



دستورالعمل فنی اتوکلاو، فور و انکوباتور

شبکه آزمایشگاهی

مرکز توسعه پژوهش، فناوری و نوآوری علوم پزشکی

دانشگاه آزاد اسلامی

اتوکلاو

اگر چه اتوکلاو بهترین وسیله برای استریلیزاسیون است، 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 استریلیزاسیون باید از زمان کوتاه تر و دمای بالاتر استفاده کنیم تا علاوه بر آنکه آسیب کمتری به محیط کشت وارد می شود، برای ارگانایسم نیز کشنده تر باشد.

چرخه استریلیزاسیون

مرحله ۱: زمان بالا رفتن دما در محفظه اتوکلاو (۲۰-°C ۱۲۱°C)

مرحله ۲: زمان نفوذ گرما به داخل ظرف محیط کشت (۱۲۱°C < ۱۰۰-°C)

مرحله ۳: زمان نگهداری در دمای مقرر (۱۲۱°C)

مرحله ۴: زمان پایین آمدن دمای محفظه (۸۰-°C ۱۲۱°C)

انواع استریلیزاسیون

- استریلیزاسیون محیط های کشت و محلول ها
- استریلیزاسیون مواد مصرفی آلوده
- استریلیزاسیون مواد خشک بسته بندی شده

استریلیزاسیون محیط های کشت و محلولها

- بهتر است از لوله و ارلن درپیچ دار استفاده شود. بیشتر از ۲/۳ آنها را پر نکنید. درپیچ 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.
- درب اتوکلاو را ببندید. زمان و دما را طبق دستور شرکت سازنده (معمولاً ۱۵ دقیقه در ۱۲۱°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 نمکهای صفاوی هستند) تحت تأثیر دمای بالا، PH محصول نهایی کاهش مییابد.
- دمای استریلیزاسیون به دمای چمبر اتوکلاو برمیگردد نه به دمای محیط کشت. زمان لازم برای رسیدن به این دما باید در حد ممکن کوتاه باشد
- چرخه استریلیزاسیون 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.

استریلیزاسیون مواد مصرفی آلوده

- مواد مصرفی 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 (۰/۳ لیتر) آب به آن اضافه کنید. بیش از ۳/۴ کیسه را پر نکنید.
- برای جلوگیری از مسدود شدن آبگذر اتوکلاو توسط آگار مذاب، کیسه ها را داخل سطل قرار دهید.
- زمان لازم برای استریلیزاسیون زباله، ۶۰-۳۰ دقیقه در 121°C یا ۳۰-۱۵ دقیقه در 134°C می باشد.
- وقتی آگار ذوب شده، سفت شد آنرا مثل زباله طبیعی دور بریزید. اما محیط کشت محتوی سلنیت را باید بصورت زباله مخصوص منهدم کنید.

استریلیزاسیون 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 استریلیزاسیون مواد خشک بسته بندی شده ، ۲۵ دقیقه با خروج سریع بخار یا ۳۰ دقیقه بدون خروج بخار در دمای 121°C می باشد.

• نحوه نگهداری

- روزانه: صفحه کف اتوکلاو را از سوراخ آبگذر اتاقک 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

تست شیمیایی:

- نوار کاغذی TST: سه عامل زمان، بخار و دما را کنترل می کند و از زرد به بنفش تغییر رنگ می دهد . در هر سری کاری از این نوار استفاده کنید.
- برچسب Sterility-Record: علاوه بر سنجش استریلیتی، امکان ثبت تاریخ استریلیزاسیون، نام فرد استریل کننده و نام محیط کشت بر روی این برچسب وجود دارد. در هر سری کاری از این برچسب استفاده کنید.

تست بیولوژیک:

استفاده از ویال حاوی اسپور باسیلوس استئاروترموفیلوس ATCC7953 بطور هفتگی توصیه می شود.

ایمنی

- از دستکش مقاوم به حرارت و محافظ چشم استفاده کنید

- بعد از آنکه فشار اتاقک اتوکلاو به صفر و دمای آن به حدود 60°C رسید کنار درب اتوکلاو بایستید و آنرا 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 .
- هرگز در هنگام روشن بودن دستگاه و اتصال آن به پریز اقدام به تمیز نمودن آن نکنید .
- هرگز پیچ های محکم کننده درب را در هنگام کار دستگاه شل و سفت نکنید.

فور(اون)

اون برای استریل کردن موادی که نمی توانند بطور کامل تحت نفوذ بخار قرار گیرند، اما می توانند دمای بالای مورد نیاز مثل $160-180^{\circ}\text{C}$ را تحمل کنند، به کار می رود. اون بویژه برای ظروف شیشه ای مثل لوله آزمایش، پتری دیش، پی پت 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.

استریلیزاسیون در اون

- ۱- برای بسته بندی وسایل فوق الذکر جهت استریل نمودن آنها در اون می توان از فویل آلومینیومی یا کاغذ کرافت و سربطری های پنبه ای استفاده نمود.
- ۲- باید دقت شود که کاغذ و پنبه نسوزند چون پنبه نیم سوز مواد ضد باکتری فرآری را متعاضد می کند.
- ۳- حدود ۲ سانتی متر از انتهای فوقانی پیپت ها را با پنبه غیر جاذب ببندید و آنها را در ظروف فلزی قرار داده، درب آنها را ببندید.
- ۴- درپوش لوله های آزمایش را با کاغذ آلومینیومی بپوشانید و آنها را بطور عمودی در جا لوله ای قرار دهید . درپوش، لبه لوله را از آلودگی از طریق هوا در طی ذخیره سازی حفظ می کند.
- ۵- در صورتی می توان بطری های درپیچ دار را در اون استریل نمود که درپوش و آستری آنها از موادی مثل فلز، پلیپروپیلن یا لاستیک سیلیکون ساخته شده باشد تا در دمای استریلیزاسیون از شکل طبیعی خارج نشود.
- ۶- 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، استریل نمایید.
- ۷- قبل از قرار دادن ظروف شیشه ای در اون، از خشک بودن آنها مطمئن شوید .مواد را به گونه ای در اون قرار دهید که هوای داغ در اطراف و مابین آنها در جریان باشد.



۸- زمان نگهداری استریلیزاسیون از زمانی آغاز می شود که اتاقک به دمای استریل انتخابی برسد و نیز مدتی هم بیشتر در نظر گرفته می شود تا همه قسمت‌های اتاقک و مواد داخل آن به دمای مورد نظر برسند (180°C - 160 به مدت ۲ ساعت).

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

نحوه نگهداری:

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

کنترل کیفیت:

تست شیمیایی: ویال شیشه ای Browne و مشاهده تغییر رنگ مناسب از قرمز به سبز. از این ویال درهرسری کاری استفاده کنید.

تست بیولوژیک: استفاده از نوار کاغذی حاوی اسپور باسیلوسوسوبتیلیس واریته نایجر ATCC 9372 بطور هفتگی توصیه می شود.

ایمنی:

استفاده از دستکش مقاوم به حرارت و محافظ چشم.

انکوباتور

انکوباتور محفظه عایق بندی شده ایست که برای نگهداری دما و رطوبت کنترل شده محیط برای رشد برای میکروارگانیسم ها نیاز است. بعضی انکوباتورها برای نگهداری میزان دلخواه از CO_2 برای میکروارگانیسم هایی که دی اکسید کربن دوست (Capnophilic) هستند، تجهیز شده اند.

الف _ انکوباتورهای بدون CO_2

- 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 میشود، روی برگه QC ثبت کنید.
- نمونه ها را به طور ایمن روی سینی ها یا قفسه ها قرار دهید.
- می توانید با قراردادن یک تشتک پر از آب متناسب با اندازه اتاقک در کف انکوباتور، محیط مرطوب ایجاد نمایید.

ب _ انکوباتورهای CO_2 دار

سطح دما و CO_2 در برگه QC در هر روز استفاده ثبت می شوند.

نکته:

در صورت اتمام کیسول گاز CO_2 ، تا زمان شارژ مجدد آن می توانیم جهت انکوباسیون نمونه های نیازمند CO_2 ، کندل جار بصورت جایگزین استفاده نماییم.

نحوه نگهداری:

- همه انکوباتورها باید به طور ماهانه با محلول صابون ملایم تمیز شوند.
- به منظور رعایت موارد ایمنی، کیسول گاز CO_2 باید به صورت ایستاده با زنجیر سنگین به دیوار محکم شود. زمانیکه از سیلندرها استفاده نمی شود، سوپاپها و درپوشها باید، به طور محکم بسته شوند. سیلندرها خالی را روی حمل کننده سیلندر گاز به طور محکم با زنجیر نگهداری کنید. هرگز سیلندرها را در دمای بالاتر از $52^{\circ}C$ ($125^{\circ}F$) نگهداری نکنید. سیلندرها را در وضعیت افقی قرار ندهید.

الف _ انکوباتورهای بدون CO₂

زمانیکه دمای انکوباتور خارج از محدوده قابل قبول برای واحد مورد نظر باشد ، باید 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 ارگانسیم به CO₂ نیاز کامل دارد .

دستورالعمل فنی انکوباتور

کلیات

انکوباتور برای نگهداری سوسپانسیون یا محیطهای کشت حاوی میکروب یا نگهداری مواد در برخی آزمایشها که نیاز به حرارت خاص دارند، استفاده میگردد.

چگونگی کاربری

انکوباتور محفظه عایقبندی شدهای است که برای نگهداری دما و رطوبت تنظیم شده محیط برای رشد میکروارگانسیمها مورد نیاز است. بعضی انکوباتورها برای نگهداری میزان دلخواه از CO₂ برای میکروارگانسیم هایی که دی اکسیدکربن 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 استفاده روی برگه کنترل کیفی (QC) . ثبت کنید.
- نمونه ها را به طور ایمن روی سینی ها یا قفسه ها قرار دهید .

- میتوانید با قراردادن 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 زمان استفاده از آن، ثبت میشوند .
- در صورت اتمام کپسول گاز CO₂ ، تا زمان شارژ مجدد آن میتوانیم جهت نگهداری نمونه های نیازمند CO₂ از محفظه حاوی شمع (candle jar) به صورت جایگزین استفاده نماییم .

نحوه نگهداری

- تمامی انکوباتورها باید به طور ماهانه با محلول صابون ملایم تمیز و در صورت لزوم ضد عفونی شوند .
- زمانی که دمای انکوباتور بدون CO₂ خارج از محدوده قابل قبول برای واحد مورد نظر باشد، باید به سوپروایزر فنی اطلاع داده شود. اقدامات اصلاحی مطابق موارد ذیل انجام شود:
- منبع برق، پریز برق و کلیدهای روشن / خاموش را بررسی شود .
- دمای تنظیمی (Set Point) را بررسی گردد.
- اگر دستگاه هنوز درست کار نمی کند، باید به نماینده سرویس دهنده اطلاع داده شود .
- تمام عملیات نگهداری، تمیز کردن و تعویض سیلندر باید در جداول مربوطه ثبت گردد .

کنترل کیفیت

- حرارت انکوباتور با دماسنج کالیبره، اندازه گیری و به طور روزانه و در دو نوبت بر روی منحنی حرارت ثبت میگردد.
- در انکوباتور CO₂ دار یک یک کشت از نایسریا گونوره را در انکوباتور قرار داده و هر روز آن را پاساژ و رشد آن بررسی و ثبت گردد. این ارگانیسم برای رشد به CO₂ نیاز دارد.



ایمنی

- سیستم برق رسانی مطابق توان و ولتاژ مصرفی باشد تا احتمال وقوع هرگونه حادثه مخاطره آمیز کاهش یابد .
- در موقع تنظیم فشار و دما به نکات مندرج در دفترچه راهنما و زمان مربوطه توجه گردد .
- در زمان اتمام کار با دستگاه، رعایت نکات ایمنی از جمله استفاده از دستکش و خروج تدریجی بخار و در صورت لزوم استفاده از محافظ صورت ضروری میباشد.
- به منظور رعایت موارد ایمنی، کپسول های CO_2 باید به صورت ایستاده به دیوار با زنجیر سنگین محکم شوند . زمانیکه سیلندرها استفاده نمیشود، سوپاپها و درپوشها باید محکم بسته شوند. سیلندرهاى خالی را روی حمل کننده سیلندر محکم با زنجیر بسته شود. هرگز سیلندرهاى گاز در دمای بالاتر ($52^{\circ}C$) $125^{\circ}F$ نگهداری نشوند. سیلندرها در وضعیت افقی قرارنگیرند.