ISIRI
9899
1st. Edition

جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran
مؤسسه استاندارد وتحقیقات صنعتی ایران
Institute of Standards and Industrial Research of Iran

استاندارد ملی ایران
۹۸۹۹
چاپ اول

میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – راهنمای الزامات کلی برای آزمون

Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guideline of general requirements for examination

مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
تهران - خیابان ولیعصر، ضلع جنوبی میدان ونک، پلاک ۱۲۹۴، صندوق پستی: ۶۱۳۹-۱۴۱۵۵
تلفن: ۵-۸۸۸۷۹۴۶۱
دورنگار: ۸۸۸۸۷۰۸۰ و۸۸۸۸۷۱۰۳
کرج - شهر صنعتی، صندوق پستی ۱۶۳-۳۱۵۸۵
تلفن: ۸- ۲۸۰۶۰۳۱(۰۲۶۱)
دورنگار: ۲۸۰۸۱۱۴ (۰۲۶۱)
پیام نگار: standard@isiri.org.ir
وب‌گاه : www.isiri.org
بخش فروش، ۱۲۰۰۰ ریال

Institute of Standards and Industrial Research of IRAN
Central Office: No.1294 Valiaser Ave. Vanak corner, Tehran, Iran
P. O. Box: 14155-6139, Tehran, Iran
Tel: +98 (21) 88879461-5
Fax: +98 (21) 88887080, 88887103
Headquarters: Standard Square, Karaj, Iran
P.O. Box: 31585-163
Tel: +98 (261) 2806031-8
Fax: +98 (261) 2808114
Email: standard @ isiri.org.ir
Website: www.isiri.org
Sales Dep.:12000 RLS

به‌نام خدا

آشنایی با مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب بند یک مادهٔ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفه تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) ایران را به عهده دارد.

تدوین استاندارد در حوزه های مختلف در کمیسیون های فنی مرکب از کارشناسان مؤسسه* صاحب نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می شود وکوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانهٔ صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف‌کنندگان، صادرکنندگان و وارد کنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان های دولتی و غیر دولتی حاصل می شود .پیش نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی نفع و اعضای کمیسیون های فنی مربوط ارسال می‌شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادها در کمیتهٔ ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب به عنوان استاندارد ملی(رسمی) ایران چاپ و منتشر می شود.

پیش نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان های علاقه مند و ذیصلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می کنند درکمیتهٔ ملی طرح و بررسی و درصورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می شود .بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می شود که بر اساس مفاد نوشته شده در استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تدوین و در کمیتهٔ ملی استاندارد مربوط که مؤسسه استاندارد تشکیل می‌دهد به تصویب رسیده باشد.

مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران از اعضای اصلی سازمان بین المللی استاندارد (ISO)[1] کمیسیون بین المللی الکتروتکنیک (IEC)[2] و سازمان بین المللی اندازه شناسی قانونی (OIML)[3] است و به عنوان تنها رابط[4] کمیسیون کدکس غذایی (CAC)[5] در کشور فعالیت می کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی های خاص کشور، از آخرین پیشرفتهای علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بینالمللی بهره‌گیری می‌شود.

مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران می تواند با رعایت موازین پیش بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشو ر و / یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری نماید. مؤسسه می تواند به منظور حفظ بازارهای بین المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری نماید. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده کنندگان از خدمات سا زمانها و مؤسسات فعال در زمینهٔ مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدورگواهی سیستم های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی، آزمایشگاه ها و مراکز کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش ، مؤسسهٔ استاندارد این گونه سازمان ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامهٔ تأیید صلاحیت به آن ها اعطا و بر عملکرد آنها نظارت می کند .ترویج دستگاه بین المللی یکاها، کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این مؤسسه است.

---

* موسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

1- International organization for Standardization
2 - International Electro technical Commission
3- International Organization for Legal Metrology (Organization International de Metrology Legal)
4 - Contact point
5 - Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

« میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام– راهنمای الزامات کلی برای آزمون »

رئیس :	**نمایندگی**
رحیمی فرد ، ناهید (دکترای تخصصی میکروبیولوژی)	وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی- ادارهٔ کل آزمایشگاه های کنترل غذا و دارو
دبیر :	
داورزنی ، ساره (لیسانس علوم تغذیه)	موسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
اعضاء : (اسامی به ترتیب حروف الفبا)	
ابراهیمی امام ، غلامحسن (لیسانس صنایع غذایی)	موسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
اصغری ، شهناز (لیسانس میکروبیولوژی)	وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی- ادارهٔ کل آزمایشگاه های کنترل غذا و دارو
اطهری نیا ، معصومه (فوق لیسانس بیولوژی)	موسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
بابائی بالدرلو ، پریسا (فوق لیسانس میکروبیولوژی)	شرکت شیر پاستوریزه پگاه تهران
پیری آذر هریس ، رسول (لیسانس میکروبیولوژی)	شرکت صنایع غذایی بهروز نیک
دوچشمه ، مهدی (فوق لیسانس مهندسی محیط زیست)	موسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
زندوکیلی ، فاطمه (فوق لیسانس علوم بهداشتی در تغذیه)	موسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

شجاعی آرانی ، ابوالفتح (دکترای میکروب شناسی)	دانشگاه علوم پزشکی ایران – دانشکده بهداشت
شکرالهی ، فتانه (فوق لیسانس صنایع غذایی)	موسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
غلامی ، سید رضا (فوق لیسانس بهداشت محیط)	وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی - مرکز سلامت محیط و کار
مختاری ، فهیمدخت (فوق لیسانس ایمونولوژی)	موسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
مهرپور ، رامش (لیسانس صنایع)	موسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

فهرست مندرجات

عنوان	صفحه
آشنایی با مؤسسه استاندارد	ج
کمیسیون فنی تدوین استاندارد	د
پیش‌گفتار	ط
۱ هدف	۱
۲ دامنهٔ کاربرد	۱
۳ مراجع الزامی	۲
۴ ساختمان	۴
۴-۱ کلیات	۴
۴-۲ ملاحظات ایمنی	۴
۴-۳ طراحی آزمایشگاه	۵
۴-۴ فضای آزمایشگاه	۵
۴-۵ چیدمان و تاسیسات ساختمان	۶
۴-۶ تمیز و ضدعفونی کردن	۸
۵ کارکنان	۹
۵-۱ کلیات	۹
۵-۲ صلاحیت	۹
۵-۳ تصدیق صلاحیت کارکنان	۱۰
۵-۴ بهداشت	۱۰
۶ وسایل و تجهیزات	۱۱
۶-۱ کلیات	۱۱
۶-۲ اتاقک های محافظ	۱۲
۶-۳ ترازوها و رقیق کننده های وزنی	۱۴
۶-۴ همگن کننده ، خردکن و مخلوط کن	۱۵
۶-۵ pH متر	۱۷
۶-۶ اتوکلاو	۱۸
۶-۷ دستگاه آماده ساز محیط کشت	۲۰
۶-۸ انکوباتور	۲۱
۶-۹ یخچال یا سردخانه	۲۲
۶-۱۰ فریزر و فریزر فوق انجماد	۲۳
۶-۱۱ حمام مایع با دمای ثابت	۲۴

۶-۱۲ مولد بخار (استیمر) شامل حمام آب جوش ۲۶
۶-۱۳ آون سترون سازی ۲۷
۶-۱۴ آون مایکروویو ۲۸
۶-۱۵ ماشین شستشوی ظروف شیشه ای ۲۹
۶-۱۶ میکروسکوپ نوری ۳۰
۶-۱۷ شعله گاز یا کورهٔ مخصوص سوزن کشت ۳۱
۶-۱۸ توزیع کننده محیط های کشت و واکنشگرها ۳۲
۶-۱۹ مخلوط کن گردابی (ورتکس) ۳۳
۶-۲۰ شمارشگر کلنی ۳۴
۶-۲۱ تجهیزات کشت در شرایط اتمسفری تغییر یافته ۳۵
۶-۲۲ سانتریفوژ ۳۶
۶-۲۳ اجاق های برقی تخت و گود ۳۷
۶-۲۴ اسپیرال پلیتر ۳۷
۶-۲۵ دستگاه های آب مقطر، دیونایزر و اسمز معکوس ۳۸
۶-۲۶ زمان سنج ۳۹
۶-۲۷ پی پت و پی پتور ۴۰
۶-۲۸ دماسنج و وسایل پایش دما مانند ثبت کننده های خودکار ۴۱
۶-۲۹ جداکنندهٔ مغناطیسی ایمنی (ایمونومگنتیک) ۴۳
۶-۳۰ سیستم فیلتراسیون ۴۴
۶-۳۱ سایر تجهیزات و نرم افزارها ۴۴
۷ آماده سازی وسایل شیشه ای و سایر مواد آزمایشگاهی ۴۴
۷-۱ آماده سازی ۴۴
۷-۲ سترون سازی و/یا آلودگی زدایی ۴۴
۷-۳ وسایل و تجهیزات یکبار مصرف ۴۵
۷-۴ انبارش مواد و وسایل شیشه ای تمیز ۴۵
۷-۵ مدیریت مواد و وسایل شیشه ای سترون ۴۶
۷-۶ کاربرد آلودگی زدایی و ضدعفونی ۴۶
۷-۷ مدیریت پسماند ۴۷
۷-۸ شستشو ۴۷
۸ آماده سازی و سترون سازی محیط کشت ۴۸
۹ نمونه های آزمایشگاهی ۴۸
۹-۱ نمونه برداری ۴۸
۹-۲ حمل و نقل ۴۹
۹-۳ دریافت ۴۹
۹-۴ انبارش ۵۰

۹-۵ آزمونه ۵۱
۱۰ آزمون ۵۱
۱۰-۱ اقدامات بهداشتی پیشگیرانه هنگام آزمون ۵۱
۱۰-۲ آماده سازی سوسپانسیون اولیه و رقت ها ۵۳
۱۱ شمارش ۵۴
۱۱-۱ کلیات ۵۴
۱۱-۲ شمارش با استفاده از محیط کشت جامد ۵۴
۱۱-۳ محاسبه و تفسیر نتایج به دست آمده با محیط کشت جامد ۵۹
۱۱-۴ شمارش مخمر و کپک ۶۸
۱۱-۵ شمارش با استفاده از محیط کشت مایع ۶۹
۱۲ روش جستجو (روش کیفی) ۷۸
۱۲-۱ کلیات ۷۸
۱۲-۲ اساس روش ۷۸
۱۲-۳ عدم قطعیت اندازه‌گیری ۷۹
۱۳ آزمون های تاییدی ۷۹
۱۳-۱ کلیات ۷۹
۱۳-۲ تهیه کشت خالص ۷۹
۱۳-۳ رنگ آمیزی گرم ۷۹
۱۳-۴ استفاده از مجموعه آزمون های بیوشیمیایی برای شناسایی ۸۲
۱۳-۵ استفاده از پروب های نوکلئیک برای شناسایی ۸۲
۱۳-۶ آزمون های سرولوژیکی ۸۳
۱۴ گزارش آزمون ۸۴
۱۵ صحه گذاری روش های میکروبیولوژی ۸۴
۱۵-۱ صحه گذاری روش های مرجع ۸۴
۱۵-۲ صحه‌گذاری روش های جایگزین ۸۵
۱۵-۳ صحه‌گذاری روش های داخلی ۸۵
۱۶ تضمین کیفیت نتایج و/یا کنترل کیفیت عملکرد ۸۵
۱۶-۱ کنترل کیفیت داخلی ۸۵
۱۶-۲ سویه های مرجع ۸۶
۱۶-۳ ارزیابی کیفیت خارجی ۸۶
پیوست الف (اطلاعاتی) - خصوصیات برخی از مواد ضدعفونی کننده ۸۷
پیوست ب (اطلاعاتی) - شمارش محتمل‌ترین تعداد (MPN) ۸۸

پیش‌گفتار

استاندارد « میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – راهنمای الزامات کلی برای آزمون » که پیش‌نویس آن در کمیسیون‌های مربوط تهیهٔ و تدوین شده و در دویست‌امین اجلاس کمیتهٔ ملی استاندارد میکروبیولوژی و بیولوژی مورخ ۸۶/۱۲/۲۵ مورد تصویب قرار گرفته است، اینک به استناد بند یک مادهٔ ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ ، به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت‌های ملی و جهانی در زمینهٔ صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در مواقع لزوم تجدید نظر خواهد شد و هر پیشنهادی که برای اصلاح و تکمیل این استانداردها ارائه شود، هنگام تجدید نظر در کمیسیون فنی مربوط مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین، باید همواره از آخرین تجدیدنظر استانداردهای ملی استفاده کرد.

استانداردهای ملی ایران شمارهٔ : ۲۷۴۷ سال ۱۳۸۰و ۲۳۲۵ سال ۱۳۸۰، باطل و این استاندارد جایگزین آن می شود.

منبع و مأخذی که برای تهیهٔ این استاندارد مورد استفاده قرار گرفته به شرح زیر است:

1- ISO 7218 : 2007 , Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations

میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – راهنمای الزامات کلی برای آزمون

۱ هدف

هدف از تدوین این استاندارد تعیین الزامات کلی و راهنما برای آزمون‌های میکروبیولوژی می باشد.

۲ دامنهٔ کاربرد

این استاندارد در موارد زیر کاربرد دارد :

الف- میکروبیولوژی مواد غذایی، خوراک دام، حوزه های تولید مواد غذایی و تولید مقدماتی مواد غذایی ؛

ب- راهنمایی برای تایید صلاحیت آزمایشگاه های میکروبیولوژی به منظور استقرار الزامات فنی استاندارد ملی ایران ایزو – آی ای سی ۱۷۰۲۵ ؛

پ- راهنمایی برای هماهنگی آزمایشگاه های میکروبیولوژی مواد غذایی ؛

ت- حصول اطمینان از صحت آزمون‌های میکروبیولوژی مواد غذایی ؛

ث- جستجو یا شمارش میکروارگانیسم های تعیین شده در استانداردهای خاص ؛

ج- حصول اطمینان از یکسان بودن روش های آزمون در آزمایشگاه های مختلف و دستیابی به نتایج یکسان ؛

چ- پیشگیری از خطر آلودگی برای ایمنی کارکنان آزمایشگاه ؛

ح- ایجاد عملیات خوب آزمایشگاهی[1] برای آزمون های میکروبیولوژی مواد غذایی.

این استاندارد برای آزمون باکتری ها، مخمرها، کپک ها و در صورت تکمیل شدن با رهنمودهای خاص برای پریون‌ها[2]، انگل‌ها[3] و ویروس ها نیز کاربرد دارد. این استاندارد برای آزمون توکسین ها و دیگر متابولیت‌های میکروارگانیسم ها (مانند آمین ها) کاربرد ندارد.

برای آزمون های بیولوژی ملکولی به استاندارد ISO 22174 مراجعه شود.

1- Good Laboratory Practice
2- Prions
3- Parasites

۳ مراجع الزامی

مراجع الزامی زیر حاوی مقرراتی است که در متن این استاندارد به آنها ارجاع داده شده است. بدین ترتیب آن مقررات جزئی از این استاندارد محسوب می شود. در مورد مراجع دارای تاریخ چاپ و/یا تجدید نظر، اصلاحیه ها و تجدید نظرهای بعدی این مدارک مورد نظر نیست، معهذا بهتر است کاربران ذینفع این استاندارد امکان کاربرد آخرین اصلاحیه ها و تجدید نظرهای مدارک الزامی زیر را مورد بررسی قرار دهند. درمورد مراجع بدون تاریخ چاپ و/یا تجدید نظر، آن مدارک الزامی ارجاع داده شده، مورد نظر است.

استفاده از مراجع زیر برای کاربرد این استاندارد الزامی است:

۳-۱ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۸۹۲۳ ، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – آماده سازی آزمایه، سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری برای آزمون های میکروبیولوژی – قسمت اول : مقررات کلی برای آماده سازی سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری

۳-۲ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲-۸۹۲۳ ، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – آماده سازی آزمایه، سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری برای آزمون های میکروبیولوژی – قسمت دوم : مقررات ویژه برای آماده سازی گوشت و فرآورده های آن

۳-۳ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳-۸۹۲۳ ، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – آماده سازی آزمایه، سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری برای آزمون های میکروبیولوژی – قسمت سوم : مقررات ویژه برای آماده سازی ماهی و فرآورده های آن

۳-۴ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۴-۸۹۲۳ ، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – آماده سازی آزمایه، سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری برای آزمون های میکروبیولوژی – قسمت چهارم : مقررات ویژه برای آماده سازی محصولاتی به غیر از شیر، گوشت، ماهی و فرآورده های آن ها

۳-۵ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۴۲۰۷ ، کیفیت آب – راهنمای کلی شمارش میکروارگانیسم ها به وسیلهٔ کشت

۳-۶ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۴۱۵ ، شیر و فرآورده های آن – روش آماده سازی آزمایه، سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری برای آزمون های میکروبیولوژی – راهنمای کلی

۳-۷ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲-۸۶۶۳ ، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – راهنمای آماده سازی و تهیه محیط کشت – راهنمای عملی برای آزمون محیط های کشت

۳-۸ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۶۸۰۶ ، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – شمارش استافیلوکوکوس های کواگولاز مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس و سایر گونه ها) – روش آزمون قسمت اول : روش استفاده از محیط کشت برد- پارکر آگار

۳-۹ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳-۶۸۰۶ ، میکروبیولوژی مواد غـذایی و خـوراک دام – روش جـامع بـرای شمارش استافیلوکوکوس هـای کواگـولاز مثبـت (اسـتافیلوکوکوس اورئـوس و سـایر گونـه هـا) – قـسمت سوم : جستجو، شناسایی و شمارش با شیوهٔ محتمل ترین تعداد (MPN) برای تعداد کم میکروارگانیسم

۳-۱۰ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۹۶۲ ، ویژگی های پی پت های زینه دار

۳-۱۱ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۴۸۰۶، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – روش های جامع نمونه برداری از سطوح با استفاده از پلیت های تماسی و سوآپ

۳-۱۲ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۶۱۶۵ ، راهنمای کلی پیاده سازی سیـستم تجزیـه و تحلیـل مخـاطرات، نقاط کنترل بحرانی (HACCP) در واحدهای تولیدی فرآوری کامل گوشت قرمز و گوشـت طیـور (تولیـد، بسته بندی، نشانه‌گذاری) – کشتار طیور

۳-۱۳ استاندارد ملی ایـران ایـزو- آی ای سـی شـمارهٔ ۱۷۰۲۵ ، الزامـات عمـومی بـرای احـراز صـلاحیت آزمایشگاه های آزمون و کالیبراسیون

۳-۱۴ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۹۰۳۶ ، تخمین عدم قطعیت اندازه‌گیری در آزمون های کمی – راهنما

3-15 ISO 835 (all parts), Laboratory glassware – Graduated pipettes

3-16 ISO 16140, Micribiology of food and animal feeding stuffs- Protocol for the validation of alternative methods

3-17 ISO 22174, Micribiology of food and animal feeding stuffs- Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens-General requirements and definitions

3-18 ISO 14461-1**,** Milk and milk products - Quality control in microbiological laboratories - Part 1: Analyst performance assessment for colony counts

3-19 ISO 14461-2, Milk and milk products - Quality control in microbiological laboratories Part 2: Determination of the reliability of colony counts of parallel plates and subsequent dilution steps

3-20 ISO 9998 **,** Water quality - Practices for evaluating and controlling microbiological colony count media used in water quality tests

3-21 ISO 13843**,** Water quality - Guidance on validation of microbiological methods

3-22 ISO 16654 **,** Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157

3-23 ISO 8655-1 , Piston-operated volumetric apparatus- Part 1 : Terminology, general requirements and user recommendations

3-24 ISO/IEC Guide 43-1 , Proficiency testing by interlaboratory comparisons - Part 1: Development and operation of proficiency testing schemes

3-25 ISO/IEC Guide 99 , International vocabulary of metrology - Basic and general concepts and associated terms (VIM)

۴ ساختمان

۴-۱ کلیات

این بند الزامات کلی مانند اصول طراحی و سازماندهی برای چیدمان[1] آزمایشگاه میکروبیولوژی را ارائه می‌کند.

برای کاهش خطر آلودگی متقاطع[2]، آزمون نمونه های مرحلهٔ تولید مقدماتی (به خصوص دریافت و آماده‌سازی نمونه) باید از آزمون سایر نمونه ها جدا باشد.

۴-۲ ملاحظات ایمنی

طراحی آزمایشگاه باید مطابق با الزامات ایمنی مربوط به انواع میکروارگانیسم ها باشد. برای این منظور میکروارگانیسم ها به ۴ گروه خطر دسته بندی می شوند:

گروه خطر ۱ (بدون خطر یا خطر خیلی کم برای افراد یا جامعه)

میکروارگانیسم هایی هستند که بیماریزایی آن برای انسان و حیوان نامحتمل[3] می باشد.

گروه خطر ۲ (خطر متوسط برای افراد و کم خطر برای جامعه)

میکروارگانیسم های بیماریزایی هستند که می‌توانند در انسان و حیوان ایجاد بیماری کنند اما احتمال ایجاد خطر جدی برای کاکنان برای کارکنان آزمایشگاه، جامعه یا محیط نامحتمل است ولی درمان موثر و اقدامات پیشگیرانه در دسترس می باشد و خطر گسترش عفونت محدود است.

1- Layout
2- Cross contamination
3- Unlikely

گروه خطر ۳ (پرخطر برای افراد و کم‌خطر برای جامعه)
میکروارگانیسم های بیماریزایی هستند که معمولاً سبب بیماری جدی در انسان و حیوان می شود ولی گسترش عفونت از یک فرد به دیگری معمول نیست. درمان موثر و اقدامات پیشگیرانه در دسترس می باشد.

گروه خطر۴ (پرخطر برای افراد و جامعه)
میکروارگانیسم های بیماریزایی که معمولاً بیماری جدی در انسان و حیوان ایجاد می کند و می تواند به سهولت از یک فرد به دیگری به طور مستقیم یا غیرمستقیم منتقل شود. معمولاً درمان موثر و اقدامات پیشگیرانه در دسترس نمی باشد.

۴-۳ طراحی آزمایشگاه

رهنمودهای ارائه شده در این بند، آزمون جستجو و شناسایی میکروارگانیسم های متعلق به گروه های خطر ۱ ، ۲ و ۳ در میکروبیولوژی مواد غذایی را پوشش می دهد.
علاوه بر معیارهای ایمنی باید به مقررات ملی نیز توجه شود.

۴-۴ فضای آزمایشگاه

۴-۴-۱ کلیات

آزمایشگاه باید دارای محل جداگانه برای نمونه ها، آزمون و فضای عمومی باشد. (به بند ۴-۴-۳ مراجعه شود).

۴-۴-۲ فضای مربوط به نمونه و آزمون

با توجه به شرایط خوب آزمایشگاهی داشتن فضاهای جداگانه برای بخش های زیر لازم است:

الف- دریافت و انبارش نمونه ها ؛
ب- آماده‌سازی نمونه ها به خصوص برای مواد خام (مانند فرآورده های پودری حاوی تعداد زیاد میکروارگانیسم ها) ؛
پ- آزمون نمونه‌ها (از سوسپانسیون اولیه) شامل گرمخانه‌گذاری میکروارگانیسم ها ؛
ت- آزمون میکروارگانیسم های بیماریزای احتمالی ؛
ث- نگهداری سویه[1] مرجع و سایر سویه‌ها ؛
ج- آماده سازی و سترون سازی محیط‌های کشت و وسایل ؛

1- Strain

چ- انبارش محیط‌های کشت و واکنشگرها ؛

ح- آزمون سترونی مواد غذایی ؛

خ- آلودگی زدایی[1]؛

د- شستشو و تمیز کردن وسایل شیشه‌ای و سایر تجهیزات ؛

ذ- انبارش مواد شیمیایی مخاطره‌آمیز، ترجیحاً نگهداری در کابینت‌ها، قفسه‌ها، اتاق‌ها یا ساختمان‌ها با طراحی خاص.

۴-۴-۳ فضای عمومی

فضاهای جداگانه برای موارد زیر توصیه می شود:

الف- ورودی، راهرو، راه پله و آسانسور ؛

ب- فضای اداری (مانند دبیرخانه، دفترکار و اتاق مستندسازی) ؛

پ- رخت‌کن و سرویس های بهداشتی ؛

ت- اتاق بایگانی ؛

ث- انبار؛

ج- اتاق استراحت.

۴-۵ چیدمان و تاسیسات ساختمان

۴-۵-۱ هدف

هدف حصول اطمینان از عدم تاثیر محیط آزمون بر اعتبار نتایج آزمون است.

توصیه می شود چیدمان ساختمان به گونه‌ای باشد که از خطر آلودگی متقاطع پیشگیری کند. مثال هایی برای دستیابی به این هدف شامل موارد زیر است:

الف- ساخت آزمایشگاه مطابق با اصول حرکت یکطرفه[2] ؛

ب- انجام روش ها به صورت پی‌درپی با استفاده از اقدامات پیشگیرانه مناسب برای حصول اطمینان از صحت نمونه و آزمون (مانند استفاده از ظروف انتقال با درهای غیر قابل نفوذ[3]) ؛

پ- جداسازی فعالیت ها بر حسب زمان یا مکان.

از افزایش دما، گرد و غبار، بخار، رطوبت، صدا و لرزش پیشگیری کنید.

1- Decontamination
2-No way back
3- Sealed

توصیه می شود فضای کافی کاری به منظور حفظ شرایط تمیز و منظم وجود داشته باشد. این فضا بهتر است متناسب با حجم آزمون های انجام شده و همچنین تشکیلات داخلی آزمایشگاه باشد. در صورت وجود مقررات ملی، توصیه می شود فضا مطابق با آن باشد.

۴-۵-۲ تاسیسات

مکان های آزمون باید به گونه‌ای ساخته و تجهیز شوند که خطر آلودگی به وسیله گرد و غبار و میکروارگانیسم های موجود را کاهش دهد.

الف- توصیه می شود دیوارها، سقف ها و کف ها صاف بوده و به سهولت قابل تمیز کردن باشند و مقاوم به پاک کننده ها و ضدعفونی کننده های مورد استفاده در آزمایشگاه ها باشند؛

ب- توصیه می شود کف ها مقاوم بوده و لغزنده[1] نباشند ؛

پ- توصیه می شود از نصب لوله های مخصوص انتقال مایعات در قسمت بالای فضای کار خودداری شود مگر این که به طور غیر قابل نفوذ بسته شده باشند. هر ساختاری که در قسمت سقف قرار می‌گیرد باید دارای پوشش باشد به گونه‌ای که دستیابی به آن برای تمیز کردن به سهولت امکان‌پذیر باشد.

ت- توصیه می شود به منظور به حداقل رساندن جریان هوا هنگام آزمون، پنجره ها و درها کاملاً بسته شوند. علاوه بر آن بهتر است طراحی آن به گونه‌ای باشد که از تشکیل گرد و غبار پیشگیری کرده و به سهولت تمیز شوند. توصیه می شود محدودهٔ دمایی (۱۸ °C تا ۲۷ °C) و کیفیت هوا (محتوای میکروارگانیسم ها و میزان انتشار گرد و غبار) مطابق با انجام آزمون ها باشد. برای این منظور یک سیستم تهویهٔ فیلتردار برای ورود و خروج هوا توصیه می شود؛

ث- توصیه می شود برای جلوگیری از انتشار گرد و غبار ناشی از محیط کشت های خشک و نمونه های پودری یک سیستم هواکش[2] مناسب نصب شود ؛

ج- توصیه می شود برای آزمون هایی که باید در هوای با آلودگی کم انجام شود اتاق مجهز به اتاقک جریان هوای لایه‌ای تمیز[3] و/یا اتاقک ایمن[4] باشد ؛

چ- در صورت لزوم توصیه می شود محیط آزمایشگاه با استفاده از حفاظ پنجره یا صفحات شیشه ای مناسب از اثرات مضر اشعه خورشید حفظ شود. استفاده از پرده در داخل آزمایشگاه به دلیل این که خود منبع گرد و غبار است و تمیز کردن آن نیز مشکل است، مناسب نمی باشد.

1- Slip
2- Extraction
3- Clean laminair airflow cabinet
4- Safety cabinet

۴-۵-۳ سایر نکات

توصیه می شود برای تجهیز آزمایشگاه به نکات زیر توجه شود:

الف- دسترسی به منابع آب با کیفیت مناسب برای مصارف مورد نظر ؛

ب- دسترسی به برق ؛

پ- دسترسی به گاز (لوله کشی یا کپسول) ؛

ت- وجود نور کافی در هر قسمت آزمایشگاه؛

ث- میز کار و صندلی های آزمایشگاه باید دارای سطوح صاف و غیرقابل نفوذ و به سهولت قابل تمیز و ضدعفونی کردن باشند ؛

ج- دستگاه های طراحی شده برای سهولت تمیزکردن کف ها (مانند وسایل متحرک) ؛

چ- عدم نگهداری وسایل و مدارک غیر ضروری برای آزمون در محل آزمون ؛

ح- در دسترس بودن تسهیلات نگهداری مدارک هنگام کار با نمونه ها، محیط های کشت و واکنشگرها ؛

خ- ساخت دستشویی در هر اتاق آزمون و در صورت لزوم در فضای عمومی و ترجیحاً نزدیک به در؛

د- دسترسی به اتوکلاو برای از بین بردن مواد پسماند[1] و محیط های کشت آلوده شده ، یا وجود سیستمی مناسب برای سوزاندن پسماندهای آلوده در محل ؛

ذ- فراهمی سیستم ایمنی اطفاء حریق، برق اضطراری، دوش اضطراری و تسهیلات شستشوی چشم ؛

ر- فراهمی جعبه کمک های اولیه.

۴-۶ تمیز کردن و ضدعفونی کردن

توصیه می شود نکات زیر بررسی شود:

الف- کف ها، دیوارها، سقف ها، میزهای کار آزمایشگاه، وسایل و اتصالات بین آن ها بهتر است تحت کنترل باشند و برای پیشگیری از ایجاد ترک[2] که ممکن است منبع آلودگی باشد به طور منظم تعمیر و نگهداری شوند ؛

ب- به منظور نگهداری ساختمان ها در شرایط مناسب برای انجام آزمون ها بهتر است به طور منظم تمیز و ضدعفونی شود. توصیه می شود آلودگی های بالقوه سطحی با استفاده از مواد ضدعفونی کنندهٔ باکتری کش و قارچ کش، آلودگی زدایی شوند ؛

یادآوری- در صورت وجود مقررات ملی، می توان با استفاده از بخار فرمالدئید اتاق ها و تجهیزات را آلودگی زدائی کرد.

1-Waste
2- Crack

پ- سیستم های تهویه[1] و فیلترهای آن بهتر است به طور منظم نگهداری و در صورت لـزوم فیلترهـای آن تعویض شوند ؛

ت- کیفیت میکروبی سطح کار آزمایشگاه، سطوح در تماس با کارکنان و هوا بهتر است به طور منظم پایش شوند. (تناوب انجام آزمون بستگی به نتایج آزمون های قبلی دارد) ؛

ث- آلودگی سطوح را می توان با استفاده از پلیت های تماسی[2] حاوی مواد خنثی‌کننده (مانند لـسیتین و سـدیم تیوسـولفات) در برابـر مـواد پـاک کننـده بررسـی کـرد. کنتـرل هـوا بـه منظـور جـستجوی میکروارگانیسم های خاص(مانند کپک) را می توان با قرار دادن یک پلیت درباز حاوی محـیط کـشت غیـر انتخابی مانند پلیت‌کانت‌آگار (PCA)[3] یا محیط کشت جامد انتخابی در معرض هوا به مـدت زمـان ۱۵ min بررسی کرد.

یادآوری – برای تخمین آلودگی سطوح و هوای آزمایشگاه می توان از روش های معتبر دیگر استفاده کرد . به استاندارد ملـی ایران شمارهٔ ۴۸۰۶ مراجعه شود.

۵ کارکنان

۵-۱ کلیات

برای الزامات کلی مربوط به صلاحیت کارکنان به استاندارد ملی ایران ایزو- آی ای سی ۱۷۰۲۵ مراجعه شود.

۵-۲ صلاحیت

برای هر روش، معیارهای عینی برای ارزیابی صلاحیت کارکنان باید هم در ابتدای اسـتخدام و هـم در حـین کار تعریف شده باشد.

صلاحیت کارکنان را در آزمایشگاه می توان به وسیله انجام کنترل های کیفیت داخلی مشخص کرد. (به بند ۱۶-۱-۲ مراجعه شود)

یادآوری- برای تعیین علل عملکرد ضعیف (مانند خطا در پی پت کـردن، عـدم یکنواخـت سـازی در سوسپانـسیون اولیـه و شمارش) در روش آزمون شمارش کلنی ها به استاندارد ایزو ISO 14461-1 مراجعه شود.

1- Ventilation
2- Contact plate
3- Plate Count Agar

۵-۳ تصدیق صلاحیت کارکنان

توصیه می شود تصدیق صلاحیت کارکنان به طور مستمر و با متغیرهای مورد نظر ارزیابی شود . این متغیرها شامل مشارکت در برنامه های تضمین کیفیت داخلی، آزمون های کفایت تخصصی (PT)[1] (به استاندارد ISO/IEC Guide 43-1 مراجعه شود) و استفاده از مواد مرجع (RM)[2] یا به وسیله آزمون های خود ارزیابی[3] که در استاندارد ISO 14461-2 ارائه شده است، می باشد.

۵-۴ بهداشت

به منظور پیشگیری از آلودگی نمونه ها ، محیط‌های کشت و خطر عفونت کارکنان اقدامات بهداشتی زیر باید انجام شود:

الف- پوشش کامل لباس آزمایشگاه (مانند روپوش، دستکش، پوشش محافظ مو و ریش، پوشش کفش) که باید تمیز و از مواد غیرقابل اشتعال تولید شده باشد. لباس آزمایشگاه را نباید خارج از محل کار و رخت‌کن پوشید ؛

ب- ناخن ها را تمیز و ترجیحاً کوتاه نگه دارید ؛

پ- پیش و پس از انجام آزمون های میکروبیولوژی و بلافاصله پس از خروج از توالت دست ها را با آب ولرم به طور کامل بشویید و ترجیحاً باز کردن شیر آب بدون دخالت دست باشد. از مایع یا پودر صابون یا یک پاک کننده بهداشتی که ترجیحاً در یک توزیع کننده تمیز نگهداری می شود، استفاده کنید. برای خشک کردن دست ها از کاغذ توالت یا حولهٔ یکبار مصرف استفاده کنید. اجرای این مقررات برای کارکنان و بازدیدکنندگان آزمایشگاه یکسان است ؛

ت- هنگام کار با نمونه ها، کشت ها، محیط های کشت و هنگام تلقیح، از صحبت‌کردن و سرفه‌کردن خودداری کنید ؛

ث- کارکنان مبتلا به عفونت یا بیماری پوستی باید تا زمان بهبودی کامل از کار در آزمایشگاه خودداری کنند زیرا احتمال آلودگی نمونه و همچنین نامعتبر شدن نتایج آزمون ها وجود دارد ؛

ج- از خوردن و آشامیدن در آزمایشگاه و همچنین قراردادن غذای مورد مصرف کارکنان در یخچال یا فریزر آزمایشگاه خودداری کنید ؛

چ- کشیدن پی پت با دهان ممنوع می باشد.

1- Professional test
2- Refrence material
3- Self-assessment tests

۶ وسایل و تجهیزات

۶-۱ کلیات

توصیه می شود مطابق با شرایط خوب آزمایشگاهی، کلیهٔ وسایل و تجهیزات تمیز و در محل مناسب نگهداری شوند. پیش از استفاده بهتر است وسایل از نظر داشتن شرایط لازم برای کار تصدیق و در صورت لزوم در طی استفاده، عملکرد آن پایش شود.

توصیه می شود در صورت لزوم تجهیزات و وسایل پایش مطابق با استانداردهای ملی قابل ردیابی کالیبره شوند. بهتر است کالیبراسیون مجدد روش های اجرایی ، نتایج و هر گونه کنترل انجام شده، مستند شوند.

تجهیزات بهتر است به طور منظم بازبینی شده و در مدت استفاده از ایمنی و مناسب بودن آن ها اطمینان یابید. توصیه می شود تجهیزات مطابق با وضعیت کاری و صحت مورد نظر برای نتایج، پایش شوند.

در بیشتر موارد تناوب کالیبراسیون و بررسی های تصدیقی برای هر یک از تجهیزات در این استاندارد مشخص نشده است و باید به وسیله هر آزمایشگاه بر حسب نوع تجهیزات و سطح فعالیت آزمایشگاه تعیین شده و مطابق با دستورالعمل سازنده آن باشد. در مواردی محدود که تناوب کالیبراسیون مشخص شده است، اجرای آن ضروری می باشد.

وسایل و تجهیزات باید با در نظر گرفتن تسهیل عملکرد، سهولت تعمیر، تمیزکردن، آلودگی‌زدایی و کالیبراسیون ساخته و نصب شوند.

عدم قطعیت اندازه‌گیری که در این بند ارائه شده است مربوط به وسایل و تجهیزات می باشد و نباید برای صحت روش های آزمون به کار رود.

در این بند الزامات صحت اندازه‌گیری تجهیزات اندازه‌گیری تعیین شده است. این الزامات بر اساس حد رواداری[1] عملی مورد نیاز برای نشان دادن کنترل مناسب دستگاه ها در کاربرد روزمره آن می باشد. صحت تعیین شده به عدم قطعیت اندازه شناختی[2] دستگاه ها بستگی دارد. (به استاندارد ISO/IEC Guide 99 مراجعه شود).

برای تجهیزات کنترل دما، ثبات و یکنواختی دما را پیش از کاربرد اولیه و پس از هر تعمیر یا تغییر تاثیرگذار روی کنترل دما، ارزیابی کنید.

1- Tolerance
2- Metrological

۶-۲ اتاقک های محافظ[1]

۶-۲-۱ تعریف

اتاقک محافظ، یک محل کار با جریان هوای لایه‌ای عمودی یا افقی برای زدودن گرد و غبار و ذرات دیگر مانند میکروب ها از هوا می باشد.

حداکثر تعداد قابل قبول ذرات در هر متر مکعب با اندازه بزرگتر یا مساوی ۰/۵ µm نشان دهندهٔ کلاس پراکندگی گرد و غبار از یک اتاقک ایمن می باشد. برای اتاقک هایی که در میکروبیولوژی مواد غذایی به کار می روند، تعداد ذرات نباید بیش از ۴۰۰۰ در هر متر مکعب باشد.

اتاقک های مورد استفاده در آزمایشگاه میکروبیولوژی ۴ نوع می باشند که عبارت است از:

الف- اتاقک ایمنی کلاس I اتاقک هایی با دریچه جلو و هوای خروجی محافظت شده می باشند که از کاربر و محیط محافظت می کند اما فرآورده را از آلودگی خارجی حفظ نمی کند. آئروسل‌های[2] بالقوه آلاینده ایجاد شده در داخل اتاقک، توسط فیلتر دستگاه محبوس می شوند و هوای فیلتر شده از اتاقک خارج می شود در غیر این صورت هوا باید از میان دو فیلترهای ذرات هوا با کارایی بالا (HEPA)[3] نصب شده در مجموعه عبور کند. اتاقک های ایمنی کلاس I به علت مشکلات نگهداری و عدم اطمینان از محافظت کاربر برای کار روی میکروارگانیسم های بیماریزای گروه خطر ۳ مناسب نیستند؛

ب- اتاقک ایمنی کلاس II که از فرآورده، کاربر و محیط محافظت می‌کند، با گردش مجدد هوای فیلتر شده، خروج مقداری از آن به اتمسفر و جایگزین کردن هوا از طریق دریچهٔ کار، از کاربر محافظت می کند. اتاقک ایمنی کلاس II برای کار روی میکروارگانیسم های بیماریزای گروه خطر ۳ مناسب می باشد؛

پ- اتاقک جریان هوای لایه‌ای افقی[4] از آلودگی نمونه مورد آزمون محافظت می کند اما هر آئروسل ایجاد شده را به سمت کاربر می‌دمد . بنابراین آن ها برای آزمون کشت های تلقیح شده یا آماده سازی کشت های بافت مناسب نمی باشند؛

ت- اتاقک جریان هوای لایه‌ای عمودی[5] از فرآورده با استفاده از جریان لایه ای عمودی فیلتر شده با فیلترهای HEPA محافظت می کند. آن ها همچنین با استفاده از گردش مجدد هوای داخلی از کاربر

1- Protective cabinets
2- Aerosols
3- High Efficiecy Particulate Air Filters
4- Horizontal laminar outflow cabinets
5- Vertical laminar airflow cabinets

محافظت می‌کند. این نوع اتاقک به ویژه با فراهم کردن محیط آسپتیک[1] برای آزمون فرآورده های سترون مناسب بوده و هنگام کار با پودرها از کاربر محافظت می‌کند.

هنگام کار با پودرهای آلوده و میکروارگانیسم های بیماریزا حتماً از اتاقک های محافظ استفاده کنید.

استفاده از شعله گاز[2] و کوره مخصوص سوزن کشت[3] در اتاقک های محافظ توصیه نمی شود. در صورت لزوم توصیه می شود مشعل گاز شعله کوچکی داشته باشد که سبب اختلال در جریان هوا نشود. به طور جایگزین از تجهیزات یکبار مصرف (مانند لوپ ها و پی پت ها) استفاده کنید.

۶-۲-۲ کاربرد

توصیه می شود اتاقک ها در صورت امکان عاری از وسایل اضافی باشند.

پیش از انجام آزمون برای به حداقل رساندن حرکت دست به داخل و خارج اتاقک، وسایل مورد نیاز را درون آن قرار دهید. تجهیزات و مواد را به گونه‌ای در اتاقک قرار دهید که اختلال در جریان هوا به حداقل برسد.

توصیه می شود کاربرها برای کاربرد صحیح از اتاقک ها آموزش کافی دیده باشند و از ایمنی آن ها و حساسیت فرآورده یا محیط کشت اطمینان یابید.

۶-۲-۳ تمیز و ضدعفونی کردن

پس از انجام آزمون محیط کار را با استفاده از مواد ضدعفونی کنندهٔ غیر خورنده و مناسب مطابق با دستورالعمل سازنده ، تمیز و ضدعفونی کنید. شبکه های سیمی[4] نگهدارندهٔ پیش فیلترها را به طور منظم بازبینی کنید و با یک پارچه آغشته به مواد ضدعفونی کننده پاک کنید.

توصیه می شود در اتاقک های جریان هوای لایه ای، سطح فیلتر به طور منظم از طریق مکش به گونه ای تمیز شود که سطح فیلتر آسیب نبیند.

بهتر است پیش از تعویض فیلتر یا سرویس‌کردن، اتاقک ایمنی با بخار ضدعفونی شود. (این عملیات توسط شرکت پشتیبان انجام شود).

پس از تمیز کردن اتاقک ها می توانید از لامپ های فرابنفش (U.V)[5] برای ضدعفونی کردن استفاده کنید. لامپ های U.V بهتر است به طور منظم تمیز شده و مطابق با دستورالعمل سازنده تعویض شود.

1- Aseptic
2- Gas burner
3- Wire incinerator
4- Wire grids
5- Ultra Violet

۶-۲-۴ نگهداری و بازبینی

از اتاقک های محافظ که مناسب شرایط محیطی آزمایشگاه و کاربرد مورد نظر می باشند، استفاده کنید.

کارایی اتاقک های محافظ باید توسط یک فرد کارآزموده هنگام تحویل و در فواصل زمانی پیشنهاد شده توسط سازنده و پس از هر بار تعمیر و تغییر ارزیابی شود.

بهتر است به وسیله کنترل سطح کار و دیوارهای اتاقک ، عدم وجود هرگونه الودگی میکروبی به صورت دوره‌ای تصدیق[1] شود.

توصیه می شود برای کنترل عملکرد فیلترها، تعداد میکروارگانیسم های قابل انتقال از هوا به طور دوره‌ای بررسی شود. برای مثال در هر اتاقک چندین پلیت درباز حاوی محیط کشت جامد غیر انتخابی (مانند PCA) [2] را به مدت زمان ۳۰min قرار دهید.

۶-۳ ترازوها و رقیق کننده های وزنی [3]

۶-۳-۱ کاربرد و عدم قطعیت اندازه گیری

به طور کلی ترازو برای توزین آزمونه[4]، مواد تشکیل دهندهٔ محیط های کشت و واکنشگرها به کار می رود.

علاوه بر آن ممکن است برای اندازه‌گیری حجم محلول های رقیق کننده بر حسب جرم نیز به کار رود.

رقیق کننده‌های وزنی وسایل الکترونیکی شامل یک ترازو و یک توزیع کننده مایع قابل برنامه ریزی می باشند که برای آماده‌سازی سوسپانسیون اولیه به کار می رود. اساس کار آن ها افزودن رقیق کننده به یک نمونه فرعی[5] به یک نسبت مشخص می باشند.

نمونه مورد آزمون به مقدار مشخص برای آزمون وزن می شود و رقیق کننده به نسبت مورد نیاز افزوده می شود. (برای مثال ۹ به ۱ برای رقت های اعشاری)

آزمایشگاه میکروبیولوژی مواد غذایی باید در محدوده عدم قطعیت اندازه‌گیری مورد نیاز برای فرآورده های مختلفی که توزین می شوند، مجهز به ترازوها باشد.

جز در موارد تعیین شده حداکثر خطا مجاز هنگام توزین آزمونه بهتر است ٪۱ یا کمتر باشد.

تجهیزات فوق را روی سطح افقی ثابت قرار دهید، در صورت لزوم برای اطمینان از تراز بودن، آن ها را تنظیم کرده و از لرزش[6] و کوران هوا[7] حفاظت کنید.

1- Verify
2- Plate Count Agar
3- Gravimetric diluter
4- Test portion
5- Subsample
6- Vibration
7- Draughts

۶-۳-۲ تمیز و ضدعفونی کردن

ترازو و رقیق کننده های وزنی را پس از استفاده یا ریختن مواد در طی توزین، با یک مادهٔ ضدعفونی کنندهٔ مناسب و غیرخورنده، تمیز و ضدعفونی کنید.

۶-۳-۳ تصدیق عملکرد[1] (کارایی) و کالیبراسیون

کارایی ترازو باید به طور منظم در طی استفاده و پس از تمیز کردن با وزنه های کنترل توسط فرد آموزش دیده بررسی شود. کالیبراسیون باید در فواصل مشخص توسط فرد کارآزموده در تناوب خاص با توجه به کارکرد دستگاه انجام شود.

وزنه های کنترل را نیز بلافاصله پس از کالیبراسیون ترازو بررسی کنید.

۶-۴ همگن کننده ، خردکن[2] و مخلوط کن[3]

۶-۴-۱ تعریف

این تجهیزات برای آماده‌سازی سوسپانسیون اولیه از فرآورده های غیر مایع استفاده می شود.

وسایلی که ممکن است به کار رود عبارت است از :

الف- مخلوط‌کن ضربه‌ای[4] (استومیکر[5]) با کیسه های سترون و در صورت امکان مجهز به وسیلهٔ تنظیم کنندهٔ سرعت و زمان ؛

ب- مخلوط‌کن چرخشی[6] (خردکن) با سرعت بین ۸۰۰۰ r/min و ۴۵۰۰۰ r/min با ظروف درپوش دار شیشه ای یا فلزی قابل سترون کردن ؛

ت- مخلوط‌کن ارتعاشی[7] (پالسی فایر[8]) با کیسه های سترون ؛

ث- سایر سیستم های مخلوط کردن با کارایی مشابه.

در موارد خاص، ممکن است مخلوط کردن با استفاده از گلوله های شیشه‌ای[9] سترون به قطر تقریبی ۶ mm به طور دستی انجام شود. (به استانداردهای ملی ایران شماره های ۲-۸۹۲۳ ، ۳-۸۹۲۳ ، ۴-۸۹۲۳ و ۹۴۱۵ مراجعه شود)

1- Performance
2- Blender
3- Mixer
4- Peristaltic blender
5- Stomache
6- Rotary homogenizer
7- Vibration mixer
8- Pulsifier
9- Glass beads

۶-۴-۲ کاربرد

در مخلوط‌کن ضربه‌ای زمان مخلوط کردن برای مواد غذایی خاص به طور معمول ۱ min تا ۳ min می باشد. (به استانداردهای ملی ایران شماره های ۲-۸۹۲۳ ، ۳-۸۹۲۳ ، ۴-۸۹۲۳ و ۹۴۱۵ مراجعه شود)

از این وسایل (طبق بند ۶-۴) برای آزمون فرآورده های غذایی زیر استفاده نکنید:

الف- فرآورده‌هایی که احتمال سوراخ کردن کیسه را دارند (حاوی قطعات تیز، سخت و خشک هستند) ؛

ب- فرآورده‌هایی که به دلیل داشتن بافت خاص یکنواخت کردن آن ها مشکل است مانند سوسیس و کالباس خشک (سالامی).

در مخلوط‌کن چرخشی تعداد کل چرخش ها باید بین ۱۵۰۰۰ تا ۲۰۰۰۰ باشد. حتی با مخلوط کردن نسبتاً کند این زمان نباید بیش از ۲٫۵min باشد.

مخلوط‌کن ارتعاشی را می توان برای بیشتر مواد غذایی شامل فرآورده های سخت و خشک استفاده کرد. زمان مخلوط کردن به طور معمول ۰٫۵ min تا ۱ min می باشد. اگر میکروارگانیسم ها در عمق داخلی بافت چسبیده باشند توصیه می شود پیش از انجام آزمون نمونه به قطعات کوچک بریده شود.

گلوله های شیشه‌ای را می توان برای آماده سازی فرآورده های غلیظ یا چسبناک خاص، به ویژه فرآورده های لبنی خاص به وسیله تکان دادن سوسپانسیون اولیه حاوی این گلوله ها به کار برد (به استانداردهای ملی ایران شماره های ۲-۸۹۲۳ ، ۳-۸۹۲۳ ، ۴-۸۹۲۳ و ۹۴۱۵ مراجعه شود).

۶-۴-۳ تمیز و ضدعفونی کردن

مخلوط‌کن های ضربه ای و مخلوط‌کن های ارتعاشی را به طور منظم و پس از هر بار سرریزشدن مواد از کیسه یا نشتی[1] کیسه، تمیز و ضدعفونی کنید.

ظرف فلزی یا شیشه ای مخلوط‌کن های چرخشی را پس از هر بار استفاده تمیز و سترون کنید.

۶-۴-۴ نگهداری

تجهیزات را مطابق با دستورالعمل سازنده بازرسی و نگهداری کنید.

1- Leakage

۶-۵ pH متر

۶-۵-۱ تعریف

pH متر برای اندازه گیری اختلاف پتانسیل در یک دمای معین بین الکترود سنجش و الکترود مرجع یا قرار دادن هر دو الکترود داخل فرآورده به کار می رود. قابلیت اندازه گیری باید با دقت ۰/۰۵ واحد pH و تفکیک پذیری[1] ۰/۰۱ واحد pH باشد. pH متر باید به سیستم تنظیم دمای خودکار یا دستی مجهز باشد.

یادآوری- الکترود سنجش و الکترود مرجع معمولاً با هم به صورت یک سیستم الکترود مرکب قرار می گیرند.

۶-۵-۲ کاربرد

pH متر برای اندازه‌گیری مقدار pH محیط های کشت و واکنشگرها و در صورت لزوم تنظیم pH در طی آماده سازی و کنترل کیفی پس از سترون سازی و همچنین برای اندازه‌گیری مقدار pH نمونه‌ها و سوسپانسیون آن ها به کار می رود.

در صورت وجود استانداردهای خاص برای فرآورده های مورد آزمون برای استفاده از pH متر، تعیین و تنظیم مقدار pH مطابق با آن استاندارد عمل کنید.

pH متر را مطابق با دستورالعمل سازنده برای اندازه گیری مقدار pH در یک دمای استاندارد برای مثال دمای ۲۵ °C تنظیم کنید. مقدار pH را پس از تثبیت بخوانید تا دو رقم اعشار ثبت کنید.

یادآوری- در صورتی که مقدار pH اندازه گیری شده در مدت زمان ۵s کمتر از ۰/۰۲ واحد pH نوسان داشته باشد، عدد خوانده شده، ثابت در نظر گرفته می شود. معمولاً با استفاده از الکترودها در شرایط مطلوب به تعادل در مدت ۳۰s برقرار می شود.

۶-۵-۳ تصدیق و تنظیم [2]

pH متر را مطابق با دستورالعمل سازنده مورد تصدیق قرار دهید، پیش از شروع کار به طور روزانه حداقل از دو و ترجیحاً سه محلول بافر استاندارد استفاده کنید. حداکثر خطای مجاز برای تصدیق، با توجه به نحوه استفاده از آن می باشد.

محلول‌های استاندارد باید مقادیر pH تعیین شده تا دو رقم اعشار در دمای اندازه‌گیری را داشته باشند. (در حالت کلی pH=۷/۰۰ و pH=۴/۰۰ و pH=۹/۰۰ در دمای ۲۵ °C مطابق با دستورالعمل سازنده).

1- Resolution
2- Gauging

pH محلول های استاندارد باید در محدودهٔ مقادیر pH تعیین شده باشد و محلول های استاندراد به کار رفته باید بتواند مقادیر pH اندازه‌گیری شده را شامل شود.

پس از تصدیق pH متر با دو محلول بافر استاندارد قابل ردیابی، توصیه می شود pH با یک بافر دیگر به عنوان بافر کنترل مانند pH=۵ یا pH=۸ بررسی شود.

در صورتی که هنگام تصدیق pH متر، یک نتیجه خارج از محدودهٔ حداکثر خطای مجاز به دست آید مطابق با دستورالعمل سازنده دستگاه را تنظیم کنید.

تنظیم را می‌توان پس از کالیبراسیون که تخمین عدم قطعیت اندازه‌گیری pH متر را محاسبه می کند انجام شود.

۶-۵-۴ نگهداری

الکترودها را مطابق با دستورالعمل سازنده کنترل و نگهداری کنید و لازم است به ویژه در موارد زیر به طور منظم پایش شود:

الف- وضعیت الکترودها با در نظر گرفتن فرسودگی و کثیف شدن ؛

ب- زمان پاسخ و پایداری مقدار pH.

پس از هر بار استفاده الکترودها را با آب مقطر یا آب دیونیزه شستشو دهید. به منظور پیشگیری از فرسوده شدن و جرم گرفتن الکترودها، به طور منظم آن ها را مطابق با دستورالعمل سازنده تمیز کنید.

الکترودها را مطابق با دستورالعمل سازنده در محل مناسب نگهداری کنید.

۶-۶ اتوکلاو[1]

۶-۶-۱ تعریف

اتوکلاو قادر به ایجاد بخار آب اشباع شده در محفظه داخلی دستگاه می باشد و برای از بین بردن میکروارگانیسم ها به کار می رود.

توصیه می شود اتوکلاو به وسایل زیر مجهز باشد:

الف- حداقل یک دریچهٔ اطمینان؛

ب- شیر تخلیه آب؛

پ- وسیله تنظیم دما در محفظه و حفظ آن تا ۳± °C از دمای مورد نظر (با در نظر گرفتن عدم قطعیت اندازه‌گیری مربوط به ترموکوپل[2] اندازه‌گیر) ؛

1- Autoclave
2- Thermocouple

ت- یک حرارت سنج یا یک ترموکوپل ثبات.

اتوکلاو همچنین بهتر است به ثبت کنندهٔ دما و زمان مجهز باشد.

۶-۶-۲ کاربرد

در سترون‌سازی با بخار آب تمام هوای موجود در دستگاه را پیش از بالا رفتن فشار خارج کنید. اگر اتوکلاو به وسیلهٔ تخلیهٔ خودکار مجهز نمی باشد لازم است هوا تا خروج پیوسته بخار آب خارج شود.

برای از بین بردن میکروارگانیسم ها دمای بخار آب اشباع شده در محفظه باید حداقل ۱۲۱ $^{\circ}C$ باشد.

از اتوکلاو به طور همزمان برای سترون‌سازی وسایل تمیز (و یا محیط کشت) و آلودگی‌زدایی وسایل آلوده (و یا محیط کشت استفاده شده) استفاده نکنید.

ترجیحاً اتوکلاوهای جداگانه برای این دو فرآیند در نظر بگیرید. پس از سترون‌سازی همه مواد و وسایل پیش از جابجایی بهتر است داخل اتوکلاو خنک شوند.

به دلایل ایمنی، محتویات داخل اتوکلاو را تا رسیدن دمای آن به کمتر از ۸۰$^{\circ}C$ خارج نکنید.

۶-۶-۳ نگهداری

محفظهٔ داخلی دستگاه، فیلتر شیر تخلیهٔ آب و درزگیرهای[1] در را به طور منظم تمیز کنید. صحت درزگیرهای در را کنترل کنید. عملیات تخلیه آب و رسوب‌زدایی را در صورت لزوم در فواصل زمانی مشخص انجام دهید و مطابق با توصیه های سازنده عمل کنید.

۶-۶-۴ تصدیق و کالیبراسیون

اتوکلاو باید در وضعیت مطلوب نگهداری شود و به طور منظم توسط افراد کارآزموده مطابق با دستورالعمل سازنده بازرسی شود.

وسایل پایش را در شرایط کاری مناسب نگهداری و به طور منظم عملکرد آن را تصدیق کنید.

صحه‌گذاری اولیه عملیات اتوکلاو بهتر است شامل انجام آزمون های تعیین کارایی برای هر دور سترون‌سازی و برای هر شرایط متفاوت کاربرد دستگاه به طور عملی انجام شود. این فرآیند بهتر است پس از هر تعمیر اساسی و یا تغییر تکرار شود. توصیه می شود گیرنده های حساس به دما به تعداد کافی در محل های مناسب به منظور نشان دادن نفوذ کافی دما در همه قسمت ها قرار داده شوند. توصیه می شود صحه‌گذاری و صحه گذاری مجدد با در نظر گرفتن زمان رسیدن به دمای مناسب و کاهش دما تا خنک شدن و دمای سترون‌سازی باشد.

1- Seals

در صورتی که سوابق کارایی فرآیند در دسترس نمی باشد، در هر بارگذاری اتوکلاو، برای تصدیق فرآیند حرارتی بهتر است حداقل یک نشانگر فرآیند در مرکز وسایل قرار داده شود.

۶-۷ دستگاه آماده ساز محیط کشت[1]

۶-۷-۱ تعریف

این دستگاه به طور کلی برای سترون‌سازی حجم های زیاد محیط کشت طراحی شده است (بیش از یک لیتر) و شامل یک ظرف گرم کردن، مخزن آب[2] و وسیله همزن مداوم می باشد. این تجهیزات همچنین باید به حرارت سنج، فشارسنج ، زمان سنج و شیر ایمنی مجهز باشند.

علاوه بر آن توصیه می شود دستگاه یک قفل ایمنی برای پیشگیری از بازشدن در تا رسیدن دما به کمتر از ۸۰°C داشته باشد.

۶-۷-۲ کاربرد

در تمام موارد مطابق با دستورالعمل سازنده عمل کنید.

تمام عملیات تهیهٔ محیط کشت داخل دستگاه انجام می شود. پس از افزودن مواد تشکیل دهنده با هم زدن و حرارت دادن، مواد حل شده و سپس سترون سازی انجام می شود.

۶-۷-۳ نگهداری

پس از هر بار تهیهٔ محیط کشت دستگاه را بشویید و به طور کامل با آب خالص آبکشی کنید.

۶-۷-۴ تصدیق

دستگاه باید در شرایط مطلوب نگهداری شود و به طور منظم توسط افراد با صلاحیت مطابق با دستورالعمل سازنده بازرسی شود.

وسایل پایش را در شرایط مطلوب نگهداری کنید و به طور منظم عملکرد آن ها را مورد تصدیق قرار دهید.

صحه‌گذاری اولیه عملیات ساخت محیط کشت بهتر است شامل انجام آزمون های تعیین کارایی برای هر دور سترون‌سازی و برای هر شرایط متفاوت کاربرد دستگاه به طور عملی انجام شود. این فرآیند بهتر است پس از هر تعمیر اساسی و یا تغییر تکرار شود. برای نشان دادن یکنواختی دما می توان از دو نشانگر دمایی یکی نزدیک به نشانگر کنترل و دیگری دور از آن استفاده کرد.

توصیه می شود دما و مدت زمان هر دور سترون‌سازی کنترل شود.

1- Media preparator
2- Water jacket

۶-۸ انکوباتور[1]

۶-۸-۱ تعریف

انکوباتور شامل اتاقک عایق بندی شده با قابلیت نگهداری دمای ثابت و توزیع یکنواخت دما با حداکثر خطای مجاز در مقدار نوسانات دمایی تعیین شده در روش آزمون است.

۶-۸-۲ کاربرد

انکوباتور باید به یک سیستم تنظیم کننده دما مجهز باشد تا دما یا سایر متغیرها را در کل حجم کاری ثابت نگهدارد. برای حصول اطمینان از دستیابی به دمای ثابت و درست، حجم کار را معین کنید.

اگر دمای محیط نزدیک یا بالاتر از دمای انکوباتور باشد لازم است به یک سیستم خنک کننده مجهز شود.

توصیه می شود دیوارهای انکوباتور از تابش نور خورشید محافظت شوند.

در صورت امکان در یک دورهٔ کار انکوباتور را کاملاً پر نکنید زیرا محیط های کشت برای رسیدن به دمای تعادل زمان طولانی را طی می کنند، انکوباتورهایی که دارای سیستم همرفت هوای تحت فشار[2] یا مانند آن می باشد تعادل دمایی بهتری را ایجاد می کنند.

از باز گذاشتن در انکوباتور به مدت طولانی خودداری کنید.

توصیه می شود وسایل را به گونه‌ای در انکوباتور قرار دهید که هوا جریان داشته باشد. (به بند ۱۱-۲-۴ مراجعه شود)

۶-۸-۳ تمیز و بهسازی کردن [3]

دیوارهای درونی و بیرونی انکوباتور را به طور منظم تمیز و بهسازی کرده و گرد و غبار را از سیستم تهویهٔ آن پاک کنید.

۶-۸-۴ تصدیق

ثبات و یکنواختی توزیع دمای انکوباتور را به وسیله استفاده همزمان از تعدادی دماسنج [4] و ترموکوپل با صحت شناخته شده و محدوده دمایی مناسب کنترل کنید.

برای پایش دمای داخل انکوباتور ، دماسنج را در محل مناسب داحل انکوباتور قرار دهید و محدودهٔ عملکرد قابل قبول انکوباتور را تعیین کنید.

1- Incobator
2- Forced-air convection
3- Sanitization
4- Thermometer

برای مثال برای رسیدن به دمای ۳۷ °C ± ۱ °C هنگامی که منحنی نمایش داخل انکوباتور محدودهٔ دمایی ۳۶٫۸ °C تا ۳۷٫۳ °C را نشان می دهد، برای حصول اطمینان از اینکه تمام قسمت های انکوباتور به دمای مورد نظر ۳۷ °C رسیده است، توصیه می شود محدودهٔ عملکرد به دمای ۳۶٫۲ °C تا ۳۷٫۷ °C کاهش یابد.
این فرآیند بهتر است پس از هر تعمیر یا تغییر اساسی تکرار شود.
برای مثال توصیه می شود دمای انکوباتور با استفاده از یک یا چند دماسنج حداقل و حداکثر یا ترموکوپل های ثبات کنترل شود.
برای پایش روزمره انکوباتور، دماسنج یا ترموکوپل ثبات را به منظور نمایش منحنی داده های به دست آمده از دمای مورد نظر باید در یک وضعیت ثابت قرار دهید.
دمای انکوباتور را حداقل هر روز کاری کنترل کنید. برای این منظور باید در هر انکوباتور حداقل یک وسیلهٔ اندازه‌گیری دما که حباب آن درون ظرف گلیسرول در یک بطری غیر قابل نفوذ (یا سایرحرارت گیرهای[1] مناسب) قرار دارد، گذاشته شود.

۶-۹ یخچال یا سردخانه[2]

۶-۹-۱ تعریف

اتاقک هایی برای تامین انبارش سرد می باشند. دمای نگهداری نمونه های مواد غذایی مورد آزمون، به جز در موارد خاص، باید ۳ °C ± ۲ °C (حداکثر خطای مجاز) باشد. برای سایرکاربردها، دما باید ۵°C ± ۳°C باشد مگر آن که موارد خاص دیگری تعیین شده باشد.

۶-۹-۲ کاربرد

برای پیشگیری از آلودگی متقاطع و به منظور جداسازی فیزیکی، از اتاقک های مختلف یا حداقل ظروف مختلف برای نگهداری موارد زیر استفاده کنید:

الف- محیط کشت های تلقیح نشده و واکنشگرها ؛

ب- آزمایه ها ؛

پ- کشت های میکروارگانیسم ها و محیط های کشت تلقیح شده.

وسایل را به گونه‌ای در یخچال ها، خنک کننده ها و سردخانه ها قرار دهید که گردش هوای مناسب ایجاد شده و خطر آلودگی متقاطع به حداقل برسد.

1- Heat sink
2- Cold-storage room

۶-۹-۳ تصدیق

دمای اتاقک را هر روز کاری با استفاده از یک دماسنج یا یک پروب که به طور ثابت نصب شده است کنترل کنید. صحت وسیله پایش دما، به مورد استفاده از آن بستگی دارد .

۶-۹-۴ نگهداری و تمیز کردن

برای اطمینان از عملکرد درست، عملیات نگهداری را در فواصل منظم به صورت زیر انجام دهید:

الف- زدودن گردو غبار از تیغه های موتور یا از صفحات تبادل حرارت خارجی ؛

ب- یخ زدایی[1]؛

پ- تمیزکردن و آلودگی زدایی داخل اتاقک ها.

۶-۱۰ فریزر و فریزر فوق انجماد[2]

۶-۱۰-۱ تعریف

فریزر اتاقکی است که نگهداری در شرایط انجماد را امکان‌پذیر می سازد. دما جز در موارد مشخص شده باید کمتر از ۱۵ °C- باشد و ترجیحاً برای نمونه های مواد غذایی کمتر از ۱۸ °C- باشد.

فریزر فوق انجماد اتاقکی است که نگهداری در شرایط فوق انجماد را امکان پذیر می سازد. دما جز در موارد مشخص شده بایدکمتر از ۷۰°C- باشد.

۶-۱۰-۲ کاربرد

۶-۱۰-۲-۱ فریزر

اتاقک های مختلف یا حداقل ظروف مختلف برای جداسازی فیزیکی و نگهداری مواد زیر باید در دسترس باشد:

الف- واکنشگرهای تلقیح نشده ؛

ب- نمونه های آزمون ؛

پ- کشت های میکروارگانیسم ها.

وسایل را به گونه‌ای در فریزر قرار دهید تا دمای مورد نظر حفظ شود به ویژه هنگامی که فرآورده های غیر منجمد را در آن قرار می دهید.

1- Defrosting
2- Deep freezer

۶-۱۰-۲-۲ فریزر فوق انجماد

کاربرد اصلی این نوع فریزرها برای نگهداری میکروارگانیسم ها، کشت های مرجع و/یا کاری و واکنشگرها می باشد.

وسایل را به گونه‌ای در فریزر قرار دهید تا دمای مورد نظر حفظ شود و از آلودگی متقاطع بین میکروارگانیسم ها و واکنشگرها پیشگیری شود.

۶-۱۰-۳ تصدیق

دمای هر اتاقک را با استفاده از وسیلهٔ پایش دمای مناسب به طور منظم کنترل کنید.

۶-۱۰-۴ نگهداری

نگهداری از دستگاه ها را به طور منظم به صورت زیر انجام دهید:

الف- زدودن گردو غبار از تیغه های موتور و از صفحات تبادل دمای خارجی (چنانچه در دسترس می باشد) ؛

ب- یخ زدایی ؛

پ- تمیز کردن و آلودگی زدایی داخل اتاقک ها.

۶-۱۱ حمام مایع با دمای ثابت[1]

۶-۱۱-۱ تعریف

حمام با دمای ثابت که با یک مایع (مانند آب، اتیلن‌گلیکول) پر می شود و دارای در یا بدون در یا ملحقات دیگر برای محدود کردن تبخیر[2] است، به منظور تثبیت دمای مشخص استفاده می شود. کنترل دمای حمام مایع اغلب دقیق تر از کنترل دمای انکوباتور بوده و توانایی دسترسی به حداکثر خطای مجاز $\pm ۰/۵\ ^{\circ}C$ را دارد. دماهای آزمون و حداکثر خطا مجاز مورد نیاز، برای هر کاربرد یا روش آزمون، تعیین شده است. برای نگهداری دما در محدوده دمای اتاق یا کمتر از آن یک سیستم خنک کننده لازم است.

۶-۱۱-۲ کاربرد

کاربرد اصلی این دستگاه به شرح زیر است:

الف- گرمخانه‌گذاری محیط کشت تلقیح شده در یک دمای ثابت؛

ب- نگهداری محیط کشت جامد سترون ذوب شده در طی آماده سازی محیط کشت؛

1- Thermostatically controlled bath
2- Evaporation

پ- تعدیل دمای محیط کشت جامد ذوب شدهٔ سترون برای استفاده در روش های خاص؛
ت- آماده سازی سوسپانسیون های اولیه یا محلول ها در یک دمای کنترل شده؛
ث- فرآیند حرارتی[1] سوسپانسیون های اولیه در یک دمای کنترل شده (مانند پاستوریزاسیون).

در صورت ضرورت کنترل دقیق دما ، حمام باید به پمپ گردش آب و سیستم تنظیم کنندهٔ دمای خودکار مجهز باشد. حرکت مایع نباید سبب پاشیده شدن قطرات آب به اطراف شود.
حمام‌های درپوش دار ترجیحاً برای دمای بالا یا دقیق استفاده می شوند. درپوش‌های شیب دار مانع از چکیدن قطرات ناشی از بخار روی وسایل داخل حمام مایع می شوند.
محیط های کشت تلقیح شده را به گونه‌ای گرمخانه‌گذاری کنید که سطح بالای محیط کشت حداقل ۲cm پایین تر از سطح مایع در حمام مایع باشد.
سایر ظروف را بهتر است به گونه‌ای در حمام مایع قرار دهید که سطح محتویات آن پایین تر از مایع داخل حمام باشد.
عمق مایع حمام باید به اندازه‌ای باشد که آب از درپوش[2] ظروف وارد آن ها نشود.
برای نگهداری ثابت ظروف می توان از وسایل نگهدارنده مانند رک ها[3] استفاده کرد.
کلیه ظروف بهتر است پس از خارج کردن از حمام مایع و پیش از استفاده بعدی خشک شوند.

۶-۱۱-۳ تصدیق

ثبات و یکنواختی دمای حمام را پیش از اولین استفاده و پس از هر تعمیر و تغییر تاثیر گذار روی دما کنترل کنید.
دمای حمام مایع را با استفاده از یک دماسنج ، ترموکوپل یا وسیله ثبت کنندهٔ دما با حداقل عدم قطعیت اندازه‌گیری (به بند ۶-۲۸-۲ مراجعه شود) و مستقل از سیستم تنظیم دمای خودکار پایش کنید.
یک نمایشگر دیجیتالی را نیز در صورتی که دقت و صحت آن تایید شده باشد، می توانید استفاده کنید.
دمای حمام مایع را طی هر بار استفاده و حداقل روزانه برای گرمخانه‌گذاری های طولانی مدت پایش کنید.

۶-۱۱-۴ نگهداری

حمام مایع بهتر است با مایع توصیه شده توسط کارخانه سازنده پر شوند. برای گرمخانه‌گذاری محیط های کشت، توصیه می شود ترجیحاً از آب مقطر یا دیونیزه استفاده شود.

1- Heat treatment
2- Closure
3- Racks

سطح مایع حمام را برای اطمینان از کارکرد درست و شناوری صحیح وسایل قرار گرفته در آن به طور منظم کنترل کنید. سطح مایع باید همیشه المنت های[1] گرم کننده را بپوشاند.
حمام مایع بهتر است به طور منظم و متناوب بسته به نوع کاربرد یا پس از ریختن هر گونه مواد، خالی، تمیز و بهسازی شده و مجدداً پر شوند.

۶-۱۲ مولد بخار (استیمر[2]) شامل حمام آب جوش

۶-۱۲-۱ تعریف

این وسایل دارای یک المنت گرم کننده در آب و یک درپوش می باشند. در یک استیمر، بخار در فشار اتمسفر ایجاد می شود، در حمام آب جوش دمای آب نزدیک به نقطه جوش همراه با تولید بخار آب یا بدون آن می باشد.

۶-۱۲-۲ کاربرد

کاربرد اصلی این دستگاه شامل موارد زیر است :

الف- ذوب کردن محیط های کشت جامد؛

ب- آماده سازی محیط کشت های حساس به حرارت؛

پ- کاهش آلودگی قطعات کوچک وسایل هنگام استفاده.

برای اطمینان از این که المنت های گرم کننده در تمام مدت پوشیده از آب می باشد یک سطح ایمن و کافی از آب باید در ظرف وجود داشته باشد.
برای انجام عملیات فوق می توان از اتوکلاو با دریچهٔ باز (بخار آزاد) استفاده کرد.

۶-۱۲-۳ نگهداری

این دستگاه را تمیز نگهدارید.
در صورت لزوم توصیه می شود رسوب‌زدائی منظم در یک تناوب معین بر حسب سختی آب محل انجام شود.

1- Elements
2- Steamer

۶-۱۳ آون سترون سازی[1]

۶-۱۳-۱ تعریف

آون اتاقکی است که قابلیت تثبیت دمای ۱۶۰°C تا ۱۸۰°C را برای از بین بردن میکروارگانیسم ها به وسیلهٔ حرارت خشک دارد.

۶-۱۳-۲ کاربرد

آون فقط برای سترون سازی تجهیزات مقاوم به حرارت خشک مانند وسایل فلزی و شیشه ای استفاده می‌شود. از آون برای سترون سازی وسایل لاستیکی و پلاستیکی استفاده نکنید.

پیش از سترون‌سازی، همه وسایل فلزی و شیشه ای را تمیز کنید و در آون قرار دهید.

چنانچه برای سترون سازی وسایل شیشه ای حجم سنجی[2] از آون استفاده می کنید، به طور منظم صحت حجم های مشخص شده را مورد تصدیق قرار دهید.

دما باید در کل اتاقک یکنواخت باشد. آون باید مجهز به یک ترموستات[3] و یک دماسنج یا وسیله ثبت کننده دما با دقت مناسب باشد.

آون بهتر است به یک نشانگر زمان، برنامه ریز یا زمان سنج مجهز شده باشد.

وقتی شرایط دمایی برقرار شد، روند سترون‌سازی باید برای حداقل ۱h در دمای ۱۷۰°C ادامه یابد یا تعادلی از دما/ زمان برقرار باشد.

پس از سترون‌سازی، به منظور پیشگیری از شکستن وسایل شیشه ای بهتر است پیش از خارج کردن از آون، آن ها را خنک کنید.

۶-۱۳-۳ تصدیق

ثبات و یکنواختی دما را در آون پیش از اولین استفاده و پس از هر تعمیر یا تغییر تاثیرگذار روی کنترل دما ، بررسی کنید.

آون باید با یک دماسنج کالیبره شده، ترموکوپل یا وسیله ثبت کنندهٔ دما با دقت مناسب، تجهیز شده باشد که مستقل از سیستم تنظیم دمای خودکار می باشد. وسایل پایش باید دقت ۱°C یا کمتر در دمای استفاده شده در آون داشته باشد.

دمای آون بهتر است پایش شود و در طی هر بار استفاده ثبت شود.

1- Sterilizing oven
2- Volumetric
3- Thermostat

۶-۱۳-۴ نگهداری

در صورت لزوم سطح داخلی آون را تمیز کنید.

۶-۱۴ آون مایکروویو[1]

۶-۱۴-۱ تعریف

آون مایکروویو وسیله ای است که مواد را با استفاده از انرژی امواج با طول موج کوتاه (مـایکروویو) در فـشار اتمسفر گرم می‌کند.

۶-۱۴-۲ کاربرد

مایکروویوهایی را که در حال حاضـر در دسـترس هـستند فقـط بـرای گـرم کـردن مایعـات یـا ذوب کـردن محیط های کشت جامد استفاده کنید.

هشدار- محیط های کشت حاوی ترکیبات حساس به حرارت را در مایکروویو گرم نکنیـد مگـر اینکـه عـدم تـاثیر ایـن روش گرم کردن بر کارایی محیط های کشت تصدیق شده باشد. از مایکروویو نباید برای سترون سازی محیط هـای کـشت اسـتفاده کرد زیرا تاکنون کارایی آن برای سترون سازی محیط های کشت ارزیابی نشده است.

مایکروویو باید قابلیت گرم کردن مایعات و محیط های کشت را با یک روش کنترل شده از طریق ایجاد یـک چرخهٔ تابش امواج داشته باشد. توزیع امواج باید یکنواخت باشد تا در هیچ نقطه‌ای حرارت بیش از حد ایجـاد نشود. برای توزیع بهتر دما، مایکروویو به یک صفحه‌گردان[2] یا یک همزن[3] مجهز می باشد.

وسایل فلزی مانند درپوش‌های فلزی را در مایکروویو قرار ندهید. پـیش از گـرم کـردن، در بطـری یـا چـوب پنبه ها را شل کنید.

گرم کردن با میزان قدرت کمتر در مدت طولانی ، توزیع حرارتی بهتری ایجاد می‌کند.

هشدار- وسایل گرم شده را با احتیاط از مایکروویوخارج کنید. گرم کردن زیاد سـبب جوشـیدن و سـر ریـز شـدن محتویـات بطری یا ترکیدن آن می شود.

1- Microwave oven
2- Turntable
3- stirrer

برای ذوب کردن محیط کشت جامد از تنظیم دستگاه روی قدرت کم استفاده می شود (مانند چرخهٔ یخزدایی) و توصیه می شود برای کمک به کنترل فرآیند حرارتی از یک ظرف حاوی آب حرارت‌گیر استفاده شود. (برای مثال ۵۰ml تا ۱۰۰ ml آب در یک بشر مناسب برای مایکروویو)
توصیه می شود پس از پایان فرآیند حرارتی و پیش از برداشتن وسایل از مایکروویو حداقل به مدت زمان ۵min صبر کنید.

۶-۱۴-۳ تصدیق

برای اطمینان از کارایی بهینه و پیشگیری از حرارت دادن زیاد فرآورده های حساس به حرارت ، زمان مناسب گرم کردن و تنظیم قدرت دستگاه را به طور معمول برای حجم های مختلف مایعات و محیط کشت، در ابتدای کار انجام دهید.

۶-۱۴-۴ نگهداری

آون مایکروویو را بلافاصله پس از هر بار سرریز شدن مواد و همچنین در فواصل منظم با توجه به کارکرد دستگاه تمیز کنید.
توصیه می شود حساسیت عملکرد درزگیرهای در مایکروویو بازبینی شده و در فواصل منظم نفوذ اشعه به خارج را کنترل کنید.

۶-۱۵ ماشین شستشوی ظروف شیشه ای[1]

۶-۱۵-۱ تعریف

این ماشین برای شستشوی وسایل شیشه ای معمول در آزمایشگاه دارای کنترل الکترونیکی می باشد که برای چرخه های مختلف شستشو و آبکشی قابل برنامه است (مانند آب مقطر، آب دیونیزه یا اسید)
دستگاه شستشوی پی‌پت های شیشه ای، دستهٔ خاصی از شستشو دهنده های وسایل شیشه ای هستند و به گونه‌ای طراحی شده است که سوراخ های باریک پی‌پت ها را تمیز می‌کنند.

۶-۱۵-۲ کاربرد

انواع زیادی از شستشو دهنده‌های وسایل شیشه‌ای در دسترس است و باید مطابق با دستورالعمل سازنده نصب و استفاده شود.

1- Glass washer

۶-۱۵-۳ تصدیق

کارایی وسایل شستشو دهنده را پس از شستشو به وسیله بازرسی چشمی کنترل کنید و در کاربردهای بحرانی با انجام آزمون هایی از عاری بودن وسایل از مواد مهار کننده[1] اطمینان حاصل کنید.

باقیمانده های اسیدی یا قلیایی با استفاده از یک محلول نشانگر pH کنترل می شود. pH به دست آمده بهتر است حدود ۶/۵ تا ۷/۳ باشد.

۶-۱۵-۴ نگهداری

برنامه منظم نگهداری که به وسیله سازنده در یک تناوب مناسب مشخص شده است ، اجرا کنید.

در موارد استفاده زیاد از دستگاه یا در مناطقی که سختی آب بالا می باشد، سرویس دستگاه در فواصل زمانی کوتاه‌تر، لازم است.

۶-۱۶ میکروسکوپ نوری[2]

۶-۱۶-۱ تعریف

انواع مختلفی از میکروسکوپ ها شامل: یک چشمی[3]، دو چشمی[4]، با یک واحد نمایش بصری (VDU) [5]، یک دوربین یا تجهیزات فلورسنس و یک منبع نوری داخلی یا خارجی، وجود دارد.

برای آزمون های باکتریولوژی از عدسی های شیئی با بزرگنمایی ×۱۰ (عدسی های خشک) تا ×۱۰۰ (عدسی روغنی) استفاده کنید تا بزرگنمایی کلی ×۱۰۰ تا ×۱۰۰۰ به دست آید.

میکروسکوپ فاز کنتراست[6] برای بررسی های " لام های مرطوب " مناسب نمی باشند.

۶-۱۶-۲ کاربرد

تجهیزات نوری میکروسکوپ را مطابق با دستورالعمل سازنده تنظیم کنید. نور از منبع نوری با شدت بالا باید از میان کندانسور پایینی، لام و عدسی های چشمی عبور کند و به عدسی چشمی برسد تا عدم انطباق های کانونی کروی شکل و رنگی ایجاد نشود.

1- Inhibitory
2- Optical microscope
3- Monocular
4- Biocular
5- Video Display Unit
6- Contrast

۶-۱۶-۳ نگهداری

نگهداری، تمیز و سرویس کردن میکروسکوپ را مطابق با دستورالعمل سازنده انجام دهید. در محل نگهداری میکروسکوپ از ایجاد چگالش[1] در اثر رطوبت بالا که باعث کاهش کیفیت عدسی ها می شود، پیشگیری کنید.

هر روز یا پس از هر بار استفاده روغن را از عدسی و قسمت های مرتبط را با استفاده از دستمال های مخصوص عدسی پاک کنید. از حلال توصیه شده توسط سازنده آن استفاده کنید و به طور منظم چربی ایجاد شده به وسیله مژه ها را از عدسی چشمی پاک کنید.

سیستم های نوری می‌تواند به آسانی آسیب ببیند و ترجیحاً سرویس کردن آن توسط سازنده انجام شود.

۶-۱۷ شعلهٔ گاز[2] یا کورهٔ مخصوص سوزن کشت[3]

۶-۱۷-۱تعریف

شعله‌های گازی (بونزن) [4] یک شعلهٔ باریک بدون پوشش از منابع مختلف گاز تولید می‌کنند. تغییر مقدار هوایی که با گاز مخلوط می شود، مقدار دمای ایجاد شده را کنترل می کند.

کوره‌های مخصوص سوزن کشت با استفاده از گاز یا برق و بدون شعله می باشند و به منظور ایجاد دمای لازم و قرمز شدن سوزن کشت برای سترون‌سازی لوپ ها و سوزن‌های کشت به کار می روند.

۶-۱۷-۲ کاربرد

کاربرد اصلی شعلهٔ گاز برای سترون‌سازی لوپ های فلزی و سوزن‌های کشت از طریق رساندن آن ها به دمای قرمز شدن و همچنین سترون‌سازی قطعات کوچک و مقاوم به حرارت تجهیزات می باشد.

کوره های مخصوص سوزن کشت برای سترون سازی لوپ ها و سوزن های کشت فلزی به کار می رود و برای پیشگیری از انتشار ذرات آلوده و خطر آلودگی متقاطع هنگام کار با باکتری های بیماریزا ترجیح داده می شود.

شعله گاز با ایجاد گرمای زیاد سبب افزایش گرما و آشفتگی جریان هوای [5] آزمایشگاه شود.

روش های آسپتیک را می توان بدون استفاده از شعله گاز و با استفاده از مواد یکبار مصرف انجام داد.

به دلیل تداخل غیر قابل قبول در جریان هوای لایه‌ای، از شعله های گاز در اتاقک های محافظ استفاده نکنید. در این حالت توصیه می شود از وسایل یکبار مصرف سترون استفاده شود.

1- Condensation
2- Gas burner
3- Wire incineratot
4- Bunsen
5- Turbulence

۶-۱۷-۳ نگهداری

به طور منظم این وسایل را تمیز و ضدعفونی کنید به ویژه هنگامی که به علت ریخته شدن کشت های آلوده میکروبی روی آن ها، آلوده شده باشند.

۶-۱۸ توزیع کننده[1] محیط های کشت و واکنشگرها

۶-۱۸-۱ تعریف

توزیع کننده وسیله یا دستگاهی است که برای توزیع محیط های کشت و واکنشگرها داخل لوله ها، بطری ها یا ظروف پتری به کار می رود. این دستگاه انواع مختلفی از سیلندرهای اندازه‌گیری ساده، سرنگ های دستی یا پی پتی ، سرنگ های خودکار و پمپ های ضربه ای تا دستگاه های برنامه ریزی شدهٔ برقی با مقدار توزیع متغیر محیط های کشت و واکنشگرها را در بر می گیرد.

۶-۱۸-۲ کاربرد

وسایل تمیزی که برای توزیع محیط های کشت و واکنشگرها استفاده می شوند، باید عاری از مواد مهارکننده باشند. برای به حداقل رساندن مخلوط شدن محیط های کشت ، برای هر محیط کشت از لوله های جداگانه استفاده کنید.

برای توزیع آسپتیک محیط های کشت سترون و واکنشگرها باید همه قسمت های دستگاه که در تماس با فرآورده است، سترون باشد.

۶-۱۸-۳ تصدیق

عدم قطعیت اندازه‌گیری دستگاه برای حداکثر خطای مجاز در حجم توزیع شده نباید به طور معمول بیش از ٪۵± باشد. حداکثر خطای مجاز اندازه گیری حجم های محلول رقیق کنندهٔ استفاده شده برای آماده سازی رقت های اعشاری ٪۲± می باشد.

حجم توزیع شده را پیش از اولین استفاده، و پس از آن به طور منظم مطابق با برنامه مستند شده ، پس از هر تنظیمی که روی حجم توزیع شده تاثیر می گذارد، کنترل کنید.

1- Dispenser

۶-۱۸-۴ تمیز و نگهداری

سطح خارجی دستگاه توزیع کننده را پس از هر بار استفاده تمیز کنید. تمام قسمت های توزیع کننده را که در تماس با فرآورده می باشد شسته و آبکشی کنید و در صورتی که برای توزیع مایع سترون استفاده می شود، آن را سترون کنید.

از کاربرد مواد ضدعفونی کننده روی سطوح در تماس با مادهٔ توزیع شده خودداری کنید زیرا ممکن است خاصیت مهارکنندگی داشته باشند.

کلیه توزیع کننده های خودکار باید در وضعیت مطلوب نگهداری شده و به طور منظم مطابق با دستورالعمل سازنده سرویس شوند.

۶-۱۹ مخلوط کن گردابی (ورتکس)[1]

۶-۱۹-۱ تعریف

این دستگاه تشکیل مخلوط یکنواختی از محیط کشت مایع (مانند رقت های اعشاری و نمونه های مایع مورد آزمون) یا سوسپانسیون سلول های باکتری در یک مایع را تسهیل می کند.

مخلوط کردن به وسیله یک حرکت چرخشی گریز از مرکز محتویات لوله یا ظرف، انجام می شود. (تشکیل یک گرداب)

۶-۱۹-۲ کاربرد

پایهٔ لوله یا ظرف حاوی مایع را برای مخلوط کردن به سر مخلوط‌کن فشار دهید. سرعت مخلوط کردن به وسیله تغییر سرعت موتور یا زاویهٔ تماس با سر مخلوط کن کنترل می شود.

توصیه می شود که هنگام مخلوط کردن از سرریز نشدن محتویات لوله یا ظرف اطمینان حاصل کنید. این عمل با تنظیم سرعت و نگهداشتن لوله از ارتفاع تقریباً یک سوم لوله از بالا به منظور قابلیت کنترل بهتر لوله و جلوگیری از بالا رفتن بیش از حد مایع در لوله انجام می شود.

پس از مخلوط کردن ، برای به حداقل رساندن انتشار آئروسل ها درپوش ظرف یا لوله را با احتیاط باز کنید.

۶-۱۹-۳ تصدیق

ایجاد یک گرداب در سراسر عمق مایع طی عملیات مخلوط کردن نشان دهنده کافی بودن مخلوط کردن است.

1- Vortex mixer

۶-۱۹-۴ نگهداری

دستگاه را تمیز نگهداری کنید. در صورت ریختن هر گونه مواد، آن را با استفاده از یک ضدعفونی کننده آزمایشگاهی مناسب، آلودگی‌زدایی کنید.

۶-۲۰ شمارشگر کلنی[1]

۶-۲۰-۱ تعریف

دستگاه های شمارشگر کلنی دستی دارای یک وسیله شمارشگر حساس به فشار و یک شمارندهٔ دیجیتالی می باشند و معمولاً یک صدای خفیف از هر شمارش ایجاد می کنند این دستگاه ها ممکن است وسایلی ساده شبیه قلم و یا شامل یک صفحه مدرج نورانی برای پلیت همراه با بزرگنمایی صفحه تصویر برای کمک به شمارش کلنی باشد. شمارشگرهای کلنی الکترونیکی خودکار که تصویر ایجاد شده را ثبت می کند، به وسیله ترکیبی از سیستم های سخت افزار و نرم افزار با استفاده از یک دوربین و نمایشگر کار می کند.

۶-۲۰-۲ کاربرد

برای استفاده صحیح از شمارشگر کلنی از دستورالعمل سازنده پیروی کنید.

حساسیت شمارشگر کلنی خودکار را تنظیم کنید تا از شمارش تمام کلنی های مورد نظر اطمینان حاصل کنید. شمارشگرهای کلنی الکترونیکی خودکار، در صورت استفاده از انواع مختلف آگار و ماتریکس[2] برای شمارش سطحی و پورپلیت به منظور اطمینان از تشخیص مناسب کلنی های مورد نظر، به برنامه ریزی جداگانه نیاز دارند.

۶-۲۰-۳ تصدیق

برای اطمینان از دقیق بودن شمارش های به دست آمده از شمارشگر کلنی، شمارش ها را در فواصل منظم به صورت دستی کنترل کنید.

علاوه بر این توصیه می شود شمارشگر کلنی خودکار هر روز با استفاده از یک پلیت کالیبره شده با تعداد مشخص ذرات یا کلنی های شمارش شده، کنترل شود.

1- Colony counter
2- Matrices

۶-۲۰-۴ نگهداری

دستگاه را تمیز و عاری از گرد و غبار نگهداری کنید. از خراش سطحی که عامل مهمی در فرآیند شمارش است، پیشگیری کنید. برنامه منظم نگهداری را که به وسیله سازنده دستگاه در یک تناوب مناسب تعیین شده است انجام دهید.

۶-۲۱ تجهیزات کشت در شرایط اتمسفری تغییر یافته [1]

۶-۲۱-۱ تعریف

این تجهیزات ممکن است یک جار غیر قابل نفوذ یا هر تجهیزات مناسب دیگری باشد که قادر به ایجاد شرایط اتمسفری تغییر یافته بوده (مانند شرایط بی هوازی) و در طی مدت گرمخانه‌گذاری محیط کشت، این شرایط را حفظ می‌کند. سیستم های دیگر با عملکرد مشابه مانند اتاقک های بی هوازی نیز ممکن است به کار روند.

برای نصب و نگهداری از دستورالعمل های سازنده پیروی کنید.

۶-۲۱-۲ کاربرد

ترکیب اتمسفر مورد نیاز می تواند به وسیله افزودن مخلوطی از گاز (برای مثال از یک سیلندر گاز) پس از تخلیه هوای جار به وسیله جایگزینی اتمسفر مورد نظر در یک اتاقک یا به وسیله هر روش مناسب دیگر (مانند گازپک های[2] قابل دسترس از بازار) انجام شود.

به طور کلی گرمخانه‌گذاری در شرایط بی هوازی نیاز به یک اتمسفر با مقدار کمتر از ٪۱ اکسیژن، ٪۹ تا ٪۱۳ دی اکسید کربن دارد. گرمخانه‌گذاری در شرایط کم هوازی[3] (کاپنوایروبیک[4]) نیاز به یک اتمسفر با مقدار ٪۵ تا ٪۷ اکسیژن و تقریباً ٪۱۰ دی اکسید کربن دارد.

با توجه به نیاز میکروارگانیسم های خاص تغییر شرایط ممکن است لازم باشد.

۶-۲۱-۳ تصدیق

یک نشانگر بیولوژیکی یا شیمیایی را برای پایش ماهیت اتمسفر طی هر بار استفاده در هر اتاقک قرار دهید. رشد سویهٔ کنترل یا تغییر رنگ نشانگر شیمیایی، شرایط گرمخانه‌گذاری مناسب را تصدیق می کند.

1- Modified atmospher
2- Gas packs
3- Microaerobic
4- Capnaerobic

۶-۲۱-۴ نگهداری

در صورت استفاده از کاتالیست ، به طور منظم آن را مطابق با دستورالعمل سازنده تجدید کنید.

در صورت نصب شیرها، برای اطمینان از صحت عملکرد، آن ها را تمیز، روغن‌کاری و در صورت لزوم تعویض کنید.

وسایل را به طور منظم تمیز و بهسازی کنید.

۶-۲۲ سانتریفوژ[1]

۶-۲۲-۱ تعریف

سانتریفوژها وسایل مکانیکی یا الکترونیکی هستند که با استفاده از نیروی گریز از مرکز ذرات معلق شامل میکروارگانیسم ها را از مایعات جدا می کنند.

۶-۲۲-۲ کاربرد

در بعضی موارد تغلیظ میکروارگانیسم ها به صورت ایجاد رسوب به وسیلهٔ سانتریفوژ کردن نمونه های مایع انجام می شود که این مایع تغلیظ شده مجدداً رقیق شده و برای آزمون های بعدی استفاده می شود.

اقدامات لازم را برای پیشگیری از تولید آئروسل ها و آلودگی متقاطع از طریق کاربرد صحیح سانتریفوژ و همچنین استفاده از لوله ها و ظروف مخصوص سانتریفوژ ، سترون و درپوش‌دار اقدامات لازم را انجام دهید.

۶-۲۲-۳ تصدیق

در مواردی که سرعت سانتریفوژ کردن دارای اهمیت است و یا برای استفاده های خاص، میزان آن مشخص شده است، سرعت سانتریفوژ بهتر است به طور منظم و پس از هر تعمیر یا تغییر اساسی در سانتریفوژ توسط نشانگر سرعت یا تاکومتر[2] مستقل (خارجی) و کالیبر شده کنترل شود.

۶-۲۲-۴ نگهداری

سانتریفوژها را به طور منظم و پس از هر بار استفاده با کشت های میکروبی یا نمونه های بالقوه آلوده، تمیز و ضدعفونی کنید.

1- Centrifuge
2- Tachometer

۶-۲۳ اجاق های برقی تخت و گود[1]

۶-۲۳-۱ تعریف

این دستگاه، وسیلهٔ گرمایشی با دمای کنترل شده است. برخی از این دستگاه ها دارای سیستم های همزن مغناطیسی می باشند.

۶-۲۳-۲ کاربرد

این دستگاه ها به همزن مغناطیسی مجهز می باشند که برای گرم کردن نسبی حجم های زیاد مایع مانند محیط های کشت به کار می رود.

اجاق های برقی را بدون همزن برای تهیه محیط های کشت به کار نبرید.

۶-۲۳-۳ نگهداری

عمل تمیز کردن را بلافاصله پس از خنک شدن دستگاه، انجام دهید.

۶-۲۴ اسپیرال پلیتر[2]

۶-۲۴-۱ تعریف

اسپیرال پلیتر یک توزیع کننده است که حجم از پیش تعیین شده مایع را از بالای سطح یک پلیت آگار در حال چرخش توزیع می کند. توزیع به وسیله حرکت از مرکز پلیت به طرف لبه خارجی با افزایش شعاع چرخش (چرخش ارشمیدسی) [3] می باشد. حجم توزیع شده در نتیجه توزیع با سوزن های متحرک از مرکز به لبه پلیت کاهش می یابد بنابراین بین حجم تلقیح شده و شعاع چرخش رابطهٔ معکوس وجود دارد . حجم نمونه توزیع شده روی هر بخش خاص، معین و ثابت است. دستگاه برای بارگیری[4] و توزیع مایعات به یک منبع خلاء نیاز دارد.

۶-۲۴-۲ کاربرد

این دستگاه برای توزیع نمونهٔ مایع، نمونهٔ یکنواخت شده یا رقیق شده روی یک پلیت جامد مناسب برای تعیین شمارش کلنی به کار می رود. پس از گرمخانه‌گذاری، کلنی ها در امتداد خطوطی که مایع تلقیح شده است رشد می کنند. تعداد کلنی ها در یک محدوده شناخته شده با استفاده از یک صفحه شمارش خط‌کشی شده که همراه با دستگاه می باشد، شمارش می شود.

1- Hotplate and heating mantle
2- Spiral plater
3- Archimedean spiral
4- Loading

سطح پلیت های جامد استفاده شده با اسپیرال پلیتر باید تراز و عاری از حباب هوا باشد.
برای اطمینان از حذف رطوبت اضافی پلیت ها، توصیه می شود پیش از استفاده، آن را خشک کنید.
سیستم توزیع، پیش از نمونه برداری و پس از استفاده بهتر است با آب سترون شسته و بهسازی شوند.

۶-۲۴-۳ تصدیق

به طور روزانه زاویهٔ سر سوزن را با استفاده از ایجاد خلاء برای نگهداشتن یک لامل در مقابل سوزن کنترل کنید. لامل بهتر است با سطح محیط کشت موازی و mm ۱ از آن فاصله داشته باشد.
توصیه می شود الگوی توزیع به وسیلهٔ جوهر قابل شستشو تصدیق شود و بهتر است بیشترین تراکم نزدیک مرکز پلیت باشد جایی که توزیع شروع می شود و به طور یکنواخت به تراکم کمتر برسد. بخش شفاف بهتر است در مرکز و تقریباً ۲cm قطر داشته باشد.
توصیه می شود سترون سازی اسپیرال پلیتر را با استفاده از تلقیح آب سترون توسط دستگاه روی پلیت برای هر سری از نمونه های آزمون شده تصدیق کنید.
بهتر است به طور منظم کنترل وزنی حجم توزیع شده با استفاده از آب مقطر انجام شود. جرم به دست آمده بهتر است با حداکثر خطای مجاز ٪۵ ± از جرم مورد نظر برای حجم توزیع شده باشد.

۶-۲۴-۴ نگهداری

لوله ها و سوزن توزیع کننده را با وارد کردن در محلول ٪۰/۵ تا ٪۱ از کلر آزاد ضدعفونی کنید و سپس به وسیله آب مقطر یا آب دیونیزه[1] سترون با فشار شستشو دهید.
پیش از برداشتن از سوسپانسیون برای پیشگیری از انسداد، اجازه دهید ذرات معلق در سوسپانسیون نمونه ته‌نشین شده و سپس از مایع رویی برای تلقیح استفاده کنید.
وسایل بهتر است به طور منظم و بلافاصله پس از هر بار سرریز شدن مواد روی آن تمیز شوند.
توصیه می شود وسایل را مطابق با کاربرد آن ها سرویس و مورد تصدیق قرار دهید.

۶-۲۵ دستگاه های آب مقطر، دیونایزر[2] و اسمز معکوس

۶-۲۵-۱ تعریف

دستگاه هایی هستند که برای تهیه آب مقطر یا آب بدون مواد معدنی یا یون با کیفیت مورد نیاز برای تهیه محیط های کشت میکروبیولوژی یا واکنشگرها و سایر کاربردهای آزمایشگاهی به کار می رود.

1- Deionized
2- Deionizer

۶-۲۵-۲ کاربرد

تجهیزات را مطابق با دستورالعمل سازنده آن با توجه به مکان آب آزمایشگاه، فاضلاب و وسایل برقی، نصب، راه اندازی و به کار گیرید.

۶-۲۵-۳ تصدیق

قابلیت هدایت الکتریکی آب باید هنگام استفاده یا پس از ذخیره سازی در حد مطلوب باشد و به طور منظم کنترل شود. میزان هدایت الکتریکی آب نباید بیش از ۲۵ µS/cm برای تهیه محیط های کشت و واکنشگرها باشد. (معادل با مقاومت الکتریکی بیشتر یا مساوی ۴۰۰۰۰ Ω.cm)

در صورت ایجاد تغییرات یونی در آب ذخیره پیش از استفاده، توصیه می شود کنترل های مناسب برای آلودگی میکروبی مطابق با استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲-۸۶۶۳ انجام شود.

۶-۲۵-۴ نگهداری

دستگاه تقطیر باید با توجه به سختی آب ورودی، در یک تناوب خاص تمیز و رسوب‌زدایی شود. دستگاه های دیونایزر و اسمز معکوس باید مطابق با دستورالعمل سازنده نگهداری شوند.

۶-۲۶ زمان سنج

۶-۲۶-۱ تعریف

زمان سنج، دوره های زمانی صحیحی را برای بسیاری از روش های آزمایشگاهی که مدت زمان در آن ها اختصاصی و مهم است، نشان می دهد.

۶-۲۶-۲ کاربرد

زمان سنج های دستی یا رومیزی دیجیتالی و آنالوگ برای پایش مدت عملیات آزمایش استفاده می شود. (مانند کاربرد در رنگ‌آمیزی گستره های میکروبی و همگن سازی نمونه ها) و باید در شرایط خوب کار کنند و قادر به تامین دقت مورد نیاز باشند.

زمان سنج های نصب شده روی تجهیزات آزمایشگاه را (مانند اتوکلاوها، سانتریفوژها و همگن‌کننده ها) مطابق با دستورالعمل سازنده راه اندازی کنید. این زمان سنج ها باید دارای صحت لازم باشند.

۶-۲۶-۳ تصدیق

تمام زمان سنج های استفاده شده در آزمایشگاه را در مواردی که اندازه‌گیری زمـان بحرانـی و حـائز اهمیـت است به طور منظم پس از هر تعمیر اساسی با ساعت ملی تنظیم کنید.

۶-۲۶-۴ نگهداری

به طور منظم زمان‌سنج ها را برای عملکرد مناسب تمیز و کنترل کنید.

زمان‌سنج های نصب شده روی دستگاه بهتر است به عنوان قسمتی از مراحل نگهداری دستگاه کنترل شوند.

۶-۲۷ پی‌پت و پی‌پتور

۶-۲۷-۱ تعریف

پی‌پت ها وسایل شیشه‌ای یا وسایل پلاستیکی یکبار مصرف برای انتقـال حجـم هـای مـایع یـا مـواد غلـیظ می باشند. پی‌پت های مدرج شده حجم های مشخص را با دقت مربوطه انتقال می دهد.

پی‌پتورهای خودکار یا مکانیکی با سرهای پلاستیکی، وسایلی هستند کـه توانـایی توزیـع حجـم هـای ثابـت مایعات را به وسیله حرکت پیستون دستی یا الکتریکی دارد.

۶-۲۷-۲ کاربرد

پی‌پت های آسیب دیده یا شکسته را دور بریزید.

برای پیشگیری از آلودگی هنگام سر پی‌پت های پاستور یا مدرج سترون و سرهای پی‌پتور را برای استفاده در کشت های میکروبی با پنبه غیر جاذب، پنبه‌گذاری کنید.

در آزمایشگاه میکروبیولوژی مگر برای انتقال مایعات غیر آلوده، برای مکش پی پت از دهان استفاده نکنید.

برای پیشگیری از نـشتی و اطمینـان از عملکـرد مناسـب پـی‌پـت هـای پاسـتور یـا مـدرج حبـاب‌دار و سـر پی‌پتورها باید در اندازهٔ صحیح باشند.

۶-۲۷-۳ تصدیق

چنانچه کارخانه سازنده درستی (صحت و دقت) پی‌پت های مدرج را گـواهی نمـی‌کنـد بـرای تاییـد انتقـال حجم های صحیح، آن ها راکنترل کنید.

روش کالیبراسیون پی پت ها و/یا پی پتورها در استاندارد ملی ایران شـمارهٔ ۱۹۶۲ و اسـتاندارد ISO 8655-1 ارائه شده است.

پی‌پتورهای جدید را پیش از استفاده و با توجه به تناوب و نوع استفاده از آن در فواصل منظم تصدیق کنید. حداکثر خطای مورد تایید در استاندارد ISO 8655-1 معین شده است. برای اطمینان از برقرار بودن حجم های توزیع شده مطابق با حداکثر خطای مجاز بررسی های وزنی میانی را با استفاده از آب مقطر یا آب دیونیزه انجام دهید.

سری های جدید پی‌پت های مدرج را کنترل کنید.

۶-۲۷-۴ نگهداری

پی‌پت های غیر یکبار مصرف و پی پتورهای خودکار را پس از هر بار استفاده آلودگی‌زدایی، تمیز و سترون کنید.

در صورت آلوده شدن لوله ها یا پیستون های پی پتورهای خودکار، برای آلودگی‌زدایی و تمیز کردن، آن ها را جدا کرده و پس از سوارکردن مجدد، کالیبره کنید. در صورتی که امکان انجام آن در آزمایشگاه وجود ندارد برای سوارکردن و کالیبراسیون مجدد آن را به کارخانه سازنده بازگردانید.

۶-۲۸ دماسنج و وسایل پایش دما مانند ثبت کننده های خودکار

۶-۲۸-۱ تعریف

دماسنج وسیله‌ای است که دارای جیوه یا الکل درون یک لولهٔ شیشه‌ای می باشد و برای پایش دما در محدودهٔ فعالیت های آزمایشگاهی به کار می رود.

سایر وسایل پایش دما شامل دماسنج های مقاومتی پلاتینی[1] و وسایلی است که از ترموکوپل ها برای اندازه‌گیری دما استفاده می کنند و تغییرات دما نسبت به زمان را به صورت الکترونیکی یا سخت افزاری ثبت می کنند.

دماسنج های مرجع و سایر وسایل پایش دما باید با استانداردهای ملی و بین المللی کالیبره شده و گواهی کالیبراسیون داشته باشند. این دماسنج ها فقط باید به عنوان مرجع استفاده شوند و نباید برای استفاده روزمره به کار روند.

دماسنج ها و دیگر وسایل پایش دما باید به روشی کالیبره شوند که با استاندارد های ملی و بین المللی قابل ردیابی باشند.

وسایل دارای دقت کافی و مطابق با استاندارد های ملی یا بین المللی را می توان پس از تصدیق عملکرد آن‌ها به عنوان دماسنج استفاده کرد.

1- Platinum resistance

۶-۲۸-۲ کاربرد

دماسنج ها و دیگر وسایل پایش دما باید قابلیت اندازه‌گیری دمای مورد نظر را تا حداکثر خطای مجاز داشته باشد.

عدم قطعیت اندازه‌گیری وسایل پایش دما بهتر است یک چهارم حداکثر خطای مجاز مورد نیاز باشد. برای مثال هنگامی که حداکثر خطای مجاز ۱°C± است، عدم قطعیت اندازه‌گیری بهتر است ۰٫۲۵°C± باشد. هنگامی که حداکثر خطای مجاز ۰٫۵°C± است، عدم قطعیت اندازه‌گیری بهتر است ۰٫۱۲۵°C± باشد. همچنین در اندازه‌گیری دمای عملیات باید در نظر گرفته شود.

دماسنج ها و ترموکوپل هایی که در انکوباتور قرار دارند به منظور پیشگیری از اتلاف گرما هنگام باز بودن در انکوباتور و برای خواندن درست، بهتر است در ظروف مناسب ایمن که حاوی گلیسرول، پارافین مایع یا پلی پروپیلن گلیکول می باشد، قرار داده شوند.

از دماسنج های تمام شناور[1] که فقط حباب آن ها شناور است، استفاده کنید.

توصیه می شود دماسنج هایی که در حمام آب قرار داده می شود مطابق با مشخصات دماسنج در آب شناور شوند. برای مثال دماسنج های با شناوری نسبی[2] بهتر است تا عمق مشخص شده برای آن ها در آب شناور شوند. (مانند ۷۶mm یا ۱۰۰mm)

در صورتی که ستون جیوه یا الکل دماسنج شکسته است از آن استفاده نکنید.

دماسنج های جیوه‌ای شیشه ای شکننده می باشند و در صورت وجود خطر شکستن، آن ها را بهتر است داخل محفظه های محافظ که در اندازه گیری دما تداخل ایجاد نمی کنند، قرار دهید.

هشدار- جیوه برای سلامتی خطرناک است. در صورت ریختن جیوه آن را مطابق با قوانین ملی آلودگی زدایی کنید.

۶-۲۸-۳ تصدیق

به طور کلی دماسنج های مرجع باید پیش از اولین استفاده و حداقل هر پنج سال با استانداردهای ملی یا بین المللی قابل ردیابی کالیبره شوند. کالیبراسیون تک نقطهٔ میانی، مانند نقطه انجماد باید برای تایید عملکرد انجام شود.

به طور کلی ترموکوپل‌های مرجع باید پیش از اولین استفاده با استانداردهای ملی یا بین المللی قابل ردیابی کالیبره شوند . برای تصدیق عملکرد، کنترل های میانی باید با دماسنج های مرجع انجام شود.

سایر وسایل پایش دما (مانند گیرنده های موج رادیویی) باید با استانداردهای ملی و بین المللی قابل ردیابی کالیبره شوند.

1- Total-immersion
2- Partial-immersion

دماسنج ها و ترموکوپل های مورد استفاده در آزمایشگاه بهتر است در نقطه انجماد و/یا با دماسنج های مرجع در محدودهٔ دمای آزمایشگاه کنترل شوند.

۶-۲۸-۴ نگهداری

دماسنج ها و ترموکوپل ها را در شرایط تمیز و ایمن نگهداری کنید.

سایر وسایل پایش دما را مطابق با دستورالعمل سازنده نگهداری کنید.

۶-۲۹ جداکنندهٔ مغناطیسی ایمنی (ایمونومگنتیک[1])

۶-۲۹-۱ تعریف

این دستگاه برای جداسازی و تغلیظ میکروارگانیسم های مورد نظر در کشت های مایع با استفاده از گلوله های مغناطیسی پوشیده شده با یک آنتی بادی مناسب به کار می رود.

جداکننده های دستی دارای یک مخلوط کن چرخشی با قابلیت چرخش r/min ۱۲ تا r/min ۲۰ و یک جزء تغلیظ کننده با یک ستون مغناطیسی قابل جداسازی می باشند.

در جداکننده های خودکار، ستون مغناطیسی چیده شده به شکل شانه و جا لوله ای استفاده می شود. ذرات مغناطیسی از یک لوله به لوله دیگر حرکت می کنند و بدین ترتیب مرحلهٔ جداسازی کامل شامل مراحل شستشو به طور خودکار در یک محیط بسته انجام می شود.

۶-۲۹-۲ کاربرد و تصدیق

برای کاربرد ایمونومگنتیک مطابق با دستورالعمل سازنده و استانداردهای خاص در این زمینه (مانند *E.coli* O157) استفاده کنید.

برای سیستم های دستی، سرعت چرخش مخلوط‌کن را کنترل کنید.

برای سیستم های دستی و خودکار قابلیت دستگاه را برای جداسازی غلظت کم میکروارگانیسم های مورد نظر را در سیستم، پیش از استفاده روزمره تصدیق کنید.

شناخت آلودگی های متقاطع و پیشگیری از آن ها در طی روش های جداسازی دستی حائز اهمیت است.

۶-۲۹-۳ نگهداری

وسایل را مطابق با دستورالعمل سازنده بازرسی و نگهداری کنید.

1- Immunomagnetic

۶-۳۰ سیستم فیلتراسیون

توصیه می شود برای استفاده از سیستم فیلتراسیون به استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۴۲۰۷ مراجعه شود.

۶-۳۱ سایر تجهیزات و نرم افزارها

سایر تجهیزات و نرم افزارها باید صحت لازم را داشته و باید با ویژگی های مربوط به آزمون های مورد نظر مطابق باشند. برنامه های کالیبراسیون باید برای مقادیر یا کمیت های کلیدی که خصوصیات تاثیر اساسی روی نتایج دارد، انجام شود. تجهیزات را پیش از استفاده روزمره برای مطابقت با الزامات آزمایشگاه و ویژگی های استاندارد مربوط کالیبره یا کنترل کنید. برای حصول اطمینان از توانائی نرم افزار در ایجاد نتایج صحیح ، هر تغییر یا اصلاحی که توسط آزمایشگاه روی نرم افزار انجام می شود باید تصدیق شود.

۷ آماده سازی وسایل شیشه ای و سایر وسایل آزمایشگاهی

۷-۱ آماده سازی

وسایل شیشه‌ای و سایر وسایل آزمایشگاهی مورد استفاده در آزمایشگاه میکروبیولوژی باید دارای طراحی مناسب باشند، به طور صحیح به کار روند و آماده‌سازی آن به گونه‌ای باشد که پاکیزگی و/یا سترونی مواد را تا زمان استفاده تامین کند.

توصیه می شود وسایل به گونه‌ای طراحی شوند که تماس بین کاربر و مواد عفونی را محدود کرده یا از آن پیشگیری کند.

بهتر است لوله ها و بطری ها با استفاه از وسایل مناسب درپوش‌گذاری شوند. در صورت لزوم وسایل شیشه‌ای که سترون می شوند (مانند پی پت ها) بهتر است در ظروف خاص یا در پوشش مناسب (مانند کاغذ مخصوص، کاغذ آلومینیوم) قرار داده شوند. توصیه می شود برای کامل شدن فرآیند سترون‌سازی از خارج کردن وسایل شیشه ای از اتوکلاو تا تخلیهٔ بخار اضافی خودداری کنید.

۷-۲ سترون سازی و/یا آلودگی زدایی

۷-۲-۱ کلیات

توصیه می شود دما و مدت زمان سترون سازی ثبت شود برای تشخیص بین مواد سترون شده و سترون نشده می توان از نشانگرهای سترون سازی استفاده کرد.

۷-۲-۲ سترون سازی با حرارت خشک

وسایل شیشه ای و مانند آن را در آون سترون سازی حداقل به مدت یک ساعت در دمای ۱۷۰°C یا معادل آن (ایجاد تعادل زمان/دما) سترون کنید.

۷-۲-۳ سترون سازی با حرارت مرطوب (بخار)

موثرترین روش سترون‌سازی وسایل شیشه‌ای و مواد در آزمایشگاه، استفاده از بخار آب تحت فشار می باشد.

محفظهٔ اتوکلاو باید دمای ۱۲۱°C را به مدت زمان حداقل ۱۵ min (طبق بند ۶-۶) تامین کند.

۷-۲-۴ آلودگی زدایی با ترکیبات شیمیایی

از ترکیبات شیمیایی (مانند مواد بر پایه کلر، الکل ها، ترکیبات چهارتایی آمونیوم) را در غلظت و مدت زمان تماس مناسب استفاده کنید.

از عدم تاثیر باقیماندهٔ مواد شیمیائی بر بازیافت میکروارگانیسم ها، اطمینان حاصل کنید.

۷-۳ وسایل و تجهیزات یکبار مصرف

از وسایل و تجهیزات یکبار مصرف در صورت مشابه بودن خصوصیات آن ها می توان به جای وسایل و تجهیزات چند بار مصرف استفاده کرد (مانند وسایل شیشه‌ای، ظروف پتری، پی پت ها، بطری ها، لوله ها، لوپ ها و پخش‌کننده ها)

توصیه می شود مناسب بودن وسایل مورد استفاده برای آزمون های میکروبیولوژی را از نظر سترونی و همچنین نداشتن مواد مهار کننده رشد میکروارگانیسم ها تصدیق کنید. (به استاندارد ISO 9998 مراجعه شود).

۷-۴ انبارش مواد و وسایل شیشه ای تمیز

در طی انبارش، مواد و وسایل شیشه ای را در مقابل گرد و غبار حفظ کرده و آن ها را در شرایط تمیز نگهداری کنید.

۷-۵ مدیریت مواد و وسایل شیشه ای سترون

انبارش مواد و وسایل شیشه ای باید در شرایطی باشد که از سترون ماندن آن ها اطمینان حاصل شود. وسایل یکبار مصرف را مطابق با دستورالعمل سازنده و بدون هر گونه تغییر ماهیت در بسته بندی انبار کنید. وسایل تهیه شده در آزمایشگاه را در شرایط تمیز انبارکنید.

تاریخ سپری شدن زمان مصرف (یا تاریخ آماده سازی) وسایل سترون را که برای میکروبیولوژی اختصاص یافته‌اند روی هر بسته درج کنید.

۷-۶ کاربرد آلودگی زدایی و ضدعفونی

۷-۶-۱ آلودگی زدایی وسایل یکبار مصرف

وسایل یکبار مصرف را پیش از دور انداختن، آلودگی زدایی کنید.

علاوه بر روش های بیان شده در این بند ممکن است از روش سوزاندن نیز استفاده شود. در صورت استفاده از این روش، آلودگی‌زدایی و دفع می تواند در یک مرحله انجام شود.

۷-۶-۲ آلودگی‌زدایی مواد و وسایل شیشه‌ای پیش از استفاده

به طورکلی وسایل توسط حرارت مرطوب (بند ۷-۲-۳) و یا حرارت خشک (بند ۷-۲-۲) سترون می شوند.

در شرایط خاص ممکن است آلودگی‌زدایی شیمیایی مناسب باشد (مانند نمونه برداری میدانی)، بهتر است پس از آلودگی‌زدایی با مواد شیمیایی، تجهیزات عاری از مواد مهارکننده باشند.

۷-۶-۳ آلودگی زدایی مواد و وسایل شیشه ای پس از استفاده

برای آلودگی‌زدایی و دفع مواد بهتر است آن ها را در ظروفی مانند کیسه های پلاستیکی اتوکلاو، قرار دهید. استفاده از اتوکلاو روش ارجح برای تمام فرآیندهای آلودگی‌زدایی می باشد (مدت زمان حداقل ۳۰min در دمای ۱۲۱°C) وسایل را به گونه‌ای در اتوکلاو قرار دهید که دما به درون وسایل نفوذ کند (برای مثال بدون لفاف پیچی یا بسته بندی مجدد[1]) و دقت کنید که درها یا درپوش ها نیمه باز بوده و کیسه ها در باز باشند.

از سایر روش‌های معتبر (به غیر از استفاده از اتوکلاو) نیز در صورت مطابقت با مقررات ملی می توان استفاده کرد.

1- Overpacking

پیش از شستشو، تمام وسایل در تماس با کشت های میکروبی (محیط کشت های جامد یا مایع) شامل ظروف چند بار مصرف را در اتوکلاو سترون کنید.
در طی آزمون وسایل کوچک و مقاوم به خوردگی (مانند پی پت ها) را با شناور کردن در محلول ضدعفونی کنندهٔ تازه تهیه شده، می توان آلودگی‌زدایی کرد.
پی‌پت های پاستور را فقط یکبار استفاده کنید.
بیشتر مواد ضدعفونی کننده (به پیوست **الف** مراجعه شود) اثرات سمی دارند و هنگام کار با مواد ضدعفونی کنندهٔ تغلیظ شده، از دستکش و عینک استفاده کنید.

۷-۷ مدیریت پسماند

دفع صحیح مواد آلوده، روی کیفیت آزمون نمونه تاثیر مستقیم ندارد و از نظر مدیریت خوب آزمایشگاهی حائز اهمیت است.
توصیه می شود دفع مواد آلوده با دستورالعمل های ایمنی و بهداشتی یا محیطی ملی مطابقت داشته باشد.
توصیه می شود برای شناسایی و جداسازی مواد آلوده و ظروف آن ها در موارد زیر، سیستمی ایجاد شود:

الف- پسماندهای غیر آلوده (مانند نمونه های مواد غذایی کشت داده نشده) که می تواند به عنوان پسماندهای عمومی باشد ؛

ب- قیچی ، سوزن ، چاقو و وسایل شیشه ای شکسته ؛

پ- مواد آلوده برای سترون سازی در اتوکلاو و وسایل با قابلیت بازیافت[1] ؛

ت- مواد آلوده برای برای سترون سازی در اتوکلاو و دفع یا فقط برای دفع در صورتی که مواد سوزانده شده باشد (برای میکروارگانیسم های گروه خطر ۳ الزامات خاصی وجود دارد).

توصیه می شود سوزاندن مواد آلوده و ظروف آن ها مطابق با آیین نامه های ایمنی و بهداشتی یا محیطی ملی انجام شود.
ظروف مواد آلوده شده با میکروارگانیسم های گروه خطر ۳ و باید پیش از سوزانده شدن در اتوکلاو سترون شوند.

۸-۷ شستشو

وسایل چند بار مصرف را پس از آلودگی‌زدایی بشویید. پس از شستشو، تمام وسایل را با آب دیونیزه آبکشی کنید.

1- Recycling

برای تسهیل در عملیات تمیز کردن می توان از وسایل تخصصی استفاده کرد (مانند دستگاه های شستشو دهندهٔ پی پت)

وسایل چند بار مصرف پس از شستن، باید عاری از موادی باشد که ممکن است روی رشد میکروارگانیسم ها تاثیر داشته باشد.

۸ آماده سازی و سترون سازی محیط کشت

محیط کشت را مطابق با استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲-۸۶۶۳ آماده و سترون کنید.

۹ نمونه های آزمایشگاهی

۹-۱ نمونه برداری

۹-۱-۱ کلیات

با توجه به اهمیت نمونه برداری در بیان نتایج آزمون ها، آزمایشگاه باید نمونه ای را دریافت کند که نمایندهٔ سری ساخت[1] محصول باشد، و در طی حمل و نقل و نگهداری آسیب ندیده و تغییری در آن ایجاد نشده باشد.

نمونه بهتر است در مقابل آلودگی خارجی ناشی از هوا، ظروف نمونه برداری، وسایل نمونه برداری و جابجایی های نامناسب محافظت شود. برای پیشگیری از نشتی و مخلوط کردن صحیح نمونه در آزمایشگاه توصیه می شود ظرف نمونه برداری را بیش از سه چهارم پرنکنید.

نمونه را به طور کامل و دقیق مشخص کرده و اطلاعات نمونه را ثبت کنید.

ثبت دما در زمان نمونه برداری هنگام دریافت نمونه برای تفسیر نتایج آزمایشگاه ضروری می باشد.

نمونه در ظرف اصلی و به صورت دربسته به آزمایشگاه ارسال شود.

در صورتی که فرآورده به صورت فله می باشد و یا در ظروفی قرار دارد که برای ارسال به آزمایشگاه خیلی بزرگ است، بخشی از نمونه را در شرایط آسپتیک به ظرف نمونه برداری سترون منتقل کنید.

در ظرف نمونه برداری سترون فقط به مدت لازم برای انتقال نمونه باز شده و سپس بلافاصله بسته شود.

۹-۱-۲ طرح نمونه برداری[2]

نمونه برداری را مطابق با استانداردهای خاص هر فرآورده انجام دهید.

1- Batch
2- Sampling plan

۹-۲ حمل و نقل

نمونه ها باید تحت شرایطی به آزمایشگاه منتقل شوند که حداقل تغییر در تعداد میکروارگانسم های موجود ایجاد شود.

تحویل نمونه ها به ازمایشگاه باید سریع بوده و تا حد امکان با حفظ شرایط نگهداری اصلی نمونه باشد.

نمونه ها را به گونه‌ای بسته بندی کنید که از نشتی و ریختن آن پیشگیری شود.

در صورت لزوم روی برچسب نمونه شرایط نگهداری، باید مشخص شود.

نمونه هایی که نیاز به نگهداری در یخچال یا فریزر ندارند را می توان در ظروف مناسب بسته بندی کرد.

از یخ آب شده[1] استفاده نکنید زیرا در صورت شکستگی یا نشتی ظرف، سبب آلودگی فرآورده می شود.

به جز موارد تعیین شده در استاندارد فرآورده های خاص (به استاندارد های ملی ایران شماره های ۹۴۱۵ ، ۸۹۲۳-۱ ، ۸۹۲۳-۲ ، ۸۹۲۳-۳ و ۸۹۲۳-۴ مراجعه شود) در طی حمل و نقل درجهٔ حرارت های زیر پیشنهاد می شود:

الف- فرآورده های پایدار[2] ، درجه حرارت محیط (کمتر از ۴۰°C) ؛

ب- فرآورده های منجمد یا فوق انجماد، (کمتر از ۱۵°C- ، ترجیحاً کمتر از ۱۸°C-) ؛

پ- سایر فرآورده های ناپایدار[3] ، درجه حرارت محیط (۱°C تا ۸°C) ؛

ت- نمونه های برداشته شده با سوآپ[4] (به استاندارد های ملی ایران شماره های ۴۸۰۶ و ۶۱۶۵ مراجعه شود).

در صورتی که شرایط حمل و نقل مشخص نشده است توصیه می شود طرفین روی مدت و دمای آن توافق کنند.

۹-۳ دریافت

شرایط نمونه ها را هنگام دریافت بررسی کنید.

در صورت وجود شرایط نامطلوب یا ناکافی بودن مقدار نمونه، آزمایشگاه نباید نمونه را پذیرش کند.

در شرایط خاص، ممکن است آزمون نمونه پس از مذاکره و توافق با مشتری انجام شود.

به هر حال گزارش آزمون باید شامل موارد استثناء برای اعتبار نتایج باشد.

نمونه های پذیرفته شده در آزمایشگاه را به گونه ای مستند کنید که امکان نشان دادن پیشرفت کار وجود داشته باشد. شناسایی و شناسه‌گذاری نمونه ها و سوابق باید در هر مرحله در آزمایشگاه قابل ردیابی باشد.

1- Loose ice
2- Stable
3- Not stable
4- Swab

در صورت لزوم سطح خارجی ظروف باید با استفاده از مواد ضدعفونی کنندهٔ مناسب ضدعفونی شوند.
ظروف نمونه برداری را از تظر نقص های فیزیکی ظاهری کنترل کنید.
هنگام دریافت نمونه به نکات زیر توجه کنید:

الف- تاریخ دریافت (در صورت لزوم زمان) ؛

ب- جزئیات نمونه برداری (تاریخ و زمان نمونه برداری و در صورت لزوم شرایط نمونه) ؛

پ- نام و آدرس مشتری.

هنگام دریافت نمونه های فاسد شدنی دمای حمل و نقل یا دمای نمونهٔ شبیه سازی شده برای این منظـور را ثبت کنید.
در صورت امکان نمونه ها را به محض دریافت ترجیحاً در مدت ۲۴h آزمون کنید، یا با توافق طرفین آزمون را انجام دهید.
برای فرآورده های بسیار فاسد شدنی (مانند صدف[1]) تا ۲۴h از زمان نمونه برداری آزمـون انجـام مـی شـود.
برای فرآورده های فاسد شدنی (مانند مـاهی و شـیر خـام) تـا ۳۶h از زمـان نمونـه بـرداری آزمـون انجـام می شود.
چنانچه آزمون در زمان های تعیین شدهٔ فوق انجام نشود، در صورت عدم تغییر اساسی میکروارگانیسم ها در مادهٔ زمینه‌ای نمونه ، می توان نمونه ها رادر دمای کمتر از ۱۵- °C و ترجیحاً ۱۸- °C منجمد کرد.

۹-۴ انبارش

انبارش نمونه های در انتظار آزمون را در شرایطی که حداقل تغییـر در تعـداد میکروارگانیـسم هـای موجـود ایجاد شود، انجام دهید.
توصیه می شود دمای انبارش به صورت زیر باشد:

الف- فرآورده های پایدار ، درجه حرارت محیط (۱۸ °C تا ۲۷ °C) ؛

ب- فرآورده های منجمد یا فوق انجماد، (کمتر از ۱۵- °C ، ترجیحاً کمتر از ۱۸- °C) ؛

پ- سایر فرآورده های ناپایدار شامل مواد غذایی فاسدشدنی، درجه حـرارت محـیط (۲ °C ± ۳ °C) به استاندارد های ملی ایران شماره های ۹۴۱۵ ، ۲-۸۹۲۳ ، ۳-۸۹۲۳ و ۴-۸۹۲۳ مراجعه شود ؛

ت- نمونه های برداشته شده با سـوآپ (بـه اسـتاندارد هـای ملـی ایـران شـماره هـای ۴۸۰۶ و ۶۱۶۵ مراجعه شود).

1- Shellfish

۹-۵ آزمونه

۹-۵-۱ مقررات خاص برای آماده سازی آزمونه

برای مقررات خاص آماده سازی آزمونه و سوسپانسیون اولیه به استاندارد های ملی ایران شماره های ۹۴۱۵ ، ۸۹۲۳-۱ ، ۸۹۲۳-۲ ، ۸۹۲۳-۳ و ۸۹۲۳-۴ مراجعه شود.

۹-۵-۲ نگهداری و امحاء[1] نمونه های آزمایشگاهی

جز در موارد خاص نمونه ها را تا رسیدن به نتایج نهایی و یا در صورت لزوم به مدت طولانی تر نگهداری کنید. نمونه ها را در ظروف سترون (مانند کیسهٔ پلاستیکی) بسته بندی کرده و به انبار با دمای انبارش اولیه آن ها، انتقال دهید.

فرآورده های فاسد شدنی منجمد می شوند.

یادآوری- معمولاً به دلیل تغییر در وضعیت میکروبی نمونه، آزمون مجدد نمونه قابل قبول نمی باشد.

۱۰ آزمون

۱۰-۱ اقدامات بهداشتی پیشگیرانه هنگام آزمون

برای پیشگیری از آلودگی محیط و آزمونه، آماده سازی و آزمون فرآورده های پودری (بدون آب) را در یک اتاق یا فضای جداگانه یا اتاقک محافظ انجام دهید.

پیش از بازکردن بسته بندی نمونه های معمولی، اطراف محل باز کردن را با الکل ٪۷۰ یا سایر مواد مشابه آغشته کنید و صبر کنید تا تبخیر شود. پیش از باز کردن بسته های سترون، محل باز کردن را به مدت حداقل ۱۰min در محلول حاوی ۱۰۰ppm تا ۲۰۰ppm کلر آزاد (یا سایر مواد سترون کنندهٔ مناسب) غوطه ور کنید تا میکروارگانیسم هایی که ممکن است نمونه را آلوده کنند از بین بروند.

وسایلی که برای باز کردن نمونه و جابجایی کل نمونه و یا بخشی از آن استفاده می شود باید سترون باشند. (مانند قوطی بازکن، قیچی، قاشقک ، گیره ، پی پت)

پیش از شروع آزمون بهتر است محدودهٔ آزمون را با مواد ضدعفونی کننده مناسب تمیز کنید.

توصیه می شود دست ها را بلافاصله پیش از آزمون و همچنین در صورت آلوده شدن در طی آزمون بشوئید.

توصیه می شود تمام وسایل به کار رفته سترون بوده و از قرار گرفتن در معرض آلودگی پیش از استفاده و در طی آزمون محافظت شوند.

بهتر است تمام لوازم و وسایل برای استفاده بعدی یا سترون سازی در ظروف مناسب قرار داده شوند.

1- Destruction

در صورت امکان اقدامات لازم را برای ایجاد شرایط آسپتیک انجام دهید برای مثال:

الف- از تمیز بودن محل آزمون، برطرف شدن منابع احتمالی آلودگی یا به حداقل کاهش یافته است و عدم وجود گرد و غبار (مانند بسته بودن درها و پنجره ها) اطمینان یابید و از حرکت غیرضروری کارکنان در طی آزمون پیشگیری کنید؛

ب- پیش و پس از آزمون سطح میز کار را با مواد ضدعفونی کنندهٔ مناسب آلودگی‌زدایی کنید؛

پ- پیش از شروع آزمون از دسترس بودن کلیهٔ وسایل مورد نیاز برای انجام آزمون اطمینان یابید؛

ت- آزمون را بدون تاخیر انجام دهید؛

ث-فعالیت های تمیز و کثیف را از نظر زمانی یا مکانی تفکیک کنید (به ویژه این موضوع برای نمونه های با احتمال خطر بالا مانند گوشت خام و تخم مرغ خام حائز اهمیت است)؛

ج- از وسایل یکبار مصرف استفاده کنید؛

چ- در صورتی که محتویات یک بسته پی‌پت و پلیت یکبار مصرف در طی یک دوره آزمون استفاده نمی شود اطمینان یابید که پس از برداشتن تعدادی از آن به طورکامل بسته شده باشد؛

ح- پس از ریختن هر گونه مواد بلافاصله با استفاده از دستمال های[1] نخی آغشته به الکل ٪۷۰ یا سایر مواد ضدعفونی کنندهٔ مناسب پاک کنید و سپس پیش از ادامهٔ آزمون سطح میز کار را تمیز و ضدعفونی کنید؛

خ- برای آزمون فرآورده هایی که احتمال وجود باکترهای بیماریزا در آن وجود دارد از اتاقک ایمنی استفاده کنید ؛

د- هنگام برداشتن یک پی پت سترون از جا پی‌پتی نباید نوک پی‌پت به سطح خارجی پی‌پت های باقیمانده در ظرف تماس پیدا کند زیرا این سطوح در معرض آلودگی می باشند؛

ذ- از تماس پی پت ها به لبه یا گردن بطری های حاوی محلول رقیق کننده خودداری کنید.

آئروسل ها علت اصلی آلودگی محیطی و عفونت می باشند و ممکن است در موارد زیر تشکیل شوند:

الف- هنگام باز کردن در پلیت ها، لوله ها و بطری ها؛

ب- هنگام استفاده از تکان دهنده[2]، سرنگ ها و سانتریفوژها و مانند آن؛

پ- هنگام خالی کردن پی پت ها؛

ت- هنگام سترون سازی لوپ ها و سوزن های کشت مرطوب؛

ث- هنگام باز کردن آمپول های حاوی کشت های لیوفیلیزه .

بنابراین موارد تشکیل آن ها باید به حداقل برسد.

1- Pads
2- Shaker

برای روش های ملکولی احتیاط های خاصی لازم است که در استاندارد ISO 22174 تعیین شده است.

۱۰-۲ آماده سازی سوسپانسیون اولیه و رقت ها

۱۰-۲-۱ کلیات

سوسپانسیون اولیه و رقت ها را مطابق با قسمت مربوطه در استاندارد های ملی ایران شماره های ۱-۸۹۲۳ ، ۲-۸۹۲۳ ، ۳-۸۹۲۳ ، ۴-۸۹۲۳ و ۹۴۱۵ آماده سازی کنید. مدت زمان بین پایان آماده سازی سوسپانسیون اولیه، تلقیح و ریختن محیط کشت نباید بیش از ۴۵min طول بکشد. مگر در موارد خاص که در استانداردهای مربوطه به آن اشاره شده است.

آماده‌سازی سوسپانسیون اولیه و رقت ها ممکن است با استفاده از یک مرحله غنی سازی که در استانداردهای خاص معین شده است همراه باشد.

۱۰-۲-۲ تغلیظ کردن

۱۰-۲-۲-۱ سانتریفوژ کردن یا فیلتراسیون غشایی

در صورتی که شمارش تعداد کمی از میکروارگانیسم ها مورد نظر است برای بهبود حساسیت و دقت روش شمارش، تغلیظ آزمونه انجام می شود. تغلیظ ممکن است به وسیله سانتریفوژ یا صافی غشایی انجام شود.

در صورت سانتریفوژ کردن، مجدداً مواد ته نشین شده را در حجم مشخصی از محلول رقیق کننده به حالت تعلیق در آورید و آزمون را ادامه دهید.

برای هر ترکیب مطرح شده (مواد غذایی و میکروارگانیسمها) ، به منظور ضرورت افزودن مرحلهٔ تغلیظ و معتبر بودن آن باید بررسی های قبلی انجام شده باشد. قابلیت فیلتراسیون سوسپانسیون مواد غذائی باید ارزیابی شود.

کارایی کلی روش از نظر حساسیت، انتخابی بودن، خطی بودن[1] و تکرارپذیری[2] بهتر است تصدیق شود. در صورت نامشخص بودن میزان آلودگی، توصیه می شود به موازات آن ، روش استاندارد (بدون فیلتراسیون) انجام شود.

۱۰-۲-۲-۲ جداسازی به روش ایمونولوژی

اگر تعداد کمی از میکروارگانیسم های مورد نظر در نمونه وجود دارد جداسازی و تغلیظ میکروارگانیسم ها ممکن است با گلوله های ایمونومگنتیک[3] پوشیده شده با آنتی بادی های خاص انجام شود.

1- Linearity
2- Repeatability
3- Immunomagnetic beads

گلوله‌های همراه با میکروارگانیسم مورد نظر را مستقیماً روی سطح محیط کشت جامد خاص مطابق با استانداردهای خاص آن پخش کنید. به هر حال گلوله‌های ایمونومگنتیک که با آنتی بادی های خاص پوشیده شده است برای این مرحله تغلیظ مناسب است . بررسی های ارزیابی انجام و چاپ شده در این زمینه، به میکروبیولوژی مواد غذائی مربوط است. تصدیق کردن به ویژه در صورتی دارای اهمیت است که این روش مطابق با استاندارد ISO 16140 صحه‌گذاری نشده باشد.

۱۱ شمارش

۱۱-۱ کلیات

برای ارزیابی کیفیت میکروبی و/یا ایمنی مواد غذایی و خوراک دام تنها شناخت میکروارگانیسم های موجود در آن ها کافی نیست. در بیشتر موارد ، کمیت میکروارگانیسم ها هم به همان اندازه حائز اهمیت است که باعث ضرورت شمارش میکروارگانیسم ها می شود . شمارش میکروارگانیسم ها به روش های مختلف از طریق آزمون مستقیم (میکروسکوپی)، تلقیح محیط کشت جامد یا مایع، فلوسایتومتری[1] و با استفاده از زمان واقعی واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)[2] انجام می شود. اگرچه در این استاندارد فقط روش های شمارش با استفاده از محیط های کشت جامد و مایع ارائه شده است.

شمارش در محیط کشت جامد بر اساس توانایی برخی میکروارگانیسم ها در تشکیل کلنی روی محیط کشت جامد یا داخل آن می باشد که با استفاده از چشم غیرمسلح یا با کمک وسایل بزرگنمایی ساده قابل تشخیص است. اگر ماده زمینه‌ای حاوی ذراتی می باشد که ممکن است با شمارش کلنی ها تداخل کند یا در صورتی که تعداد باکتری ها خیلی کم است این روش بدون جداسازی اولیه میکروارگانیسم ها از مادهٔ زمینه ای (مانند جداسازی به روش فیلتراسیون یا ایمونولوژی) استفاده شود. در چنین مواردی توصیه می شود برای شمارش از محیط کشت مایع استفاده شود.

۱۱-۲ شمارش با استفاده از محیط کشت جامد

۱۱-۲-۱ کلیات

توصیه می شود روی پلیت، شمارهٔ نمونه، رقت، تاریخ و هر اطلاعات لازم دیگر درج شود.

توصیه می شود برای اطمینان از به دست آوردن تعداد مناسبی از کلنی در پلیت ها و همچنین غلبه بر خصوصیات مهارکنندگی احتمالی آن ها، رقت های مناسب را انتخاب کنید.

برای انتقال رقت ها از پی پت های سترون جداگانه استفاده کنید به غیر از مواردی که از بالاترین رقت به پایین ترین رقت کار می کنید.

1- Flow cytometry
2- Polymerase Chain Reaction

۱۱-۲-۲ تعداد پلیت های هر رقت

برای روش های شمارش میکروبیولوژی مواد غذایی در آزمایشگاه هایی که تحت شرایط تضمین کیفیت مطابق با اصول استاندارد ملی ایران ایزو- آی ای سی ۱۷۰۲۵ عمل می کنند، یک پلیت برای هر رقت و حداقل دو رقت متوالی باید استفاده شود. در صورتی که فقط یک رقت تهیه می شود یا اگر آزمایشگاه تحت شرایط تضمین کیفیت عمل نمی کند دو پلیت باید مطابق با استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۴۲۰۷ استفاده شود.

۱۱-۲-۳ روش کشت آمیخته (پورپلیت) [1]

۱۱-۲-۳-۱ کلیات

حجم معین از رقت مورد آزمون را بردارید، برای زدودن مایع اضافی چسبیده به قسمت خارجی پی‌پت، نوک پی‌پت را به کنارهٔ لوله تماس دهید. در پلیت را فقط به اندازه ای که پی پت وارد آن شود باز کنید و سپس محتویات آن را داخل پلیت[2] خالی کنید. محیط جامد ذوب شده را که دمای ۴۴ °C تا ۴۷ °C دارد را در هر پلیت بریزید. از ریختن مستقیم محیط کشت ذوب شده روی مایع تلقیح خودداری کنید. برای به دست آوردن توزیع یکنواختی از میکروارگانیسم با محیط کشت، بلافاصله محیط کشت ذوب شده و ماده تلقیحی را مخلوط کنید. پلیت ها را روی سطح افقی خنک قرار دهید و صبر کنید تا ببندد. (زمان بستن آگار نباید بیش از ۱۰min طول بکشد) .

پس از برداشتن محیط کشت حرارت دیده از حمام آب، برای پیشگیری از آلودگی پلیت ها به وسیله آب بطری را با یک کاغذ تمیز خشک کنید. از ریختن محیط کشت روی سطح خارجی ظروف و داخل در پلیت خودداری کنید.

برای این منظور، بطری را در وضعیت تقریباً افقی نگهدارید یا از قرار دادن آن روی میز ، بین مراحل ریختن خودداری کنید.

به منظور پیشگیری یا کاهش پخش شدن کلنی ها (مانند گونه های پروتئوس) پس از جامد شدن آگار محیط کشت سطح پلیت ها را با لایه ای از آگار سترون غیر مغذی بپوشانید.

1- Pour plate

۲- معمولاً ۱۸ml تا ۲۰ml آگار در پلیت هایmm ۹۰ برای ایجاد حداقل ۳mm ضخامت محیط کشت کافی می باشد.

۱۱-۲-۴ کشت سطحی

۱۱-۲-۴-۱ کلیات

این روش فقط برای ایجاد کلنی های سطحی روی پلیت های آگار طراحی شده است و به روش پورپلیت برتری دارد. مشاهده شکل ظاهری کلنی های سطحی آسان تر بوده و باعث بهبود توانایی آزمون کننده برای تشخیص انواع مختلف کلنی ها می شود

به دلیل این که در این روش میکروارگانیسم ها در معرض حرارت ناشی از محیط های کشت جامد ذوب شده قرار نمی گیرند بنابراین شمارش بیشتری ممکن است به دست آید.

از پلیت های پیش ریخته با حداقل ۳mm ضخامت محیط کشت جامد که دارای سطح صاف و عاری از حباب هوا و رطوبت سطحی می باشد، استفاده کنید.

برای تسهیل در پخش یکنواخت، سطح آگار جامد شده مطابق با استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲-۸۶۶۳ خشک می شود تا مادهٔ تلقیحی در مدت زمان ۱۵min جذب شود.

۱۱-۲-۴-۲ روش پخش با قاشقک کشت

با استفاده از پی پت سترون ماده تلقیحی (معمولاً ۰/۱ml یا ۰/۵ml) از آزمایه مایع یا از سوسپانسیون اولیه در مورد سایر نمونه ها را روی پلیت جامد (به ترتیب با ضخامت ۹۰mm یا ۱۴۰mm) انتقال دهید. این مرحله را برای رقت اعشاری بعدی (کلنی هایی که باید شمارش شوند به ترتیب در رقت ۰/۱ برای مایعات و رقت ۰/۰۱ برای سایر فرآورده ها می باشند) تکرار کنید. در صورت لزوم این عمل را برای رقت های اعشاری بعدی تکرار کنید.

در صورت لزوم برای شمارش میکروبی کم در فرآورده های خاص، محدودهٔ شمارش ممکن است با مضرب ۱۰ برابر با آزمون ml ۱ از نمونه برای فرآورده های مایع و ml ۱ از سوسپانسیون اولیه برای سایر فرآورده افزایش یابد. برای این منظور ml ۱ از ماده تلقیحی را روی سطح یک پلیت بزرگ (قطر ۱۴۰mm) یا روی سطح سه پلیت کوچک (قطر ۹۰mm) پخش کنید

با استفاده از قاشقک های پخش کننده شیشه ای ، پلاستیکی یا فولادی (مانند میله شیشه ای شبیه چوب هاکی با قطر حدود ۳/۵ mm و طول ۲۰cm و خمیدگی با زاویه قائمه در حدود ۳cm از یک طرف که انتهای آن با گرم کردن پهن شده است) به سرعت ماده تلقیحی را به طور یکنواخت روی سطح آگار بدون تماس با دیواره های پلیت پخش کنید. با قرار دادن پلیت ها در دمای آزمایشگاه به مدت زمان ۱۵ min اجازه دهید تا مادهٔ تلقیحی جذب محیط کشت شود.

در موارد خاص (در استاندارد ملی مربوطه بیان شده است) مادهٔ تلقیحی ممکن است روی سطح یک صافی قرار داده شده و سپس پخش شود.

۱۱-۲-۴-۳ روش اسپیرال پلیت[1]

۱۱-۲-۴-۳-۱ کلیات

این روش برای تعیین تعداد میکروارگانیسم در آزمون های بین آزمایشگاهی روی شیر و فرآورده های آن و سایر مواد غذایی مورد آزمون قرار گرفته است.

وسیلهٔ مورد استفاده (اسپیرال پلیتر) در بند ۶-۲۴ شرح داده شده است.

۱۱-۲-۴-۳-۲ آماده سازی پلیت حاوی آگار

برای اطمینان از مسطح بودن پلیت ها، یک توزیع کننده خودکار با یک سیستم دریافت سترون برای آماده سازی پلیت های حاوی آگار، توصیه می شود.

مقدار مساوی از آگار داخل همه پلیت ها بریزید به گونه‌ای که ارتفاع یکسانی از آگار برای سرسوزن های اسپیرال پلیتر به منظور تثبیت زاویه تماس صحیح تشکیل شود.

می توان از پلیت های حاوی آگار که به صورت آماده قابل دسترس از بازار می باشد، به عنوان جایگزین استفاده کرد.

۱۱-۲-۴-۳-۳ روش تلقیح پلیت ها و شمارش

سرسوزن ها و لوله ها را ابتدا با انتقال محلول سدیم هیدروکلریت (طبق بند ۶-۲۴-۴) و سپس آب سترون در تمام سیستم پیش از انتقال نمونه مایع داخل سوزن ها آلودگی‌زدایی کنید.

یک پلیت جامد پیش‌ریخته را روی صفحه قرار داده و سوزن را پایین بیاورید. نمونه با حرکت های سر سوزن ها روی پلیت جامد در حال چرخش به طور پراکنده پخش می شود. پلیت تلقیح شده را برداشته و سوزن ها را به حالت اولیه برگردانید. سوزن را آلودگی‌زدایی کنید و برای تلقیح پلیت بعدی پر کنید.

پس از گرمخانه‌گذاری، شبکهٔ شمارش پلیت اسپیرال را در مرکز صفحهٔ قرار دهید. از قانون شمارش بیست برای تعیین شمارش ها استفاده کنید. تیغه ای را انتخاب کنید و شمارش کلنی ها را از لبه خارجی اولین قسمت به سمت مرکز شروع کنید تا این که ۲۰ کلنی شمارش شود. شمارش کلنی های باقی مانده در حلقه دارای بیستمین کلنی را کامل کنید. قسمت مشابه قرار گرفته در سمت مقابل پلیت را شمارش کنید و تعداد کلنی های شمارش شده در هر دو قسمت را بر حجم نمونه پخش شده در این دو ناحیه تقسیم کنید. حجم های نمونه مربوط به هر قسمت از شبکهٔ شمارش دستگاه اسپیرال پلیتر در دستورالعمل کاربردی همراه دستگاه موجود می باشد.

1- Spiral-plate method

۵-۲-۱۱ گرمخانه‌گذاری

غیر از موارد ذکر شده در استانداردهای خاص، بلافاصله ظروف تلقیح شده را به صورت وارونه در دمای مناسب در انکوباتور قرار دهید. در صورت خشک شدن بیش از حد پلیت ها ، (برای مثال در دمای $55\ ^{\circ}C$ یا در مواقع گردش هوای زیاد) ظروف را پیش از گرمخانه‌گذاری در کیسه های پلاستیکی با در شل قرار دهید و یا از سیستم های دیگر با کارایی مشابه استفاده کنید.

در طی دوره گرمخانه‌گذاری ممکن است تغییرات جزئی در دمای گرمخانه‌گذاری ایجاد شود که اجتناب ناپذیر و قابل قبول می باشد (برای مثال طی عملیات معمول پر کردن و خالی کردن انکوباتور)، اما مهم است که این دوره ها به حداقل برسد. این تغیرات بهتر است برای اطمینان از عدم تاثیر قابل توجه روی نتایج پایش شوند.

یادآوری – در برخی موارد هنگام شمارش نگهداری پلیت های تلقیح شده در دمای $3\ ^{\circ}C \pm 2\ ^{\circ}C$ برای مقایسه با ظروف تلقیح و گرمخانه‌گذاری شده به منظور پیشگیری از اشتباه درشمارش ذارت فرآورده به جای کلنی می تواند مفید باشد. همچنین یک ذره بین یک چشمی می تواند برای تشخیص ذرات فرآورده از کلنی ها به کار رود.

در برخی شرایط، ممکن است برای سازماندهی کارها در آزمایشگاه نگهداری پلیت های تلقیح شده برای حداکثر ۲۴h پیش از گرمخانه‌گذاری در یخچال ضروری می باشد. در صورت انجام، آزمایشگاه باید اطمینان یابد که این عمل تاثیری روی شمارش نتایج ندارد.

به طور معمول پلیت ها برای گرمخانه‌گذاری بهتر است بیش از ۶ عدد روی هم انباشته نشوند و توصیه می شود جدا از هم و از دیوار انکوباتور به فاصلهٔ حداقل ۲۵ mm قرارگیرند. به هر حال انباشتن بیش از حد با فاصله کم ممکن است برای انکوباتورهای مجهز شده با سیستم جریان هوا قابل قبول باشد. در این حالت توزیع دما بهتر است تصدیق شود.

توصیه می شود پلیت ها بلافاصله پس از پایان گرمخانه‌گذاری، بررسی شوند. پلیت ها ممکن است برای حداکثر ۴h در یخچال نگهداری شوند (جز در موارد مشخص شده در استانداردهای خاص). نگهداری در یخچال در دوره های طولانی مدت فقط در صورتی مجاز است که روی تعداد، ظاهر یا تایید بعدی کلنی ها تاثیری نداشته باشد. در برخی از محیط های کشت که دارای نشانگر رنگی هستند پلیت های نگهداری شده در یخچال بهتر است پیش از آزمون برای اطمینان از برگشتن رنگ صحیح آن در دمای اتاق به تعادل برسند

۱۱-۳ محاسبه و تفسیر نتایج به دست آمده با محیط کشت جامد

۱۱-۳-۱ شمارش کلنی ها

از دوره های گرمخانه‌گذاری تعیین شده در استاندارد خاص پیروی کنید. کلنی های (مجموع کلنی های ، کلنی های تیپیک یا کلنی های احتمالی) موجود در هر پلیت حاوی کمتر از ۳۰۰ کلنی (یا هر تعدادی که در استاندارد خاص ذکر شده است) را شمارش کنید.

هنگام شمارش کلنی های تیپیک یا احتمالی، توصیف کلنی ها باید در استاندارد خاص ارائه شده باشد.

در برخی موارد ممکن است شمارش کلنی ها مشکل باشد.(مانند وجود میکروارگانیسم های پخش شده). در این حالت کلنی های پخش شده را یک کلنی در نظر بگیرید. در صورتی که کمتر از یک چهارم ظرف کلنی ها پخش شده است، کلنی های قسمتی از ظرف را که در آن کلنی پخش نشده است، شمارش کنید و از روی آن تعداد کلنی برای تمام پلیت را محاسبه کنید. اگر کلنی در بیش از یک چهارم ظرف پخش شده است آن را شمارش نکنید. کلنی های پخش شده به شکل زنجیر را نیز یک کلنی در نظر بگیرید.

در روش های مختلف محاسبه که در بند ۱۱-۳-۲ بیان شده است، درموارد انتخاب پلیت های فاقد کلنی این پلیت ها را نیز باید برای شمارش در نظر بگیرید.در صورت استفاده از اسپیرال پلیتر، کلنی ها را طبق بند ۱۱-۲-۴-۳-۳ شمارش کنید.

۱۱-۳-۲ بیان نتایج

۱۱-۳-۲-۱ کلیات

۱۱-۳-۲-۱-۱ حالات کلی به صورت زیر است :

الف- تلقیح یک ظرف پلیت به قطر ۹۰mm از هر رقت ؛

ب- حداکثر تعداد برای شمارش کلی کلنی های موجود : ۳۰۰ کلنی در هر پلیت ؛

پ- حداکثر تعداد کل کلنی های (تیپیک و غیر تیپیک) موجود روی یک پلیت هنگام شمارش کلنی های تیپیک یا احتمالی: ترجیحاً ۳۰۰ کلنی در هر پلیت ؛

ت- حداکثر تعداد برای شمارش کلنی های تیپیک یا احتمالی : ۱۵۰ کلنی در هر پلیت ؛

ث- تعداد کلنی های احتمالی تلقیح شده برای شناسایی یا تایید (به بند ۱۱-۳-۲-۳ مراجعه شود) که در هر پلیت در نظر گرفته شده : در حالت کلی ۵ کلنی.

این ارقام در استانداردهای خاص معین شده است.

در صورت استفاده ازسایر اندازه های پلیت (به غیر از پلیت های ۹۰ mm) حداکثر تعداد کلنی ها متناسب با سطح پلیت ها (یا صافی ها) باید افزایش یا کاهش یابد.

۱۱-۳-۲-۱-۲ روش های محاسبه که در زیر معین شده است بیشتر برای مواردی است که آزمون ها مطابق با شرایط خوب آزمایشگاهی انجام می شود. گاهی موارد خاص ممکن است اتفاق بیفتد (مانند مواردی که ممکن است نسبت ضریب رقت استفاده شده برای دو رقت متوالی خیلی متفاوت باشد) و در نتیجه لازم است شمارش نتایج آزمون و تفسیر آن توسط میکروبیولوژیست کارآزموده انجام شود و در صورت لزوم پذیرفته نشود.

۱۱-۳-۲-۲ روش محاسبه : حالت کلی (شمارش کلی کلنی ها یا کلنی های تیپیک)

به طور کلی برای معتبر بودن نتایج، لازم است کلنی ها را حداقل روی یک پلیت که دارای حداقل ۱۰ کلنی می باشد، شمارش کنید (مجموع کلنی ها، کلنی های تیپیک یا کلنی های مطابق با معیار شناسایی (به بند ۱۱-۳-۲-۳ مراجعه شود))

تعداد N میکروارگانیسم موجود در آزمایه را بر حسب میانگین دو رقت متوالی با استفاده از فرمول شمارهٔ (۱) محاسبه کنید:

فرمول شمارهٔ (۱)

$$N = \frac{\sum C}{V \times 1.1 \times d}$$

که در آن :

$\sum C$ مجموع کلنی های شمارش شده روی دو پلیت از دو رقت متوالی که حداقل یکی از پلیت ها حداقل ۱۰ کلنی داشته باشد ؛

V حجم تلقیح شده در هر پلیت بر حسب میلی لیتر ؛

d رقت معادل با اولین رقت شمارش شده ($d = 1$ وقتی که پلیت مربوط به فرآورده مایع رقیق نشده (آزمایه) در نظر گرفته شود).

نتایج محاسبه شده را تا دو رقم معنی دار گرد کنید. برای این کار اگر رقم سوم کمتر از ۵ است رقم قبلی را تغییر ندهید و اگر رقم سوم بیشتر یا مساوی ۵ است به رقم قبلی یک واحد اضافه کنید.

نتایج را ترجیحاً به صورت عددی بین ۱٫۰ و ۹٫۹ ضرب در توان مناسبی از ۱۰ یا عددی کامل با دو رقم غیر صفر در سمت چپ و بقیه ارقام صفر بیان کنید.

نتایج را به صورت تعداد N میکروارگانیسم در هر میلی لیتر (فرآورده های مایع) یا هرگرم (سایر فرآورده ها) گزارش کنید.

مثال : شمارش نتایج به دست آمده به صورت زیر است :

- در اولین رقت انتخابی ($۱۰^{-۲}$) : ۱۶۸ کلنی
- در دومین رقت انتخابی ($۱۰^{-۳}$) : ۱۴ کلنی

$$N = \frac{\sum C}{V \times 1.1 \times d} = \frac{168+14}{1 \times 1.1 \times 10^{-2}} = \frac{182}{0.011} = 16545$$

نتایج را به صورت مشخص شده در بالا گرد کنید. تعداد میکروارگانیسم ها برابر با ۱۷۰۰۰ یا $۱/۷ \times ۱۰^{-۴}$ در هر میلی لیتر یا هر گرم از نمونه می باشد.

۱۱-۳-۲- ۳ روش محاسبه : پس از شناسایی

در صورتی که در روش مورد استفاده، شناسایی کلنی ها لازم باشد :

تعداد معین A (به طور کلی ۵ کلنی) از کلنی های احتمالی در هر پلیت مورد شمارش را برای شناسایی انتخاب کنید. پس از شناسایی برای هر پلیت تعداد a کلنی مطابق با معیار شناسایی به دست آمده را با استفاده از فرمول شمارهٔ (۲) محاسبه کنید :

فرمول شمارهٔ (۲)

$$a = \frac{b}{A} \times C$$

که در آن :

b تعداد کلنی های مطابق با معیار شناسایی از میان کلنی های شناسایی شده A ؛

C تعداد کل کلنی های احتمالی شمارش شده روی پلیت.

نتایج محاسبه شده را گرد کنید. برای این کار اگر رقم اول پس از اعشار کمتر از ۵ است رقم قبلی را تغییر ندهید و اگر رقم اول پس از اعشار بیشتر یا مساوی ۵ است به رقم قبلی یک واحد اضافه کنید.

تعداد N میکروارگانیسم شناسایی شده را در نمونه مورد آزمون با جانشین کردن $\sum c$ با $\sum a$ در معادله معین شده در بند ۱۱-۳-۲-۲ محاسبه کنید.

نتایج را طبق بند ۱۱-۳-۲-۲ گرد کنید.

نتایج را طبق بند ۱۱-۳-۲-۲- بیان کنید.

مثال : شمارش نتایج به دست آمده به صورت زیر است :

- در اولین رقت انتخابی ($۱۰^{-۳}$) : ۶۶ کلنی
- در دومین رقت انتخابی ($۱۰^{-۴}$) : ۴ کلنی

نتایج به دست آمده از آزمون روی کلنی های انتخاب شده به صورت زیر می باشد:

برای ۶۶ کلنی ، اگر تعداد ۶ کلنی از ۸ کلنی تایید شده باشد، $a = 50$ است؛

برای ۴ کلنی ، اگرتمام ۴ کلنی تایید شده باشد، $a = 4$ است.

$$N = \frac{\sum C}{V \times 1.1 \times d} = \frac{50+4}{1 \times 1.1 \times 10^{-3}} = \frac{54}{1.1 \times 10^{-3}} = 49090$$

نتایج را طبق بند ۱۱-۳-۲-۲ گرد کنید. تعداد میکروارگانیسم ها برابر با ۴۹۰۰۰ یا $۴٫۹ \times ۱۰^{۴}$ در هر میلی لیتر یا هر گرم از نمونه می باشد.

۱۱-۳-۲-۴ روش محاسبه : شمارش کم

۱۱-۳-۲-۴-۱ در مواردی که یک پلیت (آزمایه، سوسپانسیون اولیه یا اولین رقت) دارای کمتر از ده کلنی می باشد

شمارش های از ۱۰ کلنی تا حد بالای (عملی) هر روش در دامنهٔ بهینهٔ دقت قرار دارد. گرچه وقتی تعداد کلنی ها به کمتر از ۱۰ می رسد ، دقت به سرعت کاهش می یابد. بر اساس هدف آزمون مورد نظر، یک حد اندازه گیری پایین تر را می توان به شرح زیر برای تعداد کمتر از ۱۰ کلنی تعیین کرد.

مطابق با ISO/TR 13843 پایین ترین حد اندازه‌گیری عبارت است از : متوسط کمترین غلظت ذرات x در مادهٔ مورد آزمون در صورتی که عدم قطعیت نسبی استاندارد مورد انتظار مساوی با مقدار مشخص شده (RSD) می باشد. RSD انحراف معیار نسبی است که از تقسیم تخمین انحراف معیار s برای یک جمعیت از یک نمونه بر میانگین آن نمونه $\bar{x}$ محاسبه می شود. به جای RSD علامت w برای انحراف معیار نسبی استفاده می شود.

بنابراین:

$$w = s / \bar{x}$$

بر اساس توزیع پواسون، x (تعداد میکروارگانیسم ها در هر میلی لیتر یا هر گرم از نمونه) طبق فرمول شمارهٔ (۳) محاسبه کنید:

فرمول شمارهٔ (۳)

$$x = \frac{1}{(w)^2}$$

در صورتی که w را برابر ٪۵۰ به عنوان حد نسبی دقت قابل قبول در نظر بگیریم (که به نظر می رسد در میکروبیولوژی متناسب باشد) حد پایین‌تر اندازه‌گیری برابر است با تعداد کلنی های زیر :

$$x = \frac{1}{(0.50)^2} = 4$$

بنابراین توصیه می شود برای شمارش های کمتر از ۴ از روش جستجوی میکروارگانیسم ها استفاده شود.

به طور خلاصه :

در صورتی که پلیت، حاوی کمتر از ده کلنی، اما حداقل ۴ کلنی داشته باشد به طور کلی محاسبات را طبق بند ۱۱-۳-۲-۲ انجام دهید و تعداد x میکروارگانیسم را در هر میلی لیتر (فرآورده های مایع) یا هر گرم (سایر فرآورده ها) گزارش کنید.

در صورتی که کل کلنی ها ۱ تا ۳ باشد دقت نتایج خیلی کم بوده و نتایج باید به صورت زیر گزارش شود:

"میکروارگانیسم ها وجود دارند اما تعداد آن ها کمتر از $(4\times\frac{1}{d})$ در هر گرم یا میلی لیتر از نمونه می باشد"

۱۱-۳-۲-۴-۲ در **مواردی که پلیت (آزمایه، سوسپانسیون اولیه یا اولین رقت) فاقد کلنی باشد**

در صورتی که پلیت آزمایه (فرآورده های مایع) یا سوسپانسیون اولیه (سایر فرآورده ها) یا اولین رقت تلقیح شده فاقد کلنی باشد ، گزارش نتایج به صورت زیر است:

" کمتر از $\frac{1}{d}$ میکروارگانیسم در هر میلی لیتر از نمونه (فرآورده های مایع) یا کمتر از $\frac{1}{d}$ میکروارگانیسم در هر گرم از نمونه (سایر فرآورده ها) "

که در آن d ضریب رقت سوسپانسیون اولیه یا اولین رقت تلقیح شده می باشد. (هنگامی که آزمایه به طور مستقیم از فرآوردهٔ مایع تلقیح شده باشد $d = 10^0 = 1$ می باشد)

۱۱-۳-۲-۴-۳ موارد خاص

۱۱-۳-۲-۴-۳-۱ کلیات

این موارد مربوط به شمارش کلنی های مشخص یا احتمالی می باشد.

۱۱-۳-۲-۴-۳-۲ مورد ۱

در صورتی که تعداد کلنی های تیپیک و غیر تیپیک قابل مشاهده در پلیت حاوی اولین رقت d_1 بیشتر از ۳۰۰ (یا هر مقدار ذکر شده در استاندارد خاص) باشد و در صورتی که پلیت حاوی رقت بعدی d_2 کمتر از ۳۰۰ کلنی (یا هر مقدار ذکر شده در استاندارد خاص) و فاقد کلنی تیپیک یا تایید شده باشد نتایج را به صورت زیر گزارش کنید :

" کمتر از $\frac{1}{d2}$ و بیشتر از $\frac{1}{d1}$ میکروارگانیسم در هر میلی لیتر از نمونه " (فرآورده های مایع) یا
" کمتر از $\frac{1}{d2}$ و بیشتر از $\frac{1}{d1}$ میکروارگانیسم در هر گرم از نمونه " (سایر فرآورده ها)

که در آن d_1 و d_2 به ترتیب ضریب رقت های اول و دوم می باشند.

مثال : شمارش نتایج به دست آمده به صورت زیر است :

- در اولین رقت انتخابی ($۱۰^{-۲}$) : بیشتر از ۳۰۰ کلنی در پلیت، با کلنی های تیپیک یا تایید شده
- در دومین رقت انتخابی ($۱۰^{-۳}$) : ۳۳ کلنی، فاقد کلنی تیپیک یا تایید شده

نتایج به صورت کمتر از ۱۰۰۰ و بیشتر از ۱۰۰ میکروارگانیسم در هر میلی لیتر یا هر گرم از نمونه بیان می شود.

۱۱-۳-۲-۴-۳-۳ مورد ۲

در صورتی که تعداد کلنی های تیپیک و غیر تیپیک در پلیت حاوی اولین رقت d_1 بیشتر از ۳۰۰ (یا هر مقدار ذکر شده در استاندارد خاص) بدون مشاهدهٔ کلنی های تیپیک یا تایید شده باشد و در صورتی که پلیت حاوی رقت بعدی d_2 کمتر از ۳۰۰ کلنی (یا هر مقدار تعیین شده در استاندارد خاص) و فاقد کلنی تیپیک یا تایید شده باشد نتایج را به صورت زیر گزارش کنید :

" کمتر از $\frac{1}{d_2}$ میکروارگانیسم در هر میلی لیتر " (فرآورده های مایع) یا " کمتر از $\frac{1}{d_2}$میکروارگانیسم در هر گرم " (سایر فرآورده ها)

که در آن d_2 ضریب رقت دوم می باشد.

مثال : شمارش نتایج به دست آمده به صورت زیر است :

- در اولین رقت انتخابی ($۱۰^{-۲}$) : بیشتر از ۳۰۰ کلنی در پلیت بدون کلنی های تیپیک یا تایید شده
- در دومین رقت انتخابی ($۱۰^{-۳}$) : ۳۳ کلنی بدون کلنی تیپیک یا تایید شده

نتایج به صورت " کمتر از ۱۰۰۰ میکروارگانیسم در هر میلی لیتر یا هر گرم " از نمونه بیان می شود.

۱۱-۳-۲-۵ روش محاسبه : موارد خاص

۱۱-۳-۲-۵-۱ وقتی تعداد کلنی های شمارش شده (مجموع کلنی ها، کلنی های تیپیک یا کلنی های احتمالی) بیشتر از ۳۰۰ کلنی (یا هر تعداد تعیین شده در استاندارد خاص) در پلیت حاوی اولین رقت d_1 می باشد و تعداد کلنی ها (مجموع کلنی ها ، کلنی های تیپیک یا کلنی های مطابق با معیار شناسایی) کمتر از ۱۰ کلنی در رقت بعدی d_2 باشد :

الف- در صورتیکه تعداد کلنی ها در پلیت حاوی اولین رقت d_1 در محدودهٔ بین ۳۰۰ تا ۳۳۴ (حد بالایی فاصلهٔ اطمینان برای میانگین وزنی معادل ۳۰۰ کلنی) از موارد کلی محاسبه طبق بند ۱۱-۳-۲-۲ استفاده کنید.

ب- در صورتیکه تعداد کلنی ها برای پلیت حاوی اولین رقت d_1 بیشتر از ۳۳۴ است (حد بالایی فاصلهٔ اطمینان برای میانگین وزنی معادل ۳۰۰ کلنی) فقط رقت d_2 را در نظر گرفته و آن را به طور تخمینی مطابق با بند ۱۱-۳-۲-۴ شمارش کنید مگر زمانی که حداکثر ۳۰۰ کلنی برای شمارش در نظر گرفته شده باشد ولی شمارش تخمینی کمتر از ۸ باشد (حد پایینی فاصلهٔ اطمینان برای میانگین وزنی معادل ۱۰ کلنی) در این مورد اختلاف بین دو رقت غیر قابل قبول می باشد.

مقادیر متناسب با فاصلهٔ اطمینان باید با حداکثر تعداد تعیین شده برای شمارش کلنی تطابق داشته باشند.

مثال ۱ : شمارش به دست آمده از نتایج به صورت زیر است:

- اولین رقت انتخابی ($۱۰^{-۲}$) : ۳۱۰ کلنی
- دومین رقت انتخابی ($۱۰^{-۳}$) : ۸ کلنی

برای محاسبه از موارد کلی محاسبه برای دو رقت انتخابی (طبق بند ۱۱-۳-۲-۲) استفاده کنید.

مثال۲ : شمارش به دست آمده از نتایج به صورت زیر است:

- اولین رقت انتخابی ($۱۰^{-۲}$) : بیشتر از ۳۳۴ کلنی در پلیت
- دومین رقت انتخابی ($۱۰^{-۳}$) : ۹ کلنی

شمارش تخمینی را بر اساس کلنی های شمارش شده در پلیت با رقت $۱۰^{-۳}$ گزارش کنید.

مثال۳ : شمارش به دست آمده از نتایج به صورت زیر است (وقتی حداکثر۳۰۰ کلنی برای شمارش در نظر گرفته شده است) :

- اولین رقت انتخابی ($۱۰^{-۲}$) : بیشتر از ۳۳۴ کلنی
- دومین رقت انتخابی ($۱۰^{-۳}$) : ۷ کلنی

نتایج شمارش غیر قابل قبول می باشد.

مثال۴ : شمارش به دست آمده از نتایج به صورت زیر است(وقتی حداکثر۱۵۰ کلنی برای شمارش در نظر گرفته شده است):

- اولین رقت انتخابی ($۱۰^{-۲}$) : بیشتر از ۱۶۷کلنی (حد بالایی فاصلهٔ اطمینان با میانگین وزنی مساوی با ۱۵۰)
- دومین رقت انتخابی ($۱۰^{-۳}$) : ۷ کلنی

شمارش تخمینی را بر اساس کلنی های شمارش شده در پلیت با رقت $۱۰^{-۳}$ گزارش کنید.

۱۱-۳-۲-۵-۲ وقتی شمارش کلنی ها (مجموع کلنی ها، کلنی های تیپیک یا احتمالی) برای هر یک از پلیت ها برای همه رقت های تلقیح شده بیشتر از ۳۰۰ (یا هر تعداد تعیین شده در استاندارد خاص) باشد، نتایج را به صورت زیر گزارش کنید:

"بیشتر از $\frac{300}{d}$(مجموع کلنی ها یا کلنی های تیپیک)" یا "بیشتر از $300\times\frac{b}{A}\times\frac{1}{d}$(کلنی های تایید شده) " میکروارگانیسم در هر میلی لیتر (فرآورده های مایع) یا هر گرم (سایر فرآورده ها) از نمونه

که در آن :

d رقت آخرین رقت تلقیح شده

b تعداد کلنی هایی که از میان کلنی های احتمالی A طبق معیارهای شناسایی مورد تایید قرار گرفته است.

۱۱-۳-۲-۵-۳ وقتی پلیت حاوی آخرین رقت تلقیح شده دارای بیشتر از ۱۰ کلنی و کمتر از ۳۰۰ کلنی باشد (یا هر تعداد ذکر شده در استاندارد خاص) کلنی ها (مجموع کلنی ها، کلنی های تیپیک یا کلنی های احتمالی)، تعداد N' میکروارگانیسم را طبق فرمول شمارهٔ (۴) محاسبه کنید:

فرمول شمارهٔ (۴)

$$N' = \frac{c}{V \times d}$$

که در آن :

c تعداد کلنی های شمارش شده در پلیت؛

V حجم تلقیح شده در هر پلیت بر حسب میلی لیتر؛

d رقت مربوط به رقت انتخابی.

نتیجه را مطابق با بند ۱۱-۳-۲-۲ گرد کنید.

نتیجه را به صورت تعداد N' میکروارگانیسم در هر میلی لیتر (فرآورده های مایع) یا هر گرم (سایر فرآورده ها) از نمونه گزارش کنید.

مثال : شمارش به دست آمده به صورت زیر است :

- در آخرین رقت تلقیح شده ($۱۰^{-۴}$): ۱۲۰ کلنی

بنابراین:

$$N' = \frac{120}{1 \times 10^{-4}} = 1200000$$

نتیجه را طبق بند ۱۱-۳-۲-۲ گرد کنید، تعداد N' میکروارگانیسم برابر با ۱۲۰۰۰۰۰ یا $۱/۲×۱۰^{۶}$ در هر میلی لیتر یا هر گرم از نمونه می باشد.

۱۱-۳-۲-۶ عدم قطعیت اندازه گیری

برای تعیین کمیت به استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۹۰۳۶ مراجعه شود.

۱۱-۴ شمارش مخمر و کپک

۱۱-۴-۱ کلیات

توصیه می شود مخمرها و کپک ها را به طور معمول، یا با روش پورپلیت که شمارش در آن آسان‌تر انجام می شود یا باروش کشت سطحی که که در آن مدت زمان قرارگرفتن سلول ها در معرض اکسیژن اتمسفر به حداکثر می رسد و همچنین از تنش حرارتی ناشی از آگار ذوب شده پیشگیری می کند شمارش شوند. سطح پلیت های آگار پیش ریخته بهتر است پیش از تلقیح خشک شود (به استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲-۸۶۶۳ مراجعه شود).

گاهی اوقات برخی از مخمرها و کپک ها ممکن است سبب بیماری های عفونی و ایجاد واکنش های حساسیتی حتی در افراد سالم شوند. بنابراین احتیاط هنگام کار با آن ها اهمیت دارد. به طور ایده آل، بهتر است پلیت ها داخل انکوباتور نگهداری شوند و از نگهداری آن ها در فضای باز خودداری شود. تا حد امکان در پلیت ها را کم باز کنید و فقط در موارد ضروری مانند تهیهٔ لام برای آزمون میکروسکوپی در آن را باز کنید. پیش از برداشت از آن ها سوزن یا لوپ کشت را پس از شعله دادن خنک کنید. توصیه می شود میزهای کار و انکوباتور به طور روزمره ضدعفونی شوند.

توصیه می شود پلیت ها را در وضعیت عمودی گرمخانه‌گذاری کنید و تا زمان شمارش، آن ها را جابجا نکنید. جابجایی می تواند سبب آزاد شدن کنیدی[1] کپک و اسپورها و در نتیجه ایجاد کلنی های اقماری[2] شده و شمارش بالاتر از حد واقعی را نشان دهد.

۱۱-۴-۲ شمارش کلنی های مخمر و کپک

به طور معمول پلیت های دارای ۱۰ تا ۱۵۰ کلنی شمارش می شوند. در صورتی که فلور قارچی غالب، کپک می باشد، پلیت های نزدیک تر به حد پائینی را برای شمارش انتخاب کنید و در صورتی که فلور قارچی غالب، مخمر می باشد پلیت های نزدیک تر به حد بالائی را برای شمارش انتخاب کنید.

1- Conidia
2- Satelite

در صورت مشکوک بودن به شناسایی کلنی ها، چنانچه از روی شکل کلنی، تشخیص کپک و مخمر از باکتری ها امکان پذیر نباشد، با انجام آزمون لام مرطوب یا رنگ آمیزی سلول ها برای حداقل ۵ کلنی از هر نمونه، عدم وجود باکتری ها را تایید کنید.

۱۱-۵ شمارش با استفاده از محیط کشت مایع

۱۱-۵-۱ اساس روش

آزمونه به محیط کشت مایعی تلقیح می شود که برای رشد میکروارگانیسم خاص یا گروهی از میکروارگانیسم ها مناسب بوده و اغلب رشد میکروارگانیسم های غیر هدف را مهار می کند.

برای تعیین رشد میکروارگانیسم های هدف از معیارهای مختلفی مانند بررسی چشمی کدورت، ایجاد گاز، تغییر رنگ یا جداسازی بعدی میکروارگانیسم ها روی یک محیط کشت جامد انتخابی می توان استفاده کرد. نوع محیط کشت و معیارهای شناسایی برای تمایز بین نتیجهٔ مثبت و منفی در استانداردهای خاص تعیین شده است.

با استفاده از این روش فقط نتایج کیفی (نتیجهٔ مثبت یا منفی) برای هر آزمونه به دست می آید و برای تخمین تعداد میکروارگانیسم های موجود، آزمون چندین آزمونه و استفاده از روش های آماری برای تعیین محتمل ترین تعداد (MPN) ضروری است.

۱۱-۵-۲ تلقیح

۱۱-۵-۲-۱ کلیات

در صورتی که از یک محیط کشت انتخابی استفاده می شود، افزودن آزمونه بهتر است خصوصیات انتخابی محیط را که باعث رشد میکروارگانیسم های غیر هدف می شود، کاهش ندهد. در بیشتر استانداردها، دربارهٔ سازگاری ماتریکس و محیط کشت اطلاعاتی ارائه شده است اما توصیه می شود در مورد ماتریکس هایی مانند ادویه و کاکائو دقت شود زیرا ممکن است حاوی مواد مهار کنندهٔ رشد باشند که با افزودن ترکیبات خنثی کننده، استفاده از رقت های بالاتر، سانتریفوژ کردن، فیلتراسیون یا جداسازی ایمونومگنتیک، میکروارگانیسم های هدف از ماتریکس جدا می شود حتی اگر در استانداردهای خاص تعیین نشده باشد.

همچنین ناسازگاری ممکن است ناشی از ترکیبات بیولوژیکی ماتریکس باشد مانند نمونه های محیطی بسیار آلوده، فرآورده های تخمیر شده، یا فرآورده های دارای باکتری های پروبیوتیک[1] که نسبت به نمونه های با تعداد کم میکروارگانیسم مشکلات بسیاری را برای متخصصین میکروبیولوژی ایجاد می کند. برای چنین ماتریکس های مشکل زا ، توصیه می شود با استفاده از میکروارگانیسم های مورد نظر برای تصدیق سازگاری

1- Probiotic

این روش با ماتریکس آزمون های اسپایک[1] روی نمونه هایی که به طور عمدی و مشخص در آزمایشگاه آلوده می شوند انجام شود.

۱۱-۵-۲-۲ روش کار

جز در موارد ذکر شده در استانداردهای خاص، معمولاً ۱ ml آزمونه یا کمتر از آن را بـه ۵ تـا ۱۰ برابـرحجم محیط کشت مایع با غلظت معمولی اضافه می شود. معمولاً بین ۱ ml تا ۱۰۰ ml از آزمونه به همان حجم از محیط کشت با غلظت دو برابر اضافه می شود.

برای تلقیح حجم های بیشتر از ۱۰۰ml می توان از محیط کشت های با غلظت بیشتر استفاده کرد. در مـوارد خاص، می توان محیط کشت سترون بدون آب (به صورت پودر یا گرانول) را در نمونهٔ سرد (یا نمونه‌ای که از پیش تا دمای ۳۰°C گرم شده است) حل کرد.

جز در موارد ذکر شده ، بهتر است زمان بین آماده سازی اولین رقت از یک نمونه و تلقـیح بـه آخـرین لولـه، میکروپلیت[2] یا بطری کمتر از ۱۵ min باشد.

باید از پی‌پت سترون جداگانه برای هر رقت استفاده شود.

۱۱-۵-۳ انتخاب سیستم تلقیح

اساس روش محتمل‌ترین تعداد (MPN)، رقیق کردن نمونه به میزانی است که آخرین رقت تلقیحی[3] حاوی میکروارگانیسم های قابل رشد باشد، این حالت در تمـام مـوارد امکـان پـذیر نیـست . در نتیجـه ایـن عمـل (تعداد تلقیح هایی که در هر رقت رشد نشان می دهند) غلظت اولیهٔ باکتری در نمونه تخمین زده می شود. برای تخمین شمارش در غلظت های زیاد میکروارگانیسم ها، از رقت های متوالی و گرمخانـه‌گـذاری چنـدین لوله (یا پلیت) در هر رقت استفاده می شود. محتمل ترین تعداد (MPN) میکروارگانیسم های موجـود در نمونه اولیه و دقت تخمین را می توان با روش های آماری بر اساس تعداد لوله های مثبت و منفـی مـشاهده شده پس از گرمخانه‌گذاری محاسبه کرد.

یکی از حالات مختلف روش MPN را طبق موارد زیر انتخاب کنید:

الف- تعداد مورد انتظار میکروارگانیسم ها در نمونه مورد آزمون؛

ب- الزامات قانونی؛

پ- دقت مورد نیاز ؛

ت- و هر ملاحظات عملی دیگر.

1- Spiking
2- Multiwell plate
3- Inocula

عدم قطعیت اندازه‌گیری تعداد آزمونه های مثبت مشاهده شده را طبق آنچه برای تعداد کلنی ها در پلیت محاسبه می شود تخمین بزنید. عدم قطعیت اندازه گیری به صورت تابعی از ریشهٔ دوم تعداد لوله های استفاده شده افزایش می یابد. برای نصف کردن عدم قطعیت تعداد لوله ها باید چهار برابر شود. در مواردی که سیستم فقط از تعداد کمی لوله استفاده کند، عدم قطعیت اندازه‌گیری کم می شود.

آزمونه ها را بر اساس حجم می توان به لوله ها یا بطری های حاوی مقدار لازم از محیط کشت مایع تلقیح کرد. برای آزمونه های کم حجم، می توان از میکروپلیت ها استفاده کرد.

۱۱-۵-۳-۱ سیستم تک رقتی[1]

هنگامی که غلظت مورد انتظار میکروارگانیسم ها کم یا تغییرات محدودی در آن پیش می آید، مناسب ترین روش، تلقیح یک سری از لوله ها با آزمونه های یکسان می باشد. در مواردی که نسبت بین حداکثر و حداقل تعداد میکروارگانیسم های مورد انتظار کمتر از حدود ۲۵ باشد، تعداد حداقل ۱۰ لوله موازی آزمونه برای انجام آزمون لازم است و در صورتی که این نسبت ۲۰۰ باشد با ۵۰ لوله موازی آزمون انجام می شود. مثال هایی از سیستم MPN تک رقتی در پیوست **ب** در جدول های ب-۱ تا ب-۴ ارائه شده است.

۱۱-۵-۳-۲ سیستم چند رقتی[2]

در موارد نامشخص بودن غلظت میکروارگانیسم ها در نمونه یا پیش بینی تغییرات زیاد کاربرد سیستم چند رقتی برای تلقیح، چند سری لوله لازم است. برای اطمینان از این که سیستم هر دو نتایج مثبت و منفی را داشته باشد تعداد کافی از رقت ها را تلقیح کنید. تعداد رقت ها همچنین به روش محاسبه برای تخمین مقدار MPN بستگی دارد. در صورت استفاده از جدول ها، نتایج سه رقت باید موجود باشد و ترکیب سیستم محدود به داده هایی است که در این جدول ها موجود می باشد. با استفاده از برنامه های رایانه‌ای از تعداد رقت ها و لوله های موازی نامحدود می توان استفاده کرد.

۱۱-۵-۳-۳ سیستم رقت متقارن[3]

معمول‌ترین سیستم های متقارن از۳ تا ۵ لوله موازی برای هر رقت استفاده می کند. دقت این روش با تعداد کم لوله در هر رقت به سرعت کاهش می یابد. نتایج به دست آمده از طراحی سه لوله ای برای غلظت های بالای میکروارگانیسم ها معمولاً کاربرد ندارد. توصیه می شود از طراحی ۵ لوله موازی یا بیشتر استفاده شود.

1- Single-dilution
2- Multiple-dilution
3- Symmetric dilution

مثال هایی از یک روش MPN سه لوله ای و یـک روش MPN پـنج لولـه ای در پیوسـت **ب**، بـه ترتیـب در جدول های ب-۵ و ب-۷ ارائه شده است.

۱۱-۵-۳-۴ سیستم رقت نامتقارن[1]

در سیستم نامتقارن هر رقت متفاوت دارای تعداد لوله های متفاوت می باشـند. ایـن سیـستم را فقـط بـرای تخمین تعداد میکروارگانیسم ها در یک محدودهٔ کاملاً مشخص اسـتفاده کنیـد. (بـه اسـتاندارد ملـی ایـران شمارهٔ ۴۲۰۷ مراجعه شود).

۱۱-۵-۴ گرمخانه‌گذاری

لوله های تلقیح شده، ارلن ها و بطری ها را در انکوباتور یا حمـام آب و میکروپلیـت هـا را در انکوبـاتور قـرار دهید. پس از مراجعه به روش استاندارد خاص، مدت و دمای گرمخانه‌گذاری را انتخاب کنید. مـدت و دمـای گرمخانه‌گذاری به میکروارگانیسم یا گروه میکروارگانیسم ها بستگی دارد.

برای برخی میکروارگانیسم ها یک روش گرمخانه‌گذاری دو مرحله ای و/یا یک روش تاییدی ممکن است لازم باشد.

برای آگاهی های بیشتر به استانداردهای خاص مراجعه شود.

۱۱-۵-۵ تفسیر نتایج

معیار تشخیص نتایج مثبت از منفی برای هر میکروارگانیسم یـا گـروه میکروارگانیـسم هـا در اسـتانداردهای خاص تعیین شده است. با استفاده از این معیارها ، تعداد نتایج مثبت به دست آمده از تمام لوله های مربـوط به یک نمونه را شمارش و ثبت کنید.

۱۱-۵-۶ تعیین شاخص های MPN

تعیین شاخص های MPN به سه روش مختلف امکان پذیر است :

الف- محاسبه با فرمول های ریاضی؛

ب- استفاده از جدول های MPN ؛

پ- استفاده از برنامه های رایانه ای خاص.

1- Non-symmetric dilution

هر سه روش فوق به دلیل اینکه بر اساس روش های آماری تعیین شده اند ، بنابراین از اعتبار یکسان برخوردار هستند.

۱۱-۵-۶-۱ فرمول های ریاضی

۱۱-۵-۶-۱-۱ فرمول تقریبی برای تمام موارد

شاخص تقریبی MPN برای هر تعداد رقت و لوله های موازی طبق فرمول شمارهٔ (۵) محاسبه می شود:

فرمول شمارهٔ (۵)

$$MPN = \frac{Z_p \times m_r}{\sqrt{m_s \times m_t}}$$

که در آن:

Z_p تعداد لوله های مثبت؛

m_r جرم مرجع نمونه بر حسب گرم؛

m_s جرم کل نمونه بر حسب گرم در تمام لوله های منفی؛

m_t جرم کل نمونه بر حسب گرم در تمام لوله ها.

شاخص MPN در هر گرم از جرم مرجع نمونه بیان می شود. (معمولاً در یک گرم و گاهی ۱۰۰g)

۱۱-۵-۶-۱-۲ روش محاسبه « دقیق » برای سیستم تک رقتی

شاخص MPN برای سیستم تک رقتی طبق فرمول شمارهٔ (۶) محاسبه می شود:

فرمول شمارهٔ (۶)

$$MPN = \frac{m_r}{m_m} In\left[\frac{n}{n - Z_p}\right]$$

که در آن :

m_r جرم مرجع نمونه برحسب گرم؛

m_m جرم نمونه بر حسب گرم در هر لوله از سری ها؛

In لگاریتم طبیعی؛

n تعداد لوله ها در سری ها؛

Z_p تعداد لوله های مثبت.

۱۱-۵-۶-۱-۳ تخمین دقت آزمون های تک رقتی

تخمین MPN با سطح اطمینان ٪۹۵ به طور تقریبی با استفاده از فرمول شمارهٔ (۷) محاسبه می شود:

فرمول شمارهٔ (۷)

$$x = \frac{m_r}{m_m} In \left[\frac{n}{Z_n \pm 2\sqrt{\frac{Z(n - Z_n)}{n}}} \right]$$

که در آن :

x حد بالایی یا پایینی اطمینان ٪۹۵؛

m_r جرم مرجع نمونه بر حسب گرم؛

m_m جرم نمونه بر حسب گرم در هر لوله از سری ها؛

In لگاریتم طبیعی؛

n تعداد لوله ها در هر سری؛

Z_n تعداد لوله های منفی.

علامت بعلاوه (+) مربوط به حد پایینی و علامت منها (-) مربوط به حد بالایی می باشد. در صورتی که بیشتر لوله ها منفی می باشند (بدون رشد) تقریب خوبی به دست نمی آید ولی با افزایش نسبت لوله های مثبت بهبود می یابد.

۱۱-۵-۶-۱-۴ دقت تخمین های آزمون های چند رقتی متقارن

$\log_{10}$ عدم قطعیت استاندارد از سیستم MPN چند رقتی متقارن می تواند از فرمول تقریبی کوچرانس[1] طبق فرمول شمارهٔ (۸) به دست آید:

1- Cochrans

فرمول شمارهٔ (۸)

$$SE = 0.58\sqrt{\frac{\log_{10} f}{n}}$$

که در آن:

SE خطای استاندارد $\log_{10}$ MPN ؛

f نسبت بین دو رقت متوالی (در بیشتر موارد ۱۰) ؛

n تعداد لوله ها در هر رقت.

حد بالایی و پایینی اطمینان٪۹۵ به ترتیب با استفاده از ضرب و تقسیم کردن تخمین MPN با آنتی لگاریتم ۲×SE به طور تقریبی به دست آید. در این روش حد بالایی سطح اطمینان بیش از حد واقعی نشان داده می شود.

۱۱-۵-۶-۲ جدول های MPN

۱۱-۵-۶-۲-۱ جدول های سیستم تک رقتی

جدول های ب-۱ تا ب-۴ در پیوست **ب** شاخص های MPN با سطح اطمینان ٪۹۵ در هر آزمونه برای لوله های موازی ۱۰، ۱۵ ، ۲۰ و ۲۵ تایی را نشان می دهد (هر لوله با یک رقت یکسان تلقیح می شود).

برای بیان نتایج در جرم معین نمونه یا حجم نمونه های مایع شاخص MPN را با سطح اطمینان ٪۹۵ در نسبت جرم معین به جرم آزمونه ضرب کنید . این شاخص را در لگاریتم عدم قطعیت استاندارد ضرب نکنید. جرم معین در میکروبیولوژی مواد غذایی معمولاً یک گرم می باشد. جرم آزمونه به مقدار نمونهٔ (بر حسب گرم) لوله های تلقیح شده بستگی دارد. برای مثال چنانچه ۱ml از رقت $۱۰^{-۱}$ استفاده شده است جرم آزمونه ۰٫۱g می باشد.

مثال :

۵ ml از نمونه ۰٫۱ رقیق شده (۰٫۱ g/ml) به۲۰ لوله محیط کشت مایع با غلظت دوبرابر تلقیح شده است. پس از گرمخانه‌گذاری، در ۱۶ لوله رشد مشاهده شده است. بیشترین غلظت احتمالی باکتری ها (ارگانیسم ها در گرم) در نمونه چه مقدار بوده است؟ از جدول ب-۳ در پیوست **ب** شاخص MPN ، ۱٫۶۱ ارگانیسم در هر لوله با حد پایینی۰٫۹۳ و حد بالایی ۲٫۷۷ در سطح اطمینان ٪۹۵ به دست می آید.

هر لوله حاوی ۵ ml از آزمونه است که برابر ۰٫۵ g از نمونه می باشد.بنابراین محتمل ترین تعداد میکروارگانیسم ها در یک گرم از نمونه به طریق زیر به دست می آید:

$MPN = \frac{1.61}{0.5}$ در گرم $3.2 =$ در گرم

با سطح اطمینان ٪۹۵:

در گرم $1.9 =$ در گرم $\frac{0.93}{0.5} =$ حد پایینی ٪۹۵

در گرم $5.5 =$ در گرم $\frac{2.77}{0.5} =$ حد بالایی ٪۹۵

۱۱-۵-۶-۲-۲ جدول های سیستم چند رقتی : سه رقت متوالی

در سیستم های متقارن از سه رقت متوالی با سه (جدول ب- ۵) یا پنج (جدول ب-۷) لوله در هر سری استفاده می شود. تعداد نتایج مثبت برای هر سری از لوله ها را ثبت کنید و با استفاده از جدول MPN مربوط به روش استفاده شده ، محتمل ترین تعداد را برای تعیین تعداد میکروارگانیسم ها در حجم معین از نمونه به دست آورید. برخی از حالات لوله های مثبت در روش MPN نسبت به دیگر حالات بیشتر مشاهده می شوند برای مثال ترکیبی از نتایج مثبت ۰ ، ۰ و ۳ نسبت به حالت ۳ ، ۲ و ۱ خیلی کمتر اتفاق می افتد. برای تعیین مقدار عددی این احتمالات تمام حالات نتایج مثبت در محدودهٔ صفر تا سه رده بندی می شوند. ردهٔ یک، نتایج با احتمال بالاتر است در حالی که ردهٔ سه، شامل نتایجی است که به ندرت حاصل می شود و به آسانی به دست نمی آید. بدترین حالات ردهٔ صفر نتایج می باشد . توصیه می شود به نتایج این رده کمتر اطمینان کنید.

با فرض این که نتایج آزمون درست باشند و انتظار داریم ٪۹۵ حالات مشاهده شده در ردهٔ یک ، ٪۴ در ردهٔ دو ، ٪۰/۹ در ردهٔ سه و تنها ٪۰/۱ در ردهٔ صفر قرار می گیرد. رده ها در جدول ب-۶ به طور کامل شرح داده شده است.

در صورتی که بیش از سه رقت تهیه می شود، انتخاب دقیق حالت سه رقت متوالی معمولاً خیلی واضح نیست البته به راحتی این عمل می تواند با استفاده از جدول ب-۵ با گزارش تمام حالات ممکن از لوله های مثبت در رده های مربوطه به دست آید.

پس از آن از مقررات زیر استفاده کنید :

الف- برای به دست آوردن شاخص MPN حالتی از سه رقت متوالی را انتخاب کنید که دارای ردهٔ ۱ باشند در صورتی که بیش از یک حالت در ردهٔ ۱ وجود داشت حالتی را که دارای بیشترین لوله های مثبت است انتخاب کنید.

ب – در موارد یکه هیچ حالتی در ردهٔ یک قرار نداشت از حالتی که در ردهٔ دو قرار دارد استفاده کنید و اگر بیشتر از یک حالت در ردهٔ ۲ قرار داشت حالتی را که دارای بیشترین لوله های مثبت است انتخاب کنید.

پ – در صورتی که هیچ حالتی در ردهٔ دو قرار نداشت حالتی را در انتخاب کنید که در ردهٔ ۳ قرار گرفته باشد . در صورتی که بیش ار یک حالت در ردهٔ ۳ قرار داشت حالتی را که دارای بیشترین لوله های مثبت است انتخاب کنید.

در جدول ۱ برای محاسبهٔ نتایج MPN ، مثال های مختلفی ارائه شده است.

جدول ۱ – مثال هایی از انتخاب نتایج مثبت برای محاسبهٔ MPN

نمونه	تعداد لوله های مثبت به دست آمده از سه لوله تلقیح شده برای مقادیر معین زیر [a]					MPN[b]	
	فرآوردهٔ مایع ۱۰ ml سایر فرآورده ها ۱ g	۱ml $۱۰^{-۱}$g	$۱۰^{-۱}$ ml $۱۰^{-۲}$g	$۱۰^{-۲}$ ml $۱۰^{-۳}$g	$۱۰^{-۳}$ ml $۱۰^{-۴}$g	فرآوردهٔ مایع ($ml^{-۱}$)	سایر فرآورده ها ($g^{-۱}$)
۱	۳	۳	۲	۱	۰	$۱/۱ \times ۱۰^{۱}$	$۱/۱ \times ۱۰^{۲}$
۲	۳	۳	۳	۰		$۲/۴ \times ۱۰^{۱}$	$۲/۴ \times ۱۰^{۲}$
۳	۲	۲	۱	۱	۰	۷/۴	$۷/۴ \times ۱۰^{۱}$
۴	۳	۳	۰	۰	۰	۲/۴	$۲/۴ \times ۱۰^{۱}$
۵	۲	۲	۰	۱	۰	$۲/۱ \times ۱۰^{-۱}$	۲/۱

a اعدادی که پررنگ و زیر آن خط کشیده شده است حالات انتخاب شده می باشد.
b با استفاده از شاخص MPN محاسبه شده است (به جدول ب-۵ مراجعه شود)

۱۱-۵-۶-۳ برنامه های رایانه ای

توانمندترین برنامه های رایانه ای موجود هیچ محدودیتی در تعداد رقت ها و لوله های موازی یا سیستم MPN متقارن ایجاد نمی کند. برنامه های نرم افزاری MPN Assay Analyzer به صورت رایگان بر اساس برنامه های قدیمی در دسترس می باشد.

۱۱-۵-۷ بیان نتایج

از شاخص MPN مشخص شده در پیوست **ب** جدول ب-۵ (بر حسب ترکیب ۳ یا ۵ رقت متوالی) محتمل‌ترین تعداد میکروارگانیسم ها را در حجم معین تعیین کنید.

محتمل‌ترین تعداد میکروارگانیسم ها (یا گروه خاصی از میکروارگانیسم ها) را در هر گرم یا میلی لیتر از نمونه گزارش کنید. جرم یا وزن مرجع نمونه ممکن است متفاوت باشد. (برای مثال در ۱۰g یا ۱۰۰ml از نمونه).

۱۲ روش جستجو (روش کیفی)

۱۲-۱ کلیات

این روش وجود یا عدم وجود میکروارگانیسم های خاص را در مقدار معین از فرآورده تعیین می کند.

۱۲-۲ اساس روش

جز در موارد ذکر شده در استانداردهای مربوطه، مقدار p از فرآورده را با ۹×p ml یا ۹×p g از یک محیط کشت مایع اختصاصی و یا انتخابی برای فرآورده های مایع مخلوط و برای سایر فرآورده ها یکنواخت کنید.

برای تسهیل در احیاء میکروارگانیسم های تحت تنش قرار گرفته در مواد غذایی ، نمونه ها معمولاً در یک محیط مایع غیر انتخابی پیش غنی سازی شده و سپس در محیط کشت غنی کنندهٔ انتخابی منتقل می شود و برای جداسازی روی محیط کشت جامد انتخابی افتراقی کشت داده می شوند. استفاده از دو محیط کشت مایع غنی کننده مختلف و دو نوع یا بیشتر محیط کشت جامد انتخابی، حساسیت روش را افزایش می دهد.

پس از گرمخانه‌گذاری، با استفاده از لوپ از کشت به دست آمده روی سطح محیط کشت جامد انتخابی کشت داده به روشی که کلنی های مجزا ایجاد شود. محیط های کشت مایع غنی کننده گرمخانه‌گذاری شده را فقط در صورتی می توانید در یخچال نگهداری کنید که اثرات نگهداری محیط کشت در یخچال روی نتایج، ارزیابی شده باشد و در گزارش آزمون نیز به وضوح شرح داده شود.

تعدادی از کلنی های به دست آمده پس از گرمخانه‌گذاری روی محیط کشت جامد (معمولاً ۵ کلنی از هر پلیت) برای انجام آزمون های تاییدی مناسب برای شناسایی استفاده می شوند

انتخاب کلنی ها برای آزمون های تاییدی بهتر است بهتر است تمام کلنی های مشکوک را تحت پوشش داشته باشد.

۱۲-۳ عدم قطعیت اندازه گیری

عدم قطعیت برای اندازه گیری های کیفی توسط کمیتهٔ فنی فرآورده های غذایی ISO/TC 34/SC 9 در دست بررسی می باشد.

۱۳ آزمون های تاییدی

۱۳-۱ کلیات

برای آزمون های تاییدی بیوشیمیایی و سرولوژیکی فقط از کشت های خالص استفاده کنید.

آزمون های تاییدی مرجع در استانداردهای خاص بیان شده است . به عنوان جایگزین آزمون های بیوشیمیایی تعیین شده در استانداردهای خاص، آزمون های تاییدی ارائه شده و با شرایط تعیین شده در این بند اصلی (مجموعهٔ آزمون های بیوشیمیایی ، پروب های نوکلئیک) می تواند با شرایط مشخص شده در این استاندارد (جز در موارد ذکر شده در استانداردهای خاص) مورد استفاده قرار گیرد.

۱۳-۲ تهیه کشت خالص

برای تهیه کشت خالص یک کلنی منفرد را از سطح یا داخل محیط کشت جامد انتخاب کنید. سپس کلنی منتخب را بر محیط کشت جامد غیر انتخابی کشت دهید. پس از گرمخانه‌گذاری، کلنی های کاملاً مجزا را برای آزمون های تاییدی بعدی انتخاب کنید در صورتی که کلنی کاملاً مجزا به دست نیامده باشد این عمل را مجدداً تکرا کنید.

در صورت امکان آزمون تاییدی بهتر است با استفاده از کلنی منفرد انجام شود. در صورت ناکافی بودن مقدار کلنی منفرد برای انجام آزمون های تاییدی توصیه می شود ابتدا کلنی منفرد را در محیط کشت مایع یا یک محیط جامد شیب دار مجدداً کشت دهید سپس از آن برای انجام آزمون های تاییدی استفاده کنید.

۱۳-۳ رنگ آمیزی گرم[1] (روش اصلاح شده هوکر[2])

۱۳-۳-۱ کلیات

این روش رنگ آمیزی سلول های باکتری برای توصیف شکل ظاهری باکتری ها و طبقه بندی آن ها به دو گروه از نظر حفظ رنگ کریستال ویوله (گرم مثبت) تحت شرایط آزمون، به کار می رود. به طور کلی این تقسیم بندی به دلیل تفاوت در ا ساختار دیوارهٔ سلولی باکتری های دو گروه و همچنین تفاوت های اصلی دیگر بین دو گروه می باشد.

1- Gram’s stain
2- Modified Hucker technique

یک روش جایگزین مناسب برای رنگ آمیزی گرم استفاده از محلول ٪۳ هیدروکسید پتاسیم (KOH) می باشد. یک لوپ کامل از باکتری رشد یافته را در ۲ قطره محلول KOH روی لام شیشه ای کاملاً حل کنید . باکتری گرم منفی در مدت ۳۰s باعث چسبناک و موکوئیدی شدن محلول می شوند به گونه ای که با حرکت دادن لوپ به سمت بالا نوار کش دار ایجاد می شود.

روش های مختلفی برای رنگ آمیزی گرم وجود دارد ولی در تمام آن ها توالی مراحل مطابق با بند ۱۳-۳-۳ می باشد:

۱۳-۳-۲ محلول ها

۱۳-۳-۲-۱ کلیات

می توان از محلول های آمادهٔ قابل دسترس در بازار استفاده کرد.

در صورت استفاده از محلول های آماده، طبق توصیه های سازنده عمل کنید.

۱۳-۳-۲-۲ محلول کریستال ویوله

۱۳-۳-۲-۲-۱ مواد تشکیل دهنده

نام مواد	مقدار
کریستال ویوله	۲٫۰ g
اتانول (٪۹۵)	۲۰ ml
آمونیوم اگزالات	۰٫۸ g
آب مقطر	۸۰ ml

۱۳-۳-۲-۲-۲ روش تهیه :

پودر کریستال ویوله را در اتانول حل کنید. آمونیوم اگزالات را در آب مقطر حل کنید . این دو محلول را مخلوط کنید و پیش از استفاده آن را به مدت ۲۴h اجازه دهید بماند.

۱۳-۳-۲-۳ محلول ید

۱۳-۳-۲-۳-۱ مواد تشکیل دهنده

نام مواد	مقدار
ید	۱/۰ g
یدید پتاسیم (KI)	۲/۰ g
آب مقطر	۱۰۰ ml

۱۳-۳-۲-۳-۲ روش تهیه:

یدید پتاسیم را در ۱۰ml آب مقطر حل کنید و ید را کم کم به آن اضافه کنید. پس از حل شدن در بالن حجم سنجی به حجم ۱۰۰ ml برسانید.

۱۳-۳-۲-۴ محلول سافرانین

۱۳-۳-۲-۴-۱ مواد تشکیل دهنده

نام مواد	مقدار
سافرانین	۰/۲۵ g
اتانول (٪۹۵)	۱۰ ml
آب مقطر	۱۰۰ ml

۱۳-۳-۲-۴-۲ روش تهیه :

سافرانین را در اتانول حل کرده و سپس با آب مقطر مخلوط کنید.

۱۳-۳-۳ روش رنگ آمیزی

یک لایهٔ نازک از یک کشت تازهٔ ۱۸ تا ۲۴ ساعته یا پس از ایجاد کدورت در محیط کشت مایع یک گستره روی لام تهیه کرده و پس از خشک شدن در هوا با شعله آن را ثبیت کنید سپس :

الف- لام را با محلول کریستال ویوله (طبق بند ۱۳-۳-۲-۲) بپوشانید و مدت یک دقیقه صبر کنید؛

ب- در حالیکه لام را به صورت مایل نگهداشته اید، به آرامی به مدت چند ثانیه با آب بشویید؛

پ- لام را با محلول ید (طبق بند ۱۳-۳-۲-۳) بپوشانید و به مدت یک دقیقه صبر کنید؛

ت- در حالیکه لام را به صورت مایل نگهداشته اید ، به آرامی به مدت چند ثانیه با آب بشویید؛

ث- در حالیکه لام را به صورت مایل نگهداشته اید ، بـه آرامـی و بـه طـور پیوسـته اتـانول ٪۹۵ را روی لام بریزید تا زمانی که رنگ کریستال ویوله دیگر شسته نشود و این زمان بیشتر از ۳۰s نشود؛

ج- برای حذف اتانول لام را به آرامی با آب بشویید؛

چ- لام را با محلول سافرانین به مدت ۱۰s بپوشانید سپس به آرامی با آب بشویید؛

ح- لام را خشک کنید.

۱۳-۳-۴ تفسیر

لام را زیر میکروسکوپ دارای عدسی روغنی[1] با بزرگنمایی بالا مشاهده کنید. آن دسته از سلول های باکتری که رنگ آبی تا بنفش را به خود گرفته اند گرم مثبت (+ GRAM) و آن دسته که رنگ صورتی پر رنـگ تـا قرمز دارند گرم منفی (– GRAM) می باشند.

در رنگ آمیزی از کشت خالص انواعی از باکتری های خاص، شامل سلول های گرم مثبـت و گـرم منفـی در یک میدان میکروسکوپ مشاهده می شود.

یادآوری- تراکم سلول ها روی گستره ممکن است پاسخ نامشخص ایجاد کند.

۱۳-۴ استفاده از مجموعه آزمون های بیوشیمیایی برای شناسایی

مجموعه آزمون های بیوشیمیایی در دسترس می تواند برای شناسایی کلنی های جدا شده استفاده شود.

مناسب بودن مجموعه آزمون های بیوشیمیایی را با استفاده از تحقیقات علمی منتشر شده در مراجـع علمـی بین المللی ترجیحاً مربوط به میکروبیولوژی مواد غذایی[2] تصدیق کنید. این نوع تصدیق بـه ویـژه در مـواردی که سازنده داده های اعتبار سنجی برای مجموعه آزمون های بیوشیمیایی خود ارائه نداده است، اهمیت دارد.

آزمایشگاه باید ضمن مشخص کردن سویهٔ آزمون، برای هر سری ساخت، گواهی کنترل را داشته باشد.

سازنده باید سویه های کنترل را که آزمایشگاه ممکـن اسـت بـرای تـصدیق کـارایی مجموعـه آزمـون هـای بیوشیمیایی مورد استفاده قرار دهد، مشخص کند.

مجموعه آزمون ها باید حداقل شامل آزمون های بیوشیمیایی ارائه شده در استانداردهای خاص باشـد یـا بـه وسیلهٔ آزمون های دیگر تکمیل شود.

1- Oil objective

۲ - برای هر میکروارگانیسم هر گونه اطلاعات بهتر است مرتبط با مرکز مرجع ملی، منطقه ای یا بین المللی باشد.

۱۳-۵ استفاده از پروب های نوکلئیک[1] برای شناسایی

پروب های نوکلئیک موجود در دسترس را می توان برای شناسایی کلنی های جدا شده به کار برد.
مناسب بودن پروب های نوکلئیک را با استفاده از تحقیقات علمی منتشر شده در مراجع علمی بین المللی ترجیحاً مربوط به میکروبیولوژی مواد غذایی تصدیق کنید. این نوع تصدیق به ویژه در مواردی که سازنده اطلاعات معتبری برای پروب های نوکلئیک نداشته باشد اهمیت دارد.
آزمایشگاه باید ضمن مشخص کردن سویهٔ آزمون، برای هر سری ساخت، گواهی کنترل را داشته باشد.
سازنده باید سویه های کنترل را که آزمایشگاه ممکن است برای تصدیق کارایی پروب های نوکلئیک مورد استفاده قرار دهد، مشخص کند.

۱۳-۶ آزمون های سرولوژیکی

۱۳-۶-۱ کلیات

در صورت نیاز به انجام آزمون های تاییدی سرولوژیکی، پس از شناسایی بیوشیمیایی کلنی های جدا شده، آزمون را انجام دهید.

۱۳-۶-۲ آزمون های آگلوتیناسیون[2] روی لام

واکنش های آنتی ژن – آنتی بادی سبب تجمع سلول های باکتری به شکل تودهٔ به هم چسبیده[3] یا گرانول های متراکم می شود. برای باکتری های از خانواده انتروباکتریاسه ، اگر آنتی ژن H (مربوط به تاژک[4]) با آنتی سرم مربوطه واکنش دهد آگلوتیناسیون به صورت توده به هم چسبیده و اگر آنتی ژن O (مربرط به جسم باکتری[5]) با آنتی سرم مربوطه واکنش دهد آگلوتیناسیون به صورت توده گرانولی متراکم می باشد.
پیش از آگلوتیناسیون با آنتی سرم ها بهتر است آگلوتیناسیون در محلول سدیم کلراید (٪۳ وزنی) انجام شود. در صورتی که باکتری دارای خاصیت خودآگلوتیناسیون باشد این سویه نباید برای آزمون آگلوتیناسیون با آنتی سرم استفاده شود.
به طور معمول آنتی سرم های قابل دسترس از بازار دو نوع می باشند: آنتی سرم های پلی والان[6] که با جنس های خاصی از میکروارگانیسم ها یا گروه هایی از سرووارها[7] واکنش نشان می دهند و برای بررسی

1- Nucleic probes
2- Agglutination
3- Flocculent
4- Flagellar
5- Somatic
6- Polyvalent
7- Serovars

اولیه مناسب می باشند. دسته دوم آنتی بادی های مونوکلونال[1] اختصاصی هستند که استفاده از آن ها اجازهٔ شناسایی یک سرووار خاص را می توان شناسایی کرد.

آزمایشگاه باید ضمن مشخص کردن سویهٔ آزمون، برای هر سری ساخت، گواهی کنترل را داشته باشد.

مناسب بودن آزمون های آگلوتیناسیون را با استفاده از تحقیقات علمی منتشر شده در مراجع علمی بین المللی ترجیحاً مربوط به میکروبیولوژی مواد غذایی تصدیق کنید. این نوع تصدیق به ویژه در مواردی که سازنده اطلاعات معتبری برای آزمون های آگلوتیناسیون نداشته باشد اهمیت دارد.

هنگام استفاده از واکنشگرها ، توصیه می شود کنترل های مثبت و منفی مناسب استفاده شود.

۱۳-۶-۳ آزمون آگلوتیناسیون لاتکس[2]

یک روش سریعتر که به صورت آماده قابل دسترس از بازار است استفاده از ذرات لاتکس پوشیده شده با آنتی بادی‌های اختصاصی می باشد (برای مثال *E.coli* O157 یا *استافیلوکوکوس*). آنتی ژن در محلول استخراج شده در برابر محدوده ای از واکنشگرهای لاتکس آزمون می شود.

مناسب بودن آزمون های آگلوتیناسیون لاتکس را با با استفاده از تحقیقات علمی منتشر شده در مراجع علمی بین المللی ترجیحاً مربوط به میکروبیولوژی مواد غذایی تصدیق کنید. این نوع تصدیق به ویژه در مواردی که سازنده اطلاعات معتبری برای آزمون های آگلوتیناسیون لاتکس نداشته باشد اهمیت دارد.

آزمایشگاه باید ضمن مشخص کردن سویهٔ آزمون، برای هر سری ساخت ،گواهی کنترل را داشته باشد.

توصیه می شود هنگام استفاده از واکنشگرها ، توصیه می شود از کنترل های مثبت و منفی مناسب استفاده شود.

۱۴ گزارش آزمون

گزارش آزمون روش آزمون و در صورت لزوم درجهٔ حرارت گرمخانه‌گذاری و نتایج به دست آمده را مشخص کند. همچنین جزئیات عملیاتی را که در این استاندارد تعیین نشده را نیز ارائه کند. در گزارش آزمون نکات اختیاری در روش آزمون و جزئیات هر رویدادی که ممکن است روی نتایج آزمون تاثیر گذار باشد نیز باید مشخص شود.

همچنین گزارش آزمون، سایر آزمون های انجام شده آزمون ها توسط آزمایشگاه های مرجع را باید مشخص کند

گزارش آزمون بهتر است شامل تمام اطلاعات لازم برای شناسایی کامل نمونه و همچنین تفسیر نتایج باشد.

1- Monoclonal
2- Latex

توصیه می شود گزارش آزمون شامل عدم قطعیت اندازه‌گیری کـه مطـابق بـا اسـتاندارد ملـی ایـران شـمارهٔ ۱۹۰۳۶ تعیین شده است، باشد.

۱۵ صحه گذاری روش های میکروبیولوژی

۱۵-۱ صحه گذاری روش های مرجع

صحه‌گذاری روش های مرجع توسط کمیتهٔ فنی میکروبیولـوژی مـواد غـذائی ISO/TC 34/SC 9 در دسـت بررسی می باشد.

۱۵-۲ صحه‌گذاری روش های جایگزین

برای صحه‌گذاری روش های جایگزین در مقابل روش های مرجع به استاندارد ISO 16140 مراجعه شود .

۱۵-۳ صحه‌گذاری روش های داخلی[1]

صحه‌گذاری روش های داخلی توسط کمیتهٔ فنی میکروبیولـوژی مـواد غـذائی ISO/TC 34/SC 9 در دسـت بررسی می باشد.

۱۶ تضمین کیفیت نتایج و/یا کنترل کیفیت عملکرد

۱۶-۱ کنترل کیفیت داخلی

۱۶-۱-۱کنترل کیفیت داخلی شامل تمام روش های به کار رفته توسط یک آزمایشگاه برای ارزیابی پیوسـتهٔ کار می باشد. هدف اصلی حصول اطمینان از هماهنگی نتایج به طور مستمر و مطابقت آن ها بـا معیارهـای کاملا مشخص می باشد.

۱۶-۱-۲برنامهٔ بررسی های دوره‌ای برای تعیین تحت کنترل بودن تغییرپذیری[2] (بین آزمون ها، تجهیزات و مواد) لازم می باشد. این برنامه باید تمام آزمون ها در دامنهٔ کاربرد آزمایشگاه را در بر گیرد.

این برنامه ممکن است شامل:

الف- استفاده از نمونه های اسپایک با سطوح آلودگی متغیر دارای فلور زمینه‌ای و مورد نظر؛

ب- استفاده از اسپایک و/یا نمونه های آلوده شده طبیعی در دامنه‌ای از ماتریکس‌ها ؛

پ- استفاده از مواد مرجع(RM) شامل آزمون های کفایت تخصصی(PT) ؛

ت- انجام آزمون مجدد روی نمونه ؛

ث- ارزیابی مجدد نتایج آزمون.

1- In-house
2- Variability

فاصلهٔ بین این کنترل ها تحت تاثیر ماهیت و تناوب آزمون های انجام شده به وسیله آزمایشگاه و می باشد. توصیه می شود در صورت امکان آزمون ها برای پایش عملکرد همراه با به کار بردن کنترل ها انجام شود.

۱۶-۱-۳ در موارد خاص، یک آزمایشگاه ممکن است یک آزمون خاص را به ندرت انجام دهد. در این موارد یک برنامه کنترل کیفیت داخلی مستمر ممکن است مناسب نباشد و برای نشان دادن عملکرد مطلوب ممکن است یک طرح که به موازات آزمون انجام می شود مناسب‌تر باشد.

.

۱۶-۲ سویه های مرجع

برای نگهداری از سویه های مرجع به استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲-۸۶۶۳ مراجعه شود.

۱۶-۳ ارزیابی کیفیت خارجی(آزمون های کفایت تخصصی PT)

آزمایشگاه ها باید به طور منظم در آزمون های کفایت تخصصی PT مربوط به دامنهٔ فعالیت خود شرکت کنند. توصیه می شود آزمون های کفایت تخصصی ترجیحا با استفاده از مواد زمینه ای مناسب انجام شود. توصیه می شود آزمایشگاه ها برای ارزیابی اریبی[1] آزمایشگاه علاوه بر استفاده از آزمونهای کفایت تخصصی اعتباربخشی کلی سیستم کیفیت آزمایشگاه را نیز بررسی کنند.

1- Bias

پیوست الف

(اطلاعاتی)

خصوصیات برخی از ضدعفونی کننده ها

جدول الف-۱ : خصوصیات برخی از ضدعفونی کننده ها

ضد عفونی کننده	موثر روی:								غیر فعال می شوند با :					سمیت		
	قارچ ها	باکتری ها		مایکوباکتری ها	اسپورها	ویروس های لیپیدی	ویروس های غیر لیپیدی	پروتئین	مواد طبیعی	مواد مصنوعی	آب سخت	پاک کننده	پوست	چشم	ریه
		گرم مثبت	گرم منفی												
هیپو کلریت	+	+++	+++	++	++	+	+	+++	+	+	+	C	+	+	+
الکل ها	_	+++	+++	+++	_	+	V	+	+	+	+	_		+	
فرمالدئید	+++	+++	+++	+++	+++[a]	+	+	+	+	+	+	_	+	+	+
گلوتارآلدئید	+++	+++	+++	+++	+++[b]	+	+	NA	+	+	+	NA	++	++	++
یدوفورها	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+++	+	+	+	A	+	+	_

+++ خوب
++ متوسط
+ کم
- صفر
V بستگی به نوع ویروس
C کاتیونی
A آنیونی
NA کاربرد ندارد
a بیش از ۴۰°C
b بیش از ۲۰°C

پیوست ب

(اطلاعاتی)

شمارش محتمل ترین تعداد (MPN)

جدول ب-۱ : شاخص های MPN در آزمونه و حدود اطمینان ٪۹۵ برای سری ۱۰ لوله ای

تعداد لوله های مثبت	سری ۱۰ لوله ای			
	MPN	عدم قطعیت استاندارد $\log_{10}$ MPN	حدود اطمینان ٪۹۵	
			حد پایینی	حد بالایی
۱	۰/۱۱	۰/۴۳۵	۰/۰۲	۰/۷۵
۲	۰/۲۲	۰/۳۰۸	۰/۰۶	۰/۸۹
۳	۰/۳۶	۰/۲۵۲	۰/۱۱	۱/۱۱
۴	۰/۵۱	۰/۲۲۰	۰/۱۹	۱/۳۸
۵	۰/۶۹	۰/۱۹۸	۰/۲۸	۱/۶۹
۶	۰/۹۲	۰/۱۸۴	۰/۴۰	۲/۱۰
۷	۱/۲۰	۰/۱۷۴	۰/۵۵	۲/۶۴
۸	۱/۶۱	۰/۱۷۱	۰/۷۵	۳/۴۸
۹	۲/۳۰	۰/۱۷۹	۱/۰۳	۵/۱۶

جدول ب-۲ : شاخص های MPN در آزمونه و حدود اطمینان ٪۹۵ برای سری ۱۵ لوله ای

تعداد لوله های مثبت	سری ۱۵ لوله ای			
	MPN	عدم قطعیت استاندارد $\log_{10}$ MPN	حدود اطمینان ٪۹۵	
			حد پایینی	حد بالایی
۱	۰/۰۷	۰/۴۳۴	۰/۰۱	۰/۴۹
۲	۰/۱۴	۰/۳۰۷	۰/۰۴	۰/۵۷
۳	۰/۲۲	۰/۲۵۱	۰/۰۷	۰/۶۹
۴	۰/۳۱	۰/۲۱۸	۰/۱۲	۰/۸۳
۵	۰/۴۱	۰/۱۹۶	۰/۱۷	۰/۹۸
۶	۰/۵۱	۰/۱۷۹	۰/۲۳	۱/۱۵
۷	۰/۶۳	۰/۱۶۷	۰/۳۰	۱/۳۳
۸	۰/۷۶	۰/۱۵۷	۰/۳۷	۱/۵۵
۹	۰/۹۲	۰/۱۵۰	۰/۴۷	۱/۸۰
۱۰	۱/۱۰	۰/۱۴۴	۰/۵۷	۲/۱۱
۱۱	۱/۳۲	۰/۱۴۱	۰/۷۰	۲/۴۹
۱۲	۱/۶۱	۰/۱۳۹	۰/۸۶	۳/۰۲
۱۳	۲/۰۱	۰/۱۴۲	۱/۰۶	۳/۸۲
۱۴	۲/۷۱	۰/۱۵۵	۱/۳۵	۵/۴۵

جدول ب-۳ : شاخص های MPN در آزمونه و حدود اطمینان ٪۹۵ برای سری ۲۰ لوله ای

تعداد لوله های مثبت	سری ۲۰ لوله ای			
	MPN	عدم قطعیت استاندارد $\log_{10}$ MPN	حدود اطمینان ٪۹۵	
			حد پایینی	حد بالایی
۱	۰/۰۵	۰/۴۳۴	۰/۰۱	۰/۳۶
۲	۰/۱۱	۰/۳۰۷	۰/۰۳	۰/۴۲
۳	۰/۱۶	۰/۲۵۱	۰/۰۵	۰/۵۰
۴	۰/۲۲	۰/۲۱۸	۰/۰۸	۰/۶۰
۵	۰/۲۹	۰/۱۹۵	۰/۱۲	۰/۶۹
۶	۰/۳۶	۰/۱۷۸	۰/۱۶	۰/۸۰
۷	۰/۴۳	۰/۱۶۵	۰/۲۰	۰/۹۱
۸	۰/۵۱	۰/۱۵۵	۰/۲۵	۱/۰۳
۹	۰/۵۹	۰/۱۴۷	۰/۳۱	۱/۱۶
۱۰	۰/۶۹	۰/۱۴۰	۰/۳۷	۱/۳۰
۱۱	۰/۸۰	۰/۱۳۴	۰/۴۴	۱/۴۶
۱۲	۰/۹۲	۰/۱۳۰	۰/۵۱	۱/۶۵
۱۳	۱/۰۵	۰/۱۲۶	۰/۵۹	۱/۸۵
۱۴	۱/۲۰	۰/۱۲۳	۰/۶۹	۲/۱۰
۱۵	۱/۳۹	۰/۱۲۱	۰/۸۰	۲/۴۰
۱۶	۱/۶۱	۰/۱۲۱	۰/۹۳	۲/۷۷
۱۷	۱/۹۰	۰/۱۲۲	۱/۰۹	۳/۲۹
۱۸	۲/۳۰	۰/۱۲۷	۱/۳۰	۴/۰۸
۱۹	۳/۰۰	۰/۱۴۱	۱/۵۸	۵/۶۷

جدول ب-۴ : شاخص های MPN در آزمونه و حدود اطمینان ٪۹۵ برای سری ۲۵ لوله ای

تعداد لوله های مثبت	سری ۲۵ لوله ای			
	MPN	عدم قطعیت استاندارد $\log_{10}$ MPN	حدود اطمینان ٪۹۵	
			حد پایینی	حد بالایی
۱	۰/۰۴	۰/۴۳۴	۰/۰۱	۰/۲۹
۲	۰/۰۸	۰/۳۰۷	۰/۰۲	۰/۳۳
۳	۰/۱۳	۰/۲۵۱	۰/۰۴	۰/۴۰
۴	۰/۱۷	۰/۲۱۷	۰/۰۷	۰/۴۷
۵	۰/۲۲	۰/۱۹۵	۰/۰۹	۰/۵۴
۶	۰/۲۷	۰/۱۷۸	۰/۱۲	۰/۶۱
۷	۰/۳۳	۰/۱۶۵	۰/۱۶	۰/۶۹
۸	۰/۳۹	۰/۱۵۴	۰/۱۹	۰/۷۷
۹	۰/۴۵	۰/۱۴۶	۰/۲۳	۰/۸۶
۱۰	۰/۵۱	۰/۱۳۹	۰/۲۷	۰/۹۶
۱۱	۰/۵۸	۰/۱۳۳	۰/۳۲	۱/۰۶
۱۲	۰/۶۵	۰/۱۲۸	۰/۳۷	۱/۱۶
۱۳	۰/۷۳	۰/۱۲۳	۰/۴۲	۱/۲۸
۱۴	۰/۸۲	۰/۱۱۹	۰/۴۸	۱/۴۱
۱۵	۰/۹۲	۰/۱۱۶	۰/۵۴	۱/۵۵
۱۶	۱/۰۲	۰/۱۱۳	۰/۶۱	۱/۷۰
۱۷	۱/۱۴	۰/۱۱۱	۰/۶۹	۱/۸۸
۱۸	۱/۲۷	۰/۱۰۹	۰/۷۸	۲/۰۹
۱۹	۱/۴۳	۰/۱۰۸	۰/۸۸	۲/۳۳
۲۰	۱/۶۱	۰/۱۰۸	۰/۹۹	۲/۶۲
۲۱	۱/۸۳	۰/۱۰۹	۱/۱۲	۲/۹۹
۲۲	۲/۱۲	۰/۱۱۱	۱/۲۹	۳/۵۰
۲۳	۲/۵۳	۰/۱۱۷	۱/۴۹	۴/۲۸
۲۴	۳/۲۲	۰/۱۲۳	۱/۷۷	۵/۸۵

جدول ب-۵ : راهنمای MPN و حدود اطمینان ٪۹۵ برای سری ۹ لوله ای

(۳ آزمونهٔ ۱g ، آزمونهٔ ۰/۱g و ۳ آزمونهٔ ۰/۰۱g)

تعداد نتایج مثبت			شاخص MPN	گروه[a]	حدود اطمینان (٪۹۵)[b]	
					حد پایینی	حد بالایی
۰	۰	۰	<۰/۳۰		۰/۰۰	۰/۹۴
۰	۰	۱	۰/۳۰	۳	۰/۰۱	۰/۹۵
۰	۱	۰	۰/۳۰	۲	۰/۰۱	۱
۰	۱	۱	۰/۶۱	۰	۰/۱۲	۱/۷
۰	۲	۰	۰/۶۲	۳	۰/۱۲	۱/۷
۰	۳	۰	۰/۹۴	۰	۰/۳۵	۳/۵
۱	۰	۰	۰/۳۶	۱	۰/۰۲	۱/۷
۱	۰	۱	۰/۷۲	۲	۰/۱۲	۱/۷
۱	۰	۲	۱/۱	۰	۰/۴	۳/۵
۱	۱	۰	۰/۷۴	۱	۰/۱۳	۲
۱	۱	۱	۱/۱	۳	۰/۴	۳/۵
۱	۲	۰	۱/۱	۲	۰/۴	۳/۵
۱	۲	۱	۱/۵	۳	۰/۵	۳/۸
۱	۳	۰	۱/۶	۳	۰/۵	۳/۸
۲	۰	۰	۰/۹۲	۱	۰/۱۵	۳/۵
۲	۰	۱	۱/۴	۲	۰/۴	۳/۵
۲	۰	۲	۲/۰	۰	۰/۵	۳/۸
۲	۱	۰	۱/۵	۱	۰/۴	۳/۸
۲	۱	۱	۲/۰	۲	۰/۵	۳/۸
۲	۱	۲	۲/۷	۰	۰/۹	۹/۴
۲	۲	۰	۲/۱	۱	۰/۵	۴
۲	۲	۱	۲/۸	۳	۰/۹	۹/۴
۲	۲	۲	۳/۵	۰	۰/۹	۹/۴
۲	۳	۰	۲/۹	۳	۰/۹	۹/۴
۲	۳	۱	۳/۶	۰	۰/۹	۹/۴

جدول ب-۵ : ادامه

تعداد نتایج مثبت			شاخص MPN	گروه	حدود اطمینان (٪۹۵)	
					حد پایینی	حد پایینی
۳	۰	۰	۲/۳	۱	۰/۵	۹/۴
۳	۰	۱	۳/۸	۱	۰/۹	۱۰/۴
۳	۰	۲	۶/۴	۳	۱/۶	۱۸/۱
۳	۱	۰	۴/۳	۱	۰/۹	۱۸/۱
۳	۱	۱	۷/۵	۱	۱/۷	۱۹/۹
۳	۱	۲	۱۲	۳	۳	۳۶
۳	۱	۳	۱۶	۰	۳	۳۸
۳	۲	۰	۹/۳	۱	۱/۸	۳۶
۳	۲	۱	۱۵	۱	۳	۳۸
۳	۲	۲	۲۱	۲	۳	۴۰
۳	۲	۳	۲۹	۳	۹	۹۹
۳	۳	۰	۲۴	۱	۴	۹۹
۳	۳	۱	۴۶	۱	۹	۱۹۸
۳	۳	۲	۱۱۰	۱	۲۰	۴۰۰
۳	۳	۳	>۱۱۰			

a به جدول ب-۶ مراجعه شود.

b حدود اطمینان داده شده در جدول ب-۵ فقط به منظور نشان دادن تاثیر نوسانات آماری بر روی نتایج حاصله ارائه شده است. منابع دیگری برای ایجاد این نوسانات وجود دارد که گاهی اوقات می تواند بسیار با اهمیت باشد.

جدول ب-۶ : تفسیر نتایج گروه ها

رده	تعریف
۱	هنگامی که تعداد میکروارگانیسم ها در فرآورده برابر MPN است، نتیجه به دست آمده بیشترین شانس را دارد که به عدد واقعی نزدیک باشد. در این حالت حداکثر ٪۵ شانس به دست آمدن نتیجه ای وجود دارد که احتمال آن کمتر از حداقل در نظر گرفته شده در این رده باشد.
۲	هنگامی که تعداد میکروارگانیسم ها در فرآورده برابر MPN است، نتیجه به دست آمده نسبت به رده ۱ شانس کمتری دارد که به عدد واقعی نزدیک باشد. در این حالت حداکثر ٪۱ شانس به دست آمدن نتیجه ای وجود دارد که احتمال آن کمتر از حداقل در نظر گرفته شده در این رده باشد
۳	هنگامی که تعداد میکروارگانیسم ها در فرآورده برابر MPN است، نتیجه به دست آمده نسبت به رده ۲ شانس کمتری دارد که به عدد واقعی نزدیک باشد. در این حالت حداکثر ٪۰/۱ شانس به دست آمدن نتیجه ای وجود دارد که احتمال آن کمتر از حداقل در نظر گرفته شده در این رده باشد
صفر	هنگامی که تعداد میکروارگانیسم ها در فرآورده برابر MPN است، نتیجه به دست آمده نسبت به رده ۳ شانس کمتری دارد که به عدد واقعی نزدیک باشد و فقط ٪۰/۱ شانس به دست آمدن نتیجه ای بدون اشتباه در این رده وجود دارد.
یادآوری - پیش از شروع آزمون ردهٔ قابل قبول برای انجام آزمون باید تعیین شود (یعنی فقط ردهٔ ۱، ۱ و ۲ یا حتی ۱، ۲ و ۳). چنانچه تصمیم گیری بر اساس نتایج ردهٔ ۱ یا در بیشتر مواقع ردهٔ ۱ و ۲ قابل قبول باشد، به نتایج ردهٔ صفر باید شک کرد.	

جدول ب-۷ : راهنمای MPN و حدود اطمینان ٪۹۵ برای سری ۱۵ لوله ای

(۵ آزمونهٔ ۱g ، ۵ آزمونهٔ ۰/۱g و ۵ آزمونهٔ ۰/۰۱g)

تعداد لوله های مثبت			MPN	حدود اطمینان ٪۹۵	
۵ آزمونهٔ ۱g	۵ آزمونهٔ ۰/۱g	۵ آزمونهٔ ۰/۰۱g	(در گرم)	حد پایینی	حد بالایی
۰	۰	۰	<۰/۲	<۰/۱	۰/۷
۰	۱	۰	۰/۲	<۰/۱	۰/۷
۰	۲	۰	۰/۴	<۰/۱	۱/۱
۱	۰	۰	۰/۲	<۰/۱	۰/۷
۱	۰	۱	۰/۴	<۰/۱	۱/۱
۱	۱	۰	۰/۴	<۰/۱	۱/۱
۱	۱	۱	۰/۶	<۰/۱	۱/۵
۲	۰	۰	۰/۵	<۰/۱	۱/۳
۲	۰	۱	۰/۷	۰/۱	۱/۷
۲	۱	۰	۰/۷	۰/۱	۱/۷
۲	۱	۱	۰/۹	۰/۲	۲/۱
۲	۲	۰	۰/۹	۰/۲	۲/۱
۲	۳	۰	۱/۲	۰/۳	۲/۸
۳	۰	۰	۰/۸	۰/۱	۱/۹
۳	۰	۱	۱/۱	۰/۲	۲/۵
۳	۱	۰	۱/۱	۰/۲	۲/۵
۳	۱	۱	۱/۴	۰/۴	۳/۴
۳	۲	۰	۱/۴	۰/۴	۳/۴
۳	۲	۱	۱/۷	۰/۵	۴/۶
۳	۳	۰	۱/۷	۰/۵	۴/۶
۴	۰	۰	۱/۳	۰/۳	۳/۱

جدول ب-۷ : ادامهٔ

تعداد لوله های مثبت			MPN	حدود اطمینان ٪۹۵	
۵ آزمونهٔ ۱g	۵ آزمونهٔ ۰/۱g	۵ آزمونهٔ ۰/۰۱g	(در گرم)	حد پایینی	حد بالایی
۴	۰	۱	۱/۷	۰/۵	۴/۶
۴	۱	۰	۱/۷	۰/۵	۴/۶
۴	۱	۱	۲/۱	۰/۷	۶/۳
۴	۱	۲	۲/۶	۰/۹	۷/۸
۴	۲	۰	۲/۲	۰/۷	۶/۷
۴	۲	۱	۲/۶	۰/۹	۷/۸
۴	۳	۰	۲/۷	۰/۹	۸
۴	۳	۱	۳/۳	۱/۱	۹/۳
۴	۴	۰	۳/۴	۱/۲	۹/۳
۵	۰	۰	۲/۳	۰/۷	۷
۵	۰	۱	۳/۱	۱/۱	۸/۹
۵	۰	۲	۴/۳	۱/۵	۱۱
۵	۱	۰	۳/۳	۱/۱	۹/۳
۵	۱	۱	۴/۶	۱/۶	۱۲
۵	۱	۲	۶/۳	۲/۱	۱۵
۵	۲	۰	۴/۹	۱/۷	۱۳
۵	۲	۱	۷	۲/۳	۱۷
۵	۲	۲	۹/۴	۲/۸	۲۲
۵	۳	۰	۷/۹	۲/۵	۱۹
۵	۳	۱	۱۱	۳/۱	۲۵
۵	۳	۲	۱۴	۳/۷	۳۴
۵	۳	۳	۱۸	۴/۴	۵۰

جدول ب-۷ : ادامهٔ

تعداد لوله های مثبت			MPN	حدود اطمینان ٪۹۵	
۵ آزمونهٔ ۱g	۵ آزمونهٔ ۱g	۵ آزمونهٔ ۱g	(در گرم)	حد پایینی	حد بالایی
۵	۴	۰	۱۳	۳/۵	۳۰
۵	۴	۱	۱۷	۴/۳	۴۹
۵	۴	۲	۲۲	۵/۷	۷۰
۵	۴	۳	۲۸	۹	۸۵
۵	۴	۴	۳۵	۱۲	۱۰۰
۵	۵	۰	۲۴	۶/۸	۷۵
۵	۵	۱	۳۵	۱۲	۱۰۰
۵	۵	۲	۵۴	۱۸	۱۴۰
۵	۵	۳	۹۲	۳۰	۳۲۰
۵	۵	۴	۱۶۰	۶۴	۵۸۰
۵	۵	۵	>۱۸۰	-	-

ICS:07.100.30

صفحه : ۹۶