

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۸/۰۹	 آزمایشگاه مرجع معاونت بهداشت	فرم: دستورالعمل انجام آزمایش آنتی سرمها صفحه: ۱ از ۴
شماره سند:		بخش استقرار: میکروب شناسی
محدوده توزیع: تضمین کیفیت		

دستورالعمل انجام آزمایش آنتی سرم ها

هدف:

برای شناسایی سرولوژیکی سروتیپ های ویبریو کلرا، شناسایی سروتیپ های شیگلا، شناسایی عفونت *E.Coli O157* و شناسایی سرولوژیکی اعضای جنس سالمونلا به کار میرود.

اقدامات وابسته:

قبل از انجام آزمایش، آنتی سرم مربوطه باید با سوش های استاندارد کنترل کیفی شود.

آنتی سرم ها باید قبل از استفاده به دمای اتاق برسند.

هشدارها و احتیاط ها:

-قبل از استفاده حتما بروشور را مطالعه فرمایید.

- استفاده از آنتی سرم تاریخ گذشته پرهیز شود.

- هنگام انجام آزمون از دستکش و حفاظت ایمنی شخصی PPE مناسب استفاده کنید.

-در صورت کدر بودن یا لخته بودن آنتی سرمها، از آن استفاده نشود.

-آنتی سرمها را تا تاریخ یاد شده بر روی بسته بندی و در دمای ۸-۲ درجه سانتیگراد نگهداری کنید.

مواد و وسایل مورد نیاز:

-کیت آنتی سرم مربوطه

-لام شیشه ای تمیز

-سرم فیزیولوژی

-لوپ

-شعله

-دستکش و پوشاننده های مناسب

نکته: از آنجا که استفاده از محیط های کشت مختلف آزمون را دچار اختلال می سازد جهت ارزیابی صحیح نتایج، شدیداً توصیه می گردد، کلنی از محیط های Blood Agar, TSA, KIA, TSI برداشته شود. فقط در شناسایی *E.Coli O157* میتوانید کلنی را مستقیماً از محیط SMac بردارید.

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۸/۰۹	 آزمایشگاه مرجع معاونت بهداشت	فرم: دستورالعمل انجام آزمایش آنتی سرمها صفحه: ۴ از ۲
شماره سند:		بخش استقرار: میکروب شناسی
محدوده توزیع: تضمین کیفیت		

روش انجام آزمایش:

توجه: کشت هایی که از طریق آزمون های بیوشیمیایی و خصوصیات مورفولوژیکی میکروب مورد نظر شناخته شده اند، می توانند جهت هدف مورد نظر مورد آزمایش قرار گیرند.

-آزمایش به روش آگلوتیناسیون بر روی لام:

۱-آنتی سرمها را قبل از آزمایش از یخچال بیرون آورده، به درجه حرارت اتاق برسانید اطمینان حاصل کنید که لام ها تمیز و عاری از هرگونه ماده اضافی همانند دترژنت ها هستند. یک قطره آنتی سرم (حدود ۵۰ لاند، اگرچه می توان ۱۰ لاند هم استفاده شود). روی یک طرف لام قرار دهید.

۲-یک قطره سرم فیزیولوژی روی طرف دیگر لام قرار دهید برای بررسی اتوآگلوتیناسیون یا خشن بودن کلنی ها (به عنوان کنترل منفی)

۳-به وسیله لوپ از کلنی های خالص و ۱۸ تا ۲۴ ساعته باکتری مشکوک یا سویه کنترل، رشد یافته بر روی محیط های غیرمهماری را در قطره آنتی سرم و جدا گانه در قطره کنترل برده، کاملاً حل نمایید به طوری که یک سوسپانسیون غلیظ و یکنواخت بوجود آید

۴-لام را به مدت ۳۰ ثانیه تا ۱ دقیقه (مطابق دستورالعمل همراه آنتی سرم) به عقب و جلو بچرخانید.

تفسیر آزمایش:

-واکنش آگلوتیناسیون را در زیر نور کافی (چراغ مطالعه) با پس زمینه تیره بررسی کنید.

-قطره سرم فیزیولوژی باید فاقد آگلوتیناسیون باشد، تا نتیجه قطره آنتی سرم قابل اطمینان محسوب شود.

-شدت آگلوتیناسیون را قرائت نمایید.

-نتایج همه واکنش ها را در زمان تعیین شده مطابق دستورالعمل همراه (بروشور) در فرم جداگانه ای ثبت نمایید.

-اگر باکتری مورد آزمایش در سرم فیزیولوژی نیز خود به خود آگلوتینه می شود؛ این باکتری از نوع Rough (کلنی خشن) بوده و نتیجه آزمون قابل اعتماد نمی باشد.

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۸/۰۹	 آزمایشگاه مرجع معاونت بهداشت	فرم: دستورالعمل انجام آزمایش آنتی سرمها صفحه: ۳ از ۴
شماره سند:		بخش استقرار: میکروب شناسی
محدوده توزیع: تضمین کیفیت		

-در صورت عدم مشاهده آگلوتیناسیون در هیچ یک از قطره ها، احتمال دارد سوویه از جمله سوویه های کپسول دار بوده بنابراین جهت اجتناب از منفی کاذب، حتما لازم است آزمون پس از حذف کپسول (حرارت دادن سوسپانسیون میکروبی) مجددا انجام گردد.

نتیجه مثبت: آگلوتیناسیون +۱ تا +۴ در مدت ۳۰ ثانیه تا یک دقیقه (طبق دستورالعمل همراه)

نتیجه منفی: عدم مشاهده آگلوتیناسیون در هیچ یک از قطره ها

کنترل کیفیت آنتی سرم:

دفعات کنترل کیفیت: هر سری ساخت و خرید و سپس هر شش ماه یک بار

آزمایش کنترل کیفیت:

-بررسی چشمی در هر بار استفاده: یک قطره آنتی سرم را روی لام بریزید و در زیر نور کافی بررسی نمایید. آنتی سرم باید کاملا شفاف و فاقد هرگونه ذره باشد در غیر اینصورت نباید از آن استفاده شود.

-بررسی خصوصیات و شدت آگلوتیناسیون آنتی سرم، آزمایش حداقل یک سوویه کنترل مثبت و یک سوویه کنترل منفی

توجه: آزمون کنترل کیفیت آنتی سرم با سوویه های کنترل باید مطابق روش انجام آزمایش و کاملا منطبق با دستورالعمل شرکت سازنده باشد.

محدودیت های انجام آزمایش:

-گزارش صحیح واکنش های سرولوژیک وابسته به خلوص کشت، خصوصیات مورفولوژیک و واکنش های بیوشیمیایی است

-گرمای بالای (منابع خارجی) مانند: لوپ باکتریولوژیک، منبع نوری و غیره ممکن است از ایجاد یک سوسپانسیون یک دست از باکتری ممانعت کرده یا موجب تبخیر یا پرسپیتاسیون مخلوط شوند که در نتیجه آن واکنش مثبت کاذب رخ می دهد.

-روش های سرولوژیک نباید به تنهایی برای تشخیص عامل ایجاد کننده بیماری مورد استفاده قرار گیرند
روش های کشت باید قبل از هرگونه آزمایش سرولوژی انجام شود و تشخیص نهایی بدون بررسی خصوصیات بیوشیمیایی میکروارگانیسم ارزشی ندارد.

-کنترل نرمال سالین باید در هر آزمایش جهت اطمینان از اختصاصی بودن واکنش به کار رود.

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۸/۰۹	 آزمایشگاه مرجع معاونت بهداشت	فرم: دستورالعمل انجام آزمایش آنتی سرمها صفحه: ۴ از ۴
شماره سند:		بخش استقرار: میکروب شناسی
محدوده توزیع: تضمین کیفیت		

-سویه های خشن (Rough) اتواگلوتیناسیون می دهند.

نکات ایمنی :

لام، اپلیکاتور و دستکش های عفونی را به صورت ایمن (در سیفتی باکس و با سطل زباله عفونی) و بعد از آلودگی زدائی و اتوکلاو، دفع کنید.

مراجع :

دستورالعملهای آزمایشگاه مرجع سلامت وزارت بهداشت

نام و امضاء تهیه کننده:	نام و امضاء تایید کننده:	نام و امضاء تصویب کننده:
حوریه قربانی - کارشناس آزمایشگاه	حوریه قربانی - کارشناس آزمایشگاه علی حقی - کارشناس ارشد باکتری	