ISIRI
10761
1st. edition

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

استاندارد ملی ایران
۱۰۷۶۱
چاپ اول

شیر و فرآورده‌های آن – تعیین باقیمانده مواد ضد میکروبی – روش انتشار در ژل

Milk and milk products - Determination of antimicrobial residues - Tube diffusion method

مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
تهران - خیابان ولیعصر، ضلع جنوبی میدان ونک، پلاک ۱۲۹۴، صندوق پستی: ۶۱۳۹-۱۴۱۵۵
تلفن: ۵-۸۸۸۷۹۴۶۱
دورنگار: ۸۸۸۸۷۰۸۰ و۸۸۸۸۷۱۰۳
کرج - شهر صنعتی، صندوق پستی ۱۶۳-۳۱۵۸۵
تلفن: ۸- ۲۸۰۶۰۳۱(۰۲۶۱)
دورنگار: ۲۸۰۸۱۱۴ (۰۲۶۱)
پیام نگار: standard@isiri.org.ir
وب‌گاه : www.isiri.org
بخش فروش، تلفن: ۲۸۱۸۹۸۹ (۰۲۶۱) ، دورنگار: ۲۸۱۸۷۸۷ (۰۲۶۱)
بها: ۲۲۵۰ ریال

Institute of Standards and Industrial Research of IRAN
Central Office: No.1294 Valiaser Ave. Vanak corner, Tehran, Iran
P. O. Box: 14155-6139, Tehran, Iran
Tel: +98 (21) 88879461-5
Fax: +98 (21) 88887080, 88887103
Headquarters: Standard Square, Karaj, Iran
P.O. Box: 31585-163
Tel: +98 (261) 2806031-8
Fax: +98 (261) 2808114
Email: standard @ isiri.org.ir
Website: www.isiri.org
Sales Dep.: Tel: +98(261) 2818989, Fax.: +98(261) 2818787
Price 2250 Rls.

به‌نام خدا

آشنایی با مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

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

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

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

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

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

---

* موسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

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

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

« شیر و فرآورده‌های آن – تعیین باقیمانده مواد ضد میکروبی – روش انتشار در ژل »

رئیس:	سمت و/ یا نمایندگی
رحیمی فرد ، ناهید (دکترای میکروبیولوژی)	وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی- اداره کل آزمایشگاه‌های کنترل غذا و دارو
دبیر:	
حیدرپور، مژگان (فوق لیسانس میکروبیولوژی)	مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
اعضاء:(به ترتیب حروف الفبا)	
ابراهیمی، غلامحسن (لیسانس صنایع غذایی)	مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
احمدی، رامتین (لیسانس علوم آزمایشگاهی	مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
تبرایی، بهمن (دکترا میکروبیولوژی)	دانشگاه آزاد اسلامی کرج
سعادتی، شهلا (لیسانس تغذیه)	وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی- اداره کل آزمایشگاه‌های کنترل غذا و دارو
دبیریان، شهریار (دکترا دامپزشکی)	سازمان صنایع شیر ایران
لک، غلامرضا (دکترای دامپزشکی)	سازمان دامپزشکی کل کشور
مختاری، فهیم دخت (فوق لیسانس ایمونولوژی)	مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

مهدی زاده، مهرانگیز (فوق لیسانس میکروبیولوژی)	وزارت بهداشت، درمان و آمـوزش پزشـکی- اداره کل آزمایشگاه‌های کنترل غذا و دارو
مهرپور، رامش (لیسانس صنایع)	موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

فهرست مندرجات

عنوان	صفحه
آشنایی با مؤسسهٔ استاندارد	ج
کمیسیون فنی تدوین استاندارد	د
پیش گفتار	و
مقدمه	ز
۱ هدف و دامنه کاربرد	۱
۲ مرجع الزامی	۱
۳ اصطلاحات وتعاریف	۱
۴ اصول آزمون	۲
۵ ارگانیسم آزمون، محیط های کشت، محلول‌های استاندارد و نمونه‌های کنترل	۲
۶ تجهیزات و لوازم شیشه ای	۹
۷ نمونه برداری	۱۰
۸ آماده سازی نمونه مورد آزمون	۱۰
۹ روش اجرای آزمون	۱۰
۱۰تائید	۱۲
۱۱بیان نتایج	۱۳
۱۲ دقت	۱۳
۱۳ گزارش آزمون	۱۳
۱۴ پیوست الف (اطلاعاتی) جداول حد تشخیص برخی از آنتی بیوتیک ها	۱۴
۱۵ پیوست ب (اطلاعاتی)تهیه سوسپانسیون مورد آزمون	۱۶

پیش گفتار

استاندارد« شیر و فرآورده‌های آن – تعیین باقیمانده مواد ضد میکروبی – روش انتشار در ژل» که پیش نویس آن درکمیسیون های مربوط توسط مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران تهیه و تدوین شده و..صدو پنجاودومین اجلاس کمیتهٔ ملی استاندارد میکروبیولوژی و بیولوژی مورخ ۱۳۸۶/۱۲/۴ مورد تصویب قرار گرفته است ، اینک به استناد بند یک مادهٔ ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ ، به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود .
برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت های ملی و جهانی در زمینهٔ صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در مواقع لزوم تجدید نظر خواهد شد و هر پیشنهادی که برای اصلاح و تکمیل این استانداردها ارائه شود، هنگام تجدید نظر در کمیسیون فنی مربوط مورد توجه قرار خواهد گرفت . بنابراین، باید همواره از آخرین تجدیدنظر استانداردهای ملی استفاده کرد.

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

ISO/TS26844 IDF/RM215:2006 Milk and milk products — Determination of antimicrobial residues — Tube diffusion test

شیر و فرآورده‌های آن – تعیین باقیمانده مواد ضد میکروبی – روش انتشار در ژل

۱ هدف

هدف از تدوین این استاندارد تعیین روش های فنی، برای یک آزمون مهار کننده میکروبیولوژی برای تشخیص انواع گسترده‌ای از مواد ضد میکروبی در شیر و فرآورده‌های آن می‌باشد.
این استاندارد برای شیر خام، شیر حرارت دیده و شیر خشک باز ساخته[1] در آب کاربرد دارد.

۲ مراجع الزامی

مدارک الزامی زیر حاوی مقرراتی است که در متن این استاندارد ملی ایران به آن‌ها ارجاع داده شده است. بدین ترتیب آن مقررات جزئی از این استاندارد ملی ایران محسوب می‌شود. در صورتی که به مدارکی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد، اصلاحیه‌ها و تجدیدنظرهای بعدی آن مورد نظر این استاندارد ملی ایران نیست. در مورد مدارکی که بدون ذکر تاریخ انتشار به آن‌ها ارجاع داده شده است، همواره آخرین تجدید نظر و اصلاحیه‌های بعدی آن‌ها مورد نظر است.استفاده از مراجع زیر برای این استاندارد الزامی است:

۲-۱ استاندارد ملی ایران شماره ۲۳۲۵ ـ میکروبیولوژی ـ آئین کاربرد روش‌های عمومی آزمایش‌های میکروبیولوژی

۲-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۲۷۴۷ ـ میکروبیولوژی ـ آئین کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی

۲-۳ استاندارد ملی ایران شماره ۳۲۶ –شیرو فرآورده های آن –نمونه برداری

2-4 ISO 13969 IDF 183, Milk and milk products — Guidelines for a standardized description of microbial inhibitortests tests

2-5 ISO 18330 IDF 188, Milk and milk products — Guidelines for a standardized description of immunoassays or receptor assays for the detection of antimicrobial residues

۳ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد اصطلاحات با تعاریف زیر به کار می‌روند :

۳-۱

مواد ضدمیکروبی[2]

موادی که در روش مشخص شده در این استاندارد اثر مهار کنندگی نشان می‌دهند.

---

1 -Reconstitued dried milk

2 -Antimicrobial substances

۲-۳

حدود تشخیص[1]

سطح غلظتی که در آن، درصد معینی از نمونه‌های مثبت تشخیص داده می‌شوند، برای مثال ۹۵ درصد.

۳-۳

شیر منفی[2]

شیری که فاقد هر گونه مواد مهارکننده میکروارگانیسم‌ها است.

۴ اصول آزمون

یک نمونه شیر به دو لوله آزمایش حاوی محیط کشت آگاردار شامل *ژئوباسیلوس*استئاروترموفیلوس[3] ATCC10149 (معادل سویه C953 NIZO) اضافه می‌شود. لوله‌های آزمایش در pH، مواد مکمل افزوده شده و آنتی‌بیوتیک‌هایی که اثر تقویت کننده[4] دارند، با همدیگر متفاوت هستند.

بعداز گرمخانه‌گذاری در شرایط طبیعی رشد ارگانیسم، رنگ شناساگر pH آگار از ارغوانی به زرد تغییر می‌کند.

وقتی موادی که مهارکننده رشد میکروارگانیسم‌ها هستند در شیر وجود داشته باشد رنگ شناساگر pH به رنگ ارغوانی باقی می‌ماند.

لوله آزمایش الف (pH =7، کلرامفنیکل) به باقیمانده تتراسایکلین حساسیتِ نشان می‌دهد و لولهٔ آزمایش ب(pH=8، تری‌متوپریم) به باقیمانده بتالاکتام‌ها، ماکرولیدها، آمینوگلیکوزیدها، سولفونامیدها و تری‌متوپریم حساسیت نشان می‌دهد.

۵ ارگانیسم آزمون، محیط های کشت، محلول‌های استاندارد و نمونه‌های کنترل

فقط از واکنشگرهای های که دارای درجه خلوص شناخته شده باشد استفاده کنید، مگر در مواردی که مشخص شده است. از آب مقطر یا آب فاقد یون یا آبی با خلوص مشابه استفاده کنید.

۵-۱ ارگانیسم آزمون

سوسپانسیون *ژئوباسیلوس استئاروترموفیلوس* ATCC10149 (معادل سویه NIZO C953) که شمارش میکروب های زنده آن معادل ۵ میلیون واحد تشکیل دهنده کلنی(CFU) در هر میلی‌لیتر است (به پیوست ب مراجعه شود) استفاده کنید.

1-Limits of detection
2 - Negative milk
3 -Geobacillus stearothermophilus
4 - Synergitic

کیفیت هر بچ جدید از سوسپانسیون ارگانیسم آزمون را با تعیین حساسیت به محلول‌های استاندارد مشخص شده در جدول یک بررسی کنید.

جدول یک – محلول‌های استاندارد برای تعیین حساسیت سوسپانسیون ارگانیسم آزمون

محلول استاندارد	مقدار میکروگرم برکیلوگرم شیر
بنزیل پنی‌سیلین (پنی‌سیلین G)	۲
سولفادیازین	۱۵۰
نئومایسین	۳۰
اریترومایسین	۱۰
اکسی تتراسایکلین	۱۰۰

بررسی را با محلول‌های استاندارد و نمونه شیر کنترل بر اساس روش ارائه شده در بند ۹ انجام دهید.
حساسیت سوسپانسیون ارگانیسم آزمون به بنزیل پنی سیلین (پنی‌سیلین G) واکسی تتراسایکلین را با لوله الف (بند ب ۵-۲-۵) و حساسیت ارگانیسم به سولفادیازین، نئومایسین و اریترومایسین را با لوله ب(بند ب ۵-۲-۶) تعیین کنید، باید در تمام لوله‌های آزمون نتیجه مثبت به دست آید.

۵-۲ محیط های کشت

به منظور بهبود تجدید پذیری در روش های آزمون توصیه می‌شود که از مواد تشکیل دهنده بدون آب یا محیط‌های کشت بدون آب استفاده کنید. برای تهیه محیط‌های کشت دستورالعمل سازنده آن مورد توجه قرار گیرد.

۵-۲-۱ محیط کشت پایه

۵-۲-۱-۱ ترکیبات

تریپتون کازئین	۵/۰ گرم
عصاره مخمر	۲/۵ گرم
گلوکز بدون آب	۱/۰ گرم
آگار	۱۰ تا ۱۵ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

یادآوری– محیط کشت دهیدراته آماده با نام پلیت کانت آگار[1] در دسترس است.

1 -Plate Count Agar

۵-۲-۱-۲ طرز تهیه

ترکیبات را به وسیله حرارت دادن در آب حل کنید، pH را به گونه‌ای تنظیم کنید که پس از سترون کـردن برابر با ۰/۲±۷/۰ باشد، محیط کشت را در ۱°C±۱۲۱°Cبه مدت زمان ۱۵ دقیقه اتوکلاوکنید.

این محیط کشت پایه را می‌توان حداکثر به مدت ۳ ماه در تاریکی ودمای ۵°C - ۰°C نگهداری کرد..

۵-۲-۲ محلول برموکرزول **ارغوانی**

۵-۲-۲-۱ ترکیبات

برموکرزول ارغوانی	۲۵۰ میلی گرم
اتانول ٪۹۶	۵ میلی لیتر
آب مقطر	۱۰۰ میلی لیتر

۵-۲-۲-۲ طرز تهیه

برموکرزول ارغوانی را در اتانول حل کنید با آب تا ۱۰۰ میلی‌لیتر رقیق کنید .

محلول برموکرزول ارغوانی را می‌توان حداکثر به مدت ۶ ماه در تـاریکی و در دمـای ۵°C - ۰°C نگهـداری کرد .

۵-۲-۳ محلول کلرامفنیکل

۵-۲-۳-۱ ترکیبات

کلرامفنیکل	۲۰ میلی‌گرم
متانول٪۹۶	۵ میلی‌لیتر
آب مقطر	۱۰۰ میلی‌لیتر

۵-۲-۳-۲ طرز تهیه

کلرامفنیکل را در متانول حل کرده با آب تا ۱۰۰ میلی‌لیتر رقیق کنید.

محلول کلرامفنیکل را می‌توان حداکثر به مدت یک ماه در تاریکی و در دمای ۵°C - ۰°C نگهداری کرد.

۵ -۲-۴ محلول تری‌متوپریم

۵-۲-۴-۱ ترکیبات

تری متوپریم	۲۵ میلی‌گرم
اتانول ٪ ۹۶	۵ میلی‌لیتر
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

۵-۲-۴-۲ طرز تهیه

تری‌متوپریم را در اتانول حل کرده، با آب مقطر تا حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رقیق کنید.
محلول تری‌متوپریم را می‌توان حداکثر به مدت یک ماه در تاریکی و دمای ۵°C - ۰°C نگهداری کرد.

۵-۲-۵ لوله آزمایش الف (pH برابر با ۷)

محیط کشت پایه (بند ۵-۲-۱) را ذوب کنید. محیط کشت را در حمام آب (۶-۳) تا دمای۶۳°C±۱°C خنک کنید، سپس ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول کلرامفنیکل (بند ۵-۲-۳) و ۲ میلی‌لیتر از محلول برموکرزول ارغوانی (بند ۵-۲-۲) را به ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت پایه گرم شده در حالی‌که آن را در حمام آب ۶۳°C نگهداری کرده‌اید، اضافه کرده و محیط را به خوبی مخلوط کنید.
در حالی‌که محیط را در حمام آب ۶۳°C نگهداری کرده‌اید pH آن را در این دما با استفاده از هیدروکسیدسدیم یک مولار یا اسیدکلریدریک یک مولار در ۰/۱±۷/۰ تنظیم کنید.
سپس به هر ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت یک مقدار مشخص (تقریباً ۲ میلی‌لیتر) از سوسپانسیون ارگانیسم آزمون (بند ۵-۱) را اضافه کنید، در صورت عدم وجود مواد ضد میکروبی بعد از گرمخانه‌گذاری در حمام آب ۶۳°C به مدت ۴ ساعت و ۱۵ دقیقه ± ۳۰دقیقه تغییر رنگ ظاهر می‌شود.
محیط کشت را مخلوط کرده و در حجم‌های یک میلی‌لیتری (بند ۶-۴) در لوله‌ها تقسیم کنید و اجازه دهید که محیط کشت ببندد. در صورتی‌که برای جلوگیری از تبخیر در لوله‌ها پوشیده باشد (برای مثال باپارافیلم) آنها را می‌توان حداکثر به مدت ۳ روز در دمای۵° C - ۰°C نگهداری کرد.

۵-۲-۶ لوله آزمایش ب (PH برابر با ۸)

محیط کشت پایه (بند ۵-۲-۱) را ذوب کنید، محیط کشت را در حمام آب (۶-۳) تا دمای۶۳ °C ±۱°C خنک کنید، سپس ۰/۶ میلی‌لیتر از محلول تری‌متوپریم (بند ۵-۲-۴) و ۲ میلی‌لیتر از محلول برموکرزول ارغوانی (۵-۲-۲) را به ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت پایه گرم شده در حالی‌که آن را در حمام آب ۶۳°C نگهداری کرده‌اید اضافه کنید، محیط را به خوبی مخلوط کنید.

در حالی که محیط کشت را در حمام آب ۶۳°C نگهداری کرده‌اید pH آن را در این دما با استفاده از هیدروکسیدسدیم یک مولار یا اسیدکلریدریک یک مولار در ۸/۰۰±۰/۰۲۰ تنظیم کنید. در حین تنظیم pH دقت کنید که pH محیط کشت از ۸/۰۵ بیشتر نشود.
سپس به هر ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت یک مقدار مشخص (تقریباً ۲ میلی‌لیتر) از سوسپانسیون ارگانیسم آزمون (بند ۵-۱) را اضافه کنید، در صورت عدم وجود مواد ضد میکروبی بعد از گرمخانه‌گذاری در حمام آب ۶۳°C به مدت ۴ ساعت و۱۵ دقیقه ± ۳۰دقیقه تغییر رنگ ظاهر می‌شود.
محیط کشت را مخلوط کرده و در حجم‌های یک میلی‌لیتری (بند ۶-۴) در لوله‌ها تقسیم کنید و اجازه دهید که محیط کشت ببندد. در صورتی‌که برای جلوگیری از تبخیر در لوله‌ها پوشیده باشد (برای مثال باپارافیلم) آنها را می‌توان حداکثر به مدت ۳ روز در دمای۵°C -۰°C نگهداری کرد.

۵-۳ محلول‌های استاندارد و نمونه‌های کنترل

اصلاح وزن برحسب خلوص و میزان نمک طبق استاندارد ISO 13969-IDF183 انجام شود.
برای آماده‌سازی محلول‌های استاندارد و نمونه‌های کنترل، می‌توان این‌طور فرض کرد که یک میلی‌لیتر از محلول با یک گرم از محلول برابر است .

۵-۳-۱ محلول‌های استاندارد بنزیل پنی‌سیلین و نمونه‌های کنترل

با در نظر گرفتن محدودیت پایداری بنزیل پنی‌سیلین، پیشنهاد می‌شود تمام محلولهای استاندارد بنزیل پنی‌سیلین به صورت تازه تهیه شده و پس از افزودن به نمونه شیر کنترل در همان روز در دمای ۱۸°C- منجمد شود.

۵-۳-۱-۱ محلول ذخیره [1] استاندارد بنزیل پنی سیلین

مقدار۲۰/۰±۰/۱ میلی‌گرم از بنزیل پنی سیلین را در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل و مخلوط کنید. محلول ذخیره بنزیل پنی سیلین که به این صورت آماده شده حاوی ۲۰ میلی‌گرم درلیتر بنزیل پنی سیلین است .
محلول ذخیره استاندارد بنزیل پنی سیلین را می‌توان حداکثر به مدت ۲ روز در دمای۵° C - ۰°C نگهداری کرد .

۵-۳-۱-۲ محلول آماده کار [2] استاندارد بنزیل پنی سیلین

مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از محلول ذخیره استاندارد بنزیل پنی سیلین (بند ۵-۳-۱-۱) را با آب مقطر تا ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رقیق کرده و مخلوط کنید. این محلول حاوی ۲۰۰ میکروگرم در لیتر بنزیل پنی‌سیلین است .

1- Stock
2 -Working solution

۵-۳-۱-۳ نمونه شیر کنترل بنزیل پنی سیلین

یک میلی‌لیتر از محلول آماده کار استاندارد بنزیل پنی سیلین (بند ۵-۳-۱-۲) را با شیر منفی (بند ۵-۴) به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر برسانید و مخلوط کنید نمونه شیر کنترلی که به این صورت آماده گشته حاوی ۲ میکروگرم در لیتر بنزیل پنی سیلین است.

این محلول را می‌توان حداکثر به مدت ۲ ماه در لوله های آزمایش دردمای کمتر از ۱۸°C- نگهداری کرد .

یادآوری – یک میلی‌گرم از پنی سیلین G خالص با ملح پتاسیم معادل با ۱۵۹۵ واحد بین‌المللی پنی سلین G است و یک میلی‌گرم از پنی‌سلین G با ملح سدیم معادل با ۱۶۷۰ واحد بین‌المللی پنی‌سلین G است.

۵-۳-۲ محلول‌های استاندارد اکسی تتراسایکلین ونمونه‌های کنترل

۵-۳-۲-۱ محلول ذخیره استاندارد اکسی تتراسایکلین

مقدار۰/۱±۵/۰ میلی‌گرم از اکسی تتراسایکلین را در ۱۰ میلی‌لیتر از محلول اسیدکلریدریک یک دهم مولار حل کنید. سپس با آب مقطر تا ۱۰۰ میلی‌لیتر رقیق کنید و مخلوط نماید این محلول حاوی ۵۰ میلی‌گرم اکسی تتراسایکلین در لیتر است .

محلول ذخیره استاندارد اکسی تتراسایکلین را می‌توان حداکثر به مدت یک هفته در تاریکی و دمای ۵°C - ۰°C نگهداری کرد .

۵-۳-۲-۲ محلول آماده کار استاندارد اکسی تتراسایکلین

مقدار۱۰ میلی‌لیتر از محلول ذخیره اکسی تتراسایکلین استاندارد (بند ۵-۳-۲-۱) را با آب مقطر به حجم۱۰۰ میلی‌لیتر برسانید و مخلوط کنید. این محلول حاوی ۵۰۰۰ میکروگرم در لیتر اکسی تتراسایکلین است.

۵-۳-۲-۳ نمونه شیر کنترل اکسی تتراسایکلین

مقدار ۲ میلی‌لیتر از محلول آماده کار استاندارد اکسی تتراسایکلین (بند ۵-۳-۲-۲) را با شیر منفی (بند ۵-۴) به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده و مخلوط کنید، نمونه شیر کنترلی که به این صورت تهیه شده حاوی ۱۰۰ میکروگرم در لیتر اکسی تتراسایکلین است .

نمونه شیر کنترل اکسی تتراسایکلین را می‌توان حداکثر به مدت ۳ ماه در لوله های آزمایش (۶-۴) در دمای کمتر از ۱۸°C- نگهداری کرد .

۵-۳-۳ محلول‌های استاندارد سولفادیازین و نمونه‌های کنترل

۵-۳-۳-۱ محلول ذخیره استاندارد سولفادیازین

مقدار ۰/۱±۱۵/۰ میلی‌گرم از سولفادیازین را در۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل نموده و مخلوط کنید، این محلول حاوی ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر سولفادیازین است .

محلول ذخیره استاندارد سولفادیازین را می‌توان حداکثر به مدت ۲ هفته در دمای ۰°Cتا۵°C نگهداری کرد.

۵-۳-۳-۲ محلول آماده کار استاندارد سولفادیازین

مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از محلول ذخیره استاندارد سولفا دیازین (۵-۳-۳-۱) را با آب به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر برسانید و مخلوط کنید، این محلول حاوی ۱۵۰۰۰ میکروگرم در لیتر سولفادیازین است .

۵-۳-۳-۳ نمونه شیر کنترل سولفادیازین

مقدار ۱ میلی لیتر از محلول آماده کار استاندارد سولفادیازین (۵-۳-۳-۲) را با شیر منفی (۵-۴) به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده و مخلوط کنید نمونه شیر کنترلی که به این صورت آماده گشته حاوی ۱۵۰ میکروگرم در لیتر سولفادیازین است .

نمونه شیر کنترل سولفادیازین را می‌توان حداکثر به مدت ۲ ماه در لوله های آزمایش (۶-۴) در دمای کمتر از $-18\ ^{\circ}C$ نگهداری کرد .

۵-۳-۴ محلول های استاندارد نئومایسین و نمونه‌های کنترل

۵-۳-۴-۱ محلول ذخیره استاندارد نئومایسین

مقدار ۳۰/۰ ±۰/۱ میلی‌گرم از نئومایسین را در ۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات یک دهم مولار (pH برابر ۸/۰±۰/۱) حل نموده و مخلوط کرده، حجم آن را با آب مقطر به ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسانده و مخلوط کنید، این محلول حاوی ۳۰ میلی‌گرم در لیتر نئومایسین است .

محلول ذخیره استاندارد نئومایسین را می‌توان حداکثر به مدت ۲ هفته دمای $۰^{\circ}C$ - $۵^{\circ}C$ نگهداری کرد.

۵-۳-۴-۲ محلول آماده کار استاندارد نئومایسین

مقدار ۱۰میلی‌لیتر از محلول ذخیره استاندارد نئومایسین (۵-۳-۴-۱) را با آب به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده و مخلوط کنید، این محلول حاوی ۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر نئومایسین است.

۵-۳-۴-۳ نمونه شیر کنترل نئومایسین

مقدار ۱ میلی‌لیتر از محلول کار استاندارد نئوماسین (۵-۳-۴-۲) را با شیر منفی (۵-۴) به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر برسانید و مخلوط کنید، نمونه شیر کنترلی که به این صورت تهیه شده حاوی ۳۰ میکروگرم در لیتر نئومایسین است.

نمونه شیر کنترل نئومایسین را می‌توان حداکثر به مدت ۲ ماه در لوله‌های آزمایش (۶-۴) دردمای کمتر از $-18\ ^{\circ}C$ نگهداری کرد .

۵-۳-۵ محلول های استاندارد اریترومایسین و نمونه های کنترل

۵-۳-۵-۱ محلول ذخیره استاندارد اریترومایسین

مقدار ۰/۱±۲۰/۰ میلی‌گرم از اریترومایسین را در ۵ میلی‌لیتر از متانول حل کرده و با آب مقطر به حجم ۱۰۰۰ برسانید و مخلوط کنید، محلول ذخیره استاندارد اریترومایسین که به این صورت تهیه شده حاوی ۲۰ میلی‌گرم در لیتر اریترومایسین است.

محلول ذخیره استاندارد اریترومایسین را می‌توان حداکثر به مدت ۲ هفته در دمای ۰°Cتا۵°C نگهداری کرد.

۵-۳-۵-۲ محلول کار استاندارد اریترومایسین

مقدار ۵ میلی‌لیتر از محلول ذخیره استاندارد اریترومایسین (۵-۳-۵-۱) را با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر برسانید و مخلوط کنید، این محلول حاوی ۱۰۰۰ میکروگرم در لیتر اریترومایسین است .

۵-۳-۵-۳ نمونه شیر کنترل اریترومایسین

مقدار۱ میلی‌لیتر از محلول کار استاندارد اریترومایسین (۵-۳-۵-۲) را با شیر منفی (۵-۴) به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر برسانید و مخلوط کنید نمونه شیر کنترل اریترومایسین که به این صورت تهیه شده حاوی ۱۰ میکروگرم در لیتر اریترومایسین است.

نمونه شیر کنترل اریترومایسین را می‌توان حداکثر به مدت ۲ ماه در لوله‌های آزمایش(۶-۴) در دمای کمتر از°C ۱۸- نگهداری کرد .

۵-۴ شیر منفی (شیر فاقد مواد ضد میکروبی)

برای تهیه شیر منفی به استانداردISO 13969-IDF183 مراجعه کنید یا از شیر کامل استریلیزه شده با دمای بالا (فرادما)[1] که فاقد مواد مهارکننده میکروارگانیسم ها استفاده کنید.

۶ تجهیزات و لوازم شیشه ای

ظروف یک بار مصرف اگر ویژگی مناسبی داشته باشند را می‌توان به جای ظروف شیشه‌ای به کار برد.

از لوازم معمول آزمایشگاه میکروبیولوژی و به‌ویژه از لوازم زیر استفاده کنید.

۶-۱ اتوکلاو برای سترون کردن مرطوب

به استاندارد ملی ایران۲۴۷۴رجوع شود.

۶-۲ میکروپی‌پت‌ها با ظرفیت ۱۰۰۰ میکرولیتر

۶-۳ حمام‌های آب، دارای قابلیت تنظیم دما و حفظ آن در دماهای ۶۳°C±۱°C ، ۷۰°C±۱°C و۸۰°C±۱°C، مجهز به درپوش وشیکر

۶-۴ لوله‌های آزمایش با قطر تقریبی ۱۶ میلی‌متر و طول تقریبی ۸۰ میلی‌متر

۶-۵ pH متر با دقت ۰/۰۱±واحد pH مجهز به اصلاح اتوماتیک دما و الکترودهای مناسب برای اندازه‌گیری مایعات با دمای ۶۳°C (یعنی الکترود Ag/AgCl)

۶-۶ ترازوی حساس[1] با توانایی وزن کردن ۰/۱ میلی‌گرم و قابلیت خواندن تا ۰/۰۱ میلی‌گرم

۷ نمونه برداری

نمونه‌ای که به آزمایشگاه فرستاده می‌شود باید نماینده کل فرآورده بوده و در طی حمل ونقل نباید آسیب دیده و یا تغییراتی در آن ایجاد شود.

نمونه برداری طبق استاندارد ملی ایران به شماره ۳۲۶ انجام پذیرد.

۸ آماده‌سازی نمونه مورد آزمون

نمونه‌های شیر مایع باید بدون تأخیر آزمایش شوند نمونه‌های شیر خشک را پیش از آزمون در آب مقطر بازسازی کنید.

۹ روش اجرای آزمون

۹-۱ نمونه‌های کنترل

در هرجا لوله ای، لوله های آزمایش زیر را با ۰/۳ میلی‌لیتر از نمونه‌های شیر کنترل مثبت یا نمونه‌های شیر منفی در حالی که به ازای هر لوله محلول های زیر اضافه گشته قرار دهید :

الف – لوله آزمایش الف (۵-۲-۵) با نمونه شیر کنترل بنزیل پنی سیلین

ب- لوله آزمایش الف (۵-۲-۵) با نمونه شیر کنترل اکسی تتراسایکلین (۵-۳-۲-۳)

پ- لوله آزمایش الف (۵-۲-۵) با نمونه شیر منفی (۵-۴)

ت- لوله آزمایش ب (۵-۲-۶) با نمونه شیر کنترل بنزیل پنی‌سیلین (۵-۳-۱-۳)

ث- لوله آزمایش ب(۵-۲-۶) با نمونه شیر کنترل سولفادیازین (۵-۳-۳-۳)

د- لوله آزمایش ب (۵-۲-۶) با نمونه شیر منفی (۵-۴)

هنگامی که تعداد نمونه‌ها زیاد است و انتظار داریم که بیشتر آنها فاقد مواد ضدمیکروبی باشند، می‌توان از این نمونه‌ها به عنوان شیر منفی استفاده کرد.

1-Analytical

۹-۲ آماده‌سازی لوله آزمایش

۹-۲-۱ مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از آزمایه را به درون یک لوله آزمایش بریزید و آن را در حمام آب (۶-۳) در دمای $۸۰^{\circ}C$ به مدت ۱۰ دقیقه حرارت دهید، تا مواد مهارکننده طبیعی غیر فعال شوند، فوراً آن را تا رسیدن به دمای آزمایشگاه خنک کنید.

۹-۲-۲ ۰/۳ میلی‌لیتر از آزمونه را با پی‌پت به لوله آزمایش الف و ب منتقل کنید.

۹-۲-۳ به منظور انتشار شیر در لوله های آزمایش الف و ب، آنها را به مدت یک ساعت در دمای اتاق نگهداری کنید.

۹-۲-۴ شیر روی لایه آگار را دور بریزید، برای جلوگیری از تبخیر، لوله‌های آزمایش را با ورق آلومینیمی یا درپوش بپوشانید.

بعد از انتشار، لوله‌های آزمایش را در حمام آب (۶-۳) در دمای $۷۰^{\circ}C$ به مدت ۱۰ دقیقه قرار دهید (اختیاری) تا از طریق شوک حرارتی اسپورها فعال شوند.

۹-۳ گرمخانه‌گذاری

لوله‌های آزمایش (بند ۹-۲-۴) را در حمام آب (۶-۳) در دمای $۶۳^{\circ}C$ به مدت ۴ ساعت و ۱۵ دقیقه ± ۳۰دقیقه قرار دهید، تا زمانی که رنگ لوله‌های آزمایش مربوط به (الف یا ب) شیر منفی از ارغوانی به رنگ کاملاً زرد تغییر کند.

رنگ لوله‌های آزمایش (الف یا ب) مربوط به نمونه‌های کنترل باید حداقل، در زمان برداشتن هنوز ارغوانی روشن باشد. لوله های‌آزمایش (الف یا ب) را از حمام آب بردارید و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.

۹-۴ تفسیر

رنگ لوله‌های آزمایش حاوی آزمایه‌ها و کنترل را به‌صورتی که در زیر می‌آید مشاهده و ثبت کنید.

الف – وجود رنگ ارغوانی به صورت کامل یا جزیی درمحیط کشت جامد نشان‌دهنده وجود مواد مهارکننده ارگانیسم مورد نظر در هر کدام از لوله‌های آزمایه یا کنترل است و یک آزمایش مثبت را نشان می‌دهد .

ب- رنگ زرد کامل (پررنگ) در محیط کشت جامد نشان‌دهنده عدم وجود مواد مهارکننده نسبت به ارگانیسم مورد نظر در هر یک از لوله‌های آزمایه یا کنترل می‌باشد، و یک آزمایش منفی را نشان می‌دهد.

لوله های آزمایش حاوی شیر منفی باید به رنگ زرد و نمونه‌های شیر کنترل باید به رنگ ارغوانی باشند در غیر این صورت آزمایش را تکرار کنید.

اگربه صورت مکرر رنگ‌ها مغایر با نمونه های شیر کنترل یا شیر منفی ایجاد شود باید علت را شناسایی کنید.

۱۰ تأیید (اختیاری)

۱۰-۱ کلیات

روش آزمون تأییدی برای وجود باقیمانده‌های بتالاکتام و سولفانامید در بندهای ۱۰-۲ و ۱۰-۳ ارائه شده است.

یادآوری – وجود ترکیب چند آنتی‌بیوتیک ویا دیگر مهارکننده‌ها در نمونه مورد آزمون می‌تواند باعث ایجاد مشکلاتی در تایید شود.

۱۰-۲ تأیید احتمالی بتالاکتام‌ها

نمونه‌های مثبت با لوله آزمایش الف (۵-۲-۵) و لوله آزمایش ب (۵-۲-۶) را می‌توان با استفاده از بتالاکتاماز برای تأیید وجود باقیمانده‌های پنی سیلین و سفالوسپورین مورد آزمون قرار داد.

در صورتی که فعالیت مهارکنندگی در نمونه مورد آزمایش با بتالاکتاماز خنثی شده باشد، باقیمانده بتالاکتام مثبت در نظر گرفته می‌شود .

دو نوع آنزیم بتالاکتاماز را می‌توان از همدیگر تشخیص داد : پنی سیلیناز (فعالیت بتا I) که در تخریب پنی سیلین ها بیشتر مؤثر است

سفالوسپورناز (فعالیت بتا Π) که در تخریب سفالوسپورین بیشتر مؤثر است .

مثال- روش آزمون باپنی سیلیناز

پیش از تنظیم pH ، ۲ میلی‌لیتر از محلول غلیظ پنازکه حاوی ۱۰۰۰۰۰۰۰ واحد بین المللی پناز در میلی‌لیتر است را به ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت لوله الف (۵-۲-۵) اضافه کنید و مخلوط نمایید، سپس در لوله‌های آزمایش به حجم یک میلی‌لیتر تقسیم کنید و اجازه دهید که محیط کشت ببندد، ادامه روش آزمون را طبق روش ارائه شده در بند ۹ انجام دهید.

بعضی از بتالاکتام‌ها (مانند سفالکسین) حساسیت کمتری به بتالاکتاماز دارند. در این موارد استفاده از یک پیش تیمار برای نمونه شیر (یک میلی از نمونه مورد آزمون به همراه ۰/۳ میلی‌لیتر از محلول غلیظ پناز در$۳۷^{\circ}C$ به مدت ۲ ساعت) توصیه می‌شود.

۱۰-۳ تأیید احتمالی سولفانامیدها

نمونه‌های مثبت با لوله آزمایش ب (۵-۲-۶) را می‌توان با استفاده از محلول پاراآمینوبنزوئیک اسید (PABA) از نظر وجود باقیمانده سولفانامید مورد آزمون قرارداد، در صورتی که فعالیت مهارکننده‌گی در نمونه تیمار شده توسط پاراآمینوبنزوئیک اسید خنثی شده باشد، باقیمانده سولفانامید مثبت در نظر گرفته می‌شود.

مثال- پس از اضافه نمودن ارگانیسم آزمون و قبل از تنظیم pH، ۲ میلی‌لیتر از محلول پاراآمینو بنزوئیک اسید با غلظت ۵ گرم در کیلوگرم را به ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت اضافه ومخلوط کنید. محیط کشت مورد آزمون را به حجم های یک میلی‌لیتر در لوله های آزمایش تقسیم کنید و اجازه دهید که محیط ببندد، سپس روش آزمون را طبق روش ارائه شده در بند ۹ انجام دهید.

۴-۱۰ تأیید سایر مهارکننده‌ها

در صورت عدم شناسایی ماده مهار کننده به عنوان بتالاکتام و سولفانامید ، برای شناسایی بیشتر می‌توان از سیستم آزمایش چند پلیتی میکروبیولوژی[1]، روش‌های ایمنی سنجی یا روش‌های شیمیایی(LC-MC وHPLC) استفاده کرد.

یادآوری- برای اطلاع بیشتر به استاندارد ملی ISO 18330 مراجعه کنید.

۱۱ بیان نتایج

نتایج را با مشخص کردن وجود یا عدم وجود مواد ضدمیکروبی بیان کنید.

۱۲ دقت

جهت تعیین حدود تشخیص بعضی از آنتی‌بیوتیک‌ها در شیر با روش انتشار در ژل به پیوست الف مراجعه کنید .

۱۳ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید دارای آگاهیهای زیر باشد:

الف- تمام اطلاعات لازم برای شناسایی کامل نمونه

ب- روش نمونه‌برداری استفاده شده

پ- نام ونام خانوادگی و امضاء آزمایش کننده

ت- روش آزمون مورد استفاده با ارجاع به این استاندارد

ث- کلیه جزئیات مربوط به نحوه آزمایش که در این استاندارد به آنها اشاره‌ای نشده یابه عنوان اختیاری ذکرشده،به همراه جزئیات هر گونه وقایعی که ممکن است نتایج آزمایش را تحت تأثیر قرار دهد.

ج- نتایج آزمون بدست آمده

---

1 -Microbiological multiplate

پیوست الف

(اطلاعاتی)

جداول حد تشخیص برخی از آنتی بیوتیک ها

حد تشخیص برحسب میکروگرم در کیلـوگرم شـیر بـرای روش دو لولـه‌ای، لولـه الـف (PH=7) و لولـه ب (PH=8) که از مطالعات اشتراکی چندین آزمایشگاه معتبر بدست آمده در جداول الف -۱ تا الف -۵ ارائـه شده است.

جدول- الف-۱- بتالاکتام ها

بتالاکتامها	لوله الف میکروگرم در کیلو گرم	لوله ب میکروگرم در کیلوگرم
بنزیل پنی سیلین	۲	۳
آموکسی‌سلین		۳
کولوآکسیلین		۲۰
سفیتوفور		۵۰
سفالکسین		۸۰

جدول الف -۲ ماکرولیدها

ماکرولیدها	لوله الف میکروگرم در کیلوگرم	لوله ب میکروگرم در کیلوگرم
اریترومایسین	-	۱۰
اسپرامایسین	-	۲۰۰
تیلوسین	-	۲۰

جدول الف-۳- آمینوگلیکوزیدها

آمینوگلیکوزیدها	**لوله الف** **میکروگرم در کیلوگرم**	**لوله ب** **میکروگرم در کیلوگرم**
دی‌هیدرواسترپترومایسین	-	۷۰
نئومایسین	-	۳۰
کانامایسین	-	۵۰۰
جنتامایسین	-	۲۰

جدول الف -۴ تتراسایکلین

تتراسایکلین	**لوله الف** **میکروگرم بر کیلوگرم**	**لوله ب** **میکرو گرم بر کیلو گرم**
اکسی تتراسکلین	۱۰۰	۴۰۰
تتراسیکلین	۱۰۰	۳۰۰
داکسی سیلین	۱۰۰	
کلروتتراسیلین	۲۰۰	بیشتر از ۸۰۰

جدول الف -۵ سولفامیدها

سولفامیدها	لوله الف میکروگرم در کیلوگرم	لوله ب میکروگرم در کیلو گرم
داپسون		۲
سولفامتازین		۴۰۰
سولفادیازین		۱۵۰

پیوست ب

(اطلاعاتی)

تهیه سوسپانسیون مورد آزمون

ب-۱ ارگانیسم آزمون

یک کشت *ژئوباسیلوس استئاروترموفیلوس* ATCC10149 (معادل سویه NIZO C953) را از ATCC یا منبع دیگری تهیه کنید .

ب-۲- کشت ذخیره

ب-۲-۱ آگار شیب‌دار

ب-۲-۷-۱ ترکیبات

ترکیبات	مقدار
عصاره مخمر	۲/۰ گرم
پیتون	۵/۰ گرم
عصاره گوشت	۱/۰ گرم
سدیم کلراید	۵/۰ گرم
سولفات منگنز	۳۵ گرم
آگار	۱۵ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

یادآوری- مخلوط دهیدراته این ترکیبات پایه بدون سولفات منگنز به نام نوترینت آگار در دسترس است .

ب-۲-۱-۲ آماده‌سازی

ترکیبات را به وسیله حرارت دادن در آب حل کنید، pH را به گونه‌ای تنظیم کنید که بعد از سترون کردن ۰/۱± ۷/۴ باشد، محیط فوق را در ۱۲۱°C±۱°C به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو کنید. محیط کشت را قبل از

بسته شدن در لوله های سترون درپوش‌داربه مقدار تقریبی ۱۰ میلی‌لیتری بریزید و اجازه دهید کـه در یـک وضعیت مورب ببندد.

ب- ۲-۲ نگهداری محیط های کشت آزمون

- با استفاده از یک لوپ سـترون از سوسپانسـیون ATCC بـه صـورت خطـی در یـک لولـه آگـار شـیب‌دار (ب-۲-۱) کشت دهید . و به مدت ساعت ۴۸ در گرمخانه ۶۳°C ±۱°C قرار دهید. بعد از گرمخانه گذاری سر لوله‌ها را به وسیله شعله ببندید و یک مسیر کوچک را به درون لوله باز کرده و با یـک سـرپوش سـترون ببندید.

لوله کشت ذخیره‌ای که به این صورت بدست آمده را می‌توان برای چنـدین مـاه در یخچـال در دمـای ۵°C نگهداری کرد و یا بصورت سوسپانسیون ارگانیسم آزمون در دمای کمتر از °C ۲۰- نگهداری کرد .

ب- ۳ تکثیر ارگانیسم آزمون

ب-۳-۱ مقدار ۲۰ میلی‌لیتر از آگار شیب دار ذوب شده (ب-۲-۱) را در شـرایط سـترون بـه درون یـک پلیت با قطر ۱۴۰ میلی‌متر بریزید و تا رسیدن به دمای اتاق خنک کنید .

ب-۳-۲ با استفاده از یک پی‌پت سترون ۵ میلی‌لیتر از آب مقطـر را بـه لولـه کشـت ذخیـره (ب-۲-۲) اضافه کنید.

یک سوسپانسیون از ارگانیسم آزمون را به وسیله برداشتن کشت از آگار شـیب‌دار بـه وسـیله لـوپ و حـل کردن آن در آب موجوددر لوله تهیه کنید.

ب-۳-۳ با استفاده از یک پی‌پت سترون ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون ارگانیسم آزمون (ب-۳-۲) را به پلیت‌های حاوی آگار جامد (ب-۳-۱) اضافه کنید، و ماده تلقیحی را به وسیله میله شیشه‌ای در تمام سطح پلیت پخش کنید .

ب-۳-۴ سپس در گرمخانه ۶۳°C ±۱°C به مدت ۷۲ ساعت گرمخانه گذاری کنید.

ب-۳-۵ با استفاده از یک پی‌پت سترون محلول آب پپتونه نمک دار (۸/۵ گرم کلریدسدیم و ۱ گرم پیتون بر کیلوگرم آب) را به پلیت کشت داده شده اضافه کنید و به وسیله یک میله شیشه‌ای آن را در سطح آگار پخش کنید. سوسپانسیون ارگانیسم آزمون بدست آمده را به یک بطری سترون منتقل کرده، در بطری را ببندید و کاملاً تکان دهید.

ب-۳-۶ سوسپانسیون را در g ۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه به وسیله سانتریفوژ شستشو دهید. مایع روی را دور بریزید و رسوب را درون یک محلول آب پپتونه نمک‌دار مجدداً حل کنید این مرحله را دوبار تکرار کنید.

ب-۳-۷ به منظور تحریک تشکیل اسپورها سلول‌ها را در محلول آب پپتونه نمک دار سترون به مدت ۱۰ دقیقه در ۸۰°C حرارت دهید.

ب-۴ تنظیم غلظت سوسپانسیون ارگانیسم آزمون

غلظت سوسپانسیون ارگانیسم آزمون را به گونه‌ای تنظیم کنید، تا در پلیت کانت آگار با گرمخانه گذاری در۶۳°C و به مدت ۱۸تا ۲۴ ساعت تقریباً ۵۰۰۰/۰۰۰ واحد تشکیل دهنده cfu/ml کلنی) ظاهر شود.

ب-۵ ذخیره سوسپانسیون ارگانیسم آزمون

سوسپانسیون موجود را در مقادیر کوچک بریزید، حداکثر می توان به مدت یک سال در دمای ۲۰- نگهداری کرد.

ICS: 67.100.01

صفحه : ۱۸