _ انجام آزمایش 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 . بر اساس ضریب اطمینان ۹۵٪ تنها یک مورد از ۲۰ نتیجه قرائت شده می تواند خارج از محدوده کنترل باشد (به ضمیمه ۲مراجعه کنید) . چنانچه بیشتر از یک مورد خارج از محدوده کنترل باشد نیاز به اقدامات اصلاحی خواهد بود ، که در ادامه توضیح داده می شود.

ب _ انجام آزمایش هفتگی

– در صورتیکه تنها یک مورد از ۲۰ نتیجه قطر هاله عدم رشد برای هر سویه کنترلی/ دیسک آنتی بیوتیکی خارج از محدوده قابل قبول مندرج در جداول ۳ و ۳A(ضمیمه ۳) قرار گیرد ، کنترل کیفی روزانه را به هفتگی تغییر دهید(به ضمیمه ۲ مراجعه کنید) .

– آزمایش کنترل کیفی هفتگی را یکبار در هفته و هم چنین زمانیکه یکی از عوامل آزمایش (مانند سری ساخت آگار یا دیسکهای تهیه شده از یک سازنده) تغییر کند، انجام دهید .

اگر هر یک از نتایج کنترل کیفی هفتگی خارج از محدوده قابل قبول باشد ، انجام اقدامات اصلاحی مورد نیاز است .

اقدامات اصلاحی (Corrective actions)

الف _ نتایج خارج از محدوده قابل قبول به دلیل خطاهای مشهود و واضح شامل:

- استفاده از دیسک اشتباه
- استفاده از سویه کنترلی اشتباه
- آلودگی واضح سویه
- استفاده غیرعمدی از دما و شرایط اشتباه انکوباسیون

بوجود آمده است . دراین حال باید دلیل ایجاد خطا مکتوب و پس از اصلاح آزمایش دوباره تکرار شود . اگر نتایج گزارش شده در محدوده مورد نظر قرار گرفت ، عملیات اصلاحی بیشتری مورد نیاز نمی باشد .

ب _ عامل ایجاد نتایج خارج از محدوده کنترل نامشخص است. در این حال باید اقدامات اصلاحی فوری بشرح زیر انجام شود.

- آزمایش را جهت یک سویه کنترلی / دیسک آنتی بیوتیکی برای ۵ روز متوالی تکرار و همه نتایج را ثبت کنید .
- اگر اندازه هر ۵ قطرهاله مطابق جداول ۳ و ۳A(ضمیمه ۳) و در محدوده قابل قبول باشد ، عملیات اصلاحی بیشتری مورد نیاز نمی باشد .
- اگر اندازه هر یک از ۵ قطر هاله عدم رشد خارج از محدوده قابل قبول باشد ، به عملیات اصلاحی اضافی نیاز است .
- آزمایشهای کنترلی روزانه باید ادامه داده شود تا به دلیل نهایی مشکل پی برده شود .

عملیات اصلاحی اضافی :

وقتی عملیات اصلاحی فوری مشکل را حل نکرد ، احتمالا" خطای مشاهده شده بعلت بروز یک اشکال کلی در سیستم و نه یک خطای تصادفی ایجاد شده است . در این حالت باید موارد بیشتری بررسی شوند.مانند:

- اندازه گیری و ثبت صحیح قطر هاله های عدم رشد
- رعایت تاریخ انقضا و شرایط نگهداری دیسکها و مواد مورد استفاده (دور از رطوبت و در دمای مناسب)
- مناسب بودن دما و اتمسفر انکوباتور
- تغییرنیافتن یا آلوده نبودن سویه های کنترل
- مطابقت صحیح سوسپانسیون تلقیح با استاندارد نیم مک فارلند
- استفاده از پلیت کشت تازه برای تلقیح (پلیت کشت باید تازه بوده و مدت زمان انکوباسیون آن بیشتر از ۲۴ ساعت ، نباشد.)

وقتی مشکل بر طرف شد ، می‌توان کنترل کیفی هفتگی را برقرار کرد.

نگهداری دیسکهای آنتی بیوتیکی

– دیسکها باید در یخچال$^{\circ}C$ ۸ و پایین تر ، یا در فریزر$^{\circ}C$ ۱۴- و پایین تر تا زمان مصرف نگهداری شوند.

– تمامی دیسکهای گروه بتالاکتام مانند پنی سیلین ، آمپی سیلین ، کربنی سیلین ، تیکارسیلین ، اگزاسیلین و نسل اول ، دوم و سوم سفالوسپورین ها و ... باید در فریزر نگهداری شوند ، و فقط می توان مقداری از آن را بر اساس کار روزانه آزمایشگاه حداکثر به مدت یک هفته در یخچال نگهداری نمود .

– بعضی آنتی بیوتیکهای حساس مثل ایمیپنم ، سفاکلر و ترکیبات کلاولانیک اسید یا سولباکتام اگر تا هنگام مصرف در فریزر نگهداری شوند ، پایداری بیشتری خواهند داشت .

– دیسکها باید در ظروف دارای درپوش محکم و حاوی مواد جاذب رطوبت نگهداری شوند .

– دیسکهای آنتی بیوتیکی باید یک تا دو ساعت قبل از استفاده از یخچال یا فریزر خارج شوند تا به درجه حرارت اتاق برسند .

روش تعیین حجم لوپ

برای شمارش کلنی‌های بدست آمده از کشت نمونه‌های بالینی بویژه ادرار به منظور تشخیص عفونت لازم است از لوپهای استاندارد با حجم معین استفاده شود. آزمایشگاه می‌بایست همواره از لوپهای کالیبره جهت کشت نمونه‌های ادراری استفاده وتعداد کلنی‌های موجود در هر میلی‌لیتر ادرار(CFU/ml) را گزارش نماید.

برای بررسی حجم لوپ از روشهایی مانند رنگ‌سنجی و توزین استفاده می‌شود. ساده ترین روش برای بررسی حجم لوپ استفاده از روش رنگ‌سنجی از طریق اسپکتروفتومتر یا فتومتر به کمک مواد رنگی مانند متیلن بلو ، کریستال ویوله و اوانس بلو می‌باشد. در این دستورالعمل روش رنگ‌سنجی با استفاده از اوانس بلو توضیح داده شده است.

ابزار و مواد مورد نیاز تعیین حجم لوپ با استفاده از ماده رنگی اوانس بلو

۱-پودر اوانس بلو (Evans Blue) .این ماده به صورت پودر تجاری قابل‌دسترس بوده و به آسانی در آب حل می‌شود.

۲-آب مقطر

۳-لوله آزمایش

۴-پیپت یا سمپلر

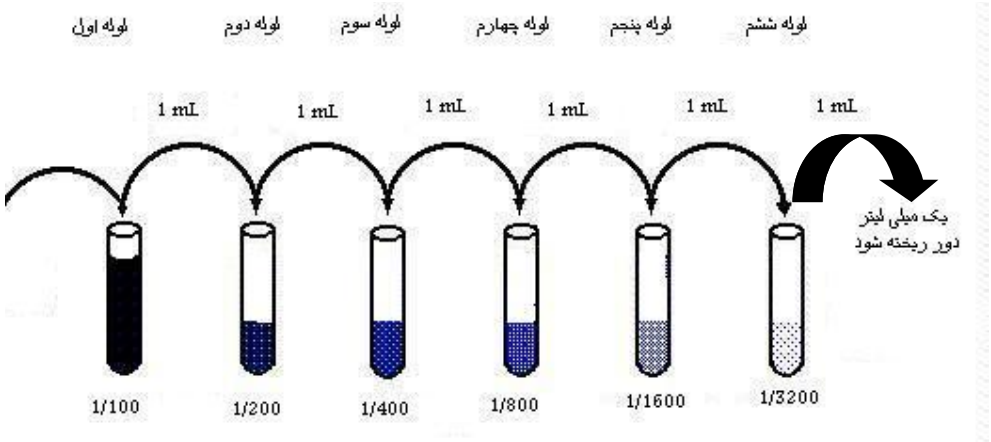
۵-اسپکتروفتومتر یا فتومتر کالیبره

۶-کاغذ میلیمتری

روش انجام

۱- 20mg از پودر رنگی اوانس بلو را در ۱۰ میلی لیترآب حل نمایید. غلظت این محلول 0.2g/100 می‌باشد.

۲- ۶ لوله آزمایش انتخاب کرده ، در لوله اول 2ml ودر هر یک از لوله‌های باقیمانده 1ml آب مقطر بریزید. 20 لاندا (0.02 ml) از محلول ذخیره اولیه (0.2g/100) برداشته در لوله اول ریخته و کاملا مخلوط نمایید. سپس 1ml از لوله اول برداشته و در لوله دوم بریزید ، از لوله دوم ، در لوله سوم و این عمل را تا آخر ادامه دهید. در انتها یک میلی لیتر از لوله ششم را برداشته و دور بریزید . به این ترتیب ۶ محلول خواهید داشت که رقت نهایی بدست آمده در هر یک و میزان ماده رنگی موجود در آن بشرح زیر خواهد بود.



20λ از محلول ذخیره 0.2g/100

رقت

مقدار ماده رنگی	**10λ**	**5 λ**	**2.5λ**	**1.25λ**	**0.625λ**	**0.3125λ**

۳- میزان جذب نوری (OD) هر یک از۶ محلول حاصله را به کمک اسپکتروفتومتر در طول موج 620nm بدست آورید.

۴- جهت تعیین حجم لوپ مورد بررسی ، ۱۰ لوله آزمایش برداشته و در هر یک ۱ میلی‌لیتر آب مقطر بریزید.

۵- لوپ تحت کنترل را بطور کاملا عمودی وارد محلول ذخیره اولیه نموده ، از محلول رنگی برداشته و در لوله‌های آزمایش فرو برید . این کار را ۱۰ بار تکرار و در فواصل لوپ را روی کاغذ خشک کن قرار دهید تا کاملا خشک شود. از سوزاندن لوپ خودداری نمایید.

۶- بعد از مخلوط کردن ، جذب هریک از لوله‌ها را در طول موج 620nm قرائت نمائید.

۷- بر روی کاغذ میلی‌متری نموداری ترسیم نمایید که در آن ، محور افقی نشانگر رقتهای تهیه شده و محور عمودی نمایانگر جذب نوری هر رقت باشد. (مشابه ضمیمه ۴)

۸- با قرار دادن میانگین جذب بدست آمده از لوپ کنترلی، روی محور عمودی می‌توان ضریب رقت لوپ کنترلی را از روی محور افقی بدست آورد.

جهت تعیین تعداد کلنی در هر میلی‌لیتر ادرار ، باید تعداد کلنی‌های بدست آمده از کشت روی پلیت را در عکس ضریب رقت لوپ ، ضرب کرد. بطور مثال اگر ضریب رقت لوپ مجهول ۱/۱۰۰ و تعداد کلنی‌های روی پلیت ۵۰۰ عدد باشد ، باید ۵۰۰ را در ۱۰۰ ضرب و نتیجه را بصورت cfu/ml ۵۰/۰۰۰ گزارش نمود.

روشهای دیگری نیز برای بررسی میزان حجم برداشتی توسط لوپ باکتریولوژی وجود دارد که از بین آنها می‌توان به روش توزینی مندرج در کتاب

Diagnostic microbiology ,Elmer W.Koneman, 5th edition, page 96

اشاره کرد که در آن با استفاده از ترازوی بسیار حساس تغییرات وزن دیسک کاغذی بعد از افزودن یک لوپ آب مقطر روی آن، محاسبه می‌گردد.