

دستورالعمل فنی

فور، اتوکلاو و انکوباتور

آزمایشگاه مرجع سلامت
وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی
تابستان ۱۳۹۶

محل مهر تضمین کیفیت	
تاریخ:	تاریخ:

فور (اون)

از اون برای خشک کردن لوازم آزمایشگاهی یا سترون کردن آنها به روش حرارت خشک استفاده می شود. اون برای سترون کردن موادی به کار می رود که با اطمینان کافی تحت نفوذ بخار قرار نمی گیرند، اما می توانند دماهای بالای مورد نیاز مثل 180°C - 160°C را تحمل کنند. اون به ویژه برای سترون کردن ظروف شیشه ای مثل لوله های آزمایش، پلیت های شیشه ای، پی پت ها و نیز برای آلات فلزی مثل پنس، اسکالپل و قیچی به کار می رود. اون باید دارای فن (جهت چرخش هوای متراکم در سراسر اتاقک)، نشانگر درجه حرارت، ترموستات و تایمر، طبقات مشبک، قفل داخلی درب و عایق بندی مناسب جداره ها باشد.

سترون سازی در اون

- 1- برای بسته بندی وسایل فوق الذکر جهت سترون نمودن آنها در اون می توان از فویل آلومینیومی یا کاغذ کرافت و سربطری های پنبه ای استفاده نمود. باید دقت شود که کاغذ و پنبه نسوزند، چون پنبه نیم سوز مواد ضد باکتری فرآری را متصاعد می کند.
- 2- حدود ۲ سانتی متر از انتهای فوقانی پی پت ها را با پنبه غیر جاذب ببندید و آنها را در ظرف فلزی قرار داده، در ظرف را ببندید.
- 3- درپوش لوله های آزمایش را با کاغذ آلومینیومی ببوشانید و آنها را به طور عمودی در جالوله ای قرار دهید. درپوش، لبه لوله را از آلودگی از طریق هوا در طی ذخیره سازی حفظ می کند.
- 4- در صورتی می توان بطری های درپچ دار را در اون سترون نمود که درپوش و آستری آنها از موادی مثل فلز، تفلون، پلی پروپیلن یا لاستیک سیلیکون ساخته شده باشد، چون در دمای سترون سازی از شکل طبیعی خارج نمی شوند.
- 5- قبل از قرار دادن ظروف شیشه ای در اون، از خشک بودن آنها مطمئن شوید. توصیه می شود که ابتدا آنها را در دمای 100°C قرار دهید.
- 6- پودر، روغن، چربی و گریس مثل Petroleum Jelly را در ظرف شیشه ای یا فلزی و در اندازه های کوچک که از وزن ۱۰ گرم یا عمق یک سانتی متر تجاوز نکند، سترون نمایید.
- 7- مواد، وسایل یا بسته ها را به گونه ای در اون قرار دهید که هوای داغ در اطراف و بین آنها در جریان باشد.
- 8- در اون را ببندید و منبع گرما را روشن کنید.
- 9- زمان نگهداری سترون سازی از زمانی آغاز می شود که اتاقک به دمای سترون انتخابی برسد و نیز مدتی هم بیشتر در نظر گرفته می شود تا همه قسمت های اتاقک و بار داخل آن به دمای مورد نظر برسند (180°C - 160°C به مدت ۲ تا ۴ ساعت).

۱۰- به دلیل عایق بودن دستگاه، چند ساعت طول می کشد تا اشیاء داخل آن خنک شوند، مگر آنکه دستگاه مجهز به فن باشد. در اون را باز نکنید تا اتاقک، ظروف و مواد داخل آن تا دمای حدود 60°C خنک شوند. اگر هوای سرد به طور ناگهانی وارد دستگاه شود، ممکن است ظروف شیشه ای ترک بخورند.

۱۱- برای خشک کردن وسایل معمولاً از دمای کمتر از 100°C استفاده می گردد.

نحوه نگهداری:

به طور ماهانه داخل آن تمیز و هر ۶ ماه توسط نماینده سرویس تعمیر، بازرسی شود.

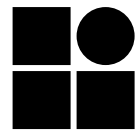
توجه: قبل از انجام هر گونه اقدام برای نگهداری معمول، اطمینان حاصل کنید که اون به دمای اتاق رسیده و به پریز برق متصل نیست.

کنترل کیفیت:

اندیکاتور شیمیایی: برای پایش مستمر اون در هر بار استفاده، از این اندیکاتور استفاده کنید. مشاهده تغییر رنگ مناسب اندیکاتور پس از پایان مرحله سترون سازی، نشان دهنده عملکرد مطلوب دستگاه است.

اندیکاتور بیولوژیک: استفاده از نوار کاغذی حاوی اسپور *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 حداقل به طور هفتگی یا فواصل بیشتر، متناسب با بار کاری اون برای پایش عملکرد آن توصیه می شود. پس از پایان سیکل، پاکت نوار کاغذی اندیکاتور بیولوژیک را از داخل اون بیرون بیاورید و طی مدت ۲ ساعت نوار اندیکاتور را در کنار شعله با پنس استریل (شرایط آسپتیک) خارج نمایید و در داخل لوله حاوی محیط کشت تریپتیک سوی براث (TSB) یا سوی بین کازئین دایجست براث تلقیح کنید. لوله را حداقل به مدت ۴۸ ساعت در دمای $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ انکوبه نمایید. لوله محیط کشت را هر روز از نظر ایجاد کدورت که علامت رشد باکتریایی است، بررسی نمایید. مشاهده هرگونه رشد باید از نظر وجود این باسیلوس بررسی گردد، بنابراین باید آن را بر روی محیط های کشت مناسب، کشت مجدد دهید. نتیجه را ثبت کنید.

کنترل منفی: همیشه از یک لوله کنترل منفی در کنار سایر لوله های حاوی نوار کاغذی اندیکاتور بیولوژیک استفاده کنید. این لوله فقط حاوی محیط کشت است و برای بررسی آلوده نبودن محیط کشت، در کنار سایر لوله های حاوی نوار کاغذی اندیکاتور بیولوژیک، داخل انکوباتور قرار می گیرد. این لوله را به همراه سایر لوله ها حداقل به مدت ۴۸ ساعت در دمای $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ انکوبه نمایید، لوله محیط کشت را هر روز از نظر ایجاد کدورت که علامت رشد باکتریایی است، بررسی نمایید. اگر در لوله کنترل منفی کدورت ایجاد شود، نتایج سایر لوله ها قابل اعتماد نمی باشد.



کنترل مثبت: چند وقت یکبار برای بررسی زنده بودن میکروارگانسیم نوار کاغذی اندیکاتور بیولوژیک از کنترل مثبت استفاده کنید. برای این کار یک نوار کاغذی اندیکاتور بیولوژیک را بدون آن که در داخل اون قرار گرفته باشد، در کنار شعله با پنس استریل (شرایط آسپتیک) از پاکت آن خارج نمایید و در داخل لوله حاوی محیط کشت تریپتیک سوی براث (TSB) یا سوی بین کازئین دایجست براث تلقیح کنید. به همراه سایر لوله ها، حداقل به مدت ۴۸ ساعت در دمای $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ انکوبه نمایید، لوله محیط کشت را هر روز از نظر ایجاد کدورت که علامت رشد باکتریایی است، بررسی نمایید. اگر در لوله کنترل مثبت رشد و کدورت ایجاد نشود، نتایج سایر لوله ها قابل اعتماد نمی باشد.

ایمنی:

- نباید از مواد قابل اشتعال یا انفجار در داخل اون استفاده شود.
- باید از پاشیده شدن محلول های اسیدی یا بخارات خورنده در داخل اون جلوگیری نمود، تا از خوردگی سطوح و قفسه های داخلی پیشگیری شود.
- باید برای برداشتن وسایل از داخل اون، از وسایل حفاظت فردی مثل دستکش های عایق و مقاوم به حرارت، عینک ایمنی یا محافظ چشم استفاده گردد.

اتوکلاو

اتوکلاو بهترین وسیله برای سترون کردن محیط های کشت، محلول ها، پسماند آلوده و مواد خشک است که با بهره گیری از حرارت بخار آب تحت فشار مورد استفاده قرار می گیرد.

چرخه سترون سازی

- مرحله ۱: زمان بالا رفتن دما در محفظه اتوکلاو (121°C - 20°C)
- مرحله ۲: زمان نفوذ گرما به داخل ظرف محیط کشت (121°C - 100°C)
- مرحله ۳: زمان نگهداری در دمای مقرر (121°C)
- مرحله ۴: زمان پایین آمدن دمای محفظه (80°C - 121°C)

انواع سترون سازی

- سترون سازی محیط های کشت و محلول ها
- سترون سازی پسماند آلوده
- سترون سازی مواد خشک بسته بندی شده

سترون سازی محیط های کشت و محلول ها

باید تصدیق کنیم که طولانی شدن مرحله گرمایی، سبب کاهش کیفیت مواد مغذی در محیط های کشت کمپلکس محتوی قند، مواد معدنی و فلزی می شود و در نتیجه به محیط های کشت زیان وارد می کند. بنابراین در چرخه سترون سازی باید از زمان کوتاهتر و دمای بالاتر استفاده کنیم تا علاوه بر آنکه آسیب کمتری به محیط کشت وارد می شود، برای ارگانسیم نیز کشنده تر باشد.

- بهتر است از لوله ها و ارلن های در پیچ دار استفاده شود. بیشتر از ۲/۳ آنها را پر نکنید. در پیچ آنها را شل کنید.
- از قرار دادن اشیاء بر روی یکدیگر بپرهیزید. باید فاصله اشیاء از یکدیگر و از دیواره های اتوکلاو حداقل ۵ سانتی متر باشد تا بخار جریان یابد.
- در اتوکلاو را ببندید. زمان و دما را طبق دستور شرکت سازنده (معمولاً ۱۵ دقیقه در 121°C) تنظیم کنید.

- در بعضی از محیط های کشت که به دمای بالا حساس هستند (محتوی مقدار قند بالا یا عوامل مهار کننده مثل دزوکسی کولات سدیم یا نمک های صفرای هستند) تحت تأثیر دمای بالا، pH محصول نهایی کاهش می یابد.
- دمای سترون سازی به دمای اتافک اتوکلاو برمی گردد، نه به دمای محیط کشت. زمان لازم برای رسیدن به این دما باید در حد ممکن کوتاه باشد.
- چرخه سترون سازی باید متناسب با زمان نفوذ گرما در نظر گرفته شود. برای مثال محتویات یک ظرف یک لیتری محیط کشت باید طی ۱۵ دقیقه از زمان رسیدن محفظه به دمای 121°C ، به این دما برسد.

سترون سازی پسماند آلوده

- مواد آلوده را جدا نموده و در کیسه های قابل اتوکلاو شدن قرار دهید و بر روی آنها برچسب Biohazard نصب کنید.
- برای اطمینان از نفوذ بخار به همه قسمت های کیسه، یا گره آنرا شل کنید یا قبل از محکم کردن گره، یک پیمانه (۳/۰ لیتر) آب به آن اضافه کنید. بیش از ۳/۴ کیسه را پر نکنید.
- برای جلوگیری از مسدود شدن آبگذر اتافک اتوکلاو توسط آگار مذاب، کیسه ها را داخل سطل قرار دهید.
- زمان لازم برای سترون سازی پسماند، ۶۰ دقیقه در 121°C یا ۴۵ دقیقه در 134°C می باشد.
- وقتی آگار ذوب شده، سفت شد آنرا مثل پسماند طبیعی دور بریزید. اما محیط کشت محتوی سلنیت را باید به صورت پسماند مخصوص منهدم کنید.

سترون سازی مواد خشک بسته بندی شده

- بسته ها را طوری در اتوکلاو قرار دهید که حداکثر چرخش بخار در بین آنها ایجاد شود و با دیواره های اتوکلاو نیز تماسی نداشته باشند.
- زمان لازم برای سترون سازی مواد خشک بسته بندی شده، ۲۵ دقیقه با خروج سریع بخار در دمای 121°C یا ۳۰ دقیقه بدون خروج بخار در دمای 121°C می باشد.

نحوه نگهداری

- روزانه: صفحه کف اتوکلاو را از سوراخ آبگذر اتافک جدا کرده، تمیز کنید. لوازم فرعی مثل طبقات و سینی ها را با آب و صابون بشویید. سطح آب ژنراتور را کنترل کنید.
- هفتگی: آبگذر و درزها را تمیز کنید. سوپاپ اطمینان را بررسی کنید.

- ماهانه: آب دستگاه را تعویض نمایید.
- هر ۳ ماه: داخل و خارج دستگاه و قسمت بیرونی آبگذر را تمیز کنید.
- هر ۶ ماه: دستگاه توسط نماینده سرویس تعمیر، بازرسی شود.

کنترل کیفیت

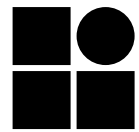
اندیکاتور شیمیایی:

اندیکاتور شیمیایی کلاس ۶ (TST): برای پایش مستمر اتوکلاو در هر بار استفاده، از این اندیکاتور استفاده کنید. این اندیکاتور سه عامل زمان، بخار و دما را کنترل می کند و تغییر رنگ می دهد. مشاهده تغییر رنگ مناسب اندیکاتور پس از پایان مرحله سترون سازی، نشان دهنده عملکرد مطلوب دستگاه است.

اندیکاتور بیولوژیک:

استفاده از ویال اندیکاتور بیولوژیک حاوی اسپور *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 حداقل به طور هفتگی یا فواصل بیشتر، متناسب با بار کاری اتوکلاو برای پایش عملکرد آن توصیه می شود. در ته یک ظرف کوچک مقاوم به حرارت و نفوذپذیر نسبت به بخار مثل Safety Box چند لایه تنزیب قرار داده، تست شیمیایی و بیولوژیک را داخل آن قرار داده، در Safety Box را ببندید و آن را به همراه سایر مواد و وسایل داخل دستگاه قرار دهید. برنامه سترون سازی را اجرا کنید. پس از پایان سیکل، ویال اندیکاتور بیولوژیک را بیرون بیاورید و طی مدت ۲ ساعت آمپول شیشه ای داخل آن را بشکنید تا محیط کشت و اندیکاتور pH داخل آمپول شیشه ای با کاغذ آغشته به اسپور باسیلوس در تماس قرار گیرد، سپس ویال را به مدت ۷۲-۲۴ ساعت در دمای $56 \pm 1^{\circ}\text{C}$ انکوبه نمایید و تغییر رنگ در آن را بررسی کنید. تغییر رنگ محیط کشت به رنگ اعلام شده توسط سازنده، نشانگر رشد باکتریایی و تغییر pH محیط کشت و عدم صحت عملکرد دستگاه است و عدم تغییر رنگ، نشان دهنده از بین رفتن باسیلوس و صحت عملکرد دستگاه است. نتیجه را ثبت کنید.

کنترل مثبت: چند وقت یکبار برای بررسی زنده بودن میکروارگانیسم داخل ویال از کنترل مثبت استفاده کنید. برای این کار، یک ویال اندیکاتور بیولوژیک را بدون آن که اتوکلاو شود، به همراه سایر ویال های بیولوژیک که از اتوکلاو خارج کرده اید، بشکنید و به مدت ۷۲-۲۴ ساعت در دمای $56 \pm 1^{\circ}\text{C}$ انکوبه نمایید. باسیلوس موجود در این ویال حتماً باید رشد کند و رنگ محیط کشت را تغییر دهد. اگر تغییر رنگ مورد نظر در این ویال ایجاد شود، نتایج سایر ویال ها قابل اعتماد



است. اگر این ویال تغییر رنگ ندهد، نشان دهنده از بین رفتن خودبخودی باسیلوس است، بنابراین نتایج سایر ویال ها نیز قابل اعتماد نیست.

ایمنی

- از دستکش مقاوم به حرارت و محافظ چشم استفاده کنید.
- بعد از آن که فشار اتاقک اتوکلاو به صفر و دمای آن به حدود 60°C رسید، کنار اتوکلاو (و نه در جلوی در آن) بایستید و آن را به آرامی باز کنید. منتظر بمانید تا ظروف کمی خنک شوند، سپس آنها را حمل کنید.
- هرگز در هنگام روشن بودن دستگاه اقدام به بارگذاری یا خارج نمودن وسایل و مواد ننمایید، همیشه ابتدا دستگاه را خاموش نموده و سپس اقدام به گذاردن و برداشتن وسایل نمایید.
- هرگز در هنگام روشن بودن دستگاه و اتصال آن به پریز برق اقدام به تمیز نمودن آن نکنید. در صورت سهل انگاری و ریختن آب یا مایعات بر روی تابلوی برق، فوراً دستگاه را از پریز جدا نموده و سپس اقدام به خشک کردن تابلوی برق نمایید، از دستگاه استفاده نکنید تا مواد ریخته شده، کاملاً خشک شود.
- هرگز پیچ های محکم کننده در را در هنگام کار دستگاه شل و سفت نکنید.

انکوباتور

انکوباتور محفظه عایق بندی شده ای است که برای نگهداری دما و رطوبت کنترل شده محیط، برای رشد میکروارگانیسم ها نیاز است. بعضی انکوباتورها برای نگهداری میزان دلخواه از CO₂ برای میکروارگانیسم هایی که دی اکسید کربن دوست (Capnophilic) هستند، تجهیز شده اند.

الف _ انکوباتورهای بدون CO₂:

- تنظیم کننده دما را روی دمای مورد نظر قرار دهید.
- وقتی درجه حرارت به دمای مورد نظر رسید، دما را در هر روز کاری که از انکوباتور استفاده می شود، روی برگه کنترل کیفیت (QC) ثبت کنید.
- نمونه ها را به طور ایمن روی سینی ها یا قفسه ها قرار دهید.
- می توانید با قرار دادن یک تشتک پر از آب متناسب با اندازه اتاقک در کف انکوباتور، محیط مرطوب ایجاد نمایید.

ب _ انکوباتورهای CO₂ دار:

- سطح دما و CO₂ در برگه QC در هر روز استفاده ثبت می شوند.
- نکته: در صورت اتمام کپسول گاز CO₂، تا زمان شارژ مجدد آن می توان جهت انکوباسیون نمونه های نیازمند CO₂ از کندل جار (جار حاوی شمع) به صورت جایگزین استفاده نمود.

نحوه نگهداری:

- همه انکوباتورها باید به طور ماهانه و نیز بعد از ریختن مواد عفونی، با استفاده از محلول گندزدای مناسب تمیز شوند.
 - قبل از تمیز کردن، انکوباتور را از پریز برق جدا کنید.
 - از مواد تمیز کننده ای استفاده کنید که خراش ایجاد نمی کنند. سطوح داخلی و خارجی انکوباتور را با پارچه آغشته به محلول تمیز کننده ملایم تمیز کنید.
 - از تماس بین مواد پاک کننده و ساختارهای الکتریکی خودداری نمایید.
 - قبل از اتصال مجدد انکوباتور به برق، منتظر بمانید تا داخل انکوباتور خشک شود.
- توجه: قبل از انجام هر گونه تعمیر، مطمئن شوید که انکوباتور، آلودگی زدایی، تمیز و از پریز برق جدا شده است.

- به منظور رعایت موارد ایمنی، کپسول های CO₂ باید به صورت ایستاده با زنجیر سنگین به دیوار محکم شود. زمانی که از سیلندرها استفاده نمی شود، سوپاپ ها و درپوش ها باید به طور محکم بسته شوند. سیلندرها را خالی را روی حمل کننده سیلندر گاز به طور محکم با زنجیر نگهداری کنید. هرگز سیلندرها را در دمای بالاتر از ۱۲۵°F (۵۲°C) نگهداری نکنید. سیلندرها را در وضعیت افقی قرار ندهید.

کنترل کیفی:

الف _ انکوباتورهای بدون CO₂:

- دمای انکوباتور را با دماسنج کالیبره اندازه گیری نموده و به طور روزانه و در دو نوبت بر روی منحنی دما، ثبت کنید.
 - تمام عملیات نگهداری، تمیز کردن و دمای روزانه را در جداول مربوطه ثبت نمایید.
- زمانی که دمای انکوباتور خارج از محدوده قابل قبول باشد، علاوه بر اطلاع رسانی به مسئول فنی یا سوپروایزر، اقدامات اصلاحی باید مطابق موارد ذیل انجام شود:
- منبع برق، پریز برق و Circuit Panel را بررسی کنید.
 - دمای تنظیمی (Set Point) را بررسی کنید.
 - اگر دستگاه هنوز درست کار نمی کند، به نماینده سرویس دهنده اطلاع دهید.

ب _ انکوباتورهای CO₂ دار:

- یک کشت از نیسریا گونوره در انکوباتور قرار دهید. هر روز آن را پاساژ داده و رشدش را بررسی نمایید. این ارگانیسم برای رشد به CO₂ نیاز دارد.
- تمام عملیات نگهداری، تمیز کردن، تعویض سیلندر و دمای روزانه را در جداول مربوطه ثبت نمایید.