INSO
9899
1st.Edition
2016

جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran
سازمان ملی استاندارد ایران
Iranian National Standardization Organization

استاندارد ملی ایران
۹۸۹۹
تجدیدنظر اول
۱۳۹۴

میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- الزامات کلی و راهنما برای آزمون‌های میکروبیولوژی

Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations

ICS:07.100.30

سازمان ملی استاندارد ایران

تهران، ضلع جنوب غربی میدان ونک، خیابان ولیعصر، پلاک ۲۵۹۲

صندوق‌پستی: ۶۱۳۹-۱۴۱۵۵ تهران- ایران

تلفن: ۵-۸۸۸۷۹۴۶۱

دورنگار: ۸۸۸۸۷۰۸۰ و ۸۸۸۸۷۱۰۳

کرج ، شهر صنعتی، میدان استاندارد

صندوق پستی: ۱۶۳-۳۱۵۸۵ کرج - ایران

تلفن: ۸- ۳۲۸۰۶۰۳۱ (۰۲۶)

دورنگار: ۳۲۸۰۸۱۱۴ (۰۲۶)

رایانامه: standard@isiri.org.ir

وبگاه: http://www.isiri.org

Iranian National Standardization Organization (INSO)

No.1294 Valiasr Ave., South western corner of Vanak Sq., Tehran, Iran

P. O. Box: 14155-6139, Tehran, Iran

Tel: + 98 (21) 88879461-5

Fax: + 98 (21) 88887080, 88887103

Standard Square, Karaj, Iran

P.O. Box: 31585-163, Karaj, Iran

Tel: + 98 (26) 32806031-8

Fax: + 98 (26) 32808114

Email: standard@isiri.org.ir

Website: http://www.isiri.org

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

سازمان ملی استاندارد ایران به موجب بند یک مادهٔ ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفهٔ تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) ایران را به عهده دارد.

تدوین استاندارد در حوزه‌های مختلف در کمیسیون‌های فنی مرکب از کارشناسان سازمان، صاحب‌نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می‌شود و کوششی 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 واردکنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان‌های دولتی و غیردولتی حاصل می‌شود. پیش‌نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی‌نفع و اعضای کمیسیون‌های 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 می‌شود.

پیش‌نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان‌های علاقه‌مند و ذی‌صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می‌کنند درکمیته ملی طرح، بررسی و درصورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می‌شود. بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می‌شود که بر اساس مقررات استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تدوین و در کمیتهٔ ملی استاندارد مربوط که در سازمان ملی استاندارد ایران تشکیل می‌شود به تصویب رسیده باشد.

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

سازمان ملی استاندارد ایران می‌تواند با رعایت موازین پیش‌بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف‌کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست‌محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و/یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری کند. سازمان می‌تواند به منظور حفظ بازارهای بین‌المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری کند. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده‌کنندگان از خدمات سازمان‌ها و مؤسسات فعال در زمینهٔ مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدورگواهی سیستم‌های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی، آزمایشگاه‌ها و مراکز واسنجی (کالیبراسیون) وسایل سنجش، سازمان ملی استاندارد این‌گونه سازمان‌ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می‌کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامهٔ تأیید صلاحیت به آن‌ها اعطا و بر عملکرد آن‌ها نظارت می‌کند. ترویج دستگاه بین‌المللی یکاها، واسنجی وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این سازمان است.

1- International Organization for Standardization
2- International Electrotechnical Commission
3- International Organization for Legal Metrology (Organisation Internationale de Metrologie Legals)
4- Contact point
5- Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

«میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- الزامات کلی و راهنما برای آزمون‌های میکروبیولوژی »

(تجدید نظر اول)

رئیس:	**سمت و/ یا نمایندگی**
مختاری، فهیم دخت (فوق لیسانس ایمونولوژی)	عضو هیات علمی پژوهشگاه استاندارد
دبیر:	
داورزنی ، ساره (فوق لیسانس صنایع غذایی، میکروبیولوژی مواد غذایی)	پژوهشگاه استاندارد، گروه پژوهشی میکروبیولوژی
اعضاء : (اسامی به ترتیب حروف الفبا)	
ابراهیمی امام ، غلامحسن (لیسانس صنایع غذایی)	کارشناس استاندارد
اطهری نیا، معصومه (فوق لیسانس بیولوژی)	پژوهشگاه استاندارد، گروه پژوهشی میکروبیولوژی
بابائی، پریسا (فوق لیسانس میکروبیولوژی)	شرکت شیر پاستوریزه پگاه تهران
بابوئی، مریم (لیسانس میکروبیولوژی)	شرکت معیارگستر صدر البرز
دوچشمه، مهدی (فوق لیسانس مهندسی محیط زیست)	پژوهشگاه استاندارد، گروه پژوهشی میکروبیولوژی
رحیمی فرد، ناهید (دکترای تخصصی میکروبیولوژی)	وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی- مرکز آزمایشگاه‌های مرجع کنترل غذا و دارو

کمیسیون فنی تدوین استاندارد (ادامه)

اعضاء	سمت و/ یا نمایندگی
شفیعی، مروارید (دکترای تخصصی میکروبیولوژی)	انستیتو پاستور ایران- بخش میکروب‌شناسی
کوهی کمالی، پالیز (فوق لیسانس میکروبیولوژی)	انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور
فدای وطن، صدیقه (دکترای داروسازی)	شرکت داروسازی کیش مدیفارم
غلامی، سپیده (لیسانس میکروبیولوژی)	شرکت صنعتی پارس مینو
قربانی، پدرام (دکترای تخصصی میکروبیولوژی)	دانشگاه تهران-پردیس بین الملل کیش
مهرپور، رامش (لیسانس صنایع-کنترل کیفیت)	پژوهشگاه استاندارد، گروه پژوهشی میکروبیولوژی

فهرست مندرجات

عنوان	صفحه
آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران	ج
کمیسیون فنی تدوین استاندارد	د
پیش‌گفتار	ظ
۱ هدف	۱
۲ دامنهٔ کاربرد	۱
۳ مراجع الزامی	۲
۴ ساختمان	۴
۴-۱ کلیات	۴
۴-۲ ملاحظات ایمنی	۵
۴-۳ طراحی آزمایشگاه	۶
۴-۴ فضای آزمایشگاه	۶
۴-۵ چیدمان و تاسیسات ساختمان	۷
۴-۶ تمیزکردن و ضدعفونی کردن	۹
۵ کارکنان	۱۰
۵-۱ کلیات	۱۰
۵-۲ صلاحیت	۱۰
۵-۳ تصدیق صلاحیت مستمر کارکنان	۱۱
۵-۴ بهداشت	۱۱
۶ وسایل و تجهیزات	۱۲
۶-۱ کلیات	۱۲
۶-۲ اتاقک‌های محافظ	۱۳
۶-۳ ترازوها و رقیق‌کننده‌های وزنی	۱۵
۶-۴ همگن کننده ، مخلوط‌کن و همزن	۱۷
۶-۵ pH متر	۱۸
۶-۶ اتوکلاو	۲۰
۶-۷ دستگاه آماده ساز محیط کشت	۲۱
۶-۸ گرمخانه	۲۲
۶-۹ یخچال یا سردخانه	۲۳
۶-۱۰ فریزر و فریزر فوق انجماد	۲۴
۶-۱۱ حمام مایع با دمای ثابت	۲۵
۶-۱۲ مولد بخار (استیمر) شامل حمام آب جوش	۲۶

۶-۱۳ آون سترون‌سازی ۲۸
۶-۱۴ آون مایکروویو ۲۹
۶-۱۵ ماشین شستشوی ظروف شیشه‌ای ۳۱
۶-۱۶ میکروسکوپ نوری ۳۲
۶-۱۷ شعله گاز یا کورهٔ مخصوص سوزن کشت ۳۲
۶-۱۸ توزیع کننده محیط‌های کشت و واکنشگرها ۳۳
۶-۱۹ مخلوط کن گردابی (ورتکس) ۳۴
۶-۲۰ شمارشگر کلنی ۳۵
۶-۲۱ تجهیزات کشت در شرایط اتمسفری تغییر یافته ۳۶
۶-۲۲ سانتریفوژ ۳۷
۶-۲۳ اجاق‌های برقی تخت و گود ۳۸
۶-۲۴ اسپیرال پلیتر ۳۸
۶-۲۵ دستگاه‌های آب مقطر، یون‌زدایی شده و اسمز معکوس ۴۰
۶-۲۶ زمان سنج ۴۱
۶-۲۷ پی‌پت و پی‌پتور ۴۱
۶-۲۸ دماسنج و وسایل پایش دما مانند ثبت کننده‌های خودکار ۴۳
۶-۲۹ جداکنندهٔ مغناطیسی ایمنی (ایمونومگنتیک) ۴۵
۶-۳۰ سیستم فیلتراسیون ۴۵
۶-۳۱ سایر تجهیزات و نرم افزارها ۴۶
۷ آماده سازی وسایل شیشه‌ای و سایر مواد آزمایشگاهی ۴۶
۷-۱ آماده سازی ۴۶
۷-۲ سترون کردن و/یا آلودگی زدایی ۴۶
۷-۳ وسایل و تجهیزات یکبار مصرف ۴۷
۷-۴ انبارش مواد و وسایل شیشه‌ای تمیز ۴۷
۷-۵ مدیریت مواد و وسایل شیشه‌ای سترون ۴۷
۷-۶ کاربرد آلودگی‌زدایی و ضدعفونی ۴۸
۷-۷ مدیریت پسماند ۴۹
۷-۸ شستشو ۴۹
۸ آماده سازی و سترون‌سازی محیط کشت ۵۰
۹ نمونه‌های آزمایشگاه ۵۰
۹-۱ نمونه برداری ۵۰
۹-۲ حمل و نقل ۵۰
۹-۳ دریافت ۵۱
۹-۴ انبارش ۵۲
۹-۵ آزمونه ۵۲

۱۰ آزمون ۵۳
۱۰-۱ ملاحظات بهداشتی طی آزمون ۵۳
۱۰-۲ آماده سازی سوسپانسیون اولیه و رقت‌ها ۵۵
۱۱ شمارش ۵۶
۱۱-۱ کلیات ۵۶
۱۱-۲ شمارش با استفاده از محیط کشت جامد ۵۶
۱۱-۳ محاسبه و تفسیر نتایج به دست آمده با استفاده از محیط کشت جامد ۶۱
۱۱-۴ شمارش مخمر و کپک ۷۲
۱۱-۵ شمارش با استفاده از محیط کشت مایع ۷۳
پیوست الف (اطلاعاتی) خصوصیات برخی از ضدعفونی کننده‌ها
پیوست ب (الزامی) فواصل اطمینان برای روش شمارش کلنی
پیوست پ (الزامی) شمارش محتمل‌ترین تعداد
پیوست ت (الزامی) شمارش کلنی‌ها با دو پلیت در هر رقت
پیوست ث (اطلاعاتی) کتابنامه

پیش گفتار

استاندارد «میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- الزامات کلی و راهنما برای آزمون‌های میکروبیولوژی» نخستین بار درسال ۱۳۸۶ تدوین شد.این استاندارد براساس پیشنهادهای رسیده و بررسی توسط سازمان ملی استاندارد وتایید کمیسیون‌های مربوط برای اولین بار مورد تجدیدنظر قرار گرفت و در سیصد و نود و نهمین اجلاس کمیته ملی استاندارد بیولوژی و میکروبیولوژی مورخ ۱۳۹۴/۱۰/۷ تصویب شد. اینک به استناد بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات موسسه 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 زمینه 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 تجدید نظر استانداردهای ملی استفاده کرد.

این استاندارد جایگزین استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹ : سال ۱۳۸۶ است.

منبع و ماخذی که برای تهیه این استاندارد مورد استفاده قرار گرفته به شرح زیر است:

ISO 7218:2007+Amd 1:2013, Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations

میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – الزامات کلی و راهنما برای آزمون‌های میکروبیولوژی

۱ هدف

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

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 ۱۷۰۲۵؛

پ-راهنمایی برای هماهنگی آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی مواد غذایی؛

ت- حصول اطمینان از درستی آزمون‌های میکروبیولوژی مواد غذایی؛

ث-جستجو یا شمارش میکروارگانیسم‌های نام برده شده در استانداردهای خاص؛

ج-اطمینان از یکسان بودن روش‌های به کار رفته در آزمایشگاه‌های مختلف و دستیابی به نتایج یکسان؛

چ-پیشگیری از خطر آلودگی برای ایمنی کارکنان آزمایشگاه؛

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

یادآوری۱- این استاندارد برای آزمون باکتری‌ها، مخمرها، کپک ها و همچنین در صورت تکمیل شدن با راهنمای خاص برای پریون ها[2]، انگل ها[3] و ویروس ها نیز کاربرد دارد. این استاندارد برای آزمون توکسین‌ها و دیگر متابولیت‌های میکروارگانیسم‌ها (برای مثال: آمین‌ها) کاربرد ندارد.

یادآوری۲- برای آزمون‌های بیولوژی ملکولی به استاندارد ملی ایران شماره ۱۰۵۵۱مراجعه کنید.

1- Good Laboratory Practice
2 - Prion
3 - Parasite

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 شماره ۱۷۲۸، آب-مورد مصرف در آزمایشگاه تجزیه- ویژگی‌ها و روش‌های آزمون.

۳-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۱۹۶۲، ویژگی‌های پی‌پت‌های زینه‌دار.

۳-۳ استاندارد ملی ایران شماره ۴۲۰۷، کیفیت آب- شمارش میکروارگانیسم‌ها در آب با استفاده از روش کشت-راهنما.

۳-۴ استاندارد ملی ایران شماره ۴۸۰۶، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – روش های جامع نمونه برداری از سطوح با استفاده از پلیت های تماسی و سوآب.

۳-۵ استاندارد ملی ایران شماره ۱-۵۶۵۷، پی‌پت‌های زینه بندی شده آزمایشگاهی - بخش اول الزامات عمومی.

۳-۶ استاندارد ملی ایران شماره ۲-۵۶۵۷، پی‌پت‌های زینه بندی شده آزمایشگاهی -بخش دوم پی‌پت‌های بدون زمان انتظار.

۳-۷ استاندارد ملی ایران شماره ۳-۵۶۵۷، پی‌پت‌های زینه بندی شده آزمایشگاهی - بخش سوم پی‌پت‌های دارای زمان انتظار ۱۵ ثانیه.

۳-۸ استاندارد ملی ایران شماره ۴-۵۶۵۷، پی‌پت‌های زینه بندی شده آزمایشگاهی - بخش چهارم پی‌پت‌های دمشی (فوتی).

۳-۹ استاندارد ملی ایران شماره ۶۱۶۵، راهنمای کلی پیاده‌سازی سیستم تجزیه و تحلیل مخاطرات، نقاط کنترل بحرانی (HACCP) در واحدهای تولیدی فرآوری کامل گوشت قرمز و گوشت طیور (تولید، بسته بندی، نشانه گذاری) – کشتار طیور.

۳-۱۰ استاندارد ملی ایران شماره ۱-۶۸۰۶، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – شمارش استافیلوکوکوس های کواگولاز مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس و سایر گونه‌ها) – روش آزمون قسمت اول : روش استفاده از محیط کشت برد- پارکر آگار.

۳-۱۱ استاندارد ملی ایران شماره ۳-۶۸۰۶، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – روش جامع برای شمارش استافیلوکوکوس های کواگولاز مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس و سایر گونه ها) – قسمت سوم: جستجو، شناسایی و شمارش با شیوهٔ محتمل‌ترین تعداد (MPN) برای تعداد کم میکروارگانیسم.

۳-۱۲ استاندارد ملی ایران شماره ۸۶۶۳، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام -راهنمای آماده سازی و ساخت محیط‌های کشت -قسمت ۱- راهنمای عمومی تضمین کیفیت برای آماده سازی محیط‌های کشت در آزمایشگاه.

۳-۱۳ استاندارد ملی ایران شماره ۲-۸۶۶۳، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – راهنمای آماده سازی و تهیه محیط کشت – راهنمای عملی برای آزمون محیط‌های کشت.

۳-۱۴ استاندارد ملی ایران شماره ۱-۸۹۲۳، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام -آماده سازی آزمایه-سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری برای آزمونهای میکروبیولوژی-قسمت اول -مقررات کلی برای آماده سازی سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری.

۳-۱۵ استاندارد ملی ایران شماره ۲-۸۹۲۳، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – آماده سازی آزمایه، سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری برای آزمون‌های میکروبیولوژی – قسمت دوم : مقررات ویژه برای آماده سازی گوشت و فرآورده‌های آن.

۳-۱۶ استاندارد ملی ایران شماره ۳-۸۹۲۳، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – آماده سازی آزمایه، سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری برای آزمون‌های میکروبیولوژی – قسمت سوم : مقررات ویژه برای آماده سازی ماهی و فرآورده‌های آن.

۳-۱۷ استاندارد ملی ایران شماره ۴-۸۹۲۳، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – آماده سازی آزمایه، سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری برای آزمون‌های میکروبیولوژی – قسمت چهارم : مقررات ویژه برای آماده سازی محصولاتی به غیر از شیر، گوشت، ماهی و فرآورده‌های آن‌ها.

۳-۱۸ استاندارد ملی ایران شماره ۵-۸۹۲۳، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام -آماده سازی آزمایه-سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری برای آزمون میکروبیولوژی -قسمت ۵- مقررات ویژه برای آماده سازی شیر و فرآورده‌های آن.

۳-۱۹ استاندارد ملی ایران شماره ۹۰۳۰، لوازم شیشه‌ای آزمایشگاه-پی‌پت‌های پاستور یک بار مصرف– ویژگی‌ها.

۳-۲۰ استاندارد ملی ایران شماره ۹۶۰۶، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام-تخمین عدم قطعیت اندازه‌گیری در آزمون‌های کمی-راهنما.

۳-۲۱ استاندارد ملی ایران شماره ۱۰۵۵۱، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام -ردیابی عوامل بیماری زای منتقل شده ازغذا به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمر از (PCR) الزامات کلی و اصطلاحات.

۳-۲۲ استاندارد ملی ایران شماره ۱۰۵۲۷، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام -پروتکل صحه‌گذاری روش‌های جایگزین.

۳-۲۳ استاندارد ملی ایران شماره ۱-۱۱۵۰۴، ابزارهای حجمی با کارکرد پیستونی -قسمت ۱: اصطلاح شناسی، الزامات کلی و توصیه‌های کاربر.

۳-۲۴ استاندارد ملی ایران شماره ۲-۱۱۵۰۴، تجهیزات حجم سنجی پیستونی -قسمت ۲: پی‌پت‌های پیستونی.

۳-۲۵ استاندارد ملی ایران شماره ۳-۱۱۵۰۴، ابزارهای حجمی با کارکرد پیستونی -قسمت ۳: بورت‌های پیستونی.

۳-۲۶ استاندارد ملی ایران شماره ۴-۱۱۵۰۴، ابزارهای حجمی با کارکرد پیستونی -قسمت ۴: رقیق‌کننده‌ها.

۳-۲۷ استاندارد ملی ایران شماره ۵-۱۱۵۰۴، ابزارهای حجمی با کارکرد پیستونی -قسمت ۵: توزیع کننده‌ها.

۳-۲۸ استاندارد ملی ایران شماره ۶-۱۱۵۰۴، تجهیزات حجم سنجی پیستونی -قسمت ۶: روش‌های گراویمتری جهت تعیین خطای اندازه‌گیری.

۳-۲۹ استاندارد ملی ایران شماره ۷-۱۱۵۰۴، دستگاههای حجمی پیستونی-قسمت۷: روش‌های غیر وزنی برای ارزیابی کارایی تجهیزات.

۳-۳۰ استاندارد ملی ایران شماره ۱۱۷۰۴،کیفیت آب-روش‌هایی برای ارزیابی و کنترل میکروبیولوژیک محیط‌های کشت مورد استفاده برای شمارش کلنی در آزمون‌های کیفیت آب.

۳-۳۱ استاندارد ملی ایران شماره ۱-۱۴۱۳۰، شیر و فرآورده‌های آن - کنترل کیفیت در آزمایشگاه‌های میکروبیولوژیک قسمت ۱: ارزیابی عملکرد آزمون گر در روش شمارش کلنی.

۳-۳۲ استاندارد ملی ایران شماره ۲-۱۴۱۳۰، شیر و فرآورده‌های آن – کنترل کیفیت در آزمایشگاه‌های میکروبیولوژیک قسمت ۲: تعیین قابلیت اطمینان شمارش کلنی پلیت‌های موازی و مراحل متوالی رقت.

۳-۳۳ استاندارد ملی ایران شماره ۱۷۰۲۵، الزامات عمومی برای احراز صلاحیت آزمایشگاه‌های آزمون و کالیبراسیون.

۳-۳۴ استاندارد ملی ایران شماره ۱۷۰۴۳، ارزیابی انطباق- الزامات عمومی آزمون مهارت

۴ ساختمان

۴-۱ کلیات

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

---

1 - Layout

برای کاهش خطر آلودگی متقاطع[1]، آزمون نمونه‌های مرحلهٔ تولید مقدماتی (به ویژه برای دریافت و آماده سازی نمونه) باید از آزمون سایر نمونه‌ها جدا باشد.

۲-۴ ملاحظات ایمنی

طراحی آزمایشگاه باید مطابق با الزامات ایمنی بسته به نوع میکروارگانیسم باشد. برای این منظور میکروارگانیسم‌ها به ۴ گروه خطر دسته بندی می‌شوند:

گروه ۱ خطر[2] (بدون خطر یا خطر خیلی کم برای افراد و جامعه)
میکروارگانیسمی است که احتمال بیماری‌زایی در انسان و حیوان را ندارد.

گروه ۲ خطر (خطر متوسط برای افراد، کم خطر برای جامعه)
میکروارگانیسم بیماریزایی[3] است که می‌تواند در انسان یا حیوان ایجاد بیماری کند اما احتمال ایجاد خطر جدی برای کارکنان آزمایشگاه، جامعه یا محیط نامحتمل است. قرارگرفتن در معرض آن‌ها در آزمایشگاه ممکن است باعث عفونت جدی در انسان شود. ظهور آزمایشگاهی می‌تواند باعث عفونت جدی در انسان شود ولی درمان موثر و اقدامات پیشگیرانه در دسترس می باشد و خطر گسترش عفونت محدود است.

گروه ۳ خطر (پرخطر برای افراد، کم خطر برای جامعه)
میکروارگانیسم بیماریزایی است که به طور معمول سبب بیماری جدی در انسان یا حیوان می‌شود ولی گسترش عفونت از یک فرد به دیگری معمول نیست. درمان موثر و اقدامات پیش‌گیرانه در دسترس می باشد.

گروه ۴ خطر (پرخطر برای افراد و جامعه)
میکروارگانیسم بیماریزایی که به طور معمول بیماری جدی در انسان یا حیوان ایجاد می کند و می‌تواند به سهولت از یک فرد به دیگری به طور مستقیم یا غیرمستقیم منتقل شود. به طور معمول درمان موثر و اقدامات پیش‌گیرانه در دسترس نمی باشد.

هشدار- به کلیه قوانین و مقررات و دستورالعمل‌های صادره از سوی سازمان‌ها و مراجع قانونی و ذیصلاح کشور[4] که به ویژه گروه‌های خطر میکروارگانیسم‌ها را در مرزهای کشور تعیین می‌کند، مراجعه کنید.

---

1 - Cross contamination
2 - Risk category 1
3- pathogen
۴ - مراجع قانونی و ذیصلاح کشور، در حال حاضر وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی و وزارت جهاد کشاورزی و سازمان دامپزشکی کشور است.

۳-۴ طراحی آزمایشگاه

راهنماهای ارائه شده در این بند، جستجو میکروارگانیسم‌های متعلق به گروه‌های ۱ ، ۲ و ۳ خطر در میکروبیولوژی مواد غذایی را پوشش می‌دهد.

علاوه بر اقدامات ایمنی، بهتر است به مقررات ملی نیز توجه شود.

۴-۴ فضای آزمایشگاه

۱-۴-۴ کلیات

آزمایشگاه میکروبیولوژی باید از نظر جایگاه، شرایط محیطی، فعالیت و امکانات از آزمایشگاه‌های مجاور یا بخش‌های تولیدی جدا باشد. فضای آزمایشگاه باید دارای محل‌هایی برای نمونه‌ها و آزمون (طبق بند ۴-۴-۲) و فضای عمومی (طبق بند ۴-۴-۳) باشد. این فضاها باید از هم جدا باشند.

۲-۴-۴ فضای مربوط به نمونه و آزمون

با توجه به عملیات خوب، برای بخش های زیر مکان های جداگانه اختصاص داده شود یا فضاها دقیقا مشخص شوند:

الف- دریافت و انبارش نمونه‌ها؛

ب- آماده سازی نمونه‌ها به ویژه برای مواد خام (برای مثال: فرآورده‌های پودری حاوی تعداد زیاد میکروارگانیسم)؛

پ- آزمون نمونه‌ها (از سوسپانسیون اولیه) به همراه گرمخانه‌گذاری میکروارگانیسم‌ها؛

ت- کار[1]با میکروارگانیسم های بیماریزای احتمالی؛

ث- نگه‌داری سویه[2] مرجع و سایر سویه‌ها؛

ج- آماده سازی و سترون‌سازی محیط‌های کشت و وسایل؛

چ- انبارکردن محیط‌های کشت و واکنشگرها؛

ح- آزمون سترونی مواد غذایی؛

خ- آلودگی‌زدایی[3]؛

د-شستشو و تمیزکردن ظروف شیشه‌ای و سایر وسایل؛

1- Manipulating
2 - Strain
3 - Decontamination

ذ- انبارکردن مواد شیمیایی مخاطره‌آمیز، ترجیحاً نگه‌داری در کابینت ها، قفسه ها، اتاق ها یا ساختمان‌ها با طراحی مشخص شده.

با توجه به این اصل که، بخش‌های مجاوری که در آن‌ها فعالیت‌های ناسازگار انجام می‌شود باید از هم جدا شوند، جداسازی حداقل سه مکان زیر در آزمایشگاه میکروبیولوژی الزامی است:

الف- آزمون و گرمخانه گذاری، که می‌توانند با هم یا جدا از هم باشند؛

ب- آماده‌سازی و سترون‌سازی محیط‌های کشت؛

پ-آلودگی‌زدایی و شستشوی وسایل.

۴-۴-۳ فضای عمومی

فضاهای جداگانه برای موارد زیر در نظر گرفته شود:

الف-ورودی‌ها، راهروها، راه پله‌ها و آسانسورها؛

ب-فضای اداری (برای مثال: دبیرخانه، دفترکار و اتاق مستند سازی)؛

پ-رخت کن‌ها و سرویس های بهداشتی؛

ت-اتاق‌های بایگانی؛

ث-انبارها؛

ج-اتاق‌های استراحت[1].

۴-۵ طراحی و چیدمان ساختمان

۴-۵-۱ اهداف

هدف، حصول اطمینان از عدم تاثیر محیط بر اعتبار نتایج آزمون میکروبیولوژی است. محیطی که در آن آزمون‌های میکروبیولوژی انجام می‌شود نباید اعتبار آزمون‌ها را تحت تاثیر قرار دهد.

چیدمان تاسیسات ساختمان باید به گونه‌ای باشد که از خطر آلودگی متقاطع، پیش‌گیری کند. مثال‌هایی برای دستیابی به این هدف شامل موارد زیر است:

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

ب-انجام روش‌ها به صورت پی‌درپی با استفاده از اقدامات مناسب برای حصول اطمینان از آسیب ندیدن نمونه و آزمون (برای مثال: استفاده از ظروف انتقال با درهای غیر قابل نفوذ[3])؛

پ-جداسازی فعالیت‌ها بر حسب زمان یا فضای کاری.

---

1 - Rest room
2- no way back
3- Sealed

از افزایش بیش از حد دما، گرد و غبار، بخار آب، رطوبت، صدا و لرزش پیشگیری شود.
توصیه می شود فضای کافی کاری به منظور حفظ شرایط تمیز و منظم وجود داشته باشد. این فضا بهتر است متناسب با حجم آزمون‌های انجام شده و همچنین سازماندهی داخلی آزمایشگاه باشد. توصیه می‌شود، در صورت وجود مقررات ملی، فضا مطابق با آن باشد.

۴-۵-۲ ساختمان و تجهیزات آن

مکان‌های آزمون باید به طریق زیر ساخته شده و تجهیز شوند، به گونه‌ای که خطر آلودگی به وسیله گرد و غبار و میکروارگانیسم را کاهش دهد. (برای میکروارگانیسم‌های گروه ۳ خطر به استاندارد ملی مربوطه مراجعه کنید).

الف- دیوارها، سقف ها و کف‌ها باید صاف بوده و به سهولت قابل تمیزکردن باشند و مقاوم نسبت به مواد پاک کننده و ضدعفونی کننده‌های مورد استفاده در آزمایشگاه‌ها باشند؛

ب-توصیه می‌شود، کف‌ها لغزنده[1] نباشند؛

پ- توصیه می‌شود، لوله‌های مخصوص انتقال مایعات و گازها بالاتر از قد کاربر عبور داده نشود، مگر این که به طور محکم بسته شده باشند. هر ساختاری که بالاتر از قد کاربر قرار می گیرد بهتر است دارای پوشش باشد، به گونه‌ای که دست یابی به آن برای تمیز کردن منظم به سهولت امکان‌پذیر باشد.

ت- به منظور به حداقل رساندن جریان هوا هنگام آزمون، پنجره ها و درها باید کاملا قابل بسته شدن و غیر قابل نفوذ به گرد و غبار بوده و به سهولت تمیز شوند. علاوه بر آن کنترل شرایط محیطی از جمله دما، بار میکروبی هوا و سطوح کار در کلیه بخش‌های آزمایشگاه باید به طور منظم انجام شود. توصیه می‌شود، محدودهٔ دمایی (۱۸°C تا ۲۷°C) و کیفیت هوا (محتوای میکروارگانیسم‌ها و میزان انتشار گرد و غبار) مطابق با انجام آزمون‌ها باشد. برای این منظور یک سیستم تهویهٔ فیلتردار برای ورود و خروج هوا توصیه می‌شود؛

ث- توصیه می‌شود، برای جلوگیری از انتشار گرد و غبار ناشی از جابه‌جایی محیط‌های کشت خشک و نمونه‌های پودری یک سیستم تهویه[2] مناسب نصب شود؛

ج- توصیه می‌شود، برای انجام آزمون‌هایی که باید در هوای با آلودگی کم انجام شود، از اتاق مجهز به اتاقک جریان هوای لایه‌ای تمیز[3] و/یا اتاقک ایمن[4]، استفاده شود؛

چ- توصیه می‌شود، محیط آزمایشگاه با استفاده از حفاظ پنجره یا صفحات شیشه‌ای مناسب از اثرات مضر اشعه خورشید حفظ شود.

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

ح- استفاده از پرده در داخل آزمایشگاه به دلیل این که خود منبع گرد و غبار است و تمیز کردن آن نیز مشکل است، مجاز نمی باشد.

۴-۵-۳ نکات دیگر

توصیه می شود، نکات زیر در نظرگرفته شود:

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

ب-دسترسی به برق؛

پ-دسترسی به گاز (گاز شهری یا کپسول گاز)؛

ت-وجود نور کافی در هر قسمت آزمایشگاه؛

ث- سطح میز کار و صندلی‌های آزمایشگاه باید دارای سطوح صاف و غیر قابل نفوذ باشند و به سهولت قابل تمیزکردن و ضدعفونی کردن باشند؛

ج-کلیه وسایل مستقر در آزمایشگاه (میز، صندلی، کابینت‌های آزمایشگاه و یخچال) به گونه‌ای طراحی شوند که تمیز کردن کف آزمایشگاه به سهولت انجام شود (برای مثال: وسایل قابل حرکت)؛

چ-از نگهداری وسایل و مدارک غیر ضروری آزمون در محل آزمون، خودداری کنید؛

ح-در دسترس بودن تسهیلات نگهداری مدارک هنگام کار با نمونه‌ها، محیط‌های 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 محیط‌های کشت آلوده شده، یا وجود سیستمی مناسب برای سوزاندن پسماندهای آلوده باید در محل وجود داشته باشد؛

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

ر-فراهمی جعبه کمک‌های اولیه.

۴-۶ تمیزکردن و ضدعفونی کردن

توصیه می شود نکات زیر کنترل شود:

الف-کف‌ها، دیوارها، سقف ها، میزهای کار آزمایشگاه و اتصالات بین آن‌ها 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 ساختمان‌ها در شرایط مناسب برای انجام آزمون‌ها، آن‌ها را به طور منظم تمیز نموده و ضدعفونی کنید. توصیه می‌شود، سطوح آلوده شده یا سطوحی که امکان آلوده شدن دارند، با استفاده از مواد ضدعفونی کننده باکتری‌کش و قارچ‌کش، آلودگی‌زدایی شوند؛

---

1 -Waste

2- Crack

یادآوری- در صورت وجود مقررات ملی، می توان با استفاده از مواد ضدعفونی کننده مجاز و روش‌های مناسب (مه‌پاشی و بخار) آلودگی‌زدایی کرد.

پ-سیستم‌های تهویه[1] و فیلترهای آن بهتر است به طور منظم نگه‌داری شوند و در صورت لزوم، فیلترهای آن تعویض شوند؛

ت-کیفیت میکروبی سطح میزهای کار آزمایشگاه، سطوح در تماس با کارکنان و هوا باید به طور منظم پایش شوند (تناوب انجام آن بستگی به نتایج آزمون‌های قبلی دارد)؛

ث-آلودگی سطوح را می‌توان با استفاده از پلیت‌های تماسی[2] حاوی مواد خنثی کننده (برای مثال: لسیتین[3] و سدیم تیوسولفات[4]) در برابر مواد پاک کننده بررسی کرد. کیفیت هوا به منظور جستجوی میکروارگانیسم خاص (برای مثال:کپک) را می‌توان با قراردادن یک پلیت درباز حاوی محیط کشت غیر انتخابی (برای مثال: پلیت کانت آگار (PCA)) یا محیط کشت جامد انتخابی در معرض هوا، به مدت زمان ۱۵ min بررسی کرد.

یادآوری –برای تخمین آلودگی سطوح و هوای آزمایشگاه می‌توان از سایر روش‌های معتبر نیز استفاده کرد. به استاندارد ملی ایران شماره ۴۸۰۶ مراجعه کنید.

۵ کارکنان[5]

۵-۱ کلیات

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

۵-۲ صلاحیت

برای هر روش، معیارهای عینی برای ارزیابی صلاحیت کارکنان باید هم در ابتدای استخدام و هم در حین انجام کار تعریف شده باشد.

صلاحیت کارکنان را در آزمایشگاه می‌توان با استفاده از انجام کنترل‌های کیفیت داخلی (طبق بند ۱۶-۱-۲ این استاندارد) مشخص کرد.

1- Ventilation
2 - Contact plate
3 - Lecithin
4 -Sodium thiosulfate
5- Staff

یادآوری- برای تعیین علل عملکرد ضعیف (برای مثال: خطا در پی‌پت کردن، عدم یکنواخت سازی در سوسپانسیون اولیه و شمارش) در روش آزمون شمارش کلنی‌ها، به استاندارد ملی ایران شماره ۱-۱۴۱۳۰ مراجعه شود.

۵-۳ تصدیق صلاحیت مستمر[1] کارکنان

توصیه می‌شود، تصدیق صلاحیت کارکنان به طور منظم و مستمر و با متغیرهای مورد نظر، ارزیابی شود. این متغیرها شامل مشارکت در برنامه‌های تضمین کیفیت داخلی، آزمون‌های کفایت تخصصی (PT)[2] (به استاندارد ملی ایران شماره ۱۷۰۴۳ مراجعه کنید)، استفاده از مواد مرجع (RM)[3] یا به وسیله آزمون‌های خود ارزیابی[4] برای شمارش میکروارگانیسم‌ها که در استاندارد ملی ایران ۲-۱۴۱۳۰ ارائه شده است، می‌باشد.

۵-۴ بهداشت

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

الف- روپوش و کفش آزمایشگاهی که کاملا قابل بسته شدن و تمیز می‌باشند و احتمال خطر شعله‌ور شدن آن‌ها کم است، بپوشید. لباس آزمایشگاه را نباید خارج از محیط کار و رخت‌کن پوشید؛

ب- در صورت لزوم، به منظور جلوگیری از آلودگی نمونه از محافظ مو و ریش استفاده کنید؛

پ-ناخن‌ها را تمیز و ترجیحاً کوتاه نگه دارید؛

ت-پیش و پس از انجام آزمون‌های میکروبیولوژی و بلافاصله پس از خروج از توالت، دست‌ها 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 پاک‌کننده بهداشتی که ترجیحاً در یک توزیع‌کننده تمیز نگه‌داری می شود، استفاده کنید. برای خشک‌کردن دست‌ها از دستمال کاغذی یا حوله یک‌بار مصرف، استفاده کنید. اجرای این مقررات برای کارکنان و بازدیدکنندگان آزمایشگاه یکسان است؛

ث-هنگام کار با نمونه، کشت‌ها، محیط‌های کشت و هنگام تلقیح، از صحبت کردن و سرفه کردن خودداری کنید؛

ج-کارکنان مبتلا به بیماری‌های عفونی و 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؛

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

1- On-going staff competence
2 - Professional test
3 - Refrence material
4 - Self-assessment tests

ح-کشیدن پی‌پت با دهان ممنوع (به بند ۶-۲۷ مراجعه کنید) می باشد.

۶ وسایل و تجهیزات

۶-۱ کلیات

توصیه می‌شود، مطابق با عملیات خوب آزمایشگاهی، کلیهٔ وسایل و تجهیزات تمیز و در محل مناسب نگه‌داری شوند. پیش از استفاده بهتر است وسایل از نظر مناسب بودن برای کار مورد نظر، تصدیق شوند و در طی استفاده، کارایی آن‌ها پایش شوند.

تجهیزات و وسایل پایش باید مطابق با استانداردهای ملی قابل ردیابی، کالیبره شوند و روش ها، نتایج و هر گونه کالیبراسیون مجدد و کنترل‌های میانی مستند شوند.

تجهیزات باید به طور منظم بررسی و نگه‌داری شوند تا از ایمنی و مناسب بودن آن‌ها برای موارد مورد نظر، اطمینان حاصل شود. توصیه می‌شود، تجهیزات مطابق با وضعیت کاری و درستی مورد نظر برای نتایج، پایش شوند.

در بیشتر موارد تناوب کالیبراسیون و بررسی‌های 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 شود و مطابق با دستورالعمل سازنده آن باشد. در تعداد محدودی از موارد که تناوب کالیبراسیون مشخص شده، اجرای آن ضروری است.

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

عدم قطعیت اندازه‌گیری که در این بند بیان می‌شود، مربوط به وسایل و تجهیزات می باشد و نباید برای درستی روش های آزمون به کار رود.

در این بند، الزامات درستی اندازه گیری 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 می‌باشد. درستی تعیین شده به عدم قطعیت اندازه شناختی[2] دستگاه‌ها بستگی دارد (به راهنمای ISO Guide 99 مراجعه کنید).

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

---

1 - Tolerance
2 - Metrological

۶-۲ اتاقک‌های محافظ[1]

۶-۲-۱ توصیف

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 می‌باشد.

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 اتاقک‌هایی که در میکروبیولوژی مواد غذایی به کار می‌روند، تعداد ذرات نباید بیش از ۴۰۰۰ در هر متر مکعب باشد.

اتاقک‌های مورد استفاده در آزمایشگاه میکروبیولوژی مواد غذایی ۴ نوع می باشند که عبارت است از:

الف- اتاقک بیولوژیک ایمن[2] کلاس I اتاقک‌هایی با دریچه جلو باز و هوای خروجی محافظت شده می‌باشند که از کاربر و محیط محافظت می‌کند اما فرآورده را از آلودگی خارجی حفظ نمی‌کند. در این اتاقک‌ها ذراتی که احتمال دارد آلوده باشند، در فیلتر دستگاه گیر می‌افتند. هوای فیلترشده از اتاقک خارج می‌شود در غیر این صورت هوا باید از میان دو فیلترهای ذرات هوا با کارایی بالا HEPA[3] نصب شده در مجموعه عبور کند. اتاقک‌های ایمنی کلاس I به علت مشکلات نگه‌داری و عدم اطمینان از محافظت کاربر برای کار روی میکروارگانیسم‌های بیماریزای گروه ۳خطر ، مناسب نمی‌باشند.

ب- اتاقک بیولوژیک ایمن 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 دریچه کار، از کاربر محافظت می‌کند. اتاقک بیولوژیک ایمن کلاس II برای کار روی میکروارگانیسم های بیماریزای گروه های ۲و۳خطر ، مناسب می‌باشد؛

پ- اتاقک جریان هوای لایه‌ای افقی[4] از آلوده شدن نمونه مورد آزمون محافظت می‌کند اما هر آئروسل ایجاد شده به سمت کاربر دمیده می‌شود. بنابراین آن‌ها برای آزمون کشت‌های تلقیح شده یا آماده سازی کشت‌های بافت مناسب نمی‌باشند؛

ت- اتاقک جریان هوای لایه ای عمودی[1] از فرآورده با استفاده از جریان لایه‌ای عمودی فیلتر شده با فیلترهای ذرات هوا با کارائی بالا (HEPA)[2]، محافظت می‌کند. آن‌ها همچنین با استفاده از گردش

---

1 - Protective cabinets
2 - Biosafety cabinets (BSC)
3 - High Efficiency Particulate Air (HEPA)
4 - Horizontal laminar outflow cabinets

مجدد هوای داخلی اتاقک از کاربر محافظت می‌کند. این نوع اتاقک به ویژه با فراهم‌کردن محیط آسپتیک[3] برای آزمون فرآورده‌های سترون مناسب بوده و هنگام کار با پودرها از کاربر، محافظت می‌کند.

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

استفاده از شعله گاز[4] و کوره مخصوص سوزن کشت[5] در اتاقک‌های محافظ توصیه نمی‌شود. در صورت لـزوم توصیه می‌شود، مشعل گاز، شعله کوچکی داشته باشد که سبب اخـتلال در جریـان هـوا نشـود. بـه عنـوان جایگزین، از تجهیزات یک‌بار مصرف (مانند: لوپ و پی‌پت) استفاده کنید.

۶-۲-۲ کاربرد

اتاقک‌های محافظی را که برای کاربرد و شرایط محیطی مورد نظر در آزمایشـگاه مناسـب هسـتند، اسـتفاده کنید.

توصیه می‌شود، 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 می‌شود، کاربرها برای کاربرد صـحیح از اتاقـک‌هـا، آمـوزش کـافی دیـده باشـند و از ایمنـی آن‌هـا و آسیب‌رساندن[6] فرآورده یا محیط کشت اطمینان حاصل کنید.

۶-۲-۳ تمیز و ضدعفونی کردن

پس از انجام آزمون، محیط کار را با استفاده از ضدعفونی کننده غیر خورنده و مناسب مطابق با دستورالعمل سازنده آن، تمیز و ضدعفونی کنید. شبکه های سیمی[7] محافظت کننده پیش فیلترها (در صورت وجود) را به طور منظم بررسی کنید و با یک پارچه آغشته به مواد ضدعفونی کننده تمیز کنید.

توصیه می‌شود، در اتاقک‌های جریان هوای لایه‌ای، سطح فیلتر به طور منظم از راه مکش بـه گونـه‌ای تمیـز شود که سطح فیلتر آسیب نبیند.

بهتر است پیش از تعویض فیلتر یا سرویس کردن، اتاقک ایمنی با بخار ضدعفونی شود. (این عملیات به‌وسیله شرکت پشتیبان فنی انجام شود).

1 - Vertical laminar airflow cabinets
2 - High Efficiecy Particulate Air Filters
3 - Aseptic
4 - Gas burner
5 - Wire incinerator
6- Integrity
7- Wire grids

پس از تمیزکردن اتاقک ها می‌توانید از لامپ‌های فرابنفش(U.V)[1] برای ضدعفونی کردن استفاده کنید. در صورت استفاده از لامپ‌های U.V ،بهتر است برای از بین بردن گرد و خاک که ممکن است مانع از تاثیر ضد میکروبی نور U.V شود، مطابق با دستورالعمل سازنده آن، به طور منظم تمیز و تعویض شوند. چنانچه اتاقک ایمنی مجددا مورد تایید قرار می گیرد، شدت نور فرابنفش نیز باید کنترل شود تا اطمینان حاصل شود که مطابق با دستورالعمل سازنده آن، است.

به پیوست ث- کتابنامه مراجعه کنید.

۶-۲-۴ نگه‌داری و بازرسی

کارایی یک اتاقک محافظ باید توسط یک شخص کارآزموده و دارای صلاحیت، هنگام تحویل و پس از آن در فواصل زمانی منظم پیشنهاد شده توسط سازنده و همچنین پس از هر بار تعمیر و تغییر و جابه‌جایی، کنترل شود. بهتر است کارایی بعد از جابه‌جایی کنترل شود.

بهتر است به وسیله کنترل سطح کار و دیوارهای اتاقک ، عدم وجود هرگونه آلودگی میکروبی به صورت دوره‌ای تصدیق[2] شود.

توصیه می‌شود، هنگام کار با فیلترها، تعداد میکروارگانیسم‌های ناشی از هوا به طور دوره ای تصدیق شود. برای مثال: چندین پلیت درباز حاوی محیط کشت جامد غیر انتخابی (برای مثال: PCA) را به مدت زمان ۳۰min در هر اتاقک قرار دهید. از روش‌های دیگری نیز می‌توان استفاده نمود.

۶-۳ ترازوها و رقیق‌کننده‌های وزنی[3]

۶-۳-۱ کاربرد و عدم قطعیت اندازه‌گیری

ترازوی آزمایشگاه عمدتاً برای توزین آزمونه[4]، مواد تشکیل دهندهٔ محیط‌های کشت و واکنشگرها به کار می‌رود. علاوه بر آن ممکن است برای اندازه‌گیری حجم محلول های رقیق‌کننده بر حسب جرم نیز به کار رود.

رقیق‌کننده‌های وزنی وسایل الکترونیکی شامل یک ترازوی آزمایشگاه و یک توزیع کننده مایع قابل برنامه ریزی می‌باشند و در طی آماده سازی سوسپانسیون اولیه به کار می‌رود. اساس کار آن‌ها افزودن رقیق‌کننده به یک نمونه فرعی[5] به یک نسبت مشخص می باشند.

---

1 - Ultera Violet
2 - Verify
3- Gravimetric diluter
4 - Test portion
5 - Subsample

نمونه مورد آزمون به مقدار مشخص برای آزمون وزن می‌شود و رقیق‌کننده به نسبت مورد نیاز افزوده می‌شود. (برای مثال: ۹ به ۱ برای رقت‌های اعشاری)(به استاندارد ملی ایران شماره ۱-۸۹۲۳ مراجعه کنید).

آزمایشگاه میکروبیولوژی مواد غذایی برای توزین فرآورده‌های مختلف، باید مجهز به ترازوها در محدوده عدم قطعیت اندازه‌گیری مورد نیاز باشد.

جز در موارد بیان شده، تفکیک‌پذیری[1] ترازوی آزمایشگاه بهتر است با رواداری ٪۱ باشد. اما باید برای رسیدن به حداکثر رواداری ٪۵ وزن، کافی باشد.

برای مثال:

برای توزین ۱۰g، بهتر است ترازوی آزمایشگاه قادر به خواندن تا ۰/۱g باشد.

برای توزین ۱g، بهتر است ترازوی آزمایشگاه قادر به خواندن تا ۰/۰۱g باشد.

تجهیزات فوق را روی سطح افقی ثابت، قرار دهید، در صورت لزوم برای اطمینان از تراز بودن، آن‌ها را تنظیم کرده و از لرزش[2] و کوران هوا[3] حفاظت کنید.

۶-۳-۲ تمیز و ضدعفونی کردن

ترازوی آزمایشگاه و رقیق‌کننده‌های وزنی را پس از استفاده یا به دنبال ریختن مواد در طی توزین، با یک مادهٔ ضدعفونی‌کنندهٔ مناسب و غیرخورنده، تمیز و ضدعفونی کنید.

۶-۳-۳ تصدیق عملکرد[4] و کالیبراسیون

۶-۳-۳-۱ کالیبراسیون

کالیبراسیون باید در محدوده وزنی ترازوی آزمایشگاه و در فواصل زمانی مشخص با توجه به کارکرد دستگاه توسط فرد دارای صلاحیت، انجام شود.

۶-۳-۳-۲ تصدیق

ترازوی آزمایشگاه باید به طور منظم در طی استفاده و پس از تمیزکردن، با استفاده از وزنه‌های کنترل در دامنه استفاده توسط فرد دارای صلاحیت، تصدیق شود.

یادآوری – وزن وزنه‌های کنترل همچنین ممکن است بلافاصله پس از کالیبراسیون ترازوی آزمایشگاه تصدیق شود.

---

1 - resolution
2- Vibration
3 - Draughts
4 - Performance

۶-۴ همگن کننده[1]، مخلوط کن[2]، همزن[3]

۶-۴-۱ توصیف

این تجهیزات برای آماده سازی سوسپانسیون اولیه از آزمونه استفاده می‌شود.
وسایلی که ممکن است به کار رود عبارت است از:
الف- مخلوط‌کن ضربه‌ای[4] (استومکر[5]) با کیسه‌های سترون و در صورت امکان مجهز به وسیله تنظیم کننده سرعت و زمان؛ یا
ب-مخلوط کن چرخشی[6] (خردکن) با سرعت تقریبی[7] بین ۸۰۰۰ r/min و ۴۵۰۰۰ r/min با ظروف درپوش‌دار شیشه‌ای یا فلزی قابل سترون کردن؛ یا
ت-مخلوط کن ارتعاشی[8] (پالسی فایر[9]) با کیسه‌های سترون؛ یا
ث-سایرسیستم‌های همگن کننده با کارایی مشابه.

در موارد خاص، ممکن است مخلوط کردن به طور دستی با استفاده از گلوله‌های شیشه‌ای[10] سترون به قطر تقریبی ۶ mm انجام شود. (به استانداردهای ملی ایران شماره ۲-۸۹۲۳ ، شماره ۳-۸۹۲۳ ، شماره ۴-۸۹۲۳ و شماره ۵-۸۹۲۳ مراجعه کنید).

۶-۴-۲ کاربرد

در همگن کننده ضربه‌ای زمان مخلوط کردن به طور معمول ۱ min تا ۳ min می‌باشد. (به استانداردهای ملی ایران شماره ۲-۸۹۲۳ ، شماره ۳-۸۹۲۳ ، شماره ۴-۸۹۲۳ و شماره ۵-۸۹۲۳ مراجعه کنید).
از این وسایل (طبق بند ۶-۴) برای فرآورده‌های غذایی خاص که شامل موارد زیر است 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 آن‌ها مشکل است برای مثال: سوسیس‌های از نوع سالامی.
در همگن‌کننده چرخشی تعداد کل چرخش ها باید بین ۱۵۰۰۰r/min تا ۲۰۰۰۰ r/min باشد. حتی با مخلوط کردن نسبتاً کند، این زمان نباید بیشتر از ۲٫۵min باشد.

---
1 - Homogenizer
2 - Blender
3 - Mixer
4- Peristaltic blender
5 - Stomacher
6 - Rotary homogenizer
7 - notional speed
8 - Vibration mixer
9 - pulsifier
10 - Glass beads

همگن‌کننده ارتعاشی را می‌توان برای بیشتر مواد غذایی (برای مثال: فرآورده‌های سخت یا خشک) استفاده کرد. زمان مخلوط کردن به طور معمول min ۰٫۵ تا min ۱ می‌باشد. چنانچه میکروارگانیسم‌ها در عمق داخلی بافت چسبیده باشند، توصیه می‌شود، پیش از انجام آزمون، نمونه به قطعات کوچک بریده شود.
گلوله‌های شیشه‌ای را می‌توان برای آماده سازی فرآورده‌های غلیظ یا چسبناک خاص، به ویژه فرآورده‌های لبنی خاص به وسیله تکان دادن سوسپانسیون اولیه حاوی این گلوله‌ها به کار برد (به استانداردهای ملی ایران شمارهٔ ۲-۸۹۲۳ ، ۳-۸۹۲۳ ، ۴-۸۹۲۳ و ۵-۸۹۲۳ مراجعه کنید).

۶-۴-۳ تمیزکردن و ضدعفونی کردن

همگن‌کننده‌های ضربه‌ای و همگن‌کننده‌های ارتعاشی را به طور منظم و پس از هر بار سر ریز شدن مواد از کیسه یا نشتی[1] کیسه، تمیز و ضدعفونی کنید.
ظرف فلزی یا شیشه‌ای همگن‌کننده‌های چرخشی را پس از هر بار استفاده تمیز و سترون کنید.

۶-۴-۴ نگه‌داری

تجهیزات را مطابق با دستورالعمل سازنده آن، بررسی و نگه‌داری کنید.

۶-۵ pH متر

۶-۵-۱ توصیف

pH متر برای اندازه‌گیری اختلاف پتانسیل در یک دمای معین بین الکترود سنجش و الکترود مرجع یا قراردادن هر دو الکترود داخل فرآورده به کار می‌رود باید قادر به خوانش نزدیک به ۰٫۰۱ واحد pH باشد و قابلیت اندازه‌گیری با حد رواداری ±۰/۱ واحد pH باشد. pH متر باید به سیستم تنظیم دمای خودکار یا دستی مجهز باشد.

یادآوری- الکترود سنجش و الکترود مرجع به طور معمول با هم به صورت یک سیستم الکترود مرکب قرارمی گیرند.

۶-۵-۲ کاربرد

pH متر برای اندازه‌گیری مقدار pH محیط‌های کشت و واکنشگرها به کار می‌رود و در صورت لزوم برای تنظیم pH در طی آماده سازی و کنترل کیفی پس از سترون‌سازی و همچنین برای اندازه‌گیری مقدار pH نمونه‌ها و سوسپانسیون آن‌ها به کار می‌رود.

---
1 - Leakage

در صورت وجود استانداردهای خاص برای فرآورده‌های 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 آن، برای اندازه‌گیری مقدار pH در یک دمای استاندارد برای مثال: دمای ۲۵°Cتنظیم کنید. مقدار pH را پس از تثبیت بخوانید و تا دو رقم اعشار ثبت کنید.

یادآوری- در صورتی که مقدار pH اندازه‌گیری شده در مدت زمان ۵s کمتر از ۰٫۰۲ واحد pH نوسان داشته باشد، عدد خوانده شده، ثابت در نظر گرفته می‌شود. به طور معمول با استفاده از الکترودها در شرایط مطلوب تعادل در مدت زمان ۳۰s برقرار می‌شود.

۶-۵-۳ تصدیق و کالیبراسیون

۶-۵-۳-۱ کالیبراسیون

pH متر را مطابق با دستورالعمل سازنده آن، کالیبره کنید. پیش از استفاده، به طور روزانه حداقل از دو و ترجیحاً سه محلول بافر استاندارد استفاده کنید. حداکثر حدود رواداری مجاز برای این خوانش را مشخص کنید که باید دقیق تر از حد رواداری مجاز در حالت کلی باشد.

بهتر است محلول‌های استاندارد قابل ردیابی باشند و مقادیر pH تعیین شده در دمای اندازه‌گیری باید دو رقم اعشار را داشته باشند. (به طور معمول pH=۷٫۰۰ ، pH=۴٫۰۰ و یا pH=۹٫۰۰ در دمای ۲۵ °C مطابق با دستورالعمل سازنده). محلول‌های استاندارد مورد استفاده باید در محدوده pHای باشد که اندازه‌گیری می‌شوند.

۶-۵-۳-۲ تصدیق

پس از کالیبراسیون pH متر با دو محلول بافر استاندارد قابل ردیابی، بهتر است از یک محلول بافر استاندارد سوم نیز برای کنترل خوانش استفاده شود تا کارکرد (در حالت خوانش دستگاه) pH متر، نشان داده شود.

در صورتی که از خوانش pH متر، یک نتیجه خارج از محدودهٔ حداکثر حدود رواداری مجاز به دست آید، مطابق با دستورالعمل سازنده آن، دستگاه را تنظیم کنید. این تنظیم، با کالیبراسیون و کنترل بعدی باید مطابقت داشته باشد.

۶-۵-۴ نگه‌داری

الکترودها را مطابق با دستورالعمل سازنده آن، 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.

پس از هر بار استفاده، الکترودها را با آب مقطر یا آب یون‌زدایی‌شده شستشو دهید. به منظور پیش‌گیری از فرسوده شدن و جرم گرفتن الکترودها، به طور منظم آن‌ها را مطابق با دستورالعمل سازنده آن، تمیز کنید. الکترودها را مطابق با دستورالعمل سازنده آن، در محل مناسب نگهداری کنید.

۶-۶ اتوکلاو[1]

۶-۶-۱ توصیف

اتوکلاو قادر به ایجاد بخار آب اشباع شده در محفظه داخلی دستگاه می‌باشد و برای از بین بردن میکروارگانیسم‌ها به کار می‌رود.

توصیه می‌شود، 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 $\pm ۳^{\circ}C$ از دمای مورد نظر (با در نظر گرفتن عدم قطعیت اندازه‌گیری مربوط به ترموکوپل[2] اندازه گیر)؛

ت-یک حرارت سنج یا یک ترموکوپل ثبات.

بهتر است اتوکلاو به ثبت کننده دما و زمان مجهز باشد.

۶-۶-۲ کاربرد

در سترون کردن با بخار آب، همه هوای موجود در دستگاه را پیش از بالا رفتن فشار خارج کنید. چنانچه اتوکلاو به وسیلهٔ تخلیه خودکار مجهز نمی‌باشد، لازم است هوا تا خروج پیوسته بخار آب خارج شود.

برای سترون‌سازی محیط کشت، بخار آب اشباع درون اتاقک باید حداقل در دمای $۱۲۱^{\circ}C \pm ۳^{\circ}C$ یا دمایی که توسط سازنده، روش آزمون و یا دستورالعمل فرآورده محصول مشخص شده باشد، تنظیم شود.

برای از بین بردن میکروارگانیسم‌های کشت داده شده و آلودگی‌زدایی محیط‌های کشت استفاده شده، دمای بخار آب اشباع در محفظه، باید در دمای حداقل $۱۲۱^{\circ}C \pm ۳^{\circ}C$ باشد.

اتوکلاوهای جداگانه برای سترون کردن وسایل تمیز (و یا محیط‌های کشت) و آلودگی‌زدایی وسایل آلوده (و یا محیط‌های کشت استفاده شده) در نظر بگیرید. پس از سترون سازی همه مواد و وسایل پیش از جابه‌جایی، بهتر است داخل اتوکلاو خنک شوند.

---

1 - Autoclave

2 - Thermocouple

به دلایل ایمنی، محتویات داخل اتوکلاو را تا رسیدن دمای آن به کمتر از ۸۰°C خارج نکنید.

۶-۶-۳ نگه‌داری

محفظهٔ داخلی دستگاه، فیلتر شیر تخلیه آب و درزگیرهای در[1] را به طور منظم تمیز کنید. درستی درزگیرهای در را کنترل کنید. عملیات تخلیه آب و رسوب زدایی را در صورت لزوم در فواصل زمانی مشخص انجام دهید و مطابق با توصیه‌های سازنده عمل کنید.

۶-۶-۴ تصدیق

اتوکلاو باید در وضعیت مطلوب نگه‌داری شود و به طور منظم توسط کارکنان دارای صلاحیت مطابق با دستورالعمل سازنده آن، بازرسی شود.

ابزارهای پایش را به ترتیب کاری مناسب، نگه‌داری و آن را با استفاده از کالیبراسیون و کنترل‌های منظم تصدیق کنید.

صحه‌گذاری اولیه عملیات اتوکلاو، بهتر است شامل انجام آزمون‌های 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 می‌شود، گیرنده‌های حساس به دما به تعداد کافی در مدت بارگیری مناسب به منظور نشان دادن نفوذ کافی دما در همه قسمت ها، قرار داده شوند. توصیه می‌شود، صحه گذاری و صحه‌گذاری مجدد با در نظر گرفتن ثبات دمایی بالا و زمان خنک شدن و دمای سترون کردن باشد.

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

۶-۷ دستگاه آماده ساز محیط کشت[2]

۶-۷-۱ توصیف

این دستگاه به طور کلی برای سترون‌سازی حجم‌های زیاد محیط کشت طراحی شده است (بیشتر از مقدار یک لیتر) و شامل یک ظرف گرم کردن، پوشش خنک کننده آبی[3] و وسیله همزن مداوم می‌باشد. این تجهیزات همچنین باید به حرارت سنج، فشارسنج، زمان سنج و شیر ایمنی مجهز باشند.

1- Seals
2- Media preparator
3 - Water jacket

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

۶-۷-۲ کاربرد

در همه موارد مطابق با دستورالعمل سازنده آن، عمل کنید.

کلیه عملیات تهیهٔ محیط کشت، داخل دستگاه انجام می‌شود. پس از افزودن مواد تشکیل دهنده با هم زدن و حرارت دادن، مواد حل شده و سپس سترون‌سازی انجام می‌شود.

۶-۷-۳ نگه‌داری

پس از هر بار تهیهٔ محیط کشت، دستگاه را مطابق با دستورالعمل سازنده آن، 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 آن، بررسی شود.

وسایل پایش را در شرایط مطلوب نگه‌داری کنید و به طور منظم کارایی آن‌ها را تصدیق کنید.

صحه‌گذاری اولیه عملیات ساخت محیط کشت، بهتر است شامل انجام آزمون‌های 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 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 می‌شود، دما و مدت زمان هر دور سترون‌سازی کنترل شود.

۶-۸ گرمخانه[1]

۶-۸-۱ توصیف

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

۶-۸-۲ کاربرد

---

1 - Incubator

گرمخانه 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.
چنانچه دمای محیط نزدیک یا بالاتر از دمای گرمخانه باشد لازم است به یک سیستم خنک کننده مجهز شود.
توصیه می‌شود، دیوارهای گرمخانه از تابش نور خورشید محافظت شوند.
در صورت امکان در یک دورهٔ کار، گرمخانه را کاملاً پرنکنید زیرا محیط‌های کشت برای رسیدن به دمای تعادل زمان طولانی را طی می‌کنند، گرمخانه‌هایی که دارای سیستم همرفت هوای تحت فشار[1] یا مانند آن می‌باشد تعادل دمایی بهتری را ایجاد می کنند.
از باز گذاشتن درگرمخانه به مدت طولانی خودداری کنید.
توصیه می‌شود، وسایل را به گونه‌ای در گرمخانه قرار دهید که هوا جریان داشته باشد (طبق بند ۱۱-۲-۵).

۶-۸-۳ تمیزکردن و پاک‌سازی[2]

دیوارهای درونی و بیرونی گرمخانه را به طور منظم تمیز و پاک‌سازی[3] کرده و درصورت لزوم گرد و غبار را از سیستم تهویهٔ آن پاک کنید.

۶-۸-۴ تصدیق

ثبات و یکنواختی توزیع دمای گرمخانه را به وسیله استفاده هم‌زمان از تعدادی دماسنج [4] و ترموکوپل با درستی شناخته شده و محدوده دمایی مناسب کنترل کنید.
برای پایش دمای داخل گرمخانه، دماسنج را در محل مناسب داخل گرمخانه قرار دهید و محدوده عملکرد قابل قبول گرمخانه را تعیین کنید.
برای مثال: برای رسیدن به دمای $۳۷^{\circ}C \pm ۱^{\circ}C$ هنگامی که منحنی نمایش داخل گرمخانه محدوده دمایی $۳۶٫۸^{\circ}C$ تا $۳۷٫۳^{\circ}C$ را نشان می دهد، برای حصول اطمینان از اینکه همه قسمت‌های گرمخانه به دمای مورد نظر $۳۷^{\circ}C$ رسیده است، توصیه می‌شود، محدوده عملکرد به دمای $۳۶٫۲^{\circ}C$ تا $۳۷٫۷^{\circ}C$ کاهش یابد.
این فرآیند بهتر است پس از هر تعمیر یا تغییر اساسی تکرار شود.
برای مثال: توصیه می‌شود، دمای گرمخانه با استفاده از یک یا چند دماسنج حداقل و حداکثر یا ترموکوپل‌های ثبات کنترل شود.

1- Forced-air convecyion
2 - Sanitization
3 - Sanitize
4- Thermometer

برای پایش روزمره گرمخانه، دماسنج یا ترموکوپل ثبات را به منظور نمایش منحنی داده‌های به دست آمده از دمای مورد نظر باید در یک وضعیت ثابت قرار دهید.
دمای گرمخانه را حداقل هر روز کاری کنترل کنید. برای این منظور باید در هر گرمخانه حداقل یک وسیلهٔ اندازه‌گیری دما که می‌تواند در گلیسرول (یا سایر حرارت گیرهای مناسب) غوطه‌ور باشد، گذاشته شود. از سایر سیستم‌های کنترلی با کارایی مشابه نیز می‌توان استفاده کرد.

۶-۹ یخچال ، سردخانه[1]

۶-۹-۱ توصیف

اتاقک‌هایی برای تامین انبارش سرد می باشند. دمای نگه‌داری نمونه‌های مواد غذایی مورد آزمون، به جز در موارد خاص، باید $۲^{\circ}C \pm ۳^{\circ}C$ (حداکثر حد رواداری مجاز) باشد. برای سایرکاربردها، دما باید $۳^{\circ}C \pm ۵^{\circ}C$ 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 یخچال‌های مختلف یا حداقل ظروف مختلف برای نگه‌داری موارد زیر استفاده کنید:
الف-محیط کشت‌های تلقیح نشده و واکنشگرها؛
ب-آزمایه ها؛
پ-کشت‌های میکروارگانیسم‌ها و محیط‌های کشت تلقیح شده.
وسایل را به گونه‌ای در یخچال‌ها، خنک کننده‌ها و سردخانه ها قرار دهید که گردش هوای مناسب برقرار شده و خطر آلودگی متقاطع به حداقل برسد.

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. درستی وسیله پایش دما، به مورد استفاده از آن بستگی دارد.

۶-۹-۴ نگه‌داری و تمیزکردن

برای حصول اطمینان از کارایی مناسب، عملیات نگه‌داری را در فواصل منظم به صورت زیر انجام دهید:
الف- زدودن گرد و غبار از تیغه‌های موتور یا از صفحات تبادل حرارت خارجی؛

---
1 - Cold-storage room

ب- یخ زدایی[1]؛

پ- تمیزکردن و آلودگی زدایی داخل اتاقک ها.

۶-۱۰ فریزر و فریزر فوق انجماد[2]

۶-۱۰-۱ توصیف

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

فریزر فوق انجماد اتاقکی است که نگه‌داری در دمای کمتر از ۷۰°C- را امکان پذیر می سازد.

۶-۱۰-۲ کاربرد

۶-۱۰-۲-۱ فریزر

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

الف- واکنشگرهای تلقیح نشده؛

ب- نمونه‌های آزمون؛

پ- کشت‌های میکروارگانیسم‌ها.

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

۶-۱۰-۲-۲ فریزر فوق انجماد

کاربرد اصلی این نوع فریزر برای نگه‌داری میکروارگانیسم‌ها، کشت‌های مرجع و/یا کاری و واکنشگرها می‌باشد.

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

۶-۱۰-۳ تصدیق

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

---

1 - Defrosting

2 - Deep freezer

۶-۱۰-۴ نگه‌داری

نگه‌داری از دستگاه‌ها را به طور منظم به صورت زیر انجام دهید:

الف- زدودن گرد و غبار از تیغه‌های موتور و از صفحات تبادل دمای خارجی (چنانچه در دسترس می‌باشد)؛

ب- یخ زدایی؛

پ- تمیزکردن و آلودگی زدایی داخل اتاقک ها.

۶-۱۱ حمام مایع با دمای ثابت[1]

۶-۱۱-۱ توصیف

حمام با دمای ثابت که با یک مایع (برای مثال: آب، اتیلن گلیکول) پر می‌شود 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 گرمخانه بوده و توانایی دسترسی به حداکثر حدود رواداری مجاز$\pm ۰/۵^{\circ}C$ و بهتر از آن را دارد. دمای آزمون و حداکثر حد رواداری مجاز مورد نیاز، برای هر نوع استفاده یا روش آزمون استاندارد، تعیین شده است. یک سیستم خنک کننده برای نگه‌داری دما در محدوده دمای محیط یا کمتر از دمای محیط 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؛

پ-تعدیل دمای محیط کشت جامد ذوب شدهٔ سترون برای استفاده در روش‌های استانداردخاص؛

ت-آماده سازی سوسپانسیون‌های اولیه یا محلول ها در یک دمای کنترل شده؛

ث-فرآیند حرارتی[3] سوسپانسیون‌های اولیه در یک دمای کنترل شده (برای مثال: پاستوریزاسیون).

در صورتی که کنترل دقیق دما ضروری باشد، 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 درپوش‌دار ترجیحاً برای دمای بالا یا دقیق استفاده می‌شوند در پوش‌های شیب دار مانع از چکیدن قطرات ناشی از بخار روی وسایل داخل حمام مایع می شوند.

---

1 - Thermostatically controlled bath
2 - Evaporation
3 - Heat treatment

محیط‌های کشت تلقیح شده را به گونه‌ای گرمخانه گذاری کنید که سطح بالای محیط کشت حداقل ۲cm پایین‌تر از سطح مایع در حمام مایع باشد.
بهتر است سایر ظروف را به گونه‌ای در حمام مایع قرار دهید که سطح محتویات آن پایین‌تر از مایع داخل حمام باشد.
عمق مایع حمام باید به اندازه‌ای باشد که آب از درپوش[1] ظروف وارد آن‌ها نشود.
برای نگه‌داری ثابت ظروف می توان از وسایل نگهدارنده برای مثال: رک ها[2] استفاده کرد.
بهتر است کلیه ظروف، 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 از دستگاه و پس از هر تعمیر و تغییر تاثیر گذار روی دماکنترل کنید.
دمای حمام مایع را با استفاده از یک دماسنج، ترموکوپل یا وسیله ثبت کنندهٔ دما با حداقل عدم قطعیت اندازه‌گیری (طبق بند ۶-۲۸-۲) و مستقل از سیستم تنظیم دمای خودکار پایش کنید.

یادآوری- یک نمایشگر دیجیتالی را نیز می‌توان در صورتی که تفکیک پذیری و درستی آن تایید شده باشد، استفاده کنید. دمای حمام مایع را طی هر بار استفاده و برای گرمخانه‌گذاری های طولانی مدت به طور روزانه، پایش کنید.

۶-۱۱-۴ نگه‌داری

حمام‌های مایع بهتر است با مایع توصیه شده به‌وسیله کارخانه سازنده پر شوند. توصیه می‌شود، برای گرمخانه‌گذاری محیط‌های کشت، ترجیحاً از آب مقطر یا یون‌زدایی‌شده، استفاده شود.
سطح مایع حمام را برای حصول اطمینان از کارکرد درست و شناوری صحیح وسایل قرار گرفته در آن به طور منظم کنترل کنید. سطح مایع باید همیشه المنت‌های گرم‌کننده[3] را بپوشاند.
بهتر است حمام های مایع به طور منظم و متناوب بسته به نوع کاربرد یا پس از ریختن هر گونه مواد، خالی، تمیز و پاک‌سازی شده و دوباره پر شوند.

۶-۱۲ مولد بخار[4] شامل حمام آب جوش

۶-۱۲-۱ توصیف

---
1 - Closure
2 - Racks
3 - Elements
4- Steamers

این وسایل دارای یک المنت گرم‌کننده با آب احاطه شده و در یک ظرف قرار داشته و یـک درپـوش محکـم کننده در می باشند. در استیمر، بخار در فشار اتمسفر ایجاد می‌شود، در حمام آب جوش دمای آب نزدیک به نقطه جوش همراه با تولید بخار آب یا بدون تولید بخار می‌باشد.

۶-۱۲-۲ کاربرد

کاربرد اصلی این دستگاه شامل موارد زیر است :

الف- ذوب‌کردن محیط‌های کشت آگاردار؛

ب- آماده سازی محیط‌های کشت حساس به حرارت؛

پ- کاهش آلودگی قطعات کوچک وسایل هنگام استفاده.

برای حصول اطمینان از این که المنت‌های گرم کننده در تمام مدت پوشیده از آب می‌باشد، یک سطح ایمن و کافی از آب باید در ظرف وجود داشته باشد.

برای انجام عملیات فوق می توان از اتوکلاو با دریچه باز استفاده کرد.

۶-۱۲-۳ نگه‌داری

مولد بخار و حمام آب جوش را تمیز نگهدارید.

توصیه می‌شود، در صورت لزوم، رسوب زدائی منظم در یک تناوب معین بر حسب سـختی آب محـل انجـام شود.

۶-۱۳ آون سترون‌سازی[1]

۶-۱۳-۱ توصیف

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

۶-۱۳-۲ کاربرد

آون فقط برای سترون کردن تجهیزات مقاوم به حرارت خشک برای مثال: وسایل فلزی و شیشـه‌ای اسـتفاده می‌شود. از آون برای سترون کردن وسایل لاستیکی و پلاستیکی استفاده نکنید.

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

---

1 - Sterilizing oven

چنانچه برای سترون کردن وسایل شیشه‌ای حجم سنجی[1] آز آون استفاده می کنید، به طور منظم درستی حجم‌های مشخص شده را مورد تصدیق قرار دهید.

دما باید در کل اتاقک یکنواخت باشد. آون باید مجهز به یک ترموستات[2] و یک دماسنج یا وسیله ثبت کننده دما با درستی مناسب باشد.

آون بهتر است به یک نشانگر زمان[3]، برنامه ریز یا زمان سنج، مجهز شده باشد.

وقتی شرایط دمایی برقرار شد، روند سترون‌سازی باید برای حداقل ۱h دردمای$^{\circ}C$ ۱۰± ۱۷۰$^{\circ}C$ یا ترکیب معادلی از دما/ زمان ادامه یابد.

پس از سترون‌سازی، به منظور پیش‌گیری از شکستن وسایل شیشه‌ای بهتر است پیش از خارج کردن از آون، آن‌ها 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 درستی مناسب، تجهیز شده باشد که مستقل از سیستم تنظیم دمای خودکار باشد. وسایل پایش باید تفکیک پذیری $^{\circ}C$۱ یا کمتر در دمای استفاده شده در آون داشته باشد.

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

۶-۱۳-۴ نگه‌داری

در صورت لزوم سطح داخلی آون را تمیز کنید.

۶-۱۴ آون مایکروویو[4]

۶-۱۴-۱ توصیف

آون مایکروویو وسیله‌ای است که مواد را با استفاده از انرژی امواج با طول موج کوتاه (مایکروویو) در فشار اتمسفر گرم می‌کند.

۶-۱۴-۲ کاربرد

---

1 - Volumetric
2 - Thermostat
3 -Duration indicator
4 - Microwave oven

مایکروویوهایی را که در حال حاضر در دسترس هستند، فقط برای گرم کردن مایعات یا ذوب کردن محیط‌های کشت جامد از آن‌ها استفاده کنید.

هشدار- محیط‌های کشت حاوی ترکیبات حساس به حرارت را در مایکروویو گرم نکنید مگر اینکه عدم تاثیر این روش گرم کردن بر کارائی محیط های کشت تصدیق شده باشد. از مایکروویو نباید برای سترون کردن محیط‌های کشت استفاده کرد زیرا تاکنون کارایی آن برای سترون کردن محیط های کشت ارزیابی نشده است.

مایکروویو باید قابلیت گرم‌کردن مایعات و محیط‌های کشت را با یک روش کنترل شده از طریق ایجاد یک چرخه تابش امواج داشته باشد. توزیع امواج باید یکنواخت باشد تا در هیچ نقطه ای حرارت بیش از حد ایجاد نشود. برای توزیع بهتر دما، مایکروویو به یک صفحه گردان[1] یا یک همزن[2] مجهز می باشد.

وسایل فلزی مانند: درپوش‌های فلزی را در مایکروویو قرار ندهید. پیش از گرم کردن، در بطری یا چوب پنبه‌ها 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 مایکروویو خارج کنید. گرم کردن زیاد سبب جوشیدن و سرریزشدن محتویات بطری یا ترکیدن آن می شود.

برای ذوب کردن محیط کشت جامد از تنظیم دستگاه روی قدرت کم استفاده می‌شود (برای مثال: چرخه یخزدایی) و توصیه می‌شود، برای کمک به کنترل فرآیند حرارتی از یک ظرف حاوی آب حرارت گیر استفاده شود (برای مثال: ۵۰ml تا ۱۰۰ ml آب در یک بشر مناسب برای مایکروویو).

توصیه می‌شود، پس از پایان فرآیند حرارتی و پیش از برداشتن وسایل از مایکروویو حداقل به مدت زمان ۵min صبر کنید.

۳-۱۴-۶ تصدیق

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

---

1 - Turntable
2 - stirrer

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 می‌شود، حساسیت عملکرد درزگیرهای در مایکروویو بررسی شده و در فواصل منظم با یک پروب یا وسیله‌ای مشابه مطابق با دستورالعمل سازنده آن، نفوذ اشعه به خارج را کنترل کنید.

۶-۱۵ ماشین شستشوی ظروف شیشه‌ای[1]

۶-۱۵-۱ توصیف

ماشین شستشوی ظروف شیشه‌ای، ماشین‌های کنترل کننده الکتریکی هستند که برای شستشوی ظروف آزمایشگاهی به طور معمول استفاده می‌شود.

دستگاه شستشوی پی‌پت‌های شیشه‌ای، دستهٔ خاصی از شستشو دهنده‌های وسایل شیشه‌ای هستند و به گونه‌ای طراحی شده است که سوراخ‌های باریک پی‌پت‌ها را تمیز می کنند.

۶-۱۵-۲ کاربرد

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

۶-۱۵-۳ تصدیق

کارایی وسایل شستشو دهنده را پس از شستشو به وسیله بررسی چشمی کنترل کنید و در کاربردهای بحرانی با انجام آزمون‌هایی، از عاری بودن وسایل از مواد مهار کننده[2] اطمینان حاصل کنید.

باقیمانده‌های 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

برنامهٔ منظم نگه‌داری را 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 می‌باشد، سرویس دستگاه در فواصل زمانی کوتاه تر لازم است.

---

1 - Glass washer

2 - Inhibitory

۶-۱۶ میکروسکوپ نوری[1]

۶-۱۶-۱ توصیف

انواع مختلفی از میکروسکوپ ها شامل: یک چشمی[2]، دو چشمی[3]، با یک واحد نمایش بصری (VDU) [4]، یک دوربین یا تجهیزات فلورسنس و یک منبع نوری داخلی یا خارجی، وجود دارد.

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

عملیات میکروسکوپی فاز کنتراست[5] و زمینه تاریک و ۱۰۰۰ برای بررسی "لام‌های مرطوب" مناسب می‌باشند.

۶-۱۶-۲ کاربرد

تجهیزات نوری میکروسکوپ را مطابق با دستورالعمل سازنده آن، 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 انطباق‌های کانونی کروی شکل و رنگی ایجاد نشود.

۶-۱۶-۳ نگه‌داری

نگه‌داری، تمیز و سرویس کردن میکروسکوپ را مطابق با دستورالعمل سازنده آن، انجام دهید. در محل نگه‌داری میکروسکوپ از ایجاد چگالش[6] در اثر رطوبت بالا که باعث کاهش کیفیت عدسی ها می‌شود، پیش‌گیری کنید.

هر روز یا پس از هر بار استفاده روغن را از عدسی وقسمت 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.

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

۶-۱۷ شعله گاز[7] یا کورهٔ مخصوص سوزن کشت[8]

۶-۱۷-۱ توصیف

1- Optical microscope
2 - Monocular
3 - Biocular
4- Video Display Unit
5 - Contrast
6- Condensation
7- Gas burner
8 - Wire incineratot

شعله‌های گازی (بونزن[1]) تولید یک شعله باریک بدون پوشش از منابع مختلف گاز (شبکه اصلی یا مخزن گاز) می‌کنند. تغییر مقدار هوایی که با گاز مخلوط می‌شود درجه دمای ایجاد شده را کنترل می‌کند.
کاربرد اصلی شعله گاز کوره الکتریکی برای سترون کردن لوپ‌های فلزی و سوزن های کشت از طریق رساندن آن‌ها به دمای قرمز شدن و همچنین سترون کردن قطعات کوچک و مقاوم به حرارت تجهیزات می‌باشد.

۶-۱۷-۲ کاربرد

کوره‌های مخصوص سوزن کشت برای سترون کردن لوپ ها و سوزن‌های کشت فلزی به کار می‌رود و هنگام کار با باکتری‌های بیماریزا برای پیش‌گیری از پاشیدن ذرات آلوده و خطر آلودگی متقاطع ترجیح داده می‌شود.
شعله گاز با ایجاد گرمای زیاد می‌تواند سبب افزایش گرما و آشفتگی جریان هوا[2] در آزمایشگاه شود.
روش‌های 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 شعله‌های گاز در اتاقک‌های محافظ استفاده نکنید. در این حالت توصیه می‌شود، از وسایل یک‌بار مصرف سترون استفاده شود.

۶-۱۷-۳ نگه‌داری

به طور منظم این وسایل را تمیز و ضدعفونی کنید و کوره را بپوشانید به ویژه هنگامی که به علت ریخته شدن کشت‌های آلوده میکروبی روی آن‌ها ، آلوده شده باشند.

۶-۱۸ توزیع‌کننده[3] محیط‌های کشت و واکنشگرها

۶-۱۸-۱ توصیف

توزیع‌کننده وسیله یا دستگاهی است که برای توزیع محیط‌های کشت و واکنشگرها، داخل لوله‌ها، بطری ها یا پتری دیش ها به کار می‌رود. این دستگاه انواع مختلفی از استوانه ساده اندازه‌گیری (مزور)، سرنگ‌های دستی یا پی‌پت‌ها، سرنگ‌های خودکار و پمپ‌های ضربه ای دستگاه‌های قابل برنامه ریزی الکترونیکی تحویل خودکار متغیر محیط‌های کشت و واکنشگرها را در بر می‌گیرد.

۶-۱۸-۲ کاربرد

---

1 - Bunsen
2 - Turbulence
3- Dispenser

وسایل تمیزی که برای توزیع محیط‌های کشت و واکنشگرها استفاده می‌شوند، باید عاری از مواد مهارکننده باشند. برای به حداقل رساندن مخلوط شدن محیط‌های کشت انتخابی، برای هر محیط کشت انتخابی از لوله‌های جداگانه استفاده کنید.

برای توزیع آسپتیک محیط‌های کشت سترون و واکنشگرها، باید همه قسمت‌های دستگاه که در تماس با فرآورده است، سترون باشد.

۶-۱۸-۳ تصدیق

رواداری حجم توزیع شده به‌وسیله توزیع کننده محیط کشت نباید بیشتر از ٪۵± حجم مشخص شده باشد.

حداکثر حد رواداری مجاز برای توزیع حجم‌های اندازه‌گیری شده از رقت مایع اعشاری باید ٪۲± باشد.

حجم توزیع شده را پیش از اولین استفاده کنترل کنید، و پس از آن به طور منظم مطابق با برنامه مستند شده، پس از هر تنظیمی که روی حجم‌های توزیع شده تاثیر می گذارد، کنترل کنید. برای کسب اطلاعات بیشتر به استانداردهای ملی ایران شماره ۵۶۵۷ (همه قسمت ها) و ۱۱۵۰۴(همه قسمت ها) مراجعه کنید.

۶-۱۸-۴ تمیزکردن و نگه‌داری

سطح بیرونی دستگاه توزیع کننده را پس از هر بار استفاده تمیز کنید. همه قسمت‌های توزیع کننده را که در تماس با فرآورده می‌باشد شسته و آبکشی کنید و در صورتی که برای توزیع مایع سترون استفاده می‌شود، آن را سترون کنید.

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

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

۶-۱۹ مخلوط کن گردابی (ورتکس)[1]

۶-۱۹-۱ توصیف

این دستگاه تشکیل مخلوط یکنواختی از محیط کشت مایع (مانند: رقت‌های اعشاری و نمونه‌های مایع مورد آزمون) یا سوسپانسیون سلول‌های باکتری در یک مایع را تسهیل می‌کند.

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

1- Vortex mixer

۶-۱۹-۲ کاربرد

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

توصیه می‌شود، 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 بیشتر از حد مایع در لوله انجام می‌شود.

پس از مخلوط کردن، برای به حداقل رساندن انتشار آئروسل ها درپوش ظرف یا لولهٔ 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.

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 توصیف

دستگاه‌های دستی شمارشگر کلنی، دارای یک وسیله شمارشگر حساس به فشار و یک شمارندهٔ دیجیتالی می باشند و به طور معمول 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 با یک شبکه کالیبره شده برای پلیت همراه با بزرگنمایی صفحه تصویر برای کمک به شمارش کلنی باشد. شمارشگرهای الکترونیکی خودکار کلنی که تصویر ایجاد شده را ثبت می‌کند، به وسیله ترکیبی از سیستم‌های سخت افزار و نرم افزار با استفاده از یک دوربین و نمایشگر کار می‌کنند.

۶-۲۰-۲ کاربرد

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

---

1 - Colony counter

حساسیت شمارشگر کلنی خودکار را تنظیم کنید تا از شمارش همه کلنی‌های مورد نظراطمینان حاصل کنید. شمارشگرهای کلنی الکترونیکی خودکار، در صورت استفاده از انواع مختلف آگار و مواد زمینه ای[1] برای شمارش سطحی و پور پلیت به منظور حصول اطمینان از تشخیص مناسب کلنی‌های مورد نظر، به برنامه ریزی جداگانه نیاز دارند.

۶-۲۰-۳ تصدیق

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

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

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 [2]

۶-۲۱-۱ توصیف

این تجهیزات ممکن است یک جار غیر قابل نفوذ باشد یا هر تجهیزات مناسب دیگری که قادر به ایجاد شرایط اتمسفری تغییر یافته باشد (برای مثال: شرایط بی هوازی) و این شرایط را در طی مدت گرمخانه‌گذاری محیط کشت حفظ می‌کند. سیستم‌های دیگر با کارایی مشابه مانند: اتاقک‌های بی هوازی ممکن است استفاده شوند.

برای نصب و نگه‌داری، از دستورالعمل‌های سازنده پیروی کنید.

۶-۲۱-۲ کاربرد

ترکیب اتمسفر مورد نیاز می‌تواند به وسیله افزودن مخلوطی از گاز (برای مثال: از سیلندر گاز) پس از تخلیه هوای جار با استفاده از جایگزینی اتمسفر مورد نظر در یک اتاقک یا به وسیله هر روش مناسب دیگر (مانند:گازپک‌های قابل دسترس در بازار) به دست می آید.

---

1 - Matrices

2- Modified atmospher

به طور کلی گرمخانه‌گذاری در شرایط بی هوازی نیاز به یک اتمسفر با مقدار اکسیژن کمتر از ٪۱ حجمی، دی اکسید کربن ٪۹ تا ٪۱۳ حجمی دارد. گرمخانه‌گذاری در شرایط کم هوازی[1] (کاپناروبیک[2]) نیاز به یک اتمسفر با مقدار اکسیژن ٪۵ تا ٪۷ حجمی و تقریباً دی اکسید کربن ٪۱۰ حجمی دارد.
با توجه به نیاز میکروارگانیسم‌های خاص، تغییر شرایط ممکن است لازم باشد.

۶-۲۱-۳ تصدیق

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

۶-۲۱-۴ نگه‌داری

در صورت استفاده از کاتالیست[3]، به طور منظم آن را مطابق با دستورالعمل سازنده آن، تجدید کنید.
در صورت نصب شیرها، برای حصول اطمینان از کارایی مناسب، آن‌ها را تمیز و روغن کاری کرده و در صورت لزوم تعویض کنید.
وسایل را به طور منظم تمیز و پاک‌سازی کنید.

۶-۲۲ سانتریفوژ[4]

۶-۲۲-۱ توصیف

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

۶-۲۲-۲ کاربرد

در بعضی موارد تغلیظ میکروارگانیسم‌های مورد نظر به صورت ایجاد رسوب با استفاده از سانتریفوژ کردن نمونه‌های مایع انجام می‌شود که این مایع تغلیظ شده می‌تواند مجدداً در مایع رقیق شده و برای آزمون‌های بعدی استفاده می‌شود.
اقدامات لازم را برای پیش‌گیری از تولید آئروسل ها و آلودگی متقاطع از طریق کاربرد صحیح تجهیزات و همچنین استفاده از لوله‌ها و ظروف سترون و درپوش‌دار مخصوص سانتریفوژ انجام دهید.

---

1 - Microaerobic
2 - Capnaerobic
3 - Catalyst
4 - Centrifuge

۶-۲۲-۳ تصدیق

در مواردی که سرعت سانتریفوژ کردن دارای اهمیت است و یا برای استفاده‌های خاص، میـزان آن مشـخص شده است، سرعت سانتریفوژ بهتر است به طور منظم و پـس از هـر تعمیـر یـا تغییـر اساسـی در سـانتریفوژ به‌وسیله نشانگر سرعت یا سرعت سنج[1] مستقل (خارجی) و کالیبر شده کنترل شود.

۶-۲۲-۴ نگه‌داری

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

بهتر است سانتریفوژها به طور منظم سرویس شوند.

۶-۲۳ اجاق‌های برقی تخت و گود[2]

۶-۲۳-۱ توصیف

این دستگاه، وسیلهٔ گرم کردن ترموستاتیکی با دمای کنتـرل شـده اسـت. برخـی از ایـن دسـتگاه هـا دارای سیستم‌های همزن مغناطیسی می باشند.

۶-۲۳-۲ کاربرد

این دستگاه‌ها که با سیستم همزن مغناطیسی مجهز باشند، برای گرم کردن حجم‌های نسبتا زیاد مایع مانند: محیط‌های کشت استفاده می‌شوند.

اجاق‌های برقی که بدون سیستم همزن مغناطیسی، برای تهیه محیط‌های کشت استفاده نمی شوند.

۶-۲۳-۵ نگه‌داری

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

۶-۲۴ اسپیرال پلیتر[3]

۶-۲۴-۱ توصیف

اسپیرال پلیتر یک توزیع کننده است که حجم از پیش تعیین شده مایع را از بالای سطح یک پلیت آگـار در حال چرخش، توزیع می‌کند. بازوی توزیع کننده از مرکز پلیت به طرف لبه خارجی با افزایش شعاع چـرخش

---

1 - Tachometer
2- Hotplate and heating mantle
3- Spiral plater

(چرخش ارشمیدسی[1]) حرکت می کند. حجم توزیع شده در نتیجه توزیع با سوزن‌های 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[2] و توزیع مایعات به یک منبع خلاء و در صورت استفاده از میکروسرنگ یک‌بارمصرف یا سیستم مشابه به یک پیستون خودکار نیاز است.

۶-۲۴-۲ کاربرد

این دستگاه برای توزیع نمونهٔ مایع، نمونهٔ یکنواخت یا رقیق شده بر روی یک پلیت جامد مناسب برای تعیین شمارش کلنی به کار می‌رود. پس از گرمخانه‌گذاری، کلنی‌ها در امتداد خطوطی که مایع تلقیح شده است رشد می کنند. تعداد کلنی‌ها در یک محدوده شناخته شده با استفاده از یک صفحه شمارش خط کشی شده که همراه با دستگاه می باشد، شمارش و محاسبه می‌شود.

سیستم توزیع پیش و پس از استفاده و بین هر نمونه باید با آب مقطر سترون یا آب یون‌زدایی‌شده سترون، شسته و پاک‌سازی شوند. می‌توان آن را با استفاده از پر و خالی کردن برای مثال: با محلول حاوی کلر آزاد به مقدار ۰/۵ تا ۱ درصد جرمی، ضدعفونی کرد.

تجهیزاتی که با روش متفاوت انجام می شوند (برای مثال: میکروسرنگ‌های یک‌بارمصرف با پیستون) باید مطابق با دستوالعمل سازنده استفاده شوند.

سطح پلیت‌های آگار استفاده شده با اسپیرال پلیتر باید تراز بوده و فاقد حباب هوا باشد.

برای حصول اطمینان از تشکیل کلنی‌های مجزا، سطح پلیت ها باید عاری از رطوبت اضافی باشند.

برای جلوگیری از انسداد بخش توزیع کننده، اجازه دهید که ذرات در سوسپانسون اولیه ته نشین شوند و از مایه رویی برای بارگیری استفاده کنید. از کیسه‌های فیلتردار نیز می‌توانید استفاده کنید.

۶-۲۴-۳ تصدیق

از قرار گرفتن پتری دیش در مرکز صفحه گردونه اطمینان حاصل کنید.

توصیه می‌شود، الگوی توزیع با استفاده از توزیع کردن جوهر قابل شستشو به طور روزانه، تصدیق شود و بیشترین تراکم باید نزدیک مرکز پلیت باشد جایی که توزیع شروع می‌شود و به طور پیوسته و یکنواخت به تراکم کمتر تا نقطه بلند شدن سوزن برسد. اسپیرال باید بدون وقفه کامل شود. بخش بدون تلقیح پلیت باید در مرکز و تقریباً ۲cm قطر داشته باشد. وضعیت سوزن در ابتدا و پایان تلقیح باید هم‌زمان با استفاده از علامت‌های موجود در صفحه گردونه تصدیق شوند.

---

1 - Archimedean spiral
2 - Loading

چنانچه الگوی توزیع صحیح نیست، بهتر است سوزن ها مطابق با دستورالعمل سازنده آن، بریده شوند. برای حصول اطمینان از قرار داشتن سر سوزن در زاویه صحیح با سطح آگار، با استفاده از خلاء برای نگهداشتن یک لامل در مقابل سوزن، آن را کنترل کنید. بهتر است لامل موازی با سطح پلیت باشد.
سترونی اسپیرال پلیتر با استفاده از ریختن آب سترون به‌وسیله دستگاه روی پلیت پیش از آزمون هر سری از نمونه‌های مورد آزمون، باید تصدیق شود.
حجم توزیع شده باید با استفاده از آب مقطر به طور وزنی و منظم کنترل شود. حداکثر حد رواداری مجاز برای جرم مورد انتظار از حجم توزیع شده باید ٪۵ ± باشد.

۶-۲۴-۴ نگه‌داری

وسایل بهتر است به طور منظم و بلافاصله پس از هر بار سرریز شدن مواد روی آن، تمیز شوند.
توصیه می‌شود، وسایل را مطابق با کاربرد آن‌ها سرویس و مورد تصدیق قرار دهید.

۶-۲۵ دستگاه‌های آب مقطر، یون زدایی[1] و اسمز معکوس

۶-۲۵-۱ توصیف

دستگاه‌هایی هستند که برای تهیه آب مقطر یا آب بدون مواد معدنی یا یون زدایی شده با کیفیت مورد نیاز (به استاندارد ملی ایران شماره ۲-۸۶۶۳ مراجعه کنید) برای تهیه محیط‌های کشت میکروبیولوژی یا واکنشگرها و سایر کاربردهای آزمایشگاهی، استفاده می‌شود.

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 استفاده کنید.

۶-۲۵-۳ تصدیق

قابلیت هدایت الکتریکی آب باید به طور منظم یا پس از ذخیره سازی کنترل شود. میزان هدایت الکتریکی آب نباید بیشتر از ۵۰ µS/cm (معادل با مقاومت الکتریکی بیشتر یا مساوی ۲۰۰۰۰ Ω.cm) برای تهیه محیط‌های کشت و واکنشگرها باشد.
در صورت ایجاد تغییرات یونی در آب ذخیره پیش از استفاده، توصیه می‌شود، کنترل‌های مناسب برای آلودگی میکروبی مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۸۶۶۳ انجام شود.

---

1 - Deionizer

۶-۲۵-۴ نگه‌داری

دستگاه‌های تقطیر بهتر است در یک تناوب خاص با توجه به سختی آب ورودی با استفاده از اسید (مانند: اسید سیتریک ٪۵ تا ٪۱۰جرمی) تمیز و رسوب زدایی شود و کاملا با استفاده از آب تازه برای حذف اسید باقیمانده، آبکشی شود.

دستگاه‌های یون زدایی و اسمز معکوس بهتر است مطابق با آن نگهداری شوند.

۶-۲۶ زمان سنج[1]

۶-۲۶-۱ توصیف

زمان سنج دوره‌های زمانی صحیحی را برای بسیاری از روش‌های آزمایشگاهی که مدت زمان درآن‌ها اختصاصی و مهم است، نشان می دهد.

۶-۲۶-۲ کاربرد

زمان سنج‌های دستی یا رومیزی دیجیتالی و آنالوگ مورد استفاده برای پایش مدت عملیات آزمایشگاهی (برای مثال: کاربرد در رنگ‌آمیزی گستره‌های میکروبی و همگن سازی نمونه‌ها) باید در شرایط خوب کار کنند و قادر به تامین درستی مورد نیاز باشند.

زمان سنج‌های نصب شده روی تجهیزات آزمایشگاه (برای مثال: اتوکلاوها، سانتریفوژها و همگن کننده‌ها) را مطابق با دستورالعمل سازنده آن، استفاده کنید. این زمان سنج ها وابسته به اهمیت کاربردشان باید قادر به تامین درستی مورد نیاز باشند.

۶-۲۶-۳ تصدیق

همه زمان سنج‌های مورد استفاده در عملیات آزمایشگاهی که برای اندازه‌گیری زمان حائز اهمیت است به طور منظم پس از هر تعمیر اساسی با ساعت کشور، کنترل کنید.

۶-۲۶-۴ نگه‌داری

به طور منظم زمان سنج ها را برای کارایی مناسب تمیز و کنترل کنید.

زمان سنج‌های نصب شده روی دستگاه بهتر است به عنوان قسمتی از مراحل نگه‌داری دستگاه، کنترل شوند.

۶-۲۷ پی‌پت و پی‌پتور

---

1 - Timer

۶-۲۷-۱ توصیف

پی‌پت‌ها وسایل شیشه‌ای یا وسایل پلاستیکی یک‌بار مصرف مورد استفاده برای انتقال حجم‌های مایع یا مواد غلیظ می باشند. پی‌پت‌های مدرج شده حجم‌های مشخص را با درستی که بستگی به ویژگی آن دارد، انتقال می دهد.

پی‌پتورهای خودکار (مکانیکی) با سرهای پلاستیکی، وسایلی هستند که توانایی توزیع حجم‌های مایعات را با استفاده از حرکت دستی یا الکتریکی پیستون دارد.

۶-۲۷-۲ کاربرد

پی‌پت‌های آسیب دیده یا شکسته را دور بریزید.

برای پیش‌گیری از آلودگی پی‌پت‌های پاستور یا مدرج و سرهای پی‌پتور سترون را برای استفاده درکشت‌های میکروبی با پنبه غیر جاذب، پنبه گذاری کنید.

برای پیشگیری از نشتی و اطمینان از عملکرد مناسب، باید پوآرهای مورد استفاده در پی‌پت‌های پاستور و پی‌پت‌های مدرج و سرهای پی‌پتورها در اندازه‌های صحیح باشند. برای جزئیات بیشتر به استاندارد ملی ایران شماره ۹۰۳۰ مراجعه کنید.

۶-۲۷-۳ تصدیق

چنانچه کارخانه سازنده، درستی (صحت و دقت) پی‌پت‌های مدرج را اعلان نکرده باشد، برای تایید انتقال حجم‌های صحیح، آن‌ها را کنترل کنید.

روش کالیبراسیون پی‌پت‌ها یا پی‌پتورها در استانداردهای ملی ایران شماره ۵۶۵۷، شماره ۱۱۵۰۴(همه قسمت ها) و به ویژه شماره ۲-۱۱۵۰۴ بیان شده است.

پی‌پتورهای جدید را پیش از استفاده و با توجه به تناوب و ماهیت استفاده از آن در فواصل منظم برای تایید حداکثر حد رواداری مجاز که باید برای توزیع حجم‌هایی از رقت اعشاری و مایع تلقیح ٪۲ (برای بهبود دقت و کاهش عدم قطعیت نتایج آزمون نهایی حداکثر حد رواداری مجاز ٪۲± ارجحیت دارد) و یا ٪۵ برای سایر کاربردها باشد، کنترل کنید. برای حصول اطمینان از برقرار بودن باقیمانده حجم‌های توزیع شده مطابق با حداکثر رواداری مجاز، بررسی‌های وزنی میانی را با استفاده از آب مقطر یا آب یون زدایی شده، انجام دهید.

۶-۲۷-۴ نگه‌داری

پی‌پت‌های غیر یک‌بار مصرف و پی‌پتورهای خودکار را پس از هر بار استفاده به طور مناسب آلودگی‌زدایی، تمیز و سترون کنید.

در صورت آلوده شدن لوله‌ها یا پیستون‌های پی‌پتورهای خودکار در هنگام استفاده، برای آلودگی‌زدایی و تمیزکردن، آن‌ها را جدا کرده و پس از سوارکردن مجدد، کالیبره کنید. در صورتی که امکان انجام آن در آزمایشگاه وجود ندارد برای سوار کردن و کالیبراسیون مجدد آن را به کارخانه سازنده بازگردانید.

۶-۲۸ دماسنج و وسایل پایش دما مانند ثبت کننده‌های خودکار

۶-۲۸-۱ توصیف

دماسنج وسیله ای است که دارای جیوه یا الکل درون یک لولهٔ شیشه‌ای می‌باشد و برای پایش دما در محدودهٔ فعالیت‌های آزمایشگاهی استفاده می‌شود.

سایر وسایل پایش دما شامل دماسنج‌های 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.

دماسنج‌های و سایر وسایل پایش دمای مرجع باید مطابق با استانداردهای ملی ایران و استاندارد 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 تجهیزات پایش دمای کاری باید به روشی کالیبره شوند که با استانداردهای ملی و بین‌المللی قابل ردیابی باشند.

یادآوری- وسایل دارای درستی کافی که با استانداردهای ملی ایران و استانداردهای بین المللی تایید می شوند را می توان همچنین به عنوان دماسنج‌های کاری، پس از صحه‌گذاری کارایی آن‌ها، مورد استفاده قرار داد.

۶-۲۸-۲ کاربرد

دماسنج‌ها و دیگر وسایل پایش دما باید تفکیک پذیری برای دمای مورد نظر را مطابق با حداکثر حد رواداری مجاز تعیین شده بر اساس حساسیت کاربرد، داشته باشند.

تفکیک پذیری وسایل پایش دما بهتر است یک چهارم حداکثر حد رواداری مجاز مورد نیاز باشد. برای مثال: هنگامی که حداکثر حد رواداری مجاز $\pm 1^{\circ}C$ است، تفکیک پذیری بهتر است $\pm 0,2^{\circ}C$ باشد. هنگامی که حداکثر حد رواداری مجاز $\pm 0,5^{\circ}C$ است، تفکیک پذیری بهتر است $\pm 0,1^{\circ}C$ باشد.

---

1 - Platinum resistance

هنگام تعیین دمای عملیاتی، بهتر است عدم قطعیت اندازه‌گیری کالیبراسیون ترمومتر مرجع نیز در نظر گرفته شود.

دماسنج ها و ترموکوپل‌هایی که در گرمخانه ها قرار دارند به منظور محافظت در برابر از دست دادن گرما هنگام باز بودن در گرمخانه و برای ثابت خواندن، بهتر است در ظروف مناسب که حاوی گلیسرول، پارافین مایع یا پلی پروپیلن گلیکول می باشد، قرار داده شوند.

از دماسنج‌های شناور[1] که فقط حباب آن‌ها شناور است یا از وسایل مشابه برای حصول اطمینان از پایداری استفاده کنید.

توصیه می‌شود، دماسنج‌هایی که در حمام آب قرار داده می‌شود مطابق با مشخصات دماسنج در آب شناور شوند. برای مثال: دماسنج‌های با شناوری نسبی[2] بهتر است تا عمق مشخص شده برای آن‌ها در آب شناور شوند (به طور معمول ۷۶mm یا ۱۰۰m).

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

دماسنج‌های جیوه‌ای شیشه‌ای، شکننده هستند و در صورت وجود خطر شکستن، بهتر است آن‌ها را داخل محفظه‌های محافظ که در اندازه‌گیری دما تداخل ایجاد نمی کنند قرار دهید.

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

۶-۲۸-۳ تصدیق

به طورکلی دماسنج‌های مرجع باید پیش از اولین استفاده و حداقل هر پنج سال برای کلیه محدوده‌های اندازه‌گیری با استانداردهای ملی یا بین المللی قابل ردیابی کالیبره شوند. کالیبراسیون تک نقطهٔ میانی، برای **مثال:** نقطه ذوب یخ باید برای تایید کارایی انجام شود.

ترموکوپل‌های مرجع پیش از اولین استفاده باید با استانداردهای ملی یا بین المللی قابل ردیابی کالیبره شوند و با یک تناوب تعیین شده بوسیله آزمایشگاه، به طور منظم مطابق با دستورالعمل سازنده آن، کنترل شوند. کنترل‌های میانی باید با دماسنج‌های مرجع برای تصدیق عملکرد، انجام شود.

سایر وسایل پایش دما (مانند: گیرنده‌های موج رادیویی) باید مطابق با استانداردهای ملی ایران و استاندارد بین المللی قابل ردیابی و مطابق با دستورالعمل سازنده آن، کالیبره شوند.

دماسنج ها و ترموکوپل‌های مورد استفاده بهتر است در نقطه ذوب یخ و/یا با دماسنج‌های مرجع در محدوده دمای کاری کنترل شوند.

1- Total-immersion

2 - Partial-immersion

۶-۲۸-۴ نگه‌داری

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

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

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

۶-۲۹-۱ توصیف

این دستگاه برای جداسازی و تغلیظ میکروارگانیسم‌های مورد نظر در کشت‌های مایع با استفاده از گلوله‌های پارامغناطیسی پوشیده شده با یک آنتی بادی مناسب استفاده می‌شود.

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

در جداکننده‌های خودکار، میله‌های مغناطیسی چیده شده به شکل شانه و جا لوله‌ای استفاده می‌شود. 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 آن و استانداردهای خاص در این زمینه (برای مثال: برای *E.coli* O157) استفاده کنید.

برای سیستم‌های دستی، سرعت چرخش مخلوط کن را کنترل کنید.

برای سیستم‌های دستی و خودکار، قابلیت دستگاه را برای جداسازی مقادیر کم میکروارگانیسم‌های مورد نظر در سیستم را پیش از استفاده روزمره، تصدیق کنید.

شناخت آلودگی‌های متقاطع و پیشگیری از آن‌ها در طی روش‌های جداسازی دستی حائز اهمیت است.

۶-۲۹-۳ نگه‌داری

وسایل را مطابق با دستورالعمل سازنده آن، بررسی و نگه‌داری کنید.

۶-۳۰ سیستم فیلتراسیون

برای استفاده از سیستم فیلتراسیون به استاندارد ملی ایران شماره ۴۲۰۷ مراجعه کنید.

---

1 - Immunomagnetic

۶-۳۱ سایر تجهیزات و نرم افزارها

تجهیزات دیگر و نرم افزارها باید قابلیت رسیدن به درستی لازم را داشته و با ویژگی‌های مربوط به آزمون‌های مورد نظر مطابق باشند. کنترل‌ها و برنامه‌های کالیبراسیون در صورت امکان باید برای مقادیر یا کمیت‌های کلیدی یا مقادیری که خصوصیات آن، تاثیر معنی‌داری بر روی نتایج دارد، انجام شود. تجهیزات را پیش از استفاده روزمره برای مطابقت با الزامات آزمایشگاه و ویژگی‌های استاندارد مربوط کنترل یا در صورت امکان کالیبره کنید. برای حصول اطمینان از توانائی نرم افزار در ایجاد نتایج صحیح هر تغییریا اصلاحی که توسط آزمایشگاه روی نرم افزار انجام می شود، باید تصدیق شود.

۷ آماده سازی وسایل شیشه‌ای و سایر مواد آزمایشگاهی

۷-۱ آماده سازی

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

آبی که پس از شستشو برای آبکشی وسایل چندبار مصرف استفاده می‌شود باید مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۱۷۲۸ باشد. باقی‌مانده اسید یا قلیا را می‌توان با استفاده از محلول شناساگر pH کنترل کرد تا pH ای در محدوده ۶/۵ تا ۷/۳ بدست آید.

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

بهتر است لوله‌ها و بطری ها با استفاه از وسایل مناسب، درپوش گذاری شوند. در صورت لزوم وسایل شیشه‌ای که سترون می شوند (برای مثال: پی پت ها) بهتر است در ظروف خاص یا در پوشش مناسب (برای مثال: کاغذ مخصوص، کاغذ آلومینیوم) قرار داده شوند. توصیه می‌شود، ظروف شیشه‌ای امکان دسترسی به جریان بخار آزاد را داشته باشند، در غیر این‌صورت سترون‌سازی به درستی اتفاق نمی‌افتد.

۷-۲ سترون کردن یا آلودگی زدایی

۷-۲-۱ کلیات

توصیه می‌شود، دما و مدت زمان سترون کردن یا آلودگی‌زدایی ثبت شود. برای تشخیص بین مواد سترون شده و سترون نشده می‌توان از نشانگرهای سترون کردن استفاده کرد.

۷-۲-۲ سترون کردن با استفاده از حرارت خشک

وسایل شیشه‌ای و مانند آن را در آون سترون کننده برای مدت زمان حداقل یک ساعت در دمای$170^{\circ}C \pm 10^{\circ}C$ یا معادل آن سترون کنید.

۷-۲-۳ سترون کردن با استفاده از حرارت مرطوب (بخارآب)

موثرترین روش سترون کردن وسایل شیشه ای و مواد در آزمایشگاه، استفاده از بخار آب تحت فشار می باشد.

محفظهٔ اتوکلاو باید دمای$121^{\circ}C \pm 3^{\circ}C$را برای مدت زمان حداقل ۱۵min (طبق بند ۶-۶) تامین کند.

۷-۲-۴ آلودگی زدایی با ترکیبات شیمیایی

از ترکیبات شیمیایی (برای مثال: فرآورده‌های 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 بازیابی میکروارگانیسم‌ها، اطمینان حاصل کنید.

۷-۳ وسایل و تجهیزات یکبار مصرف

از وسایل و تجهیزات یکبار مصرف در صورت مشابه بودن خصوصیات آن‌ها، می توان به جای وسایل و تجهیزات چند بار مصرف استفاده کرد (برای مثال: وسایل شیشه ای، پتری‌دیش، پی پت ها، بطری ها، لوله‌ها، لوپ ها، پخش‌کننده ها).

توصیه می‌شود، مناسب بودن وسایل مورد استفاده برای آزمون‌های میکروبیولوژی (از نظر سترونی) و همچنین نداشتن مواد مهار کننده رشد میکروارگانیسم ها تصدیق کنید. (به استاندارد ملی ایران شماره ۱۱۷۰۴ مراجعه کنید).

۷-۴ انبارش مواد و وسایل شیشه‌ای تمیز

در طی انبارش، مواد و وسایل شیشه‌ای را در مقابل گرد و غبار حفظ کرده و آن‌ها را در شرایط تمیز نگه‌داری کنید.

۷-۵ مدیریت مواد و وسایل شیشه‌ای سترون

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

تاریخ انقضا مصرف (یا تاریخ تولید) وسایل سترون را که برای میکروبیولوژی اختصاص یافته‌اند روی هر بسته درج کنید.

۷-۶ آلودگی‌زدایی و ضدعفونی

۷-۶-۱ آلودگی زدایی وسایل یک‌بار مصرف

وسایل یکبار مصرف را پیش از امحاء، در آزمایشگاه آلودگی‌زدایی کنید و یا توسط پیمانکار متخصص امحاء[1] شوند.

علاوه بر روش‌های بیان شده در این بند ممکن است از روش سوزاندن نیز استفاده شود. در صورت وجود یک کوره در محل آزمایشگاه، آلودگی‌زدایی و امحاء می‌تواند در یک مرحله انجام شود.

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

به طور کلی وسایل به‌وسیله حرارت مرطوب (طبق بند ۷-۲-۳) و یا حرارت خشک (طبق بند ۷-۲-۲) بهتر است سترون شوند.

در شرایط خاص (برای مثال: نمونه برداری میدانی) ممکن است آلودگی‌زدایی شیمیایی نیز مناسب باشد بنابراین از کاربرد چنین روشی اطمینان حاصل کنید که باقیمانده مواد شیمیایی، اثری روی بازیابی میکروارگانیسم‌ها نداشته باشد.

۷-۶-۳ آلودگی‌زدایی مواد و وسایل شیشه‌ای پس از استفاده

بهتر است آلودگی‌زدایی و دفع مواد را در ظروفی مانند: کیسه‌های پلاستیکی قابل اتوکلاو کردن، قرار دهید. استفاده از اتوکلاو روش ارجح برای کلیه فرآیندهای آلودگی‌زدایی می‌باشد (مدت زمان حداقل ۳۰min در دمای$21^{\circ}C \pm 3^{\circ}C$) وسایل را به گونه‌ای در اتوکلاو قرار دهید که دما به درون وسایل نفوذ کند (برای مثال: بدون پر کردن انبوه[2]) و دقت کنید که درها یا درپوش‌ها 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 می‌توان استفاده کرد.

پیش از شستشو، همه وسایل در تماس با کشت‌های میکروبی (محیط کشت‌های جامد یا مایع) شامل ظروف چند بار مصرف را در اتوکلاو سترون کنید.

در طی آزمون وسایل کوچک و مقاوم به خوردگی (برای مثال: پی‌پت‌ها) را با شناور کردن در محلول ضدعفونی کننده تازه تهیه شده، می توان آلودگی زدایی کرد.

---

1 - Removed

2 - Overpacking

پی‌پت پاستور را فقط یک‌بار استفاده کنید. برای کسب اطلاعات بیشتر به استاندارد ملی ایران شماره ۹۰۳۰ مراجعه کنید.

بیشتر مواد ضدعفونی کننده (به پیوست الف مراجعه کنید) اثرات سمی دارند و هنگام کار با مواد ضدعفونی کنندهٔ تغلیظ شده، از دستکش و عینک استفاده کنید.

مواد و ظروف آلوده شده با میکروارگانیسم‌های گروه خطر ۳ باید پیش از سوزاندن، اتوکلاو شوند.

۷-۷ مدیریت پسماند

امحاء صحیح مواد آلوده شده، چنانچه باعث افزایش پتانسیل آلودگی متقاطع نشود روی کیفیت آزمون نمونه تاثیر مستقیم ندارد ولی از نظر شرایط خوب آزمایشگاهی حائز اهمیت است.

توصیه می‌شود، مدیریت پسماند با دستورالعمل‌های ایمنی و بهداشتی یا محیطی ملی، مطابقت داشته باشد.

توصیه می‌شود، برای شناسایی و جداسازی مواد آلوده و ظروف آن‌ها شامل مطالب زیر، سیستمی ایجاد شود:

الف-پسماندهای غیر آلوده (برای مثال: نمونه‌های مواد غذایی کشت داده نشده) که می‌تواند با پسماندهای عمومی امحاء شوند؛

ب- وسایل تیز، سوزن ها، تیغه‌ها، وسایل شیشه‌ای شکسته و چاقوهای کوچک جراحی؛

پ- مواد آلوده شده برای اتوکلاو کردن و وسایل با قابلیت استفاده مجدد[1]؛

ت- مواد آلوده شده برای اتوکلاو کردن و امحاء یا فقط برای امحاء در صورتی که مواد سوزانده شده باشد (برای میکروارگانیسم‌های گروه خطر۳ الزامات خاصی وجود دارد).

۷-۸ شستشو

وسایل چندبار مصرف را ابتدا آلودگی‌زدایی کرده و سپس بشویید. پس از شستشو، همه وسایل را با آب یون‌زدایی‌شده، آبکشی کنید.

برای تسهیل در عملیات تمیزکردن می‌توان از وسایل تخصصی استفاده کرد (برای مثال: دستگاه های شستشو دهنده پی‌پت، ماشین ظرفشویی و ظرفشویی اولتراسونیک).

پس از شستشو، همه تجهیزات را با آب یون زدایی آبکشی کنید و اطمینان حاصل کنید که باقیمانده مواد اثری روی بازیابی میکروارگانیسم‌ها ندارد. برای حصول اطمینان از عاری بودن تجهیزات از مواد باقیمانده، آبکشی بیشتر یا کنترل‌ها، ممکن است لازم باشد.

---

1 - Recycling

۸ آماده سازی و سترون‌سازی محیط کشت

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

۹ نمونه‌های آزمایشگاهی

۹-۱ نمونه برداری

۹-۱-۱ کلیات

مهم است نمونه‌ای را که آزمایشگاه دریافت می کند نمایندهٔ سری ساخت[1] فرآورده باشد، و در طی حمل و نقل و نگهداری آسیب ندیده و تغییری در آن ایجاد نشده باشد.

بهتر است نمونه در مقابل آلودگی خارجی ناشی از هوا، ظروف نمونه برداری، وسایل مورد استفاده برای نمونه‌برداری و جابه‌جایی‌های نامناسب محافظت شود. برای پیش‌گیری از نشتی و مخلوط کردن صحیح نمونه در آزمایشگاه، توصیه می‌شود، ظرف نمونه برداری را بیشتر 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 به طور متناوب هنگام دریافت نمونه برای تفسیر نتایج آزمایشگاه مفید می‌باشد.

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.

بهتر است 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.

۹-۲ حمل و نقل

نمونه‌ها باید تحت شرایطی به آزمایشگاه منتقل شوند که حداقل تغییر در تعداد میکروارگانیسم های موجود ایجاد شود.

تحویل نمونه‌ها به آزمایشگاه باید سریع بوده و تا حد امکان با حفظ شرایط نگهداری اصلی نمونه نزدیک باشد.

---

1 - Batch

2 - Sampling plan

بهتر است نمونه‌ها را به گونه‌ای بسته بندی کنید که از شکستن و ریختن آن پیشگیری شود.
بهتر است در صورت لزوم روی برچسب فرآورده، شرایط نگهداری در یخچال مشخص شود.
نمونه‌هایی که نیاز به نگهداری در یخچال یا فریزر ندارند را می‌توان 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 فرآورده‌های خاص (برای مثال: استاندارد ملی ایـران ۸۹۲۳) در طـی حمل و نقل درجهٔ حرارت های زیر پیشنهاد می شود:

الف– فرآورده‌های پایدار[2] : درجه حرارت محیط (کمتر از ۴۰°C)؛

ب– فرآورده‌های منجمد یا فوق انجماد: کمتر از ۱۵°C- ، ترجیحاً کمتر از ۱۸°C- ؛

پ– سایر فرآورده‌های ناپایدار[3] در درجه حرارت محیط: ۱°C تا ۸°C ؛

ت– نمونه‌های برداشته شده با سوآب[4] (به استاندارد های ملی ایران شمارهٔ ۴۸۰۶ و ۶۱۶۵ مراجعه کنید).

۹-۳ دریافت نمونه

شرایط نمونه‌ها را هنگام دریافت، کنترل کنید.
در صورت وجود شرایط نامطلوب یا کافی نبودن مقدار نمونه، آزمایشگاه بهتر است نمونه را پذیرش نکند.
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.
نمونه‌های پذیرفته شده در آزمایشگاه را به گونه‌ای مستند کنید که امکان نشـان دادن پیشـرفت کـار وجـود داشته باشد. شناسایی و شناسه کدگذاری نمونه‌ها و سوابق باید در هر مرحله در آزمایشگاه قابل ردیابی باشد.
در صورت لزوم سطح خارجی ظروف بهتر است با استفاده از مواد ضدعفونی کنندهٔ مناسب ضدعفونی شوند.
ظروف نمونه برداری را از نظر نقص‌های فیزیکی ظاهری کنترل کنید.
آگاهی‌های زیر را هنگام دریافت نمونه یادداشت کنید:

الف-تاریخ دریافت نمونه (در صورت لزوم ساعت)؛

ب–جزئیات نمونه برداری (تاریخ و زمان نمونه برداری و در صورت لزوم و مشخص بودن شرایط نمونه)؛

پ- نام و نشانی مشتری.

هنگام دریافت نمونه‌های فاسد شدنی دمای حمل و نقل یا دمای نمونهٔ شبیه سازی شده برای این منظـور را ثبت کنید.
در صورت امکان نمونه‌ها را به محض دریافت ترجیحاً در مدت زمان ۲۴h با توافق طرفین آزمون کنید.

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

برای فرآورده‌های بسیار فاسد شدنی (برای مثال: صدف[1]) تا ۲۴h از زمان نمونه برداری بهتر است آزمون انجام شود. برای فرآورده‌های فاسد شدنی (برای مثال: ماهی و شیر خام) تا ۳۶h از زمان نمونه برداری بهتر است آزمون انجام شود.

چنانچه نتوان آزمون را در زمان‌های تعیین شده انجام داد، در صورت عدم تغییر اساسی میکروارگانیسم ها در مادهٔ زمینه‌ای نمونه، می توان نمونه‌ها را در دمای کمتر از ۱۵°C- و ترجیحاً ۱۸°C- منجمد کرد.

۹-۴ انبارش

انبارش نمونه‌های در انتظار آزمون را در شرایطی که حداقل تغییر در تعداد میکروارگانیسم های موجود ایجاد شود، انجام دهید.

توصیه می شود دماهای انبارش به صورت زیر باشد:

الف-فرآورده‌های پایدار : درجه حرارت محیط (۱۸°C تا ۲۷°C)؛

ب-فرآورده‌های منجمد یا فوق انجماد: کمتر از ۱۵°C- ، ترجیحاً کمتر از ۱۸°C- ؛

پ-سایر فرآورده‌های ناپایدار و همچنین مواد غذایی فاسدشدنی: درجه حرارت محیط : ۲°C ± ۳°C به استاندارد های ملی ایران شمارهٔ ۵-۸۹۲۳ مراجعه کنید؛

ت-نمونه‌های برداشته شده با سوآب (به استاندارد های ملی ایران شمارهٔ ۴۸۰۶ و شماره ۶۱۶۵ مراجعه کنید).

۹-۵ آزمونه‌ها[2]

۹-۵-۱ مقررات مشخص برای آماده سازی آزمونه

برای مقررات مشخص برای برداشتن آزمونه و آماده سازی سوسپانسیون اولیه و یکنواخت به استانداردهای ملی ایران شمارهٔ ۵-۸۹۲۳ مراجعه کنید

۹-۵-۲نگهداری و امحاء[3] نمونه‌های آزمایشگاهی

جز در موارد خاص، نمونه‌ها را تا رسیدن به نتایج نهایی و یا در صورت لزوم به مدت طولانی تر نگهداری کنید. نمونه‌ها را در ظروف سترون (برای مثال: کیسه پلاستیکی) بسته بندی کرده و به انبار با دمای انبارش اولیه آن‌ها انتقال دهید.

فرآورده‌های فاسد شدنی منجمد می شوند.

---

1 - Shellfish
2 - Test portion
3 - Destruction

یادآوری- به طور معمول به دلیل امکان 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 فرآورده‌های پودری (بدون آب) را در یک اتاق یا فضای جداگانه یا اتاقک محافظ، انجام دهید.

پیش از بازکردن بسته بندی نمونه‌های 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 زمان حداقل ۱۰min در محلول حاوی ۱۰۰ppm تا ۲۰۰ppm کلر آزاد (یا سایر مواد سترون کنندۀ مناسب) غوطه‌ور کنید تا میکروارگانیسم هایی که ممکن است نمونه را آلوده کنند از بین بروند.

وسایلی که برای باز کردن بسته بندی و جابه‌جایی کل نمونه و یا بخشی از آن (برای مثال: قوطی بازکن، قیچی، قاشقک، گیره، پی‌پت) استفاده می‌شود، باید سترون باشند.

پیش از شروع آزمون بهتر است محدودۀ آزمون را با مواد ضدعفونی کنندۀ مناسب تمیز و پاک کنید.

بهتر است دست‌ها را بلافاصله پیش از آزمون و همچنین در صورت آلوده شدن در طی آزمون بشوئید.

توصیه می‌شود، همه وسایل به کار رفته سترون بوده و از قرار گرفتن در معرض آلودگی پیش از استفاده و در طی آزمون محافظت شوند.

بهتر است همه وسایل و لوازم برای استفاده بعدی یا سترون‌سازی، در ظروف مناسب قرار داده شوند.

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 جریان هوا (برای مثال: بسته بودن درها و پنجره‌ها) اطمینان حاصل کنید و از حرکت غیرضروری کارکنان در طی آزمون پیش‌گیری کنید؛

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

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

ت-آزمون را بدون تاخیر انجام دهید؛

ث-فعالیت‌های "تمیز" و "کثیف" را از نظر زمانی یا مکانی تفکیک کنید (به ویژه این موضوع برای نمونه‌های با احتمال خطر بالا برای مثال: گوشت خام و تخم مرغ خام حائز اهمیت است)؛

ج-از وسایل یک‌بار مصرف استفاده کنید؛

چ- در صورتی که همه محتویات بسته پی‌پت‌ها و پتری دیش‌های یک‌بار مصرف در طی یک دوره آزمون استفاده نمی‌شود، اطمینان حاصل کنید که پس از برداشتن تعدادی از آن، به طور صحیح بسته شده باشد؛

ح-پس از ریختن هر گونه مواد بلافاصله با استفاده از دستمال‌های[1] نخی یا هر ماده مناسب دیگر آغشته به الکل ٪۷۰ یا سایر مواد ضدعفونی کنندهٔ[2] پاک کنید و سپس پیش از ادامه آزمون، سطح میز کار را تمیز و ضدعفونی کنید؛

خ-برای آزمون فرآورده‌هایی که احتمال وجود باکتری‌های بیماری‌زا در آن وجود دارد، از اتاقک ایمنی استفاده کنید؛

د-هنگام برداشتن یک پی‌پت سترون از جا پی پتی نباید نوک پی‌پت به سطح خارجی پی پت‌های باقیمانده در ظرف تماس پیدا کند زیرا این سطوح در معرض آلودگی می‌باشند؛

ذ-از تماس پی‌پت‌ها به لبه یا گردن بطری‌های 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 پتری دیش‌ها، لوله‌ها و بطری ها؛

ب-هنگام استفاده از تکان دهنده[3]، سرنگ ها و سانتریفوژها و مانند آن؛

پ-هنگام خالی کردن پی‌پت‌ها؛

ت-هنگام سترون‌سازی لوپ ها و سوزن‌های کشت تلقیح مرطوب؛

ث-هنگام باز کردن آمپول‌های حاوی کشت‌های لیوفیلیزه[4] .

بنابراین موارد تشکیل آن‌ها باید به حداقل برسد.

برای روش‌های ملکولی مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۱۰۵۵۱ احتیاط‌های بیشتر در نظر گرفته شده است.

۱۰-۲ آماده سازی سوسپانسیون اولیه و رقت‌ها

۱۰-۲-۱ کلیات

---

1 - Pads

۲ - هنگام استفاده از سایر مواد ضدعفونی کننده، زمان تماس مناسب مطابق با دستورالعمل سازنده استفاده می‌شود.

3 - Shaker

4 -freeze-dried

سوسپانسیون اولیه و رقت‌ها را مطابق با قسمت مربوطه در استانداردهای ملی ایران شماره ۸۹۲۳ (همه قسمت‌ها) تهیه کنید. مدت زمان بین پایان آماده سازی سوسپانسیون اولیه، تلقیح و ریختن محیط کشت نباید بیشتر از ۴۵min باشد. مگر در موارد خاص که در استانداردهای مربوطه به آن اشاره شده است.
مراحل آماده سازی سوسپانسیون اولیه و رقت‌ها ممکن است با استفاده از یک مرحله غنی‌سازی که در استانداردهای خاص بیان 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 میکروارگانیسم‌ها مورد نظر است برای بهبود حساسیت و دقت روش شمارش، تغلیظ آزمونه انجام می شود. تغلیظ ممکن است به وسیله سانتریفوژ یا فیلتراسیون غشایی انجام شود.
در صورت سانتریفوژ کردن، مجدداً مواد ته نشین شده را در حجم مشخصی از محلول رقیق‌کننده 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 بررسی‌های قبلی (به پیوست ث- کتابنامه مراجعه کنید) 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 می‌شود، به موازات آن، روش استاندارد (بدون فیلتراسیون) انجام شود.

۱۰-۲-۲-۲ جداسازی به روش ایمونولوژی

چنانچه تعداد کمی از میکروارگانیسم‌های مورد نظر در نمونه وجود دارد، جداسازی و تغلیظ میکروارگانیسم‌ها ممکن است با گلوله‌های ایمونومگنتیک پوشیده شده با آنتی بادی‌های خاص انجام شود.
مهره‌های همراه با میکروارگانیسم مورد نظر را مستقیماً روی سطح محیط کشت جامد خاص مطابق با استانداردهای خاص آن پخش کنید. به هر حال مهره‌های ایمونومگنتیک که با آنتی بادی‌های خاص پوشیده شده است برای این مرحله تغلیظ مناسب است. همچنین بررسی‌های ارزیابی انجام و چاپ شده در این

---
1 - Linearity
2 - Repeatability

زمینه، به میکروبیولوژی مواد غذائی مربوط است. این تصدیق به ویژه در صورتی دارای اهمیت است که این روش مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۱۰۵۲۷ صحه گذاری نشده باشد.

۱۱ شمارش

۱۱-۱کلیات

برای ارزیابی کیفیت میکروبی و/یا ایمنی مواد غذایی و خوراک دام تنها شناخت میکروارگانیسم‌های موجود در آن‌هاکافی نیست. در بیشتر موارد، کمیت میکروارگانیسم‌ها هم به همان اندازه حائز اهمیت است که باعث ضرورت شمارش میکروارگانیسم‌ها می شود . شمارش میکروارگانیسم‌ها به روش‌های مختلف از طریق آزمون مستقیم (میکروسکوپی)، تلقیح محیط کشت جامد یا مایع، فلوسایتومتری[1] و با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز هم‌زمان[2] انجام می‌شود. اگرچه در این استاندارد فقط روش‌های شمارش با استفاده از محیط‌های کشت جامد و مایع ارائه شده است.

شمارش در محیط کشت جامد بر اساس توانایی بیشتر میکروارگانیسم‌ها در تشکیل کلنی روی محیط کشت جامد یا داخل آن می‌باشد که با استفاده از چشم غیرمسلح یا با کمک وسایل بزرگنمایی ساده قابل تشخیص است .

چنانچه ماده زمینه‌ای حاوی سطح بالایی از ذرات مداخله‌گر باشد، بهتر است ابتدا با استفاده از ته نشین کردن یا با استفاده از کیسه‌های فیلتردار جداسازی شود.

چنانچه تعداد باکتری‌های مورد انتظار خیلی کم است (کمتر از ۱۰ کلنی در پایین ترین رقت در پلیت) توصیه می‌شود، برای بهبود قابلیت اطمینان آماری نتایج، از محیط کشت مایع برای شمارش (برای مثال: MPN) استفاده شود (به پیوست‌های ب و پ مراجعه کنید). می‌توان همچنین از سانتریفیوژ، جداسازی به روش ایمونولوژی یا با استفاده از تغلیظ به روش فیلتراسیون استفاده کرد.

۱۱-۲ شمارش با استفاده از محیط کشت جامد

۱۱-۲-۱ کلیات

توصیه می‌شود، روی پتری دیش، شمارهٔ نمونه، رقت، تاریخ و هر اطلاعات لازم دیگر درج شود.

توصیه می‌شود، برای حصول اطمینان از به دست آوردن تعداد مناسبی از کلنی در پلیت ها (طبق بند ۱۱-۳-۱) و همچنین غلبه بر خصوصیات مهارکنندگی احتمالی آن‌ها، رقت‌های مناسب را انتخاب کنید.

---

1 - Flow cytometry

2 - Real time Polymerase Chain Reaction

برای انتقال رقت‌ها، از پی‌پت‌های سترون جداگانه استفاده کنید به غیر از مـواردی کـه از بـالاترین رقـت بـه پایین ترین رقت کار می کنید.

یادآوری- موارد فوق برای رقت‌های اعشاری است ولی برای سایر رقت‌ها نیز استفاده می‌شود برای مثال:

۱ ◄ ۵ و ۱ ◄۲

۱۱-۲-۲ تعداد پتری دیش‌های هر رقت

برای روش‌های شمارش میکروبیولوژی مواد غذایی، یک پلیت برای هر رقت و حداقل دو رقـت متـوالی بایـد استفاده شود. همچنین ممکن است برای بهبود اطمینان از نتایج، دو پلیت برای هر رقت استفاده شود.

چنانچه فقط یک رقت تهیه می‌شود، برای بهبود اطمینان از نتایج، دو پلیت این رقت باید مطابق با پیوسـت ت، استفاده شود.

برای بهبود اطمینان از نتایج برای آزمایشگاه‌هایی که تضمین کیفیت را انجام نمی دهند دو پلیـت بـرای هـر رقت مطابق با پیوست ت باید انجام شود.

۱۱-۲-۳روش کشت آمیخته[1]

حجم معین از رقت مورد آزمون را بردارید، برای زدودن مایع اضافی چسبیده به قسمت خارجی پی‌پت، نوک پی‌پت را به کناره لوله تماس دهید. در پتری دیش را فقط به اندازه‌ای که پی‌پـت وارد آن شـود بـاز کنیـد و سپس محتویات آن را داخل پتری دیش خالی کنید.

پس از برداشتن محیط کشت آگار حرارت دیده از حمام آب، برای پیش‌گیری از آلودگی پلیت ها بـه وسـیله آب، بطری را با یک دستمال تمیز، خشک کنید. از ریختن محیط کشت روی سطح خارجی ظـروف و داخـل در پلیت خودداری کنید. برای جلوگیری از آلودگی محیط کشت، بطری را در وضعیت تقریبا افقی نگهداریـد و همچنین از قراردادن آن روی میز، بین مراحل ریختن خودداری کنید. محیط کشت ذوب شده را که دمای آن به ۴۴°C تا ۴۷ °C رسیده در مدت ۱۵min از زمان تلقیح (برای جلوگیری از تجمـع کلنـی‌هـا) در هـر پتـری دیـش‌هـا (بـه طـور کلـی۱۸ ml تـا۲۰ ml بـرای پتـری دیـش‌هـای ۹۰mm و ۴۵ml تـا ۵۰ ml در پتری‌دیش‌های ۱۴۰mm برای ایجاد حداقل ضخامت ۳mm) بریزید. از ریختن مستقیم محـیط کشـت ذوب شده بر روی مایه تلقیح خودداری کنید. بلافاصله محیط کشت ذوب شده و مایه تلقـیح را بـا دقـت مخلـوط کنید تا میکروارگانیسم‌ها به طور یکنواخت در محیط کشت توزیع شوند (با استفاده از حرکت دادن ظرف در

---

1 - Pour plate

جهت عقب وجلو، از سمتی به سمت دیگر و حرکت چرخشی). پلیت ها را روی سطح افقی قرار دهید تا خنک شده و به صورت جامد درآید. (زمان بستن آگار نباید بیشتر از ۱۰min باشد).

به منظور پیش‌گیری یا کاهش پخش شدن کلنی‌ها، چنانچه احتمال رشد کلنی‌های پخش شونده (برای مثال: گونه های *پروتئوس*) در نمونه مورد آزمون وجود دارد، پس از جامد شدن آگار محیط کشت، سطح پلیت‌ها را با لایه‌ای از آگار سترون غیر مغذی یا محیط کشت مشابه با محیط کشت مورد استفاده (به طور معمول ۵ml آگار در پتری دیش۹۰mm) بپوشانید.

۱۱-۲-۴ کشت سطحی

۱۱-۲-۴-۱ کلیات

این روش فقط برای ایجاد کلنی‌های سطحی روی پلیت‌های آگار طراحی شده است و نسبت به روش کشت آمیخته برتری دارد. مشاهده شکل ظاهری کلنی‌های سطحی آسان تر بوده و باعث بهبود توانایی آزمون کننده برای تشخیص انواع مختلف کلنی‌ها 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 پلیت‌های پیش ریخته با حداقل ۳mm ضخامت محیط کشت جامد که دارای سطح صاف و عاری از حباب هوا و رطوبت سطحی می‌باشد، استفاده کنید.

برای تسهیل در پخش یکنواخت، سطح آگار جامد شده مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۸۶۶۳ یا استانداردهای مشخص شده خشک می شود تا مایه تلقیح در مدت زمان ۱۵min جذب شود.

۱۱-۲-۴-۲ روش پخش با قاشقک کشت

با استفاده از پی‌پت سترون، مایه تلقیح (به طور معمول ۰٫۱ml یا ۰٫۵ml) از آزمایه مایع یا از سوسپانسیون اولیه در مورد سایر نمونه‌ها را روی پلیت جامد (به ترتیب با قطر ۹۰mm یا ۱۴۰mm) انتقال دهید. این مرحله را برای رقت اعشاری بعدی (کلنی هایی که باید شمارش شوند به ترتیب در رقت 10^{-1} برای مایعات و رقت 10^{-2} برای سایر فرآورده‌ها می باشند)، تکرار کنید. در صورت لزوم این عمل را برای رقت‌های اعشاری بعدی تکرار کنید.

حد شمارش ممکن است با مضرب ۱۰ برابر با آزمون ۱٫۰ml از نمونه برای فرآورده‌های مایع یا ۱٫۰ml از سوسپانسیون اولیه برای سایر فرآورده‌ها بر روی سطح یک پلیت بزرگ (قطر ۱۴۰mm) یا سه پلیت کوچک

(قطر ۹۰mm) کاهش یابد. در هر دو حالت چنانچه فقط از یک رقت استفاده می‌شود به صورت دوتایی، با استفاده از دو پلیت بزرگ و یا شش پلیت کوچک تلقیح را انجام دهید.

با استفاده از قاشقک‌های پخش‌کننده شیشه ای، پلاستیکی یا استیل (برای مثال: میله شیشه‌ای و شبیه چوب هاکی با قطر حدود ۳٫۵mm و طول ۲۰cm و خمیدگی با زاویه قائمه در حدود ۳/۰cm از یک طرف که انتهای آن با گرم کردن پهن شده است) به سرعت مایه تلقیح را به طور یکنواخت روی سطح آگار بدون تماس با دیواره‌های پلیت پخش کنید. با قراردادن پلیت‌ها در دمای آزمایشگاه به مدت زمان ۱۵min اجازه دهید تا مایه تلقیح جذب محیط کشت شود.

در موارد خاص (در استاندارد ملی مربوطه بیان شده است) مایه تلقیح ممکن است روی سطح یک صافی قرار داده شده و سپس به روش مذکور پخش شود.

۱۱-۲-۴-۳ روش اسپیرال پلیت[1]

۱۱-۲-۴-۳-۱ کلیات

این روش برای تعیین تعداد میکروارگانیسم در آزمون‌های بین آزمایشگاهی روی شیر و فرآورده‌های 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 حصول اطمینان از مسطح بودن پلیت ها از نظر ضخامت و سترون بودن و عاری بودن از حباب در سطح پلیت، یک توزیع کننده خودکار با یک سیستم دریافت سترون برای آماده سازی پلیت‌های حاوی آگار، توصیه می‌شود.

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

پلیت ها را پیش از استفاده خشک کنید (به استاندارد ملی ایران شماره ۸۶۶۳ مراجعه کنید) و اطمینان حاصل کنید که قطرات کوچک آب روی سطح پلیت مشاهده نمی‌شود.

۱۱-۲-۴-۳-۳ روش تلقیح پلیت ها و شمارش

---

1 - Spiral-plate method

سرسوزن ها و لوله‌ها را ابتدا با انتقال محلول سدیم هیدروکلریت (طبق بند ۶-۲۴-۴) و سپس آب سترون در همه سیستم پیش از انتقال نمونه مایع داخل سوزن ها آلودگی‌زدایی کنید. به طور متناوب میکروسرنگ‌های یک‌بار مصرف با مجرای مسدود شده را تعویض کنید.

یک پلیت جامد پیش ریخته را در پتری دیش روی صفحه گردان قرار داده و سوزن را پایین بیاورید. نمونه با حرکت سر سوزن ها روی پلیت جامد در حال چرخش به طور تفاضلی[1] پخش می‌شود. پلیت تلقیح شده را برداشته و سوزن‌ها را به حالت اولیه برگردانید. سوزن را آلودگی‌زدایی کنید و یا میکروسرنگ را تعویض کنید و برای تلقیح پلیت بعدی پر کنید.

اجازه دهید مایه تلقیح با قراردادن در دمای اتاق به مدت زمان کمتر ۱۵min جذب شود، سپس گرمخانه‌گذاری کنید(طبق بند ۱۱-۲-۵).

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

۱۱-۲-۵ گرمخانه‌گذاری

غیر از موارد بیان شده در استانداردهای خاص، بلافاصله ظروف تلقیح شده را به صورت وارونه در دمای مناسب در گرمخانه قرار دهید. در صورت خشک شدن بیش از حد پلیت ها، (برای مثال: در دمای ۵۵°C یا در مواقع گردش هوای زیاد) ظروف را پیش از گرمخانه‌گذاری در کیسه‌های پلاستیکی با در شل قرار دهید و یا از سیستم‌های 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 می‌باشد (برای مثال: طی عملیات معمول پر کردن و خالی کردن گرمخانه)، اما مهم است که این دوره ها به حداقل برسد. این تغیرات بهتر است برای حصول اطمینان از عدم تاثیر قابل توجه روی نتایج پایش شوند.

---

[1] -Differentially

در برخی شرایط، ممکن است برای سازماندهی کارها در آزمایشگاه نگه‌داری پلیت‌های تلقیح شده برای حداکثر مدت زمان ۲۴h پیش از گرمخانه‌گذاری در یخچال، موثر می‌باشد. در صورت انجام، آزمایشگاه باید اطمینان یابد که این عمل تاثیری روی شمارش نتایج ندارد.

به طور معمول برای گرمخانه‌گذاری پلیت ها در شرایط هوازی، بهتر است بیشتر از ۶ عدد روی هم انباشته نشوند و توصیه می‌شود، جدا از هم و از دیوار گرمخانه به فاصله حداقل ۲۵mm قرار گیرند. به هر حال انباشتن بیشتر از حد با فاصله کم ممکن است برای گرمخانه‌های مجهز شده با سیستم جریان هوا قابل قبول باشد. در این حالت توزیع دما بهتر است تصدیق شود.

توصیه می‌شود، پلیت ها بلافاصله پس از پایان گرمخانه‌گذاری، بررسی شوند. پلیت ها ممکن است برای حداکثر مدت زمان ۴۸h در یخچال نگه‌داری شوند (جز در موارد مشخص شده در استانداردهای خاص). نگهداری در یخچال در دوره‌های طولانی مدت فقط در صورتی مجاز است که روی تعداد، ظاهر یا تایید بعدی کلنی‌ها تاثیری نداشته باشد. در برخی از محیط‌های کشت که دارای نشانگر رنگی هستند پلیت‌های نگهداری شده در یخچال بهتر است پیش از آزمون برای حصول اطمینان از برگشتن رنگ صحیح آن در دمای اتاق به تعادل برسند.

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

۱۱-۳-۱ شمارش کلنی‌ها

از دوره‌های گرمخانه‌گذاری تعیین شده در استاندارد خاص پیروی کنید. کلنی‌ها (مجموع کلنی‌ها، کلنی‌های تیپیک یا کلنی‌های احتمالی) موجود در هر پلیت حاوی ۳۰۰ کلنی و کمتر از آن (یا هر تعدادی که در استاندارد خاص بیان شده است) شمارش کنید.

هنگام شمارش کلنی‌های تیپیک یا احتمالی، توصیف کلنی‌ها باید در استاندارد خاص ارائه شده باشد.

در موارد خاص، ممکن است شمارش کلنی‌ها مشکل باشد (برای مثال: وجود میکروارگانیسم‌های پخش شده). در این حالت کلنی‌های پخش شده را یک کلنی در نظر بگیرید. در صورتی که کمتر از یک چهارم ظرف کلنی‌ها پخش شده است، کلنی‌های قسمتی از ظرف را که در آن کلنی پخش نشده است، شمارش کنید و از روی آن تعداد کلنی برای همه پلیت را محاسبه کنید. چنانچه کلنی در بیشتر از یک چهارم ظرف پخش شده است آن را شمارش نکنید. کلنی‌های پخش شده به شکل زنجیر را نیز یک واحد کلنی در نظر بگیرید.

یادآوری- در موارد خاص، جهت مقایسه ذرات نمونه با کلنی‌ها در ظروف تلقیح شده گرمخانه‌گذاری شده (برای این منظور عملیات تلقیح باید در دو سری انجام شود) می‌توان شرایط دمایی ۳°C±۲°C ایجاد کرد و ظروف تلقیح شده را تا بررسی نتایج نگه‌داری کرد. همچنین می‌توان از ذره بین چشمی برای تشخیص ذرات نمونه از کلنی استفاده کرد.

انواع روش‌های شمارش در بند ۱۰-۳-۲، پیوست ب و ت بیان شده است، شمارش در موارد خاص در نظر گرفته شده و اطلاعات در فواصل اطمینان ارائه شده است.

در روش‌های مختلف محاسبه، پلیت‌های فاقد کلنی را نیز باید برای شمارش در نظر بگیرید. این ظروف را نگه‌داری کنید زیرا برای محاسبه میانگین حائز اهمیت می‌باشد.

در صورت استفاده از اسپیرال پلیتر، شمارش کلنی را مطابق با بند ۱۰-۲-۴-۳-۳ انجام دهید.

۱۱-۳-۲ بیان نتایج

۱۱-۳-۲-۱ کلیات

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

الف- تلقیح از هر رقت و حداقل دو رقت متوالی در پتری دیش به قطر ۹۰mm؛

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

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

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

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

این ارقام در استانداردهای خاص معین شده است. حداکثر تعداد کلنی‌ها در هر پلیت، برای میکروارگانیسم‌های مولد کلنی‌های بزرگ در استانداردهای خاص مشخص شده است.

در صورت استفاده از سایر اندازه‌های پلیت (به غیر از پلیت های۹۰ mm)حداکثر تعداد کلنی‌ها متناسب با سطح پلیت ها (یا صافی ها) باید افزایش یا کاهش یابد.

مثال: برای پلیت‌های با قطر ۵۵mm ، حداکثر تعداد قابل شمارش کلنی‌ها باید ۱۱۰ کلنی باشد (معادل با شمارش کلی ۳۰۰cfu روی پتری دیش ۹۰mm)

برای پلیت‌های با قطر ۱۴۰mm، حداکثر تعداد قابل شمارش کلنی‌ها باید ۷۳۰ کلنی باشد (معادل با شمارش کلی ۳۰۰cfu روی پتری دیش ۹۰mm)

۱۱-۳-۲-۱-۲ روش‌های محاسبه که در زیر معین شده است بیشتر برای مواردی است که آزمون‌ها مطابق با شرایط خوب آزمایشگاهی انجام می شود. گاهی موارد خاص ممکن است اتفاق بیفتد (برای مثال: در 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 کلنی‌ها یا کلنی‌های تیپیک)

برای اعتباردهی به نتایج، به طور کلی لازم است کلنی‌ها را حداقل روی یک پلیت که دارای حداقل ۱۰ کلنی می باشد، شمارش کنید [مجموع کلنی‌ها، کلنی‌های تیپیک یا کلنی‌های مطابق با معیار شناسایی (به بند ۱۱-۳-۲-۳ مراجعه کنید)].

N تعداد میکروارگانیسم‌های موجود در آزمایه به عنوان میانگین از دو رقت متوالی با استفاده از فرمول شماره ۱ محاسبه کنید:

$$N = \frac{\sum C}{V \times 1.1 \times d} \qquad (1)$$

که در آن:

$\sum C$ مجموع کلنی‌های 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 میلی‌لیتر؛

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

چنانچه بیشتر از یک رقت استفاده می‌شود، نسبت بین شمارش کلنی از رقت d_2 و شمارش کلنی از رقت d_1 انتظار می‌رود که ۱۰٪ باشد. توصیه می‌شود، حدود بالایی و پایینی توسط آزمایشگاه برای شمارش کلنی از رقت d_2 بهتر است مشخص شود. این حدود در استاندارد ملی ایران شماره ۲-۱۴۱۳۰ممکن است مطرح شده باشد. چنانچه این حدود دنبال نشد، توصیه می‌شود، نتایج با احتیاط تفسیر شود.

مثال: چنانچه شمارش کلنی از رقت d_1 برابر با ۲۵۰ باشد، شمارش کلنی از رقت d_2 بهتر است کمتر از ۱۳ و بیشتر از ۳۹ نباشد. به استاندارد ملی ایران شماره ۲-۱۴۱۳۰ مراجعه کنید.

نتایج محاسبه شده را تا دو رقم معنی‌دار گرد کنید. به این ترتیب که چنانچه رقم سوم کمتر از ۵ است رقم قبلی را تغییر ندهید و چنانچه 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 یک عدد کامل با دو رقم معنی‌دار بیان کنید.
نتایج را به صورت تعداد N میکروارگانیسم در هر میلی‌لیتر (فرآورده‌های مایع) یا هرگرم (سایر فرآورده‌ها) گزارش کنید.

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

- در اولین رقت انتخابی (10^{-2}): ۱۶۸ کلنی؛
- در دومین رقت انتخابی (10^{-3}): 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 میکروارگانیسم‌ها ۱۷۰۰۰ یا $1/7 \times 10^{-4}$ در هر میلی‌لیتر یا هر گرم از فرآورده می‌باشد.

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 معمول ۵ کلنی) از کلنی‌های احتمالی در هر پلیت مورد شمارش را برای شناسایی انتخاب کنید. پس از شناسایی برای هر پلیت a تعداد کلنی مطابق با معیار شناسایی به دست آمده را با استفاده از فرمول شماره ۲ محاسبه کنید:

$$a = \frac{b}{A} \times C \qquad \textbf{(۲)}$$

که در آن:

b تعداد کلنی‌های مطابق با معیار شناسایی از میان کلنی‌های شناسایی شده A؛

C تعداد کل کلنی‌های احتمالی شمارش شده روی پلیت.

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

تعداد N، NE یا N_1 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 یا با جانشین کردن c با a در معادله معین شده در بند ۱۱-۳-۲-۴-۱ و ۱۱-۳-۲-۵-۳ محاسبه کنید.

نتایج را طبق بند ۱۱-۳-۲-۲ گرد کنید.

نتایج را به ترتیب طبق بند ۱۱-۳-۲-۲، ۱۱-۳-۲-۴-۱ و ۱۱-۳-۲-۵-۳ بیان کنید.

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

- در اولین رقت انتخابی (10^{-3}): ۶۶ کلنی؛
- در دومین رقت انتخابی (10^{-4}): ۴ کلنی.

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

از ۶۶ کلنی، تعداد ۸ کلنی آزمون شد و ۶ کلنی مطابق با معیار و بنابراین $a = 50$

از ۴ کلنی، هر ۴ کلنی مطابق با معیار و بنابراین $a = 4$

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

نتایج را طبق بند ۱۱-۳-۲-۲ گرد کنید. تعداد میکروارگانیسم‌ها ۴۹۰۰۰ یا $۴/۹ \times ۱۰^{۴}$ در هر میلی‌لیتر یا هر گرم از نمونه می‌باشد.

۱۱-۳-۲-۴ روش محاسبه : شمارش کم

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

شمارش‌های از ۱۰ کلنی تا حد بالای هر روش در دامنهٔ بهینهٔ دقت قرار دارد. وقتی تعداد کلنی‌ها به کمتر از ۱۰ می رسد، دقت به سرعت کاهش می‌یابد. بر اساس هدف آزمون مورد نظر، یک حد اندازه‌گیری پایین تر را می توان برای تعداد کمتر از ۱۰ کلنی تعیین کرد.

مطابق با ISO/TR 13843 پایین‌ترین 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) می‌باشد. اصطلاح "ضریب واریانس" در اینجا نسبت به RSD ارجحیت دارد. ضریب واریانس،C_V، از تقسیم تخمین انحراف استاندارد s برای یک جمعیت از یک نمونه بر میانگین آن نمونه $\bar{x}$ محاسبه می‌شود.

بنابراین:

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

در مورد توزیع پواسون، x (تعداد میکروارگانیسم‌ها در هر میلی‌لیتر یا هر گرم از نمونه) طبق فرمول شماره ۳ محاسبه می‌شود:

$$x = \frac{1}{(C_V)^2} \qquad (۳)$$

چنانچه C_V را به عنوان ٪۵۰ نتیجه حد دقت نسبی قابل قبول (که در میکروبیولوژی منطقی به نظر می رسد) در نظر گرفته شود، حد پایین‌تر اندازه‌گیری با تعداد کلنی های به دست آمده با استفاده از فرمول شماره ۳ محاسبه می‌شود:

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

بنابراین توصیه می‌شود، برای نتایج شمارش‌های کمتر از ۴ فقط از جستجوی میکروارگانیسم‌ها استفاده شود.

به طور خلاصه :

در صورتی که پلیت، حاوی کمتر از ده کلنی، اما حداقل ۴ کلنی داشته باشد نتایج را طبق فرمول زیر محاسبه کنید:

$$N_E = \frac{C}{V \times d}$$

و آن را به صورت تعداد تخمینی N_E میکروارگانیسم در هر میلی‌لیتر (فرآورده‌های مایع) یا در هر گرم (سایر فرآورده‌ها) گزارش کنید.

یادآوری- اصطلاح " تعداد تخمینی" به معنی تخمین مقدار واقعی با دقت کمتر می‌باشد.

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

"میکروارگانیسم‌ها وجود دارند اما تعداد آن‌ها کمتر از $(\frac{1}{vd} \times 4)$در هر گرم یا میلی‌لیتر می باشد".

۱۱-۳-۲-۴-۲ موردی که پلیت (آزمایه یا سوسپانسیون اولیه یا اولین رقت) فاقد کلنی باشد

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

" کمتر از $\frac{1}{vd}$میکروارگانیسم در هر میلی‌لیتر " (فرآورده‌های مایع) یا "کمتر از $\frac{1}{vd}$میکروارگانیسم‌ها در هر گرم " (سایر فرآورده‌ها)

که در آن:

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

v حجم مایه تلقیح مورد استفاده در هر ظرف، بر حسب میلی‌لیتر

۱۱-۳-۲-۴-۳ حالت های خاص

۱۱-۳-۲-۴-۳-۱ کلیات

این موارد مربوط به شمارش کلنی‌های تیپیک یا احتمالی می‌باشد.

۱۱-۳-۲-۴-۳-۲ حالت ۱

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

" کمتر از $\frac{1}{v_2 d_2}$و بیشتر از $\frac{1}{v_1 d_1}$میکروارگانیسم در هر میلی لیتر " (فرآورده‌های مایع) یا " کمتر از $\frac{1}{v_2 d_2}$و بیشتر از $\frac{1}{v_1 d_1}$میکروارگانیسم در هر گرم " (سایر فرآورده‌ها).

که در آن:

d_1 و d_2 ضریب رقت‌های مربوط به رقت‌های d_1 و d_2؛

V_1 حجم مایه تلقیح مورد استفاده در پلیت اولین رقت d_1 بر حسب میلی‌لیتر؛
V_2 حجم مایه تلقیح مورد استفاده در پلیت رقت بعدی d_2 بر حسب میلی‌لیتر.

مثال : شمارش نتایج به دست آمده به صورت زیر است:
- در اولین رقت انتخابی(10^{-2}): بیشتر از ۳۰۰ کلنی در پلیت، با کلنی های تیپیک یا تایید شده؛
- در دومین رقت انتخابی (10^{-3}): 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 فرآورده" بیان می شود.

۱۱-۳-۲-۴-۳-۳ حالت ۲

در صورتی که تعداد کلنی های تیپیک و غیر تیپیک در پلیت اولین رقت d_1 حاوی بیشتر از ۳۰۰ (یا هر مقدار بیان شده در استاندارد خاص) بدون مشاهدهٔ کلنی های تیپیک یا تایید شده باشد و در صورتی که پلیت رقت بعدی d_2 حاوی ۳۰۰ کلنی و کمتر از آن (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 $\frac{1}{v_2 d_2}$ میکروارگانیسم در هر میلی لیتر " (فرآورده‌های مایع) یا " کمتر از $\frac{1}{v_2 d_2}$ میکروارگانیسم در هر گرم " (سایر فرآورده‌ها).

که در آن:
d_2 ضریب رقت مربوط به رقت d_2 می‌باشد؛
V_2 حجم مایه تلقیح مورد استفاده در پلیت رقت بعدی، بر حسب میلی‌لیتر می‌باشد.

مثال : شمارش نتایج به دست آمده به صورت زیر است :
- در اولین رقت انتخابی (10^{-2}): بیشتر از ۳۰۰ کلنی در پلیت بدون کلنی های تیپیک یا تایید شده؛
- در دومین رقت انتخابی (10^{-3}): ۳۳ کلنی بدون کلنی تیپیک یا تایید شده.

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

۱۱-۳-۲-۵ روش محاسبه : حالت های خاص

یادآوری ۱- تعدادی از مثال ها مطابق با بند ۱۱-۳-۲-۲ نمی‌باشد که حد بالایی و پایینی تعداد کلنی‌ها را در رقت d_2 با نتایج رقت d_1 مشخص کرده است. چنانچه تکرار آزمون مقدور نباشد، می‌توان نتایج را طبق بند ۱۱-۳-۲-۲ محاسبه و بیان کرد ولی دقت نتایج کمتر از حالت معمول بوده و بهتر است در گزارش آزمون به آن اشاره شود.

یادآوری ۲- همه توضیحات و مثال ها برای یک پتری دیش از هر رقت آورده شده است و برای دو پتری دیش به پیوست ت مراجعه کنید

یادآوری ۳- حدود پایینی تعداد کلنی رقت d_2 که در مثال ها پیشنهاد شده است از استاندارد ملی ایران شماره ۲-۱۴۱۳۰ گرفته شده است.

یادآوری ۴- ارقام فاصله اطمینان بهتر است با حداکثر تعداد مشخص شده برای شمارش کلنی مطابق باشد.

۱-۵-۲-۳-۱۱ چنانچه تعداد کلنی های شمارش شده (مجموع کلنی‌ها، کلنی های تیپیک یا کلنی های احتمالی) بیشتر از حداکثر تعداد قابل شمارش (۳۰۰ کلنی یا هر تعداد تعیین شده در استاندارد خاص) در پلیت اولین رقت d_1 باشد و تعداد کلنی ها (مجموع کلنی‌ها ، کلنی‌های تیپیک یا کلنی های مطابق با معیار شناسایی) کمتر از ۱۰ کلنی(حد شمارش‌های پایین) در رقت بعدی d_2 باشد نتایج را به صورت زیر بیان کنید:

یادآوری- زیربندها برای مثال: می باشند.

الف- چنانچه تعداد کلنی ها در پلیت حاوی اولین رقت d_1 در محدودهٔ [حداکثر تعداد قابل شمارش+۱، حد بالایی فاصله اطمینان برای حداکثر تعداد قابل شمارش](برای مثال: ۳۰۱-۳۳۴) (پیوست ب) باشد و شمارش کلنی در رقت d_2 کمتر از حد پایینی مشخص شده در بند ۱۱-۳-۲-۲ نباشد از موارد کلی محاسبه طبق بند ۱۱-۳-۲-۲ استفاده کنید.

مثال۱: شمارش نتایج به دست آمده (وقتی حداکثر تعداد ۳۰۰ کلنی برای شمارش کلنی‌های تعیین شده است) به صورت زیر است :

- در اولین رقت انتخابی ($۱۰^{-۲}$): ۳۱۰ کلنی (کمتر از ۳۳۴، حد بالایی فاصله اطمینان برای ۳۰۰ کلنی)؛
- در دومین رقت انتخابی ($۱۰^{-۳}$): ۸ کلنی. حد پایینی برای شمارش کلنی در رقت $۱۰^{-۳}$ ، ۱۸ کلنی می‌باشد که از ۳۱۰ کلنی رقت $۱۰^{-۲}$ تعیین شده است.

نتایج این شمارش غیر قابل قبول می‌باشد.

مثال۲: شمارش نتایج (وقتی حداکثر تعداد ۱۵۰ کلنی برای شمارش کلنی‌های تعیین شده است) به صورت زیر است:

- در اولین رقت انتخابی ($۱۰^{-۲}$) : ۱۶۰ کلنی (کمتر از ۱۷۴، حد بالایی فاصله اطمینان برای ۱۵۰ کلنی)؛
- در دومین رقت انتخابی ($۱۰^{-۳}$): ۸ کلنی. حد پایینی برای شمارش کلنی در رقت $۱۰^{-۳}$ ، ۷ کلنی می‌باشد که از ۱۶۰ کلنی رقت $۱۰^{-۲}$ تعیین شده است.

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

ب- چنانچه تعداد کلنی‌ها برای پلیت رقت d_1 حاوی بیشتر از حد بالایی فاصلهٔ اطمینان برای حداکثر تعداد قابل شمارش (برای مثال: ۳۳۴) باشد و شمارش کلنی رقت d_2 کمتر از حد پایینی مشخص شده در بند ۱۱-۳-۲-۲ نباشد، و از حد بالایی فاصله اطمینان برای حداکثر تعداد قابل شمارش محاسبه می‌شود و فقط نتایج شمارش رقت d_2 در نظر گرفته می‌شود و شمارش تخمینی محاسبه کنید (طبق بند ۱۱-۳-۲-۴-۱).

مثال ۱: شمارش به دست آمده (وقتی حداکثر تعداد ۳۰۰ کلنی برای شمارش کلنی‌های تعیین شده است) از نتایج به صورت زیر است:

- در اولین رقت انتخابی ($۱۰^{-۲}$) : بیشتر از ۳۳۴ کلنی در پلیت؛
- در دومین رقت انتخابی ($۱۰^{-۳}$): ۹ کلنی. حد پایینی برای شمارش کلنی در رقت $۱۰^{-۳}$ ، ۲۰ کلنی می‌باشد که از ۳۳۴ کلنی رقت $۱۰^{-۲}$ تعیین شده است.

نتایج این شمارش غیر قابل قبول می‌باشد.

مثال۲ : شمارش به دست آمده (وقتی حداکثر تعداد ۱۵۰ کلنی برای شمارش کلنی‌های تعیین شده است) از نتایج به صورت زیر است:

-در اولین رقت انتخابی ($۱۰^{-۲}$) : بیشتر از ۱۷۴ کلنی در پلیت؛
- در دومین رقت انتخابی ($۱۰^{-۳}$): ۹ کلنی. حد پایینی برای شمارش کلنی در رقت $۱۰^{-۳}$ ، ۸ کلنی می‌باشد که از ۱۷۴کلنی رقت $۱۰^{-۲}$ تعیین شده است.

شمارش تخمینی را بر اساس کلنی های شمارش شده در پلیت برای رقت $۱۰^{-۳}$ را گزارش کنید (طبق بند ۱۱-۳-۲-۴-۱).

مثال۳ : شمارش به دست آمده از نتایج (وقتی حداکثر۱۵۰ کلنی برای شمارش در نظر گرفته شده است) به صورت زیر است:

- در اولین رقت انتخابی ($۱۰^{-۲}$): بیشتر از ۱۷۴ کلنی در پلیت؛
- در دومین رقت انتخابی ($۱۰^{-۳}$): ۵ کلنی. حد پایینی برای شمارش کلنی در رقت $۱۰^{-۳}$ ، ۸ کلنی می‌باشد که از ۱۷۴کلنی رقت $۱۰^{-۲}$ تعیین شده است.

نتایج شمارش غیر قابل قبول می باشد.

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

"بیشتر از $\frac{300}{vd}$(در مورد مجموع کلنی ها یا کلنی های تیپیک)" یا "بیشتر از $300 \times \frac{b}{A} \times \frac{1}{vd}$(در مورد کلنی های تایید شده) " و به صورت میکروارگانیسم در هر میلی لیتر (فرآورده‌های مایع) یا در هر گرم (سایر فرآورده‌ها) بیان می‌شود.

که در آن :

d رقت آخرین رقت تلقیح شده؛

v حجم تلقیح شده در هر پلیت بر حسب میلی‌لیتر؛

b تعداد کلنی‌ها مطابق با معیارهای شناسایی از جمله کلنی های تلقیح شده A.

۱۱-۳-۲-۵-۳ وقتی پلیت حاوی آخرین رقت تلقیح شده قابل شمارش باشند و دارای حداقل ۱۰ کلنی و حاوی ۳۰۰ کلنی یا کمتر باشد (یا هر تعداد ذکر شده در استاندارد خاص) کلنی ها (مجموع کلنی‌ها، کلنی های تیپیک یا کلنی های احتمالی)، تعداد N' میکروارگانیسم را مطابق با فرمول شماره ۴ محاسبه کنید:

$$N' = \frac{c}{Vd} \qquad (۴)$$

که در آن:

c تعداد کلنی های شمارش شده در پلیت؛

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

d رقت مربوط به رقت انتخابی.

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

نتایج را به صورت تعداد N' میکروارگانیسم در هر میلی لیتر (فرآورده‌های مایع) یا هر گرم (سایر فرآورده‌ها) گزارش کنید.

مثال: شمارش به دست آمده به صورت زیر است:

- در آخرین رقت تلقیح شده (10^{-4}): ۱۲۰ کلنی

بنابراین:

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

نتیجه را طبق بند ۱۱-۳-۲-۲ گرد کنید، تعداد N' میکروارگانیسم ۱۲۰۰۰۰۰ یا $1/2 \times 10^{6}$ در هر میلی‌لیتر یا هر گرم از نمونه می باشد.

۱۱-۳-۲-۶ عدم قطعیت اندازه گیری

برای تعیین کمی عدم قطعیت اندازه گیری به استاندارد ملی ایران شماره ۹۶۰۶ مراجعه کنید.

۱۱-۴ شمارش مخمرها و کپک‌ها

۱۱-۴-۱ کلیات

توصیه می‌شود، مخمرها و کپک‌ها را به طور معمول، یا با استفاده از روش کشت آمیخته که شمارش در آن آسان‌تر انجام می‌شود یا با استفاده از روش کشت سطحی 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 پلیت‌های آگار پیش ریخته بهتر است پیش از تلقیح خشک شود (به استاندارد ملی ایران شماره ۸۶۶۳ مراجعه کنید).

بعضی از مخمرها و کپک‌ها ممکن است سبب بیماری‌های عفونی و ایجاد واکنش‌های حساسیتی حتی در افراد سالم شوند. بنابراین احتیاط هنگام کار با آن‌ها اهمیت دارد. به طور ایده آل، پلیت‌ها بهتر است در گرمخانه‌ها نگه‌داری شوند و از نگهداری آن‌ها در اتاق خودداری شود. تا حد امکان در پلیت ها را کم بازکنید و فقط در موارد ضروری برای مثال: تهیهٔ لام برای آزمون میکروسکوپی در آن را باز کنید. پیش از برداشت از آن‌ها سوزن یا لوپ کشت را پس از شعله دادن جهت جلوگیری از کنیدی و سلول‌های دیگر، خنک کنید. میزهای کار و گرمخانه‌ها بهتر است به طور روزمره ضدعفونی شوند.

توصیه می‌شود، پلیت ها را در وضعیت درپوش بالا [1]گرمخانه‌گذاری کنید و تا زمان شمارش آن‌ها را جابجا نکنید. جابه‌جایی می‌تواند سبب آزاد شدن کنیدی[2] کپک یا اسپورها شده و در نتیجه ایجاد کلنی‌های اقماری شده و شمارش بالاتر از حد واقعی را نشان دهد.

۱۱-۴-۲ شمارش کلنی های مخمرها و کپک‌ها

به طور معمول پلیت‌های دارای ۱۰ تا ۱۵۰ کلنی شمارش می شوند. در صورتی که فلور قارچی غالب، کپک می‌باشد، پلیت‌های دارای مقدار پایین‌تر را برای شمارش انتخاب کنید و در صورتی که فلور قارچی غالب، مخمر می‌باشد پلیت‌های دارای حد بالائی را برای شمارش انتخاب کنید.

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

۱۱-۵ شمارش با استفاده از محیط کشت مایع

۱۱-۵-۱ اصول آزمون

آزمونه به یک محیط کشت مایع تلقیح می‌شود که برای رشد میکروارگانیسم خاص یا گروهی از میکروارگانیسم‌ها مناسب بوده و اغلب رشد میکروارگانیسم‌های غیر هدف را مهار می‌کند.

برای تعیین رشد میکروارگانیسم‌های هدف از معیارهای مختلفی مانند: بررسی چشمی کدورت، ایجاد گاز، تغییر رنگ یا جداسازی بعدی میکروارگانیسم‌ها روی یک محیط کشت جامد انتخابی همراه با دما و شرایط گرمخانه‌گذاری می‌توان استفاده کرد. ترکیب محیط کشت و معیارهای شناسایی برای تمایز بین نتیجهٔ مثبت و منفی در استانداردهای خاص معین شده است.

---

1 - Upright
2 - Conidia

با استفاده از این روش فقط مقدار کیفی (نتیجه مثبت یا منفی) برای هر آزمونه به دست می آید و برای تخمین کمی میکروارگانیسم‌های موجود، آزمون چندین آزمونه، سوسپانسیون اولیه و رقت‌ها و استفاده از روش‌های آماری برای تعیین محتملترین تعداد (MPN) ضروری است.

۱۱-۵-۲ تلقیح

۱۱-۵-۲-۱ کلیات

در صورتی که از یک محیط کشت انتخابی استفاده می‌شود، بهتر است افزودن آزمونه 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 می‌شود، در مورد ماتریکس هایی مانند: ادویه و کاکائو دقت شود همچنین آن‌هایی که ممکن است حاوی مواد مهار کنندهٔ رشد باشند که نیازمند افزودن ترکیبات خنثی‌کننده، استفاده از رقت‌های بالاتر، سانتریفوژکردن ، فیلتراسیون یا جداسازی ایمونومگنتیک برای جدا کردن میکروارگانیسم‌های هدف از مادهٔ زمینه‌ای جدا می‌شود حتی اگر در استانداردهای خاص تعیین نشده باشد، هستند. همچنین ناسازگاری ممکن است ناشی از ترکیبات بیولوژیکی ماتریکس باشد برای مثال: نمونه‌های محیطی بسیار آلوده ، فرآورده‌های تخمیر شده، یا فرآورده‌های دارای باکتری‌های پروبیوتیک[1] که نسبت به نمونه‌های با تعداد کم میکروارگانیسم مشکلات بسیاری را برای آزمون میکروبیولوژی ایجاد می‌کند. برای چنین ماتریکس های مشکل زا ، توصیه می‌شود، با استفاده از میکروارگانیسم‌های مورد نظر برای تصدیق سازگاری این روش با ماتریکس آزمون‌های اسپایک[2] روی نمونه‌هایی که به طور عمدی و مشخص در آزمایشگاه آلوده می‌شوند انجام شود.

چنانچه از MPN برای آزمون نمونه‌های جامد (ازجمله پودرها) استفاده می‌شود، فقط یک آزمایه برای آماده‌سازی سوسپانسیون اولیه باید در نظر گرفته می‌شود. توصیه می‌شود، دو قسمت مساوی از این سوسپاسیون اولیه برای تلقیح استفاده شود.

۱۱-۵-۲-۲ روش کار

جز در موارد بیان شده در استانداردهای خاص، به طور معمول آزمونه‌هایی با حجم ۱ml یا کمتر از آن را به ۵ تا ۱۰ برابرحجم محیط کشت مایع با غلظت معمولی اضافه می‌شود. به طور معمول آزمونه‌هایی بین ۱ml تا ۱۰۰ml به همان حجم از محیط کشت با غلظت دو برابر اضافه می‌شود.

---

1 - Probiotic
2 - Spiking

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

جز در موارد بیان شده، بهتر است زمان بین آماده سازی سوسپانسیون اولیه از یک نمونه و تلقیح به آخرین لوله، میکروپلیت[1] یا بطری کمتر از ۳۰min باشد.

۳-۵-۱۱ انتخاب سیستم تلقیح

اساس روش MPN، رقیق کردن نمونه به میزانی است که مایه تلقیح[2]، گاهی نه همیشه حاوی میکروارگانیسم‌های هدف قابل رشد باشد، در نتیجه این عمل، شمارش مایه تلقیح تولید کننده رشد در هر رقت تخمینی از غلظت اولیه باکتری در نمونه ایجاد می کند. برای به دست آوردن تعداد شمارش در غلظت‌های زیاد میکروارگانیسم‌ها، از رقت‌های متوالی و گرمخانه‌گذاری چندین لوله (یا پلیت و...) در هر رقت استفاده می شود. محتمل‌ترین تعداد (MPN) میکروارگانیسم‌های موجود در نمونه اولیه و دقت تخمین را می‌توان با روش‌های آماری بر اساس تعداد لوله‌های مثبت و منفی مشاهده شده پس از گرمخانه‌گذاری محاسبه کرد.

یکی از حالت‌های مختلف MPN را مطابق با موارد زیر انتخاب کنید:

الف–تعداد مورد انتظار میکروارگانیسم‌ها در نمونه مورد آزمون؛

ب–الزامات قانونی؛

پ–دقت مورد نیاز؛

ت–و هر ملاحظات عملی دیگر.

عدم قطعیت اندازه‌گیری تعداد آزمونه‌های مثبت مشاهده شده را مطابق با آنچه برای تعداد کلنی‌ها در پلیت محاسبه می‌شود تخمین بزنید. عدم قطعیت اندازه‌گیری به صورت تابعی از ریشهٔ دوم تعداد لوله‌های استفاده شده تغییر می‌یابد چون دقت با افزایش تعداد تکرار آزمون‌ها، افزایش می یابد. لازم است که برای نصف کردن عدم قطعیت، تعداد لوله‌ها چهار برابر شود. در مواردی که سیستم فقط از تعداد کمتر لوله‌ها استفاده کند، عدم قطعیت اندازه‌گیری افزایش خواهد یافت.

آزمونه‌ها بر اساس اندازه می‌تواند به لوله‌ها یا بطری‌های حاوی مقدار مورد نیاز از محیط کشت مایع تلقیح شوند. برای آزمونه‌های به مقدار کم، میکروپلیت ها نیز می‌تواند استفاده شود.

---

1 - Multiwell plate

2 - Inocula

۱۱-۵-۳-۱ سیستم تک رقتی[1]

هنگامی که غلظت مورد انتظار میکروارگانیسم ها کم یا تغییرات محدودی در آن پیش می آید، مناسب‌ترین روش تلقیح، یک سری تکی از لوله‌ها با آزمونه های یکسان می‌باشد. در مواردی که نسبت بین حداکثر و حداقل تعداد میکروارگانیسم‌های مورد انتظار، کمتر از حدود ۲۵ باشد، تعداد حداقل ۱۰ لوله موازی آزمونه برای انجام آزمون، مورد نیاز می‌باشد و در صورتی که این نسبت ۲۰۰ باشد با ۵۰ لوله موازی آزمون انجام می‌شود. چنانچه غلظت واقعی تقریبا نزدیک به حداکثر و حداقل مقدار ممکن MPN باشد در آن زمان امکان رشد یا عدم رشد لوله‌ها بسیار بالاست. مثال هایی از سیستم تک رقتی MPN در جداول پ-۱ تا پ-۴ آورده شده است.

۱۱-۵-۳-۲ سیستم چند رقتی[2]

وقتی غلظت میکروارگانیسم‌ها در نمونه نامشخص است یا چنانچه تغییرات زیادی پیش بینی شده، لازم است که از سیستم چند رقتی برای تلقیح چند سری لوله استفاده شود. برای حصول اطمینان از این که سیستم هر دو نتایج مثبت و منفی را داشته باشد تعداد کافی از رقت‌ها را تلقیح کنید. تعداد رقت‌ها همچنین بستگی به روش محاسبه به کار رفته برای تخمین مقدار MPN دارد. در صورت استفاده از جداولMPN، ترکیب سیستم، محدود به داده‌هایی است که در این جداول موجود می‌باشد. با استفاده از برنامه‌های کامپیوتری تعداد رقت‌ها و لوله‌های موازی، محدود نشده است که برای استفاده از کیت‌های موجود در بازار جدید آزمون MPN حائز اهمیت است.

۱۱-۵-۳-۳ سیستم رقت متقارن[3]

بیشترین انواع سیستم‌های متقارن MPN از ۳ یا ۵ لوله موازی برای هر رقت استفاده می‌کند. دقت این سیستم با تعداد کم لوله در هر رقت به سرعت کاهش می یابد. نتایج به دست آمده از طراحی سه لوله‌ای برای غلظت‌های بالای میکروارگانیسم‌ها به طور معمول کاربرد ندارد. چنانچه دقت بیشتر مورد نیاز باشد توصیه می‌شود، از طراحی ۵ لوله موازی یا بیشتر استفاده شود.

مثال‌هایی از یک MPN سه لوله‌ای، یک MPN پنج لوله‌ای و یک MPN ۱۰ لوله‌ای به ترتیب در جداول پ-۵ تا پ-۷ آمده است

---

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

۱۱-۵-۳-۴ سیستم رقت نامتقارن[1]

در سیستم نامتقارن، تعداد متفاوت لوله‌های با مقادیر متفاوت رقت وجود دارد و توصیه می‌شود، فقط برای تخمین تعداد میکروارگانیسم‌ها در یک محدودهٔ کاملاً مشخص استفاده کنید (برای مثال: به استاندارد ملی ایران شماره ۴۲۰۷ مراجعه کنید). گاهی اوقات یک لوله ممکن است که مفقود یا شکسته شود، به سیستم نامتقارن هدایت می‌شود. اگرچه بعضی کیت‌های آزمون موجود در بازار بر اساس سیستم‌های نامتقارن هستند.

توصیه می‌شود، که داده‌های چنین سیستمی با استفاده از یک برنامه نرم افزار کامپیوتری مناسب ارزیابی شود (طبق بند ۱۱-۵-۶-۳).

۱۱-۵-۴ گرمخانه گذاری

لوله‌های تلقیح شده، ارلن‌ها و بطری‌ها را در گرمخانه یا حمام آب و میکروپلیت ها را در گرمخانه گرمخانه‌گذاری کنید. پس از مراجعه به روش استاندارد خاص، مدت زمان و دمای گرمخانه‌گذاری را بر اساس جستجوی میکروارگانیسم یا گروه میکروارگانیسم‌ها انتخاب کنید.

برای برخی میکروارگانیسم‌ها یک روش گرمخانه‌گذاری دو مرحله‌ای و/یا یک روش تاییدی ممکن است لازم باشد. برای آگاهی از جزئیات به استانداردهای خاص مراجعه کنید اما توجه کنید که ممکن است پیچیدگی در استخراج مقادیر MPN ایجاد کند (به پیوست ث- کتابنامه مراجعه کنید).

۱۱-۵-۵ تفسیر نتایج

معیار تشخیص نتایج مثبت از منفی برای هر میکروارگانیسم یا گروه میکروارگانیسم‌ها در استانداردهای مربوطه معین شده است. با استفاده از این معیارها، تعداد نتایج مثبت به دست آمده از همه لوله‌های مربوط به یک نمونه را شمارش و ثبت کنید.

۱۱-۵-۶ تعیین مقادیر MPN

تعیین مقادیر MPN به سه حالت امکان پذیر است :

الف- محاسبه با استفاده از فرمول‌های ریاضی؛

ب-با استفاده از جداول MPN ؛

پ-با استفاده از برنامه‌های کامپیوتری خاص.

---

1 - Non-symmetric dilution

با فرض این که حالت‌های بندهای الف تا ت بر اساس ملاحظات آماری مشابه‌ای پایه گذاری شده‌اند، از اعتبار یکسان برخوردارند. جزئیات این سه روش شرح داده شده است.

۱۱-۵-۶-۱ فرمول های ریاضی

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

(M) مقدار تقریبی MPN بر حسب گرم را برای هر تعداد رقت و لوله‌های موازی را می‌توان مطابق با فرمول شماره ۵ محاسبه کرد:

$$M = \frac{Z_p}{\sqrt{m_s m_t}} \qquad (۵)$$

که در آن:

Z_p تعداد لوله‌های مثبت؛

m_s جرم کل نمونه در همه لوله‌های منفی بر حسب گرم؛

m_t جرم کل نمونه بر حسب گرم در همه لوله‌ها.

مثال از پیوست ث- کتابنامه

چنانچه از روش ۱۰ لوله‌ای با رقت‌های هر کدام ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ گرم از نمونه تلقیح شده است و تعداد نتایج لوله‌های مثبت به ترتیب ۱۰ لوله، ۴ لوله و ۲ لوله می‌باشد برای سهولت در عملیات ریاضی، رقت ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ و تعداد لوله‌های مثبت ۴ لوله و ۲ لوله را در نظر بگیرید و تعداد کل لوله‌های مثبت Z_p=۶ می‌شود. جرم کل نمونه (m_t) عبارت است از:

$$m_t = 10 \times 0{,}01 + 10 \times 0{,}001 = 0{,}11 \text{ g}$$

و جرم کل نمونه‌ها در لوله‌های منفی(m_s) عبارت است از:

$$m_s = 6 \times 0{,}01 + 8 \times 0{,}001 = 0{,}068$$

و (M) مقدار تقریبی MPN مطابق با فرمول شماره ۵ به دست می‌آید:

$$M = \frac{6}{\sqrt{0{,}068 \times 0{,}11}} = \frac{6}{\sqrt{0{,}007\,5}} = \frac{6}{0{,}086\,5} = 69{,}4$$

این نتیجه کاملا با مقدار MPN به دست آمده بر اساس نسبت ۲-۴-۱۰ برابری می‌کند که مقدار MPN در گرم، ۷۰ است.

۱۱-۵-۶-۱-۲ راه حل کامل برای یک سری از لوله‌ها

(M) مقدار MPN بر حسب گرم برای یک سری تکی از لوله‌ها مطابق با فرمول شماره ۶ محاسبه می‌شود:

$$M = -\frac{1}{m}\ln\left[\frac{S}{N}\right] \qquad (۶)$$

که در آن :

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

Ln لگاریتم طبیعی؛

N تعداد لوله‌ها در سری ها؛

S تعداد لوله‌های منفی.

۱۱-۵-۶-۱-۳ تخمین دقت آزمون‌های تک رقتی

تخمین MPN با سطح اطمینان ۹۵٪ می‌تواند به طور تقریبی از نتایج MPN و انحراف استاندارد $\log_{10} M$ با استفاده از روشی که در پیوست ث- کتابنامه شرح داده شده است، محاسبه شود. همچنین برای کسب اطلاعات بیشتر به پیوست ث- کتابنامه مراجعه کنید.

یادآوری- مطابق با بند ۱۲ ایزو ۲-۸۰۰۰۰ سال ۲۰۰۹ ، نشان لگاریتم دهدهی"lg" می‌باشد ولی در این استاندارد "$\log_{10}$" که در اکثر آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی مواد غذایی به کار می‌رود ارجحیت دارد.

خطای استاندارد[1] ($s_{\log_{10} M}$) MPN از فرمول شماره ۷ محاسبه می‌شود:

$$s_{\log_{10} M} = \frac{1-\exp(-Mm)}{2{,}303 \times Mm\sqrt{G\exp(-Mm)}} \qquad (۷)$$

که در آن:

M مقدار MPN؛

m جرم مایه تلقیح شده در هر لوله؛

G تعداد لوله‌های نشان دهنده رشد؛

---

[1] - Standard error

e یا exp ضریب نمایی.

تقریب نرمال سطوح اطمینان با استفاده از فرمول زیر به دست می‌آید:

$$M \pm 1,96 \times s_{\log_{10} M}$$

مثال:

چنانچه ۰/۱g از نمونه (m) به ۲۰ لوله تلقیح شد (n=20) و نتایج ۴ لوله (G=4)مثبت است (بنابراین نتایج ۱۶ لوله منفی است) . M مقدارMPN بر حسب گرم با استفاده از فرمول زیر به دست می‌آید:

$$M = -\frac{1}{m}\ln\left(\frac{S}{N}\right) = -\frac{1}{0,1}\times\ln\left(\frac{16}{20}\right) = -10\times\ln(0,8) = 2,23$$

و خطای استاندارد $s_{\log 10M}$ مطابق با فرمول زیر به دست می‌آید:

$$s_{\log_{10} M} = \frac{1-\exp(-Mm)}{2,303\times Mm\sqrt{G\exp(-Mm)}}$$
$$= \frac{1-\exp(-0,223)}{2,303\times 0,223\sqrt{4\times\exp(-0,223)}}$$
$$= \frac{(1-0,80)}{0,513\,6\times\sqrt{3,2}} = \frac{0,20}{0,918\,7} = 0,22$$

در اینجا، $\log_{10}M$ =۰/۳۵ و تقریب نرمال برای سطوح اطمینان با استفاده از فرمول زیر به دست می‌آید:

$$M \pm 1,96 \times s_{\log_{10} M}$$

سطح پایینی $\log_{10}M$ برابر است با:

$$0,35 - (1,96 \times 0,22) = 0,35 - 0,43 = -0,08.$$

سطح بالایی $\log_{10}M$ برابر است با:

$$0,35 + 0,43 = 0,78.$$

بنابراین سطح پایینی M برابر است با antilog$_{10}$(-0.08)=0.82 و سطح بالایی M برابر است با antilog$_{10}$(0.78)=6.1

به هر حال، نیازی به محاسبات دستی نیست و می‌توان با استفاده از محاسبه گر MPN آنها را تعیین کرد (طبق بند ۱۱-۵-۶-۳).

۱۱-۵-۶-۱-۴ تخمین دقت آزمون‌های چند رقتی متقارن

$\log_{10}$ انحراف استاندارد سیستم MPN چند رقتی متقارن می‌تواند از فرمول تقریبی کوچرانس[1] طبق فرمول شماره ۸ (پیوست ث- کتابنامه) به دست آید:

$$s = 0{,}58\sqrt{\frac{\log_{10} f}{N}} \qquad (۸)$$

که در آن:

s انحراف استاندارد $\log_{10}$ MPN ؛

f ضریب رقت بین رقت‌های متوالی (به طور معمول ۱۰)؛

N تعداد لوله‌ها در هر رقت.

حد بالایی و پایینی سطح اطمینان٪۹۵ می‌تواند به طور تقریبی به ترتیب با استفاده از ضرب و تقسیم کردن تخمین MPN با آنتی لگاریتم ۲s به دست آید. در این روش به حد بالایی سطح اطمینان بیشتر از حد نشان، گرایش دارد. تخمین دقیق تر را می‌توان با استفاده از محاسبه‌گر MPN به دست آورد(طبق بند ۱۱-۵-۶-۳).

۱۱-۵-۶-۲ جداول MPN

۱۱-۵-۶-۲-۱ جداول برای سیستم تک رقتی

جداول پ-۱ تا پ-۴ (پیوست ب) مقادیر MPN با سطح اطمینان ٪۹۵ در هر آزمونه برای لوله‌های موازی ۱۰، ۱۵ ، ۲۰ و ۲۵ تایی را نشان می دهد (با فرض اینکه هر لوله با حجم یکسان از یک رقت تلقیح شوند). برای بیان نتایج در جرم معین نمونه مرجع (یا حجم نمونه‌های مایع) شاخص MPN را با سطح اطمینان ٪۹۵ در نسبت جرم مرجع به جرم آزمونه ضرب کنید . این شاخص را در لگاریتم عدم قطعیت استاندارد ضرب نکنید. جرم مرجع در میکروبیولوژی مواد غذایی به طور معمول ۱g می باشد. جرم آزمونه بستگی به

1- Cochrans

مقدار نمونه (بر حسب گرم) که در لوله‌های تلقیح شده وجود دارد می‌باشد. برای مثال در صورتی که ۱ml از رقت 10^{-1} یکنواخت شده استفاده می‌شود جرم آزمونه ۰٫۱g می باشد.

مثال :

۵ml از نمونه ۱۰ برابر رقیق شده (۰٫۱g/ml) به ۲۰ لوله محیط کشت مایع با غلظت دوبرابر تلقیح شده است. پس از گرمخانه‌گذاری ۱۶ لوله رشد قابل مشاهده نشان داده‌اند. بیشترین غلظت احتمالی باکتری‌ها (ارگانیسم ها در گرم) در نمونه چه مقدار بوده است؟

جدول ب-۳ مقدار بیشترین غلظت احتمالی MPN ارگانیسم ها را در هر لوله ۱٫۶۱ با حد پایینی۰٫۹۳ و حد بالایی ۲٫۷۷ سطح اطمینان ٪۹۵ نشان می دهد.

هر لوله حاوی ۵ml از آزمایه است که برابر ۰٫۵g از نمونه می باشد. بنابراین محتمل‌ترین تعداد میکروارگانیسم‌ها (M) در ۱g با استفاده از فرمول زیر به دست می‌آید:

$$M = \frac{1,61}{0,5}\Big/\text{g} = 3,22/\text{g}$$

با محدوده سطح اطمینان ٪۹۵ ، برای حد پایینی ٪۲٫۵ برابر است با:

$$\frac{0,93}{0,5}\Big/\text{g} = 1,9/\text{g}$$

برای حد بالایی ٪۹۷٫۵ برابر است با:

$$\frac{2,77}{0,5}\Big/\text{g} = 5,5/\text{g}$$

۱۱-۵-۶-۲-۲ جداول برای سیستم چند رقتی : سه رقت متوالی

در سیستم های متقارن به طور معمول از سه رقت متوالی با سه (جدول پ- ۵)، پنج (جدول پ-۶) و یا ۱۰ (جدول پ-۷) تکرار استفاده می‌شود. تعداد نتایج مثبت برای هرمجموعه از لوله‌ها را ثبت کنید و با استفاده از جدول MPN مربوط به روش تلقیح استفاده شده، محتمل‌ترین تعداد (MPN) را برای تعیین تعداد میکروارگانیسم‌ها در حجم مرجع از نمونه به دست آورید.

در جداول تجدیدنظر شده، $\log_{10}$ MPN، انحراف استاندارد $S_{(\log 10\ M)}$ آن، حدود اطمینان بالایی و پایینی فاصله اطمینان تقریبی ٪۹۵ و همراه با مقدار موارد نادر و گروه موارد نادر تهیه شده است. مقدار موارد نادر

(بر اساس کار با Blodgett منابع ارائه شده در پیوست ث- کتابنامه) یک روش ساده برای ارزیابی احتمال یک نتیجه مشاهده شده از یک آزمون است.

احتمال وقوع برخی از حالت‌های لوله‌های مثبت در روش MPN نسبت به دیگر حالت‌ها، بیشتر می‌باشد برای مثال: ترکیبی از نتایج مثبت ۰ ، ۰ و ۳ از حالت ۳ ، ۲ و ۱ خیلی کمتر اتفاق می‌افتد. برای تعین مقدار عددی این احتمالات ، شاخص موارد نادر به عنوان نسبتی از دو مقدار احتمالی طبق فرمول زیر محاسبه می‌شود:

$$r = \frac{L(\hat{\mu})}{L_0(\hat{\mu})}$$

که در آن:

$L(\hat{\mu})$ احتمال نتیجه مشاهده شده، x_1، x_2 ... x_k از سری رقت‌های آزمون؛

$L_0(\hat{\mu})$ احتمال اینکه نتایج با بیشترین احتمال کمتر از غلظت μ باشد که برابر با میزان $\hat{\mu}$ تخمینی غلظت μ است.

برای آگاهی بیشتر از جزئیات روش محاسبه به پیوست ث- کتابنامه مراجعه کنید).

شاخص موارد نادر مقداری بین صفر و یک می‌باشد. این شاخص زمانی یک است که نتایج آزمون رقت متوالی به احتمال زیاد با مقدار MPN تخمینی برابر است و زمانی نزدیک به صفر است که نتایج آزمون رقت متوالی به احتمال خیلی کم با مقدار MPN تخمینی برابر است.

در پیوست ث- کتابنامه سه گروه از موارد نادر به شرح زیر می‌باشد:

گروه ۱: مقدار MPN به احتمال زیاد اتفاق می افتد چنانچه مقدار موارد نادر بین ۰/۰۵ تا ۱/۰۰ باشد، $۰/۰۵ \leq n \leq ۱$ ، به این معنی است که چنین نتیجه ای با احتمال ٪۹۵ حاصل می‌شود.

گروه ۲: مقدار MPN به صورت نادر مورد انتظار است چنانچه مقدار موارد نادر بین ۰/۰۱ تا ۰/۰۵ باشد، $۰/۰۱ \leq n \leq ۰/۰۵$ ، به این معنی است که چنین نتیجه ای کمتر از ٪۵ احتمال وقوع دارد.

گروه ۳: مقدار MPN بسیار نادر مورد انتظار است چنانچه مقدار موارد نادر بین صفر تا ۰/۰۱ باشد، $۰ \leq n \leq ۰/۰۱$ ، به این معنی است که چنین نتیجه ای کمتر از ٪۱ احتمال وقوع دارد.

جداول فقط نتایجی را که در گروه ۱ و ۲ قرار می گیرد را نشان داده است.

در هر شرایطی هنگامیکه بیشتر از سه رقت متوالی تهیه می‌شود، ضروری است که همه مقادیر اندازه‌گیری شده استفاده شود. از نظر علمی صحیح نیست که هر ترکیبی از مقادیر را بر این اساس که این مقادیر از دیگر ترکیبات "صحیح تر" هستند را "انتخاب کنیم". نتایج همه ترکیبات احتمالی لوله‌های مثبت بهتر است ثبت شود. محاسبه‌گر MPN (طبق بند ۱۱-۵-۶-۳) برای به دست آوردن مقدار MPN استفاده شود.

۱۱-۵-۶-۳ برنامه های کامپیوتری

برنامه‌هایی که برای تعیین مقادیر MPN استفاده می‌شود لازم است ترکیبات لوله‌های غیراحتمالی را تعیین کند زیرا چنین ترکیباتی انعکاس دهنده یک مشکل در اجرای آزمون میکروبیولوژی است (طبق بند ۱۱-۵-۶-۲-۲ با توجه به ترکیبات لوله نامحتمل و استفاده از جدول MPN). چند برنامه کامپیوتری برای تخمین مقادیر MPN با استفاده از صفحات گسترده Excel موجود است اما بسیاری از آنها در جایی که ترکیبات لوله غیر احتمالی در برنامه وارد شده است توانایی برای اندازه‌گیری را ندارند و روش‌های مختلف برای تخمین محدوده اطمینان استفاده شده است.

یک برنامه نرم‌افزاری برای استفاده در اکسل نوشته شده که می‌تواند تا ۱۰ سطح رقت متوالی را کنترل کند. این برنامه برای به دست آوردن MPN تخمینی و پارامترهای نشان داده شده در جداول تجدید نظر شده پیوست پ-۵، پ-۶ و پ-۷ مورد استفاده قرار گرفته است. این برنامه نسبت به سایر برنامه ها ترجیح داده می‌شود به این دلیل که نتایج هر ترکیب خاص گرفته شده از نتایج در سه رقت متوالی، همان خواهد بود که در جداول منتشر شده آمده بود.

جزئیات محاسبات در پیوست ث- کتابنامه بیان شده است و نرم افزار به صورت رایگان از سایت http://standards.iso.org/iso/7218 قابل دانلود است.

چنانچه صفحه گسترده اکسل یک ترکیب لوله را به عنوان نامحتمل مشخص کند مقدار MPN به دست آمده بهتر است گزارش نشود.

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 میکروارگانیسم‌ها را در حجم معین به دست آورید.

نتیجه را به عنوان محتملترین تعداد میکروارگانیسم ها (یا گروه خاصی از میکروارگانیسم ها) را در هر گرم یا میلی لیتر گزارش کنید. جرم یا حجم معین ۰/۱ گرم یا میلی لیتر می‌تواند متفاوت باشد (برای مثال: در ۱۰۰g یا ۱۰۰ml).

۱۲ روش جستجو (روش کیفی)

۱۲-۱ کلیات

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

۱۲-۲ اساس روش

جز در موارد ذکر شده در استانداردهای مربوطه، مقدار p از فرآورده را با $9 \times p$ ml یا $9 \times p$ g از یک محیط کشت مایع اختصاصی و یا انتخابی مخلوط (برای فرآورده های مایع) یا یکنواخت (برای سایر فرآورده‌ها) کنید.

برای تسهیل در بازیابی میکروارگانیسم های مورد تنش قرار گرفته در مواد غذایی، نمونه ها به طور معمول در یک محیط مایع غیر انتخابی پیش غنی‌سازی شده و بر روی محیط کشت آگار انتخابی/افتراقی غنی‌سازی انتخابی و جداسازی می شود. 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 کلنی‌های مجزا ایجاد شود. مگر در موارد ذکر شده، محیط‌های کشت مایع غنی کننده گرمخانه گذاری 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 طور واضح شرح داده شود.

تعدادی از کلنی‌های به دست آمده پس از گرمخانه گذاری روی محیط کشت جامد (به طور معمول ۵ کلنی از هر پلیت) برای انجام آزمون‌های تاییدی مناسب برای شناسایی استفاده می‌شوند.

انتخاب کلنی‌ها برای آزمون‌های تاییدی بهتر است همه کلنی های مشکوک را تحت پوشش داشته باشد.

۱۲-۳ اندازه گیری عدم قطعیت

برای تعیین کیفی تخمین عدم قطعیت اندازه گیری به استاندارد ملی ایران شماره ۹۶۰۶ مراجعه کنید.

۱۳ آزمون های تاییدی

۱۳-۱ کلیات

برای آزمون‌های تاییدی بیوشیمیایی و سرولوژیکی فقط از کشت‌های خالص، استفاده کنید.

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

۱۳-۲ آماده سازی کشت خالص

برای آماده سازی کشت خالص، یک کلنی تک را از سطح یا داخل محیط کشت جامد انتخاب کنید. سپس کلنی انتخاب شده را بر محیط کشت جامد غیر انتخابی تلقیح کنید. پس از گرمخانه گذاری، کلنی‌های کاملاً مجزا را برای آزمون‌های تاییدی بعدی انتخاب کنید در صورت لزوم، این کار را تکرار کنید.
در صورت امکان، آزمون تاییدی بهتر است با استفاده از سلول های تشکیل شده از کلنی تک انجام شود. در صورتیکه یک کلنی تک کافی نباشد، توصیه می‌شود، ابتدا کلنی را در محیط کشت مایع یا یک محیط جامد شیب‌دار کشت مجدد داده سپس از آن برای انجام آزمون‌های تاییدی استفاده کنید.

۱۳-۳ رنگ‌آمیزی گرم (روش اصلاح شده هوکر[1])

۱۳-۳-۱ کلیات

این روش رنگ‌آمیزی سلول‌های باکتری، شکل ظاهری باکتری‌ها را توصیف می کند و آن‌ها را به دو گروه از نظر قابلیت نگه‌داری حفظ رنگ کریستال ویوله (گرم مثبت) تحت شرایط آزمون، طبقه بندی می کند. نتایج این تقسیم بندی ناشی از اختلاف ساختار دیواره سلولی باکتری‌های دو گروه بوده و وابسته به دیگر تفاوت های عمده بین این دو گروه می باشد.
یک روش جایگزین مناسب برای رنگ‌آمیزی گرم استفاده از محلول ٪۳ هیدروکسید پتاسیم (KOH) می‌باشد. یک لوپ کامل از باکتری رشد یافته را در ۲ قطره محلول KOH روی لام شیشه‌ای کاملاً حل کنید. باکتری گرم منفی در مدت ۳۰s محلول را خیلی چسبناک و موکوئیدی در می‌آورد به طوری که وقتی لوپ را به سمت بالا می کشید نوار کش دار ایجاد می‌شود.
روش‌های مختلفی برای رنگ‌آمیزی گرم وجود دارد ولی در همه آن‌ها توالی مراحل مطابق با بند ۱۳-۳-۳ می باشند:

۱۳-۳-۲ محلول ها

۱۳-۳-۲-۱ کلیات

می توان از محلول‌های آمادهٔ قابل دسترس در بازار استفاده کرد.
در صورت استفاده از محلول های آماده، طبق توصیه های سازنده عمل شود.

۱۳-۳-۲-۲ محلول کریستال ویوله

مواد تشکیل دهنده:

نام مواد	مقدار

---

1 - Modified Hucker technique

کریستال ویوله	۲/۰ g
اتانول (٪۹۵)	۲۰ ml
آمونیوم اگزالات	۰/۸ g
آب مقطر	۸۰ ml

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 اجازه دهید پیش از استفاده به مدت ۲۴h بماند.

۱۳-۳-۲-۲ محلول ید

مواد تشکیل دهنده:

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

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 ۱۰۰ml برسانید.

۱۳-۳-۲-۳ محلول سافرانین

مواد تشکیل دهنده:

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

روش تهیه :

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

۱۳-۳-۳ روش رنگ‌آمیزی

یک لایهٔ نازک از یک کشت تازهٔ ۱۸ تا ۲۴ ساعته یا هنگامی که محیط کشت مایع کدر شده است روی لام تهیه کرده و پس از خشک شدن در هوا با شعله آن را تثبیت کنید سپس :

الف- لام را با محلول کریستال ویوله (طبق بند ۱۳-۳-۲-۲) پوشانید و بگذارید یک دقیقه بماند؛

ب- لام را مایل گرفته و 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-لام را مایل گرفته و به آرامی به مدت چند ثانیه با آب بشویید؛

ث- لام را مایل گرفته و به آرامی و به طور پیوسته اتانول ٪۹۵ 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 رنگ تا قرمز دارند گرم منفی ($Gram^{-}$) می باشند.

در رنگ آمیزی از کشت خالص انواعی از باکتری‌های خاص، شامل سلول‌های گرم مثبت و گرم منفی در یک میدان میکروسکوپ مشاهده می‌شوند.

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

۱۳-۴ استفاده از مجموعه آزمون های بیوشیمیایی برای شناسایی

مجموعه آزمون‌های بیوشیمیایی در دسترس می‌تواند برای شناسایی کلنی‌های ایزوله شده استفاده شود. مناسب بودن مجموعه آزمون های بیوشیمیایی را با استفاده از تحقیقات علمی منتشر شده در مراجع علمی بین‌المللی ترجیحاً مربوط به میکروبیولوژی مواد غذایی[2] تصدیق کنید. این نوع تصدیق به ویژه در مواردی که سازنده داده های اعتبار سنجی برای مجموعه آزمون های بیوشیمیایی خود ارائه نداده است، اهمیت دارد. بهتر است آزمایشگاه ضمن مشخص کردن سویهٔ آزمون، برای هر سری ساخت، گواهی کنترل داشته باشد.

---

1 - Oil objective

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

سازنده باید سویه های کنترل را که آزمایشگاه ممکن است برای تصدیق کارایی مجموعه آزمون های بیوشیمیایی مورد استفاده قرار دهد، مشخص کند.
مجموعه آزمون ها باید حداقل شامل آزمون‌های بیوشیمیایی ارائه شده در استانداردهای خاص باشد یا به وسیلهٔ آزمون‌های دیگر تکمیل شود.

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

پروب‌های نوکلئیک موجود در دسترس می‌تواند برای شناسایی کلنی‌های ایزوله شده به کار رود.
مناسب بودن پروب‌های نوکلئیک را با مطالعات علمی چاپ شده در کتاب‌های علمی بین المللی ترجیحاً مربوط به میکروبیولوژی مواد غذایی منبع ارائه شده در پیوست ث- کتابنامه مورد تایید قرار دهید. این نوع تصدیق به ویژه در مواردی که سازنده اطلاعات معتبری برای پروب‌های نوکلئیک نداشته باشد، اهمیت دارد.
بهتر است آزمایشگاه ضمن مشخص کردن سویهٔ آزمون، برای هر سری ساخت، گواهی کنترل داشته باشد.
سازنده باید سویه های کنترل خاص 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 آزمون های تاییدی سرولوژیکی، پس از شناسایی بیوشیمیایی کلنی‌های جدا شده، آزمون را انجام دهید.

۱۳-۶-۲ آزمون‌های آگلوتیناسیون[2] روی لام

واکنش های آنتی ژن – آنتی بادی سبب تجمع سلول های باکتری به شکل تودهٔ به هم چسبیده[3] یا گرانول‌های متراکم می شود. دربارهٔ باکتری‌های خانواده *انتروباکتریاسه*، اگر آنتی ژن H (مربوط به تاژک) با آنتی سرم مربوطه واکنش دهد آگلوتیناسیون به صورت توده به هم چسبیده و اگر آنتی ژن O (برای مثال مربرط به جسم باکتری) با آنتی سرم مربوطه واکنش دهد آگلوتیناسیون به صورت توده گرانولی متراکم می‌باشد.

---

1 - Nucleic probes
2- Agglutination
3 - Flocculent

پیش از آگلوتیناسیون با آنتی‌سرم‌ها بهتر است آگلوتیناسیون در محلول سدیم کلراید (۳٪ وزنی) انجام شود. در صورتی که باکتری دارای خاصیت آگلوتیناسیون خود به خودی 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[1] که با جنس خاصی از میکروارگانیسم ها یا گروهی از سرووارها[2] واکنش نشان می دهند و برای بررسی اولیه مناسب می‌باشند. دسته دوم آنتی بادی های مونوکلونال[3] اختصاصی هستند که استفاده از آن‌ها اجازهٔ شناسایی یک سرووار خاص را می توان شناسایی کرد.

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

مناسب بودن آزمون های آگلوتیناسیون را با استفاده از تحقیقات علمی منتشر شده در مراجع علمی بین‌المللی 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 می‌شود، کنترل‌های مثبت و منفی مناسب، استفاده شود.

۱۳-۶-۳ آزمون آگلوتیناسیون لاتکس[4]

یک روش سریعتر قابل دسترس تجارتی است که با استفاده از ذرات لاتکس پوشیده شده با آنتی‌بادی های اختصاصی می‌باشد (برای مثال:*Ecoli* O157 یا استافیلوکوکوس). آنتی ژن در محلول استخراج شده در برابر یک سری از واکنشگرهای لاتکس آزمون می‌شود.

مناسب بودن آزمون‌های آگلوتیناسیون را با استفاده از تحقیقات علمی منتشر شده در مراجع علمی بین‌المللی 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 داشته باشد.

توصیه می‌شود، هنگام استفاده از واکنشگرها، از کنترل‌های مثبت و منفی مناسب، استفاده شود.

۱۴ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید روش مورد استفاده و و نتایج به دست آمده را در صورت لزوم درجه حرارت گرمخانه گذاری مشخص کند. همچنین جزئیات عملیاتی را که در این استاندارد بیان نشده را نیز ارائه کند. در گزارش

---

1 - Polyvalent
2 - Serovars
3 - Monoclonal
4 - Latex

آزمون نکات اختیاری در روش آزمون و جزئیات هر رویدادی که ممکن است روی نتایج آزمون تاثیرگذار باشد نیز باید مشخص شود.

همچنین سایر آزمون‌هایی که توسط آزمایشگاه های مرجع انجام می‌شود همراه با نتایج آزمون در گزارش آزمون بیان شود.

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

در صورت لزوم بهتر است گزارش آزمون شامل اندازه گیری عدم قطعیت که مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۱۹۰۳۶ تعیین شده است، باشد.

۱۵ صحه‌گذاری روش‌های میکروبیولوژی

۱۵-۱ صحه‌گذاری روش‌های مرجع

صحه‌گذاری روش‌های مرجع توسط کمیته فنی میکروبیولوژی مواد غذایی ISO/TC 34/SC 9 مورد بررسی می‌باشد.

۱۵-۲ صحه‌گذاری روش‌های جایگزین

برای پروتکل صحه‌گذاری روش‌های جایگزین در مقابل روش‌های مرجع به استاندارد ملی ایران شماره ۱۰۵۲۷ مراجعه شود.

۱۵-۳ صحه‌گذاری روش‌های داخلی[1]

صحه‌گذاری روش‌های داخلی توسط کمیته فنی میکروبیولوژی مواد غذاییISO/TC 34/SC 9 مورد بررسی می‌باشد.

۱۶ تضمین کیفیت نتایج و/یا کنترل کیفیت عملکرد

۱۶-۱ کنترل کیفیت داخلی

۱۶-۱-۱ کنترل کیفیت داخلی شامل همه روش‌های به کار رفته توسط یک آزمایشگاه برای ارزیابی پیوسته کار می‌باشد. هدف اصلی، حصول اطمینان از هماهنگی نتایج به صورت مستمر و مطابقت آن‌ها با معیارهای کاملاً مشخص می‌باشد.

---

1 - In-house

۱۶-۱-۲ برنامه بررسی های دوره ای برای تعیین تحت کنترل بودن تغییرپذیری[1] (بین آزمون ها، بین تجهیزات و بین مواد) لازم می‌باشد. این برنامه باید کلیه آزمون‌های در دامنه کاربرد آزمایشگاه را در بر گیرد.

این برنامه ممکن است شامل:

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

ب-استفاده از اسپایک و/یا نمونه های آلوده شده طبیعی در دامنه ای از ماتریکس ها؛

پ-استفاده از مواد مرجع RM شامل طرح آزمون های کفایت تخصصی PTمواد؛

ت-تکرار آزمون؛

ث-ارزیابی تکرار نتایج آزمون.

فاصله بین این کنترل‌ها تحت تاثیر ماهیت و تناوب آزمون‌های انجام شده به وسیله آزمایشگاه می‌باشد. توصیه می‌شود، در صورت امکان، آزمون ها برای پایش کارایی، همراه با به کار بردن کنترل‌ها 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 کارایی مطلوب ممکن است یه طرح که به موازات آزمون انجام می‌شود، مناسب تر باشد.

۱۶-۲ سویه‌های مرجع

برای نگه‌داری سویه‌های مرجع، به استاندارد ملی ایران شماره ۸۶۶۳ مراجعه کنید.

۱۶-۳ ارزیابی کیفیت خارجی (آزمون‌های کفایت تخصصی PT)

آزمایشگاه‌ها بهتر است به طور منظم در طرح آزمون های کفایت تخصصی PT که در دامنه فعالیت یا عملکرد آن‌ها قرار دارد شرکت کنند. کارایی بهتر است با طرح آزمون های کفایت تخصصی، با استفاده از ماده زمینه‌ای مناسب، انجام شود.

توصیه می‌شود، آزمایشگاه‌ها برای ارزیابی اریبی[2] آزمایشگاه و همچنین برای بررسی اعتباربخشی سیستم کیفیت آزمایشگاه از آزمون‌های کفایت تخصصی استفاده کنند.

---

1 - Variability

2 - Bias

پیوست الف

(اطلاعاتی)

خصوصیات برخی از ضدعفونی کننده‌ها

جدول الف۱ - خصوصیات برخی از ضدعفونی کننده‌ها

ضد عفونی کننده‌ها	موثر در برابر							غیر فعال شده با استفاده از						سمیت		
	باکتری‌ها															
	قارچ ها	گرم مثبت	گرم منفی	مایکوباکتری‌ه ا	اسپورها	ویروس‌های لیپیدی	ویروس‌های غیر لیپیدی	پروتئین	مواد طبیعی	مواد مصنوعی	آب سخت	پاک کننده	پوست	چشم	ریه
هیپو کلریت	+	+++	+++	++	++	+	+	+++	+	+	+	C	+	+	+
الکل ها	_	+++	+++	+++	_	+	V	+	+	+	+	_		+	
فرمالدئید	+++	+++	+++	+++	+++[a]	+	+	+	+	+	+	_	+	+	+
گلوتارآلدئید	+++	+++	+++	+++	+++[b]	+	+	NA	+	+	+	NA	++	++	++
یدوفورها	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+++	+	+	+	A	+	+	_

+++ خوب

++ نسبتا خوب

+ ضعیف

- منفی

V به نوع ویروس بستگی دارد

C کاتیونی

A آنیونی

NA کاربرد ندارد

a بیش از $40^{\circ}C$

b بیش از $20^{\circ}C$

پیوست ث- کتابنامه

پیوست ب
(الزامی)
فواصل اطمینان برای روش شمارش کلنی

ب-۱ فواصل اطمینان برای روش شمارش کلنی

برای ارزیابی تصدیق نتایج و جلوگیری از تفسیر سخت‌گیرانه لازم است که عدم قطعیت اندازه‌گیری تخمین زده شود یا در صورت عدم دسترسی، فاصله اطمینان که توزیع آماری میکروبی در نمونه را مشخص می‌کند، تخمین زده شود.

در صورتی که مقدار عدم قطعیت اندازه‌گیری در دسترس نمی‌باشد، فاصله اطمینان δ که پراکندگی میکروبی را مشخص می‌کند را می‌توان با استفاده از فرمول شماره ب-۱ محاسبه کرد (با احتمال ٪۹۵):

$$\delta = \left[\frac{\sum C}{B} \pm \frac{1{,}96\sqrt{\sum C}}{B} \right] \frac{1}{d} \qquad \text{(ب-۱)}$$

که در آن:

$$B = V(n_1 + 0{,}1n_2)$$

V حجم مایه تلقیح شده در هر پلیت بر حسب میلی‌لیتر؛

n_1 تعداد پلیت‌های انتخابی در اولین رقت؛

n_2 تعداد پلیت‌های انتخابی در دومین رقت؛

$\sum C$ مجموع کلنی‌های شمارش شده در پلیت‌های انتخابی از دو رقت متوالی؛

d رقت معادل با اولین رقت انتخابی.

مثال۱:

از یک شمارش نتایج زیر به دست می‌آید(سیستم با یک پلیت در هر رقت):

- در اولین رقت انتخابی ($۱۰^{-۲}$) : ۲۱۵ کلنی؛
- در دومین رقت انتخابی ($۱۰^{-۳}$) : ۱۴ کلنی.

$$N = \frac{\sum C}{V \times \left[n_1 + (0{,}1 \times n_2) \right] \times d} = \frac{215 + 14}{1 \times \left[1 + (0{,}1 \times 1) \right] \times 10^{-2}} = \frac{229}{0{,}011} = 20\,818$$

نتایج را مانند آنچه در متن اصلی آورده شده است گرد کنید. تعداد میکروارگانیسم‌ها ۲۱۰۰۰ یا $۲{,}۱ \times ۱۰^{۴}$ در هر میلی‌لیتر یا هر گرم از فرآورده می‌باشد.

فاصله اطمینان δ برای $N = ۲/۱\times۱۰^{۴}$ در هر گرم، برای ۲۲۹ کلنی شمارش شده از معادلـه زیـر بـه دسـت می‌آید:

$$\delta = \left[\frac{229}{1,1} \pm \frac{1,96\sqrt{229}}{1,1}\right] \times \frac{1}{10^{-2}}$$

$$\delta = (208,18 \pm 26,96) \times 10^{2}$$

بنابراین محدوده‌های فاصله اطمینان می‌شود:

$$\delta_1 = 1,8 \times 10^{4}$$ و

$$\delta_2 = 2,4 \times 10^{4}$$

مثال ۲:

از یک شمارش نتایج زیر به دست می‌آید (سیستم با دو پلیت در هر رقت):

- در اولین رقت انتخابی ($۱۰^{-۲}$): ۱۶۸کلنی و ۲۱۵کلنی؛
- در دومین رقت انتخابی ($۱۰^{-۳}$): ۱۴ کلنی و ۲۵کلنی.

$$N = \frac{\sum C}{V \times \left[n_1 + (0,1 \times n_2)\right] \times d} = \frac{168 + 215 + 14 + 25}{1 \times \left[2 + (0,1 \times 2)\right] \times 10^{-2}} = \frac{422}{0,022} = 19\,182$$

نتایج را مانند آنچه در متن اصلی آورده شده است گرد کنید ، تعداد میکروارگانیسم‌ها ۱۹۰۰۰ یـا $۱/۹\times۱۰^{۴}$ در هر میلی‌لیتر یا هر گرم از فرآورده می‌باشد.

فاصله اطمینان δ برای $N = ۱/۹\times۱۰^{۴}$ در هر گرم، برای ۴۲۲ کلنی شمارش شـده از معادلـه زیـر بـه دسـت می‌آید:

$$\delta = \left[\frac{422}{2,2} \pm \frac{1,96\sqrt{422}}{2,2}\right] \times \frac{1}{10^{-2}}$$

$$\delta = (191,82 \pm 18,30) \times 10^{2}$$

بنابراین محدوده‌های فاصله اطمینان می‌شود:

$$\delta_1 = 1,7 \times 10^{4}$$ و

$$\delta_2 = 2,1 \times 10^{4}$$

جدول ب ۱ - میانگین وزنی و فاصله اطمینان δ مربوط به تعداد کلنی‌ها

Weighted mean of number of colonies counted on two successive dilutions	System "1 plate per dilution" Confidence interval δ	System "2 plates per dilution" Confidence interval δ
300	268 to 332	277 to 323
150	127 to 173	134 to 166
100	**81 to 119**	**87 to 113**
30	**20 to 40**	**23 to 37**
15	7 to 22	10 to 20
10	4 to 16	6 to 14
7	Not applicable	3 to 10

ب-۲ موارد خاص برای شمارش‌های پایین

فواصل اطمینان از جداول ب-۲ تا ب-۵ بدست می‌آید:

جدول ب ۲ - فواصل اطمینان برای شمارش با سیستم " یک پلیت در هر رقت"، تعداد پایین شمارش شده روی یک پلیت

Number of colonies[a]	Confidence limits at approximate 95 % confidence level[b]		Percentage confidence limit
	Lower limit	Upper limit	
1	<1	3	±196
2	<1	5	±139
3	<1	6	±113
4	<1	8	±98
5	<1	9	±88
6	1	11	±80
7	2	12	±74
8	2	14	±69
9	3	15	±65
10	4	16	±62
11	4	18	±59
12	5	19	±57
13	6	20	±54
14	7	21	±52
15	7	23	±51

[a] The number of colonies counted on one plate at one dilution.

[b] Compared to the number of microorganisms calculated and assuming that count is made on one plate at one dilution.

جدول ب ۳ - فواصل اطمینان برای شمارش با سیستم " یک پلیت در هر رقت" ، تعداد پایین شمارش شده روی دو پلیت تکی، از دو رقت متوالی

Number of colonies[a]	Number of microorganisms[b]	Confidence limits at approximate 95 % confidencelevel[c]		Percentage confidence limits
		Lower limit	Upper limit	
1	NA[d]	NA	NA	NA
2	NA	NA	NA	NA
3	NA	NA	NA	NA
4	NA	NA	NA	NA
5	NA	NA	NA	NA
6	NA	NA	NA	NA
7	NA	NA	NA	NA
8	NA	NA	NA	NA
9	NA	NA	NA	NA
10	9	3	15	±62
11	10	4	16	±59
12	11	5	17	±57
13	12	5	18	±54
14	13	6	19	±52
15	14	7	21	±51

a The number of colonies counted on one Petri dish at two successive dilutions.

b Weighted mean from two Petri dishes.

c Compared to the number of microorganisms calculated and assuming that count is made on a single plate at two dilutions.

d Not available: weighted mean cannot be calculated.

جدول ب ۴ - فواصل اطمینان برای شمارش با سیستم " دو پلیت در هر رقت" ، تعداد پایین شمارش شده روی دو پلیت، در یک رقت

Number of colonies[a]	Number of microorganisms[b]	Confidence limits at approximate 95 % confidence level[c]		Percentage confidence limits
		Lower	Upper	
1	1	<1	1	±196
2	1	<1	2	±139
3	2	<1	3	±113
4	2	<1	4	±98
5	3	<1	5	±88
6	3	<1	5	±80
7	4	<1	6	±74
8	4	1	7	±69
9	5	2	7	±65
10	5	2	8	±62
11	6	2	9	±59
12	6	3	9	±57
13	7	3	10	±54
14	7	3	11	±52
15	8	4	11	±51
16	8	4	12	±49
17	9	4	13	±48
18	9	5	13	±46
19	10	5	14	±45
20	10	6	14	±44
21	11	6	15	±43
22	11	6	16	±42
23	12	7	16	±41
24	12	7	17	±40
25	13	8	17	±39
26	13	8	18	±38
27	14	8	19	±38
28	14	9	19	±37
29	15	9	20	±36
30	15	10	20	±36

[a] The number of colonies counted. on two Petri dishes at one dilution.

[b] Arithmetical mean from two Petri dishes.

[c] Compared to the number of microorganisms calculated and assuming that count is made on two plates at a single dilution.

جدول ب ۵ - فواصل اطمینان برای شمارش با سیستم " دو پلیت در هر رقت"، تعداد پایین شمارش شده روی دو پلیت، در دو رقت

Number of colonies[a]	Number of microorganisms[b]	Confidence limits at approximate 95% confidence level[c]		Percentage confidence limits
		Lower	Upper	
1	NA[d]	NA	NA	NA
2	NA	NA	NA	NA
3	NA	NA	NA	NA
4	NA	NA	NA	NA
5	NA	NA	NA	NA
6	NA	NA	NA	NA
7	NA	NA	NA	NA
8	NA	NA	NA	NA
9	NA	NA	NA	NA
10	NA	NA	NA	NA
11	NA	NA	NA	NA
12	5	2	9	±57
13	6	3	9	±54
14	6	3	10	±52
15	7	3	10	±51
16	7	4	11	±49
17	8	4	11	±48
18	8	4	12	±46
19	9	5	13	±45
20	9	5	13	±44
21	10	5	14	±43
22	10	6	14	±42
23	10	6	15	±41
24	11	7	15	±40
25	11	7	16	±39
26	12	7	16	±38
27	12	8	17	±38
28	13	8	17	±37
29	13	8	18	±36
30	14	9	19	±36

a The number of colonies counted on two Petri dishes at two successive dilutions.

b Weighted mean from four Petri dishes.

c Compared to the number of microorganisms calculated and assuming that count is made on two plates at two dilutions.

d Not available: weighted mean cannot be calculated.

پیوست پ

(الزامی)

تعیین محتمل‌ترین تعداد

جدول پ ۱ – مقدار MPN در هر آزمایه و حدود اطمینان ٪۹۵ برای یک سری از ۱۰ لوله

محاسبه شده مطابق با پیوست ث– کتابنامه

Number of positive tubes	Series of 10 tubes			
	MPN /ml or /g	Standard uncertainty of $\log_{10}M$	95 % limits	
			Lower	Upper
1	0,11	0,435	0,02	0,75
2	0,22	0,308	0,06	0,89
3	0,36	0,252	0,11	1,11
4	0,51	0,220	0,19	1,38
5	0,69	0,198	0,28	1,69
6	0,92	0,184	0,40	2,10
7	1,20	0,174	0,55	2,64
8	1,61	0,171	0,75	3,48
9	2,30	0,179	1,03	5,16

جدول پ ۲ – مقدار MPN در هر آزمایه و حدود اطمینان ٪۹۵ برای یک سری از ۱۵ لوله

محاسبه شده مطابق با پیوست ث– کتابنامه

Number of positive tubes	Series of 15 tubes			
	MPN /ml or /g	Standard uncertainty of $\log_{10}M$	95 % limits	
			Lower	Upper
1	0,07	0,434	0,01	0,49
2	0,14	0,307	0,04	0,57
3	0,22	0,251	0,07	0,69
4	0,31	0,218	0,12	0,83
5	0,41	0,196	0,17	0,98
6	0,51	0,179	0,23	1,15
7	0,63	0,167	0,30	1,33
8	0,76	0,157	0,37	1,55
9	0,92	0,150	0,47	1,80
10	1,10	0,144	0,57	2,11
11	1,32	0,141	0,70	2,49
12	1,61	0,139	0,86	3,02
13	2,01	0,142	1,06	3,82
14	2,71	0,155	1,35	5,45

جدول پ ۳ – مقدار MPN در هر آزمایه و حدود اطمینان ٪۹۵ برای یک سری از ۲۰ لوله

محاسبه شده مطابق با پیوست ث– کتابنامه

Number of positive tubes	Series of 20 tubes			
	MPN /ml or /g	Standard uncertainty of $\log_{10}M$	95 % limits	
			Lower	Upper
1	0,05	0,434	0,01	0,36
2	0,11	0,307	0,03	0,42
3	0,16	0,251	0,05	0,50
4	0,22	0,218	0,08	0,60
5	0,29	0,195	0,12	0,69
6	0,36	0,178	0,16	0,80
7	0,43	0,165	0,20	0,91
8	0,51	0,155	0,25	1,03
9	0,59	0,147	0,31	1,16
10	0,69	0,140	0,37	1,30
11	0,80	0,134	0,44	1,46
12	0,92	0,130	0,51	1,65
13	1,05	0,126	0,59	1,85
14	1,20	0,123	0,69	2,10
15	1,39	0,121	0,80	2,40
16	1,61	0,121	0,93	2,77
17	1,90	0,122	1,09	3,29
18	2,30	0,127	1,30	4,08
19	3,00	0,141	1,58	5,67

جدول پ ۴ – مقدار MPN در هر آزمایه و حدود اطمینان ٪۹۵ برای یک سری از ۲۵ لوله

محاسبه شده مطابق با منبع ارائه شده در کتابنامه شماره [۲۹]

Number of positive tubes	Series of 25 tubes			
	MPN /ml or /g	Standard uncertainty of $\log_{10}M$	95 % limits	
			Lower	Upper
1	0,04	0,434	0,01	0,29
2	0,08	0,307	0,02	0,33
3	0,13	0,251	0,04	0,40
4	0,17	0,217	0,07	0,47
5	0,22	0,195	0,09	0,54
6	0,27	0,178	0,12	0,61
7	0,33	0,165	0,16	0,69
8	0,39	0,154	0,19	0,77
9	0,45	0,146	0,23	0,86
10	0,51	0,139	0,27	0,96
11	0,58	0,133	0,32	1,06
12	0,65	0,128	0,37	1,16
13	0,73	0,123	0,42	1,28
14	0,82	0,119	0,48	1,41
15	0,92	0,116	0,54	1,55
16	1,02	0,113	0,61	1,70
17	1,14	0,111	0,69	1,88
18	1,27	0,109	0,78	2,09
19	1,43	0,108	0,88	2,33
20	1,61	0,108	0,99	2,62
21	1,83	0,109	1,12	2,99
22	2,12	0,111	1,29	3,50
23	2,53	0,117	1,49	4,28
24	3,22	0,123	1,77	5,85

جدول پ ۵- مقدار MPN در هر گرم از نمونه و حدود اطمینان ٪۹۵

(وقتی سه تا ۱g از آزمایه، سه تا ۰٫۱ g و سه تا ۰٫۰۱ g استفاده شده است) پیوست ث- کتابنامه

Number positive results for inoculum volume, ml or g			MPN /ml or /g	$\log_{10}M$	Standard deviation of $\log_{10}M$	95 % Confidence limits		Rarity index	Rarity category
1,00	0,10	0,01				Lower	Upper		
0	0	0	0	NA[a]	NA[a]	0	1,1	1,00	1
0	1	0	0,30	–0,52	0,43	0,04	2,3	0,09	1
1	0	0	0,36	–0,45	0,44	0,05	2,7	1,00	1
1	0	1	0,72	–0,14	0,31	0,17	3,0	0,02	2
1	1	0	0,74	–0,13	0,31	0,18	3,1	0,21	1
1	2	0	1,1	0,06	0,26	0,35	3,7	0,02	2
2	0	0	0,92	–0,04	0,32	0,21	4,0	1,00	1
2	0	1	1,4	0,16	0,26	0,42	4,8	0,04	2
2	1	0	1,5	0,17	0,27	0,43	5,0	0,43	1
2	1	1	2,0	0,31	0,23	0,69	6,0	0,02	2
2	2	0	2,1	0,32	0,24	0,71	6,2	0,07	1
3	0	0	2,3	0,36	0,31	0,55	9,7	1,00	1
3	0	1	3,8	0,59	0,31	0,93	16	0,08	1
3	1	0	4,3	0,63	0,33	0,95	19	1,00	1
3	1	1	7,5	0,87	0,30	1,9	30	0,21	1
3	1	2	12	1,1	0,26	3,6	37	0,02	2
3	2	0	9,3	0,97	0,32	2,2	40	1,00	1
3	2	1	15	1,2	0,27	4,4	51	0,42	1
3	2	2	21	1,3	0,24	7,2	64	0,07	1
3	3	0	24	1,4	0,32	5,6	100	1,00	1
3	3	1	46	1,7	0,34	9,6	220	1,00	1
3	3	2	110	2,0	0,32	25	480	1,00	1
3	3	3	∞	NA[a]	NA[a]	36	∞	1,00	1

[a] Not available.

جدول پ ۶ - مقدار MPN در هر گرم از نمونه و حدود اطمینان ٪۹۵

(وقتی پنج تا 1g از آزمایه، پنج تا ۰/۱ گرم و پنج تا ۰/۰۱ گرم استفاده شده است)

پیوست ث- کتابنامه

No. positive results for inoculum volume, ml or g			MPN /ml or /g	$\log_{10}M$	Standard deviation of $\log_{10}M$	95 % Confidence limits		Rarity index	Category
1	0,1	0,01				Lower	Upper		
0	0	0	0	NA	NA	0	0,66	1	1
0	1	0	0,18	–0,74	0,43	0,03	1,34	0,09	1
1	0	0	0,20	–0,70	0,44	0,03	1,47	1,00	1
1	0	1	0,40	–0,40	0,31	0,10	1,65	0,02	2
1	1	0	0,40	–0,39	0,31	0,10	1,66	0,21	1
1	2	0	0,61	–0,21	0,25	0,19	1,96	0,02	2
2	0	0	0,45	–0,35	0,31	0,11	1,86	1,00	1
2	0	1	0,68	–0,17	0,25	0,21	2,18	0,03	2
2	1	0	0,68	–0,16	0,25	0,21	2,2	0,35	1
2	1	1	0,92	–0,04	0,22	0,33	2,55	0,02	2
2	2	0	0,93	–0,03	0,22	0,34	2,58	0,06	1
3	0	0	0,78	–0,11	0,26	0,24	2,54	1,00	1
3	0	1	1,1	0,02	0,22	0,38	3,00	0,05	1
3	1	0	1,1	0,03	0,22	0,38	3,02	0,57	1
3	1	1	1,4	0,14	0,20	0,54	3,48	0,03	2
3	2	0	1,4	0,14	0,20	0,54	3,53	0,15	1
3	2	1	1,7	0,23	0,19	0,72	4,02	0,10	2
3	3	0	1,7	0,24	0,19	0,73	4,09	0,03	2
4	0	0	1,3	0,11	0,23	0,44	3,72	1,00	1
4	0	1	1,7	0,22	0,21	0,62	4,4	0,08	1
4	1	0	1,7	0,23	0,21	0,63	4,5	0,92	1
4	1	1	2,1	0,33	0,20	0,85	5,28	0,07	1
4	2	0	2,2	0,33	0,20	0,86	5,41	0,31	1
4	2	1	2,6	0,42	0,19	1,1	6,31	0,03	2
4	3	0	2,7	0,43	0,19	1,1	6,5	0,07	1
4	4	0	3,4	0,53	0,18	1,4	7,8	0,01	2
5	0	0	2,3	0,36	0,24	0,76	7,0	0,77	1
5	0	1	3,1	0,50	0,24	1,0	9,4	0,09	1
5	1	0	3,3	0,52	0,24	1,1	10	1,00	1
5	1	1	4,6	0,66	0,25	1,5	14	0,20	1
5	1	2	6,3	0,80	0,24	2,1	19	0,02	2
5	2	0	4,9	0,69	0,26	1,5	16	1,00	1
5	2	1	7,0	0,84	0,24	2,3	22	0,36	1

ادامه جدول پ ۶ – مقدار MPN در هر گرم از نمونه و حدود اطمینان ٪۹۵

(وقتی پنج تا ۱g از آزمایه، پنج تا ۰/۱ گرم و پنج تا ۰/۰۱ گرم استفاده شده است)

پیوست ث– کتابنامه

5	2	2	9,4	0,97	0,22	3,4	26	0,06	1
5	3	0	7,9	0,90	0,25	2,5	25	1,00	1
5	3	1	11	1,0	0,22	3,9	31	0,57	1
5	3	2	14	1,1	0,20	5,5	36	0,15	1
5	3	3	17	1,2	0,19	7,4	42	0,03	2
5	4	0	13	1,1	0,23	4,4	38	1,00	1
5	4	1	17	1,2	0,21	6,4	46	0,94	1
5	4	2	22	1,3	0,20	8,8	56	0,30	1
5	4	3	28	1,4	0,19	12,0	67	0,07	1
5	4	4	35	1,5	0,18	15,0	81	0,01	2
5	5	0	24	1,4	0,24	7,8	74	0,74	1
5	5	1	35	1,5	0,25	11	110	1,00	1
5	5	2	54	1,7	0,27	16	190	1,00	1
5	5	3	92	2,0	0,26	28	300	1,00	1
5	5	4	160	2,2	0,24	53	490	1,00	1
5	5	5	∞	NA	NA	65	∞	1,00	1

جدول پ ۷ – مقدار MPN در هر گرم از نمونه و حدود اطمینان ٪۹۵

(وقتی ۱۰ تا ۱g از آزمایه، ۱۰ تا ۰/۱ گرم و ۱۰ تا ۰/۰۱ گرم استفاده شده است)

پیوست ث–کتابنامه

No. positive results for inoculum volume, ml or g			MPN /ml or /g	$\log_{10}M$	Standard deviation of $\log_{10}M$	95 % Confidence limits		Rarity index	Category
1	0,1	0,01				Lower	Upper		
0	0	0	0	NA	NA	0	0,33	1,00	1
0	1	0	0,09	–1	0,43	0,012	0,67	0,09	1
1	0	0	0,09	–1	0,43	0,013	0,7	0,99	1
1	0	1	0,19	–0,72	0,31	0,046	0,78	0,02	2
1	1	0	0,19	–0,72	0,31	0,046	0,78	0,19	1
1	2	0	0,29	–0,54	0,25	0,09	0,91	0,03	2
2	0	0	0,2	–0,7	0,31	0,048	0,82	0,99	1
2	0	1	0,3	–0,52	0,25	0,094	0,95	0,03	2
2	1	0	0,3	–0,52	0,25	0,094	0,95	0,31	1
2	1	1	0,4	–0,4	0,22	0,15	1,1	0,01	2
2	2	0	0,4	–0,4	0,22	0,15	1,1	0,06	1
3	0	0	0,32	–0,5	0,25	0,099	1	0,99	1
3	0	1	0,42	–0,38	0,22	0,15	1,2	0,04	2
3	1	0	0,42	–0,37	0,22	0,15	1,2	0,43	1
3	1	1	0,53	–0,27	0,2	0,22	1,3	0,02	2
3	2	0	0,53	–0,27	0,2	0,22	1,3	0,11	1
3	3	0	0,65	–0,19	0,18	0,28	1,5	0,02	2
4	0	0	0,45	–0,35	0,22	0,16	1,2	0,99	1
4	0	1	0,56	–0,25	0,2	0,23	1,4	0,06	1
4	1	0	0,56	–0,25	0,2	0,23	1,4	0,58	1
4	1	1	0,68	–0,17	0,18	0,3	1,6	0,04	2
4	2	0	0,68	–0,16	0,18	0,3	1,6	0,19	1
4	2	1	0,8	–0,096	0,17	0,37	1,7	0,02	2
4	3	0	0,81	–0,094	0,17	0,37	1,7	0,05	2
5	0	0	0,6	–0,22	0,2	0,24	1,5	0,98	1
5	0	1	0,72	–0,14	0,18	0,31	1,7	0,07	1
5	1	0	0,73	–0,14	0,18	0,32	1,7	0,75	1
5	1	1	0,85	–0,068	0,17	0,39	1,8	0,07	1
5	2	0	0,86	–0,066	0,17	0,4	1,9	0,32	1
5	2	1	0,99	–0,004 7	0,16	0,48	2	0,03	2
5	3	0	1	–0,002 1	0,16	0,48	2,1	0,09	1
5	4	0	1,1	0,055	0,15	0,57	2,3	0,02	2
6	0	0	0,78	–0,11	0,18	0,34	1,8	0,98	1

ادامه جدول پ ۷- مقدار MPN در هر گرم از نمونه و حدود اطمینان ٪۹۵

(وقتی ۱۰ تا ۱g از آزمایه، ۱۰ تا ۰/۱ گرم و ۱۰ تا ۰/۰۱ گرم استفاده شده است)

پیوست ث-کتابنامه

6	0	1	0,92	–0,038	0,17	0,42	2	0,09	1
6	1	0	0,92	–0,035	0,17	0,42	2	0,97	1
6	1	1	1,1	0,027	0,16	0,51	2,2	0,10	1
6	2	0	1,1	0,03	0,16	0,51	2,2	0,46	1
6	2	1	1,2	0,085	0,15	0,61	2,4	0,05	1
6	3	0	1,2	0,088	0,15	0,61	2,5	0,15	1
6	3	1	1,4	0,14	0,14	0,71	2,7	0,02	2
6	4	0	1,4	0,14	0,14	0,71	2,7	0,04	2
7	0	0	1	–0,001 8	0,17	0,45	2,2	0,93	1
7	0	1	1,2	0,062	0,16	0,55	2,4	0,10	1
7	1	0	1,2	0,065	0,16	0,55	2,4	1,00	1
7	1	1	1,3	0,12	0,15	0,65	2,7	0,13	1
7	2	0	1,3	0,13	0,15	0,66	2,7	0,61	1
7	2	1	1,5	0,18	0,15	0,77	3	0,08	1
7	3	0	1,5	0,18	0,15	0,77	3	0,24	1
7	3	1	1,7	0,23	0,14	0,89	3,2	0,04	2
7	4	0	1,7	0,23	0,14	0,89	3,3	0,08	1
7	4	1	1,9	0,28	0,14	1	3,5	0,01	2
7	5	0	1,9	0,28	0,14	1	3,6	0,02	2
8	0	0	1,3	0,11	0,16	0,6	2,7	0,71	1
8	0	1	1,5	0,17	0,16	0,71	3	0,09	1
8	1	0	1,5	0,17	0,16	0,72	3	1,00	1
8	1	1	1,7	0,22	0,15	0,84	3,3	0,17	1
8	1	2	1,9	0,27	0,14	0,97	3,7	0,01	2
8	2	0	1,7	0,23	0,15	0,84	3,4	0,83	1
8	2	1	1,9	0,28	0,15	0,97	3,7	0,14	1
8	2	2	2,1	0,33	0,14	1,1	4	0,01	2
8	3	0	1,9	0,28	0,15	0,98	3,7	0,42	1
8	3	1	2,1	0,33	0,14	1,1	4,1	0,08	1
8	4	0	2,2	0,33	0,14	1,1	4,1	0,16	1
8	4	1	2,4	0,38	0,14	1,3	4,5	0,04	2
8	5	0	2,4	0,38	0,14	1,3	4,6	0,05	2
8	5	1	2,7	0,43	0,13	1,4	5	0,01	2
8	6	0	2,7	0,43	0,13	1,5	5	0,01	2
9	0	0	1,7	0,22	0,16	0,79	3,5	0,53	1
9	0	1	1,9	0,28	0,16	0,93	3,9	0,09	1
9	1	0	1,9	0,29	0,16	0,94	4	1,00	1
9	1	1	2,2	0,34	0,15	1,1	4,4	0,20	1

ادامه جدول پ ۷ - مقدار MPN در هر گرم از نمونه و حدود اطمینان ٪۹۵

(وقتی ۱۰ تا ۱g از آزمایه، ۱۰ تا ۰/۱ گرم و ۱۰ تا ۰/۰۱ گرم استفاده شده است)

پیوست ث-کتابنامه

9	1	2	2,5	0,39	0,15	1,2	4,9	0,02	2
9	2	0	2,2	0,35	0,15	1,1	4,5	1,00	1
9	2	1	2,5	0,4	0,15	1,3	5	0,23	1
9	2	2	2,8	0,45	0,15	1,4	5,5	0,02	2
9	3	0	2,5	0,41	0,15	1,3	5,1	0,66	1
9	3	1	2,9	0,46	0,15	1,5	5,6	0,16	1
9	3	2	3,2	0,51	0,14	1,7	6,3	0,02	2
9	4	0	2,9	0,46	0,15	1,5	5,8	0,31	1
9	4	1	3,3	0,51	0,15	1,7	6,4	0,09	1
9	4	2	3,7	0,56	0,14	1,9	7,1	0,01	2
9	5	0	3,3	0,52	0,15	1,7	6,5	0,12	1
9	5	1	3,7	0,57	0,14	1,9	7,2	0,04	2
9	6	0	3,8	0,58	0,15	2	7,4	0,04	2
9	6	1	4,3	0,63	0,14	2,2	8,2	0,02	2
9	7	0	4,4	0,64	0,14	2,2	8,4	0,01	2
10	0	0	2,3	0,36	0,17	1,1	5,1	0,3	1
10	0	1	2,7	0,43	0,17	1,2	5,9	0,06	1
10	1	0	2,7	0,44	0,17	1,3	6	0,70	1
10	1	1	3,2	0,51	0,17	1,5	7	0,19	1
10	1	2	3,8	0,58	0,17	1,7	8,3	0,03	2
10	2	0	3,3	0,52	0,17	1,5	7,3	0,96	1
10	2	1	3,9	0,59	0,17	1,7	8,6	0,31	1
10	2	2	4,6	0,66	0,17	2	10	0,06	1
10	3	0	4	0,60	0,18	1,8	9	1,00	1
10	3	1	4,7	0,68	0,18	2,1	11	0,46	1
10	3	2	5,6	0,75	0,18	2,5	13	0,11	1
10	3	3	6,6	0,82	0,17	3	15	0,02	2
10	4	0	4,9	0,69	0,18	2,1	11	1,00	1
10	4	1	5,9	0,77	0,18	2,6	13	0,61	1
10	4	2	7	0,84	0,17	3,2	16	0,19	1
10	4	3	8,2	0,91	0,16	3,8	17	0,05	2
10	5	0	6,2	0,79	0,18	2,7	14	1,00	1
10	5	1	7,4	0,87	0,18	3,3	17	0,77	1
10	5	2	8,7	0,94	0,17	4,1	19	0,32	1
10	5	3	10	1	0,16	4,9	21	0,09	1
10	5	4	11	1,1	0,15	5,8	23	0,02	2
10	6	0	7,9	0,9	0,18	3,5	18	1,00	1
10	6	1	9,4	0,97	0,17	4,3	20	0,98	1

ادامه جدول پ ۷- مقدار MPN در هر گرم از نمونه و حدود اطمینان ٪۹۵

(وقتی ۱۰ تا ۱g از آزمایه، ۱۰ تا ۰/۱ گرم و ۱۰ تا ۰/۰۱ گرم استفاده شده است)

پیوست ث-کتابنامه

10	6	2	11	1	0,16	5,2	23	0,46	1
10	6	3	12	1,1	0,15	6,2	25	0,15	1
10	6	4	14	1,1	0,14	7,2	27	0,04	2
10	7	0	10	1	0,17	4,6	22	0,94	1
10	7	1	12	1,1	0,16	5,6	25	1,00	1
10	7	2	14	1,1	0,15	6,7	28	0,6	1
10	7	3	15	1,2	0,15	7,9	30	0,24	1
10	7	4	17	1,2	0,14	9,1	33	0,08	1
10	7	5	19	1,3	0,14	10	36	0,02	2
10	8	0	13	1,1	0,16	6,1	28	0,72	1
10	8	1	15	1,2	0,16	7,3	31	1,00	1
10	8	2	17	1,2	0,15	8,6	35	0,83	1
10	8	3	20	1,3	0,15	10	38	0,42	1
10	8	4	22	1,3	0,14	12	42	0,16	1
10	8	5	25	1,4	0,14	13	47	0,05	2
10	9	0	17	1,2	0,16	8	36	0,54	1
10	9	1	20	1,3	0,16	9,6	41	1,00	1
10	9	2	23	1,4	0,15	11	46	1,00	1
10	9	3	26	1,4	0,15	13	53	0,62	1
10	9	4	30	1,5	0,15	15	60	0,3	1
10	9	5	35	1,5	0,15	17	69	0,12	1
10	9	6	40	1,6	0,15	20	78	0,04	2
10	9	7	46	1,7	0,15	23	90	0,01	2
10	10	0	24	1,4	0,17	11	53	0,30	1
10	10	1	29	1,5	0,17	13	64	0,67	1
10	10	2	35	1,5	0,18	15	79	0,90	1
10	10	3	43	1,6	0,18	18	100	1,00	1
10	10	4	54	1,7	0,19	23	130	1,00	1
10	10	5	70	1,8	0,19	29	170	1,00	1
10	10	6	92	2	0,18	40	210	1,00	1
10	10	7	120	2,1	0,17	54	270	1,00	1
10	10	8	160	2,2	0,17	73	350	1,00	1
10	10	9	230	2,4	0,18	100	520	1,00	1
10	10	10	∞	NA	NA	120	∞	1,00	1

پیوست ت
(الزامی)
شمارش کلنی‌ها با دو پلیت در هر رقت

ت-۱ کلیات

در این پیوست، محاسبه و بیان نتایج برای شمارش با دو پلیت در هر رقت مشخص می‌شود.
کلیه الزامات و توصیه‌های بیان شده در بند ۱۱-۳ این استاندارد، در این پیوست، استفاده می‌شود. فقط مواردی که متفاوت هستند و نیاز به توضیح دارد، در این پیوست آورده شده است.

ت-۲ شمارش کلنی‌ها

الزامات و توصیه‌های بند ۱۱-۳-۱ و ۱۱-۳-۲-۱-۱ در این پیوست استفاده می شوند.
پس از دوره گرمخانه‌گذاری که در استانداردهای خاص تعیین شده است، کلنی‌ها (کل کلنی‌ها، کلنی‌های مشخص یا کلنی‌های مشکوک احتمالی) برای هر پلیت حاوی ۳۰۰ کلنی یا کمتر از ۳۰۰ کلنی (یا هر تعدادی که در استانداردهای خاص تعیین شده است) را شمارش کنید.

مقدار موارد مرتبط با موارد کلی، در زیر آورده شده است:
الف- تلقیح از هر رقت به پتری دیش با قطر ۹۰mm و حداقل برای دو رقت متوالی باید انجام شود؛
ب- حداکثر تعداد قابل شمارش برای کل کلنی‌های موجود: ۳۰۰ کلنی در هر پلیت؛
پ- حداکثر تعداد قابل شمارش کل کلنی‌ها (تیپیک یا غیرتیپیک) موجود بر روی پلیت هنگام شمارش کلنی‌های مشخص یا احتمالی: ترجیحا ۳۰۰ در هر پلیت؛
ت- حداکثر تعداد قابل شمارش کلنی‌های مشخص یا احتمالی: ۱۵۰ در هر پلیت؛
ث- تعداد کلنی‌های احتمالی تلقیح شده برای شناسایی یا تایید (طبق بند پ-۴). در هر پلیت انتخابی: ۵ کلنی.

این موارد در استانداردها تعیین شده است.
روش‌های محاسبه‌ای که در زیر بیان شده است، برای مواردی است که مکررا اتفاق می‌افتد، وقتی آزمون‌ها مطابق با شرایط خوب آزمایشگاهی انجام می‌شوند.
موارد خاص ممکن است گاهی اوقات اتفاق بیفتد (برای مثال: تعداد کلنی‌ها در دو پلیت با رقت مشابه ممکن است اختلاف معنی‌داری را نشان دهد یا نسبت ضرایب رقت استفاده شده برای دو رقت متوالی ممکن است خیلی متفاوت باشد) بنابراین لازم است نتایج شمارش به دست آمده مورد بررسی قرار گیرد و توسط میکروبیولوژیست دارای صلاحیت تفسیر و بررسی شود و در صورت لزوم، مردود شود.

ت-۳ روش محاسبه"حالت کلی (شمارش کل کلنی‌ها یا کلنی‌های تیپیک)

به طور کلی لازم است شمارش کلنی‌ها بر روی حداقل یک پلیت که حاوی حداقل ۱۰ کلنی است (کل کلنی‌ها، کلنی‌های مشخص یا کلنی‌های مطابق با معیار شناسایی یا تایید) (طبق بند پ-۴) بررسی شود تا نتیجه، تصدیق شود.

چنانچه دو پتری دیش از هر رقت استفاده می‌شود، نسبت بین شمارش کلنی در پلیت اول و شمارش کلنی پلیت دوم، بهتر است برابر با یک باشد.

توصیه می‌شود، حدود برای شمارش کلنی پلیت دوم، توسط آزمایشگاه مشخص شود.

این حدود ممکن است در استاندارد ملی ایران شماره ۲-۱۴۱۳۰ بیان شده باشد.

وقتی این حدود رعایت نشود، نتیجه باید با احتیاط، تفسیر شود.

چنانچه شمارش کلنی پلیت اول با شمارش بالاتر، ۲۵۰ کلنی باشد، شمارش کلنی پلیت دوم با شمارش پایین تر بهتر است بیشتر از ۱۹۶ کلنی باشد .(به استاندارد ملی ایران شماره ۲-۱۴۱۳۰مراجعه کنید).

توصیه می‌شود، نسبت بین شمارش کلنی رقت‌های d_1 و d_2، قابل اجرا باشد (طبق بند ۱۱-۳-۲-۲).

N تعداد میکروارگانیسم‌های موجود در آزمونه را به صورت میانگین وزنی از دو رقت متوالی با استفاده از فرمول ت-۱ محاسبه کنید:

$$N = \frac{\sum C}{V \times \left[n_1 + (0{,}1 \times n_2) \right] \times d} \qquad \text{(ت-۱)}$$

که در آن:

$\sum C$ مجموع کلنی‌های شمارش شده بر روی همه پلیت‌های انتخابی از دو رقت متوالی و حداقل یکی از پلیت‌ها حاوی حداقل ۱۰ کلنی باشد؛

V حجم مایه تلقیح به هر پلیت بر حسب میلی‌لیتر؛

n_1 تعداد پلیت‌های انتخابی در اولین رقت؛

n_2 تعداد پلیت‌های انتخابی در دومین رقت؛

d ضریب رقت مربوط به اولین رقت انتخابی (d=1) برای فرآورده مایع، که رقیق نشده است.

نتایج را تا دو رقم معنی‌دار گرد کنید، برای این منظور چنانچه رقم سوم کمتر از ۵ است رقم قبلی را تغییر ندهید، چنانچه رقم سوم مساوی یا بیشتر از 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 معنی‌دار بیان کنید.

نتایج را به صورت " تعداد N میکروارگانیسم در هر میلی‌لیتر (فرآورده‌های مایع) یا هرگرم (سایر فرآورده‌ها)" گزارش کنید.

مثال:

شمارش نتایج به دست آمده به صورت زیر است:

- در اولین رقت انتخابی (10^{-2}): ۱۶۸ کلنی و ۲۱۵کلنی؛
- در دومین رقت انتخابی (10^{-3}): ۱۴ کلنی و ۲۵کلنی.

$$N = \frac{\sum C}{V \times \left[n_1 + \left(0{,}1 \times n_2 \right) \right] \times d} = \frac{168 + 215 + 14 + 25}{1 \times \left[2 + (0{,}1 \times 2) \right] \times 10^{-2}} = \frac{422}{0{,}022} = 19\,182$$

نتایج را به صورت مشخص شده در بالا گرد کنید تعداد میکروارگانیسم‌ها ۱۹۰۰۰ یا $1{,}9 \times 10^4$ در هر میلی‌لیتر یا هر گرم از فرآورده می‌باشد.

ت-۴ روش محاسبه : پس از شناسایی یا تایید

در صورتی که در روش مورد استفاده، شناسایی یا تایید کلنی ها مورد نیاز باشد،

A عدد به دست آمده (به طور معمول ۵ کلنی) از کلنی‌های مشکوک احتمالی در هر پلیت انتخاب شده برای شمارش کلنی‌ها می‌باشد. پس از شناسایی یا تایید برای هر پلیت تعداد a کلنی مطابق با معیار شناسایی یا تایید به دست آمده را با استفاده از فرمول ت-۲ محاسبه کنید:

(ت-۲)

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

که در آن:

b تعداد کلنی‌های مطابق با معیار شناسایی یا تایید از میان کلنی‌های تلقیح شده A؛

C تعداد کل کلنی‌های مشکوک احتمالی شمارش شده، بر روی پلیت.

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

تعداد N، NE یا N' میکروارگانیسم‌های شناسایی یا تایید شده را در نمونه مورد آزمون با جانشین کردن $\sum C$ با استفاده از $\sum a$ مطابق با فرمول‌های معین شده در بند پ-۳ و پ-۵-۱ و پ-۷-۳ به ترتیب محاسبه کنید.

نتایج را طبق بند پ-۳ گرد کنید.

نتایج را به ترتیب طبق بند پ-۳، پ-۵-۱ و پ-۷-۳ بیان کنید.

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

- در اولین رقت انتخابی (10^{-3}): ۶۶ کلنی و ۸۰ کلنی؛
- در دومین رقت انتخابی (10^{-4}): ۴ کلنی و ۷ کلنی.

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

از ۶۶ کلنی، تعداد ۸ کلنی آزمون می‌شود و ۶ کلنی مطابق با معیار است و بنابراین a=50 به دست آمد.

از ۸۰ کلنی، تعداد ۹ کلنی آزمون می‌شود و ۶ کلنی مطابق با معیار است و بنابراین a=53 به دست آمد.

از ۷ کلنی، تعداد ۵ کلنی آزمون می‌شود و ۴ کلنی مطابق با معیار است و بنابراین a=6 به دست آمد.

از ۴ کلنی، هر ۴ کلنی مطابق با معیار است و بنابراین a=4 به دست آمد.

$$N = \frac{\sum a}{V \times \left[n_1 + (0{,}1 \times n_2)\right] \times d} = \frac{50 + 53 + 6 + 4}{1 \times \left[2 + (0{,}1 \times 2)\right] \times 10^{-3}} = \frac{113}{0{,}0022} = 51\,364$$

نتایج را طبق بند ت-۳ گرد کنید. تعداد میکروارگانیسم‌ها ۵۱۰۰۰ یا $۵/۱ \times ۱۰^{۴}$ در هر میلی‌لیتر یا هر گرم از فرآورده می‌باشد.

ت-۵ روش محاسبه: شمارش تخمینی

ت-۵-۱ مواردی که دو پلیت (نمونه مورد آزمون یا سوسپانسیون اولیه یا اولین رقت) حاوی کمتر از ۱۰ کلنی باشد.

الزامات و توصیه‌های بند ۱۱-۳-۲-۴-۱ درباره حد پایین تر اندازه‌گیری قابل اجراست.

چنانچه هر دو پلیت از نمونه مورد آزمون (فرآورده‌های مایع)، یا از سوسپانسیون اولیه (سایر فرآورده‌ها)، یا از اولین رقت تلقیح شده یا انتخاب شده، حاوی کمتر از ده کلنی (کل کلنی‌ها، کلنی‌های مشخص یا کلنی‌های مطابق با معیار شناسایی یا تایید و مجموع دو پلیت حاوی حداقل ۴ کلنی باشد، NE تعداد تخمینی میکروارگانیسم‌ها در نمونه مورد آزمون، به صورت میانگین حسابی کلنی‌های شمارش شده روی دو پلیت، با استفاده از فرمول ت-۳ بدست می‌آید:

$$N_E = \frac{\sum C}{Vnd} \qquad \text{(ت-۳)}$$

که در آن:

$\sum C$ مجموع کلنی‌های شمارش شده روی دو پلیت؛

V حجم مایه تلقیح مورد استفاده در هر پلیت بر حسب میلی‌لیتر؛

n تعداد پلیت‌های شمارش شده (در این مورد $n=2$)؛

d ضریب رقت سوسپانسیون اولیه یا اولین رقت تلقیح شده یا انتخاب شده ($d=1$ برای فرآورده‌های مایع که رقیق نشده است).

نتایج را طبق بند ت-۳ گرد کنید.

نتایج را به صورت N_E تعداد تخمینی میکروارگانیسم در هر میلی‌لیتر (فرآورده‌های مایع) یا در هر گرم (سایر فرآورده‌ها) بیان کنید.

مثال:

شمارش نتایج به دست آمده به صورت زیر است:

- در اولین رقت انتخابی (10^{-2}): ۸ کلنی و ۹کلنی.

$$N_E = \frac{8+9}{1\times 2\times 10^{-2}} = \frac{17}{0,02} = 850$$

نتایج را طبق بند ت-۳ گرد کنید. تعداد تخمینی میکروارگانیسم‌ها ۸۵۰ یا $8/5\times10^{2}$ در هر میلی‌لیتر یا هر گرم از فرآورده می‌باشد.

ت-۵-۲ مواردی که دو پلیت (آزمایه یا سوسپانسیون اولیه یا اولین رقت) فاقد کلنی باشد

چنانچه دو پلیت نمونه مورد آزمون (فرآورده‌های مایع) یا سوسپانسیون اولیه (سایر فرآورده‌ها) یا اولین رقت تلقیح شده یا انتخاب شده، فاقد کلنی باشد، بیان نتایج به صورت زیر است:

" کمتر از $\frac{1}{vd}$ میکروارگانیسم در هر میلی‌لیتر (فرآورده‌های مایع) یا در هر گرم (سایر فرآورده‌ها)".

که در آن:

v حجم مایه تلقیح مورد استفاده در هر پلیت بر حسب میلی‌لیتر؛

d ضریب رقت سوسپانسیون اولیه یا اولین رقت تلقیح شده یا انتخابی، می باشد. (هنگامی که نمونه مورد آزمون به طور مستقیم از فرآوردهٔ مایع تلقیح شده باشد $d = 1$ می باشد و $d = 0.1$ هنگامی که از رقت 10^{-1} استفاده شده باشد).

ت-۶ موارد خاص (شمارش کلنی‌های تیپیک یا مشکوک احتمالی)

ت-۶-۱ چنانچه تعداد کلنی های تیپیک و غیر تیپیک در دو پلیت اولین رقت d_1 حاوی بیشتر از ۳۰۰ (یا هر مقدار بیان شده در استاندارد خاص) با مشاهده کلنی‌های تیپیک یا کلنی‌های تایید شده باشد، کلنی‌های تیپیک یا تایید شده قابل رویت هم داشته باشند و چنانچه دو پلیت حاوی رقت بعدی d_2 حاوی ۳۰۰ کلنی و کمتر از ۳۰۰ کلنی (یا هر تعداد بیان شده در استاندارد خاص) و فاقد کلنی تیپیک یا تایید شده باشد، نتایج را به صورت زیر بیان کنید:

" کمتر از $\frac{1}{v_2 d_2}$ و بیشتر از $\frac{1}{v_1 d_1}$ میکروارگانیسم در هر میلی لیتر " (فرآورده‌های مایع) یا در هر گرم (سایر فرآورده‌ها)".

که در آن:

d_1 و d_2 ضریب رقت‌های اول و دوم؛

V_1 و V_2 حجم مایه تلقیحی مورد استفاده در هر پلیت برای رقت‌های d_1 و d_2 بر حسب میلی‌لیتر.

مثال: نتایج حاصل از شمارش به صورت زیر است:

- در اولین رقت انتخابی ($۱۰^{-۲}$): بیشتر از ۳۰۰ کلنی بر روی هر یک از دو پلیت، با کلنی‌های تیپیک یا تایید شده؛
- در دومین رقت انتخابی ($۱۰^{-۳}$): ۳۳ کلنی و ۳۵ 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 فرآورده بیان می شود.

ت-۶-۲ چنانچه تعداد کلنی‌های تیپیک و غیر تیپیک در دو پلیت اولین رقت d_1، حاوی بیشتر از ۳۰۰ کلنی (یا هر مقدار بیان شده در استاندارد خاص)، بدون مشاهدهٔ کلنی‌های تیپیک یا تایید شده باشد و چنانچه دو پلیت رقت بعدی d_2 حاوی ۳۰۰ کلنی و کمتر از ۳۰۰ کلنی (یا هر مقدار بیان شده در استاندارد خاص) و فاقد کلنی تیپیک یا تایید شده باشد، نتایج را به صورت زیر بیان کنید:

" کمتر از $\frac{1}{v_2 d_2}$ میکروارگانیسم در هر میلی لیتر (فرآورده‌های مایع) یا در هر گرم (سایر فرآورده‌ها)".

که در آن:

V_2 حجم مایه تلقیحی مورد استفاده در هر پلیت از رقت متوالیd_2 ، بر حسب میلی‌لیتر؛

d_2 ضریب رقت دوم.

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

- در اولین رقت انتخابی (10^{-2}) : بیشتر از ۳۰۰ کلنی در هر یک از دو پلیت، بدون کلنی‌های تیپیک یا تایید شده؛
- در دومین رقت انتخابی (10^{-3}) : ۳۳ کلنی و ۳۵ کلنی، بدون کلنی تیپیک یا تایید شده.
نتایج به صورت کمتر از ۱۰۰۰ میکروارگانیسم در هر میلی‌لیتر یا هر گرم از فرآورده بیان می‌شود.

ت-۷ روش محاسبه: موارد خاص

الزامات و توصیه‌های بند ۱۱-۳-۲-۵ در این بند نیز کاربرد دارد.

ت-۷-۱ چنانچه تعداد کلنی‌های شمارش شده (مجموع کلنی‌ها، کلنی‌های تیپیک یا کلنی‌های احتمالی)، بیشتر از حداکثر تعداد قابل شمارش (۳۰۰ کلنی یا هر تعداد تعیین شده در استاندارد خاص) در دو پلیت حاوی اولین رقت d_1 باشد، تعداد کلنی‌ها (مجموع کلنی‌ها، کلنی‌های تیپیک یا کلنی‌های مطابق با معیار شناسایی یا تایید) کمتر از ۱۰ کلنی (حد شمارش‌های پایین) برای دو پلیت حاوی رقت متوالی d_2 باشد، نتایج را به صورت زیر بیان کنید:

یادآوری- زیربندها برای مثال می باشند.

پ- چنانچه تعداد کلنی‌ها در دو پلیت حاوی اولین رقت d_1 در محدوده [حداکثر تعداد قابل شمارش+۱، حد بالایی فاصله اطمینان برای حداکثر تعداد قابل شمارش](برای مثال: ۳۰۱-۳۲۴) (پیوست ب) باشد و شمارش کلنی در دو پلیت رقت d_2، کمتر از حد پایینی مشخص شده در بند ۱۱-۳-۲-۲ نباشد، از موارد کلی محاسبه طبق بند ت-۳، استفاده کنید.

مثال۱: نتایج حاصل از شمارش (وقتی حداکثر تعداد ۳۰۰ کلنی برای شمارش کلنی‌های تعیین شده است) به صورت زیر است:
- در اولین رقت انتخابی (10^{-2}): ۳۱۰ کلنی و ۳۲۲ کلنی (کمتر از ۳۲۴ کلنی، حد بالایی فاصله اطمینان برای ۳۰۰ کلنی)؛
- در دومین رقت انتخابی (10^{-3}): ۸ کلنی و ۱۲ کلنی. حد پایینی برای شمارش کلنی در رقت 10^{-3} ، ۱۸ کلنی و ۱۹ کلنی می‌باشد که از ۳۱۰ کلنی و۳۲۲ کلنی از رقت 10^{-2}، تعیین شده است.
نتایج این شمارش غیر قابل قبول می‌باشد.

مثال۲: نتایج حاصل از شمارش (وقتی حداکثر تعداد ۱۵۰ کلنی برای شمارش کلنی‌ها تعیین شده است) به صورت زیر است:
- در اولین رقت انتخابی(10^{-2}):۱۵۱ کلنی و ۱۶۰ کلنی (کمتر از ۱۶۷کلنی، حد بالایی فاصله اطمینان برای ۱۵۰ کلنی)؛

- در دومین رقت انتخابی ($۱۰^{-۳}$) : ۸ کلنی و ۹ کلنی. حد پایینی برای شمارش کلنی در رقت $۱۰^{-۳}$، ۶ کلنی و ۷ کلنی می‌باشد که از ۱۵۱ کلنی و ۱۶۰ کلنی از رقت $۱۰^{-۲}$، تعیین شده است.

از موارد کلی محاسبه طبق بند ت-۳ برای پلیت‌های دو رقت انتخابی، استفاده کنید.

ت- چنانچه تعداد کلنی‌ها برای پلیت حاوی رقت d_1، بیشتر از حد بالایی فاصلهٔ اطمینان برای حداکثر تعداد قابل شمارش (برای مثال: ۳۲۴کلنی) باشد و شمارش کلنی برای دو پلیت رقت d_2، کمتر از حد پایینی مشخص شده در بند ۱۱-۳-۲-۲ و محاسبه شده بر اساس حد بالایی فاصله اطمینان حداکثر تعداد قابل شمارش نباشد، فقط نتایج شمارش رقت d_2 در نظر گرفته می‌شود و شمارش تخمینی (طبق بند ت-۵-۱) به دست می‌آید.

مثال۳: نتایج حاصل از شمارش (وقتی حداکثر تعداد ۳۰۰ کلنی برای شمارش کلنی‌ها تعیین شده است) به صورت زیر است:

- اولین رقت انتخابی ($۱۰^{-۲}$): بیشتر از ۳۲۴ کلنی در هر یک از دو پلیت؛
- دومین رقت انتخابی ($۱۰^{-۳}$): ۷ کلنی و ۹ کلنی. حد پایینی برای شمارش کلنی در رقت $۱۰^{-۳}$، ۱۹ کلنی می‌باشد که از ۳۲۴ کلنی از رقت $۱۰^{-۲}$، تعیین شده است.

نتایج این شمارش غیر قابل قبول می‌باشد.

مثال۴ : نتایج حاصل از شمارش (وقتی حداکثر تعداد ۱۵۰ کلنی برای شمارش کلنی‌ها تعیین شده است) از نتایج به صورت زیر است:

- اولین رقت انتخابی ($۱۰^{-۲}$): بیشتر از ۱۶۷ کلنی در دو پلیت؛
- دومین رقت انتخابی ($۱۰^{-۳}$): ۸ کلنی و۹ کلنی. حد پایینی برای شمارش کلنی در رقت $۱۰^{-۳}$، ۸ کلنی می‌باشد که از ۱۶۷کلنی از رقت $۱۰^{-۲}$، تعیین شده است.

شمارش تخمینی را بر اساس کلنی‌های شمارش شده در دو پلیت با رقت $۱۰^{-۳}$، گزارش کنید (طبق بند ت-۵-۱).

مثال۵ : نتایج حاصل از شمارش (وقتی حداکثر۱۵۰ کلنی برای شمارش در نظر گرفته شده است) به صورت زیر است:

- اولین رقت انتخابی ($۱۰^{-۲}$): بیشتر از ۱۶۷ کلنی در دو پلیت؛
- دومین رقت انتخابی ($۱۰^{-۳}$): ۵ کلنی و ۷ کلنی. حد پایینی برای شمارش کلنی در رقت $۱۰^{-۳}$، ۸ کلنی می‌باشد که از ۱۶۷کلنی از رقت $۱۰^{-۲}$، تعیین شده است.

نتایج شمارش غیر قابل قبول می باشد.

ت-۷-۲ وقتی شمارش کلنی‌ها (مجموع کلنی‌ها، کلنی‌های تیپیک یا احتمالی) برای هر یک از پلیت‌ها برای همه رقت‌های تلقیح شده، بیشتر از ۳۰۰ کلنی (یا هر تعداد بیان شده در استاندارد خاص) باشد، نتایج را به صورت زیر گزارش کنید:

"بیشتر از $\frac{300}{vd}$(مجموع کلنی ها یا کلنی های تیپیک)" یا

"بیشتر از $\left(\frac{300}{vd}\right)\times\left(\frac{b}{A}\right)$ در مورد کلنی های تایید شده " میکروارگانیسم در هر میلی لیتر (فرآورده‌های مایع) یا در هر گرم (سایر فرآورده‌ها).

که در آن :

d رقت آخرین رقت تلقیح شده؛

v حجم مایه تلقیحی مورد استفاده در هر پلیت بر حسب میلی‌لیتر؛

b تعداد کلنی‌هایی که از میان کلنی‌های تلقیح شده A ، مطابق با معیارهای شناسایی، مورد تایید قرار گرفته است.

ت-۷-۳ وقتی فقط دو پلیت حاوی آخرین رقت تلقیح شده، قابل شمارش است و حاوی حداکثر ۳۰۰ کلنی یا کمتر (یا هر تعداد بیان شده در استاندارد خاص) کلنی ها (کل کلنی ها، کلنی های تیپیک یا کلنی های مشکوک احتمالی)، N' تعداد میکروارگانیسم‌ها را به صورت میانگین حسابی کلنی‌های شمارش شده بر روی دو پلیت، با استفاده از فرمول ت-۴ محاسبه کنید:

$$N' = \frac{\sum C}{V \times n \times d} \qquad \textbf{(ت-۴)}$$

که در آن :

$\sum C$ مجموع کلنی‌های شمارش شده بر روی دو پلیت، که یکی از آنها حداقل حاوی ۱۰ کلنی باشد؛

V حجم مایه تلقیح مورد استفاده در هر پلیت بر حسب میلی لیتر؛

n تعداد پلیت‌های انتخابی شده، در این مورد n=2 می‌باشد؛

d ضریب رقت مربوط به رقت انتخابی.

نتایج را طبق بند ت-۳ گرد کنید.

نتایج را به صورت N' تعداد میکروارگانیسم در هر میلی‌لیتر (فرآورده‌های مایع) یا هر گرم (سایر فرآورده‌ها) بیان کنید.

مثال : نتایج حاصل از شمارش به صورت زیر است:

- در آخرین رقت تلقیح شده (10^{-4}): ۱۲۰ کلنی و ۱۳۰کلنی.

$$N' = \frac{120 + 130}{1 \times 2 \times 10^{-4}} = \frac{250}{0{,}000\ 2} = 1\,250\,000$$

نتیجه را طبق بند ت-۳ گرد کنید، تعداد N' میکروارگانیسم ۱۳۰۰۰۰۰ یا $1{,}3 \times 10^{6}$ در هر میلی لیتر یا هر گرم از فرآورده می باشد.

پیوست ث

(اطلاعاتی)

کتابنامه

[1] BELL, C. NEAVEs, P. and WILLIAMS, A.P. *Food microbiology and laboratory practice*, Blackwell Science Ltd, Oxford, UK (2005).

[2] ISO 9001, *Quality management systems — Requirements*.

[3] *EA-Guidelines for the use of computers and computer systems in accredited laboratories*, European cooperation for Accreditation (1998).

[4] EA-4/10, *Accreditation for microbiological laboratories*, European cooperation for Accreditation (2002) [5] *Food microbiology program requirements*, based upon the FLAWG document *United States accreditation criteria for laboratories performing food microbiological testing*, American Association for Laboratory Accreditation (A2LA) (1998)

[6] AS 1766, *Australian standard methods for the microbiological examination of food — Part 1: General techniques and procedures update*

[7] BUTTIAUX, R., BEERENS, H. and TACQUET, A. *Manuel de techniques bactériologiques*, Éditions Médicales Flammarion (4th edn.)

[8] APHA Technical Committee on Microbiological Methods for Foods. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, 2nd edition, Speck, M.L., editor. Intersociety/Agency Committee on Microbiological Methods for Foods, American Public Health Association, Washington, DC, 1984

[9] CRUICKSHANK *et al.*, *Medical microbiology*, Vol. 2, 12th edn., Churchill-Livingstone, Edinburgh (1975).

[10] D'AOUST, J.Y. Psychrotrophy and foodborne *Salmonella. Int. J. Food. Microbiol.* 1991, **13**, pp. 207-16

[11] D'AOUST, J.Y., SEWELL, A.M. and MCDONALD, C. Recovery of *Salmonella* spp. from refrigerated pre- enrichment cultures of dry food composites, *J. AOAC Int.* 1995, **78**, pp. 1322-7

[12] D'AOUST, J.Y., SEWELL, A.M. and GRECO, P. Detection of *Salmonella* in dry foods using refrigerated pre-enrichment and enrichment broth cultures: summary of collaborative study. *J. AOAC. Int.* 1994, **77**, pp. 1490-1

[13] D'AOUST, J.Y., SEWELL, A.M. and GRECO, P. Detection of *Salmonella* in dry foods using refrigerated pre-enrichment and enrichment broth cultures —

Interlaboratory study, *J. AOAC. Int.* 1993, **76**, pp. 814-21.

[14] DALSGAARD, A., GUARDABASSI, L., LUND, C., BAGGE, L. and GRAVESEN, J. Opbevaring af badevands-og drikkevandsprøver ved 0-5 °C i et døgn medfører en signifikant reduktion i antal *Escherichia coli* og kimtal, *Dansk. Vet.* 2002 **17**, pp. 1-9

[15] HARREWIJIN, G.A., and HARTOG, B.J. Guidelines to perform microbiological analyses of food and food products ("Good laboratory practice"), *De Ware(n)-Chemicus* 1979, **9**, pp. 1-11

[16] MUIR, G.D., ed. *Hazards in the chemical laboratory*, Royal Institute of Chemistry, London (1971.

[17] *WHO*. Laboratory biosafety manual, 3rd edition. Geneva: World Health Organization, 2004.184 p.available(viewed 2013-01-24) at: http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/en/biosafety7.pdf.

[18] LIGHTFOOT, N.F., MAIER, E.A. (eds). *Microbiological analysis of food and water Guidelines for quality assurance.* Elsevier, Amsterdam, Netherlands (1998).

[19] HARRIGAN, W.F. and MCCANCE, M.E. *Laboratory methods in food and dairy microbiology*, Academic Press (1976).

[20] *Laboratory safety at the Centers for Disease Control (CDC)*, NHEW Publication No. CDC 79-8118, Atlanta, 1979.

[21] *Laboratory safety at the Centers for Disease Control*, US Dept of Health, Education and Welfare (Public Health Service), Atlanta, 1979.

[22] GERHARDT, P., MURRAY, R.G.E., COSTILLOW, R.N., NESTER, E.W., KRIEG, N.R. and PHILLIPS, G.B. eds. *Manual of methods for general bacteriology.* American Society for Microbiology, Washington, DC 20006 (1981).

[23] GNANOU BESSE, N., AUDINET, N., BEAUFORT, A., COLIN, P., CORNU, M. and LOMBARD, B. A contribution to the improvement of *Listeria monocytogenes* enumeration in cold-smoked salmon. *Int. J. Food Microbiol.* 2004, **91**, pp. 119-27

[24] *Microbiological testing laboratory accommodation guidelines*, National Association of Testing Authorities, Australia.

[25] *Microorganisms in foods — 1: Their significance and methods of enumeration*, ICMSF, University of Toronto Press (1968 update).

[26] SHAPTON, D.A., BOARD, R.G. and HAUSTER, W.J. eds. *Safety in microbiology*, Society for Applied Bacteriology Technical Series No. 1 and No. 6, Academic Press (1972).

[27] DE MAN, J.C. MPN tables (corrected), *Eur. J. Appl. Biotechnol.* 1983, **17**, pp. 301-5.

[28] COCHRAN, W.G. Estimation of bacterial densities by means of the "Most Probable Number". *Biometrics* 1950, **6**, pp. 105-16.

[29] HURLEY, M.A. and ROSCOE, M.E. Automated statistical analysis of microbial enumeration by dilution series, *J. Appl. Bacteriol.* 1983, **55**, pp. 159-64

[30] NIEMELA, S. *Statistical evaluation of results from quantitative microbiological examinations*, Nordic Committee on Food Analysis (NMKL) Report No. 1, 2nd edition (1983).

[31] TAYLOR, J. The estimation of numbers of bacteria by tenfold dilution series, *J. Appl. Bacteriol.* 1962, **25**, pp. 54-61.

[32] HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A., STALEY, J.T. and WILLIAMS, S.T. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9th edn., Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA (1994).

[33] KRIEG, N.R. and HOLT, J.G. *Bergey's manual of systematic bacteriology — Volume 1*, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA (1984).

[34]SNEATH, P.H.A.,MAIR, N.S., SHARPE, M.E. and HOLT, J.G.*Bergey's manual of systematic bacteriology — Volume 2*, 2nd edition, Springer, New York, NY, 2001.

[35] KREGER-VAN RIJ, N.J.W. *The yeasts — A taxonomic study*, 3rd edn., North-Holland Publishing Co., Amsterdam, Netherlands.

[36] THOMAS, H.A. Bacterial densities from fermentation tube tests, *J. Am. Water Works Assoc.* 1942, 34, pp. 572-6.

[37] ISO/IEC Guide 43-1, *Proficiency testing by interlaboratory comparisons — Part 1: Development and operation of proficenciency testing schemes*.

[38] ISO 6888 (all parts), *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus *and other species)*.

[39] ISO 9998, *Water quality — Practices for evaluating and controlling microbiological colony count media used in water quality tests*.

[40] ISO/TR 13843, *Water quality — Guidance on validation of microbiological methods*.

[41] ISO 14461-1, *Milk and milk products — Quality control in microbiological laboratories — Part 1: Analyst performance assessment for colony counts*.

[42] 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*.

[43] ISO 16654, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of* Escherichia coli *O157.*

[44] ISO/IEC 17025:2005, *General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.*

[45] EN 12469, *Biotechnology — Performance criteria for microbiological safety cabinets.*

[46] ISO 17604, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Carcass sampling for microbiological analysis.*

[47] ISO 18593, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for sampling techniques from surfaces using contact plates and swab methods.*

[48] ISO Guide 99:1996, *International vocabulary of basic and general terms in metrology*

[49] ISO/TC 34/SC 9 N852, *Supporting document on the change from two to one plate per dilution for colony-count techniques (revision of ISO 7218), June 2007, Marie Cornu.*

[50] ISO 3696, Water for analytical laboratory use-specification and test methods.

[51] ISO 7712, Laboratory glassware-Disposable Pasteur pipettes.

[52] BLODGETT R.J. Serial dilution with a confirmation step. *Food Microbial*. 2005, 22, pp.547-552.

[53] BLODGETT R.J. Apendix 2: Most probable number from serial dilutions. In: *Bacterial analytical manual online.* Silver spring, MD: US Food and Drug administration, 2010. Available (viewed 2013-02-24).
At:http://www.fda.gov/food/scienceresearch/laboratorymethods/bacteriologicalanalyticalmanualBAM/ucm109656.htm

[54] GARTHRIGHT W.E., BLODGETT R.J. FDA's preferred MPN methods for standard, large or unusual tests, with a spreadsheet. Food microbial.2003, 20, pp.439-445.

[55] HALDANE J.B.S. Sampling errors in the determination of bacterial or virus density by the dilution method. J. *Hygiene* 1939,39,pp.289-293.

[56] JARVIS B., WILRICH.C., WILRICH P.T. Reconsideration of the derivation of most probable number, their standard deviations, confidence bounds and rarity values. J Appl. Microbial.2010, 109, pp.1660-1667.

[57] ISO 80000-2:2009, Quantities and units-part 2: Mathematical signs and symbols to be used in the natural sciences and technology.