ISIRI
4806
1st.Revision

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

استاندارد ملی ایران
۴۸۰۶
تجدیدنظر اول

میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – روش‌های جامع نمونه‌برداری از سطوح با استفاده از پلیت‌های تماسی و سوآب

Microbiology of food and animal feeding stuff - Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs

مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

تهران - خیابان ولیعصر، ضلع جنوب‌غربی میدان ونک، پلاک ۱۲۹۴، صندوق پستی: ۶۱۳۹-۱۴۱۵۵
تلفن: ۵-۸۸۸۷۹۴۶۱
دورنگار: ۸۸۸۸۷۰۸۰ و۸۸۸۸۷۱۰۳
کرج - شهر صنعتی، میدان استاندارد، صندوق پستی ۱۶۳-۳۱۵۸۵
تلفن: ۸- ۲۸۰۶۰۳۱(۰۲۶۱)
دورنگار: ۲۸۰۸۱۱۴ (۰۲۶۱)
پیام‌نگار: standard@isiri.org.ir
وب‌گاه: www.isiri.org
بخش فروش تلفن: ۲۸۱۸۹۸۹ (۰۲۶۱) ، دورنگار: ۲۸۱۸۷۸۷ (۰۲۶۱)
بها ۲۷۵۰ 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: 2750 Rls.

به‌نام خدا

آشنایی با مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

مؤسسهٔ استانداردوتحقیقات صنعتی ایران به موجب بند یک مادهٔ ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن‌ماه ۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشوراست که وظیفه تعیین، تدوین ونشراستانداردهای ملی(رسمی) ایران را به عهده دارد.

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

پیش‌نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان‌های علاقه‌مند و ذی‌صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می‌کنند درکمیتهٔ ملی طرح و بررسی و درصورت تصویب، به‌عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می‌شود. بدین‌ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می‌شود 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 بین‌المللی استاندارد(ISO)[1] ،کمیسیون بین‌المللی الکتروتکنیک (IEC)[2] و سازمان بین‌المللی اندازه‌شناسی قانونی(OIML) [3] است و به‌عنوان 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.

مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی 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 شورای‌عالی 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 استفاده‌کنندگان از خدمات سازمان‌ها و مؤسسات فعال در زمینهٔ مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدورگواهی سیستم های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی، آزمایشگاه‌ها و مراکز کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش ، مؤسسهٔ 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 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 Electrotechnical Commission
3 - International Organization for Legal Metrology (Organization International de Metrologie Legal)
4 - Contact point
5 - Codex Alimentarius Commission

پیش‌گفتار

استاندارد «میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – روش‌های جامع نمونه‌برداری از سطوح با استفاده از پلیت‌های تماسی و سوآب» نخستین بار در سال ۱۳۷۸ تهیه شد . این استاندارد بر اساس پیشنهادهای رسیده و بررسی و تأیید کمیسیون‌های مربوط برای اولین بار مورد تجدید نظر قرار گرفت و در یکصد و بیست و هشتمین اجلاسیهٔ کمیتهٔ ملی استاندارد میکروبیولوژی و بیولوژی مورخ ۱۳۸٦/۸/۲۱تصویب شد.

اینک این استاندارد 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 می شود .

برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت‌های ملی و جهانی در زمینهٔ صنایع ، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در مواقع لزوم تجدیدنظر خواهد شد و هر گونه پیشنهادی که برای اصلاح یا تکمیل این استانداردها ارائه شود، در هنگام تجدیدنظر بعدی مورد توجه قرار خواهد گرفت.

بنابراین برای مراجعه به استانداردهای ملی ایران باید همواره از آخرین تجدیدنظر آنها استفاده کرد.

در تهیه و تجدیدنظر این استاندارد سعی شده است که ضمن توجه به شرایط موجود و نیازهای جامعه، در حد امکان بین این استاندارد و استانداردهای بین المللی و استاندارد ملی کشورهای صنعتی و پیشرفته هماهنگی ایجاد شود.

منابع و مآخذی که برای تهیه این استاندارد به کار رفته به شرح زیر است:

1- ISO 18593-2004 : Microbiology of food and animal feeding stuff Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs

۲- استاندارد ملی ایران ٤٨٠٦: سال ۱۳۷۸ روش‌های ارزیابی کیفیت میکروبیولوژی سطوح در تماس با مواد غذایی

فهرست مندرجات

صفحه

پیش‌گفتار	ب
مقدمه	پ
۱ هدف	۱
۲ دامنه کاربرد	۱
۳ مراجع الزامی	۲
٤ اساس روش	۲
٥ مواد لازم	٤
٦ وسایل لازم	۹
۷ روش‌های نمونه‌برداری	۱۳
۸ انتقال به آزمایشگاه	۱٥
۹ روش اجرای آزمون	۱٦
۱۰ محاسبات، بیان نتایج	۱۹

میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – روش‌های جامع نمونه‌برداری از سطوح با استفاده از پلیت‌های تماسی و سوآب‌ها

(تجدید نظر اول)

۱ هدف

هدف از تدوین این استاندارد، تعیین و ارائه روش‌های جامع [1] نمونه‌برداری سطوح با استفاده از پلیت‌های تماسی یا سوآب، به منظور شناسایی یا شمارش میکروارگانیسم‌های زنده موجود در این سطوح می باشد.

۲ دامنه کاربرد

این روش برای نمونه‌برداری از کلیه سطوح موجود در محیط‌های تولید مواد غذایی، تجهیزات مورد استفاده در فرآیند مواد غذایی و در آزمایشگاه‌های کنترل این مواد، کاربرد دارد.

یادآوری ۱ – اصطلاح « محیط» به هر عاملی (مانند مواد، محوطه ساختمان، کارکنان) که با فرآورده غذایی در تماس بوده یا احتمال دارد که منبع آلودگی ثانویه برای آن باشد، گفته می شود.

یادآوری ۲ – در مواردی که استاندارد خاصی وجود نداشته باشد، این استاندارد برای نمونه‌برداری از سطوح در سایر صنایع نیز کاربرد دارد.

۳ مراجع الزامی

1- Horizontal methods

مدارک الزامی زیر حاوی مقرراتی است که در متن این استاندارد به آنها ارجاع داده شـده اسـت. بـدین ترتیب آن مقررات جزئی از این استاندارد محسوب می شود. در مورد مراجع دارای تاریخ چاپ و / یا تجدید نظر، اصلاحیه‌ها و تجدیدنظرهای بعدی این مدارک مورد نظر نیست. معهذا بهتر است کـاربران ذینفع این استاندارد امکان کاربرد آخرین اصلاحیه‌هـا و تجدیـدنظرهای مـدارک الزامـی زیـر را مـورد بررسی قرار دهند. در مورد مراجع بدون تاریخ چاپ و / یا تجدیدنظر، آخرین چاپ و / یا تجدیـدنظر آن مدارک الزامی ارجاع داده شده مورد نظر است:

۳-۱ استاندارد ملی ایـران ۲۳۲۵: میکروبیولـوژی - آئـین کـاربرد روش‌هـای عمـومی آزمـایش‌هـای میکروبی مواد غذایی

۳-۲ استاندارد ملی ایران ۲۷٤۷: میکروبیولوژی– آئین‌کار در آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی

۳-۳ استاندارد ملی ایران ۳٥٦: میکروبیولوژی – تهیه سوسپانسیون اولیه و رقـت‌هـای اعـشاری بـرای آزمایش‌های میکروبیولوژی

۴ اساس روش

۴-۱ با توجه به اینکه این روش‌ها از نظر کمی قابل اطمینان[1] یا تجدیدپذیر[2] نیستند، باید نتایج آنها تنها با استفاده از تجزیه و تحلیل های آماری تفسیر شود.

۴-۲ یک پلیت تماسی (یا دیپ اسلاید[3]) حاوی محیط کشت آگار مناسب، با سطح مورد آزمون تماس داده می شود و پس از گرمخانه‌گذاری و شمارش تعداد کلنی های رشد کرده، میزان آلودگی سطح فوق برآورد می شود.

1- Reliable
2- Reproducible
3- Dip slide

۴-۳ در روش سوآب، ابتدا قسمت مشخصی از سطح مورد آزمون نشانه‌گذاری شده (برای مثال با استفاده از یک قالب سترون) و سپس سوآب سترون نم‌دار روی آن کشیده می شود. سوآب فوق در لوله یا بطری حاوی محلول رقیق‌کننده یا مایع خنثی‌کننده سترون قرار داده شده و قسمتی از آن که در تماس با دست می باشد شکسته و دور انداخته می شود. محتویات بطری یا لوله فوق باید با تکان دادن کاملاً مخلوط شود.

اگر برای نمونه‌برداری از سطح مورد نظر از یک پارچه یا اسفنج سترون نم‌دار استفاده شود، پس از نمونه‌برداری، پارچه یا اسفنج در حجم مشخصی از محلول رقیق‌کننده سترون (برای مثال ۱۰۰ میلی‌لیتر برای ۱۰۰ سانتی‌متر مربع) قرار داده می شود.

در آزمایشگاه، از رقت اولیه و در صورت لزوم سایر رقت‌های ده‌دهی، با استفاده از روش‌های شرح داده شده در این استاندارد، برای شمارش میکروارگانیسم‌ها استفاده می شود.

یادآوری - در مورد زمان و دمای گرمخانه‌گذاری و روش شمارش میکروارگانیسم‌های گروه‌های خاص مورد جستجو، از استانداردهای ملی مربوطه استفاده می شود.

۴-۴ برای محیط‌های کشت انتخابی، آزمون‌های تأییدی مناسب باید انجام شود. تعداد واحدهای تشکیل‌دهنده کلنی (CFU)[1] میکروارگانیسم‌های معین در هر سانتیمتر مربع یا هر سوآب با استفاده از تعداد کلنی‌های تأیید شده محاسبه می شود.

۴-۵ در صورت لزوم، پس از نمونه‌برداری به منظور حذف مقادیر جزئی مواد مغذی باقی‌مانده ناشی از روش نمونه‌برداری، سطح مورد آزمون تمیز و ضدعفونی می شود.

۵ مواد لازم

1-Colony forming unit (CFU)

۵-۱ محیط‌های کشت و محلول‌های رقیق‌کننده

۵-۱-۱ کلیات

به منظور به دست آوردن نتایج هماهنگ در آزمون، از مواد شیمیایی و محیط‌های کشت با درجهٔ خلوص آزمایشگاهی[1] استفاده کنید.

چنانچه از محیط‌های کشت آمادهٔ قابل دسترس در بازار[2] استفاده شود، مطابق با دستورالعمل سازنده عمل کنید.

۵-۱-۲ محیط‌های کشت

برای انتخاب محیط‌های کشت مورد نیاز هر یک از میکروارگانیسم‌های مورد جستجو باید به استاندارد ملی یا بین‌المللی مربوط به شناسایی و یا شمارش آن میکروارگانیسم‌ها مراجعه شود.

۵-۱-۳ محلول‌های رقیق‌کننده

۵-۱-۳-۱ آب پپتونه بافری[3]

مواد تشکیل دهنده:

نام مواد	مقدار
پپتون یا بافت حیوانی هضم شده آنزیمی [4]	۱۰ گرم
سدیم کلراید[5]	۵ گرم
دی سدیم هیدروژن فسفات دوازده آبه[6]	۹ گرم
پتاسیم دی هیدروژن فسفات[7]	۱/۵ گرم

1- Analytical grade
2- Commercially available
3- Buffered peptone water
4- Peptone or enzymatic digest animal tissues
5- Sodium chloride (NaCl)
6- Di sodium hydrogen phosphate dodecahydrate($NaHPO_3.12H_2O$)
7- Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)

آب مقطر	۱۰۰۰میلی‌لیتر

روش تهیه:

مواد فوق را در آب حل نموده و در صورت لزوم حرارت دهید. pH محیط کشت را به گونه‌ای تنظیم کنید که پس از سترون سازی، در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس ۰/۲ ± ۷/۰ باشد.

یادآوری *– این رقیق‌کننده برای آزمون‌های جستجوی سالمونلا[1] توصیه می شود.*

۵-۱-۳-۲ پپتون نمکی[2]

مواد تشکیل دهنده:

نام مواد	**مقدار**
پپتون یا کازیین هضم شده آنزیمی[3]	۱ گرم
سدیم کلراید	۸/۵ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰میلی‌لیتر

روش تهیه:

ترکیبات فوق را در آب حل نموده و در صورت لزوم حرارت دهید. pH آن را به گونه‌ای تنظیم کنید که پس از سترون‌سازی در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس۰/۲ ± ۷/۰ باشد.

۵-۱-۳-۳ رینگر (رقیق شده به نسبت یک به چهار)[1]

1-Salmonella
2- Peptone salt solution
3- Peptone or enzymatic digest of casein

مواد تشکیل دهنده:

نام مواد	مقدار
سدیم کلراید	۲/۲۵ گرم
پتاسیم کلراید[۲]	۰/۱۲۵ گرم
کلسیم کلراید، بدون آب[۳]	۰/۰۶ گرم
هیدروژن سدیم کربنات[٤]	۰/۰۵ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

روش تهیه:

نمک‌ها را در آب حل کنید. pH رقیق‌کننده را به گونه‌ای تنظیم کنید پس از سترون‌سازی در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس ۰/۱ ±۶/۹ باشد.

۵-۱-۳-۴ بافر فسفات [۵]

مواد تشکیل دهنده:

نام مواد	مقدار
دی سدیم هیدروژن فسفات دو آبه	۸/۹۸ گرم
سدیم دی هیدروژن فسفات	۲/۷۱ گرم
سدیم کلراید	۸/۵ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

1- Rinrer ¼
2- Potassium chloride
3- Calcium chloride , anhydrous ($CaCl_2$)
4- Sodium hydrogen carbonate($NaHCO_3$)
5- Phosphate buffer

روش تهیه:

مواد فوق را در آب مقطر حل کنید. pH آن را به گونه‌ای تنظیم کنید که پس از سترون‌سازی در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس۰/۲ ± ۷/۰ باشد. برای سترون سازی آن از اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجهٔ سلسیوس به مدت زمان ۱۵ دقیقه استفاده کنید.

یادآوری *– این رقیق‌کننده برای آزمون‌های جستجوی لیستریا مونوسایتوژنز[1] توصیه می شود.*

۵-۱-۴ مایع خنثی‌کننده

در مواردی که احتمال باقی‌ماندن ضدعفونی‌کننده‌ها وجود دارد، باید خنثی کننده مناسب به محلول رقیق‌کننده و محیط‌های کشت مورد استفاده در پلیت‌های تماسی افزوده شود تا از هر گونه اثر بازدارندگی ضدعفونی‌کننده‌ها بر رشد میکروارگانیسم‌ها جلوگیری شود.

به‌طور کلی، پایهٔ مایع خنثی‌کننده آب پپتونه بافری، پپتون نمکی و هر رقیق‌کننده مناسب دیگر (مانند محلول رینگر رقیق شده به نسبت یک به چهار، بافر فسفات با pH = ۷/۵، محلول پپتون یک گرم در لیتر) می باشد.

برای همه وضعیت‌ها نمی توان خنثی‌کنندهٔ مناسب معرفی کرد. به‌طور کلی، سوربیتان منواولئات (۳۰ گرم در لیتر) و لسیتین (۳ گرم در لیتر) برای خنثی کردن باقی‌مانده ضدعفونی‌کننده‌های جذب شده (برای مثال ترکیبات چهارتایی آمونیوم، آمفوتریسایدها) مفید هستند. سدیم تیوسولفات (۵ گرم در لیتر) خنثی‌کنندهٔ مناسبی برای فرآورده‌های ضدعفونی‌کنندهٔ با پایهٔ هالوژنی می باشد. در مورد ضدعفونی‌کننده‌های با پایهٔ پراکسیدی، می توان از کاتالاز یا پراکسیداز به عنوان خنثی‌کننده استفاده کرد. یک واحد از این آنزیم‌ها، یک میکرومول از پراکسید هیدروژن را در یک دقیقه در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس و pH= ۷ ± ۰/۲ تجزیه می کنند.

ترکیبات یک خنثی‌کننده که در بیشتر مواقع می تواند مورد استفاده قرار گیرد در زیر ارائه شده است:

1- Listeria monocytogenes

مواد تشکیل دهنده:

نام مواد	مقدار
پپتون	۱ گرم
سدیم کلراید	۸/۵ گرم
سوربیتان منوالوئات (پلی سوربات ۸۰)[1]	۳۰ گرم
لسیتین[2]	۳ گرم
سدیم تیوسولفات[3]	۵ گرم
ال- هیستیدین[4]	۱ گرم
ساپونین[5]	۳۰ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی‌لیتر

روش تهیه:

پپتون و سدیم کلراید را در آب مقطر حل کرده و سپس سایر مواد را به آن افزوده و به مدت زمان ۱۵ دقیقه در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجهٔ سلسیوس سترون کنید.

۶ وسایل لازم

از وسایل معمول در آزمایشگاه میکروب‌شناسی مطابق با استاندارد ملی ایران ۲۷۴۷ و همچنین وسایل زیر استفاده کنید:

1- Sorbitan monooleate (polysorbate 80)
2- Lecithin
3- Sodium thiosulfate
4- L-Histidine
5- Saponin

یادآوری *– ظروف یک‌بار مصرف سترون با ویژگی‌های مشابه می تواند جایگزین ظروف شیشه‌ای شود.*

۶-۱ پلیت تماسی

ظروف پلاستیکی با قطر ٦٥ میلی‌متر است که حاوی حجم مشخصی از محیط‌کشت آگاردار (مطابق با نوع میکروارگانیسم مورد جستجو) بوده و مخصوص نمونه‌برداری از سطح می باشد.

برحسب سطح مورد آزمون می توان از پلیت‌های تماسی با قطر یا سطح متفاوت استفاده کرد. همچنین محیط کشت آگاردار باید سطح محدب با ظرف ایجاد کند.

یادآوری *– می توان از هر وسیله دیگری (محیط کشت مغذی در ظروف قابل انعطاف یا غیر قابل انعطاف) که تماس با سطح مورد آزمون را ممکن می سازد، مانند دیپ اسلاید، استفاده کرد.*

۶-۲ دیپ اسلاید

لامی با سطح ۷ تا ۱۰ سانتیمتر مربع است که یک یا هر دو سطح آن با یک لایه از محیط کشت جامد (مطابق با میکروارگانیسم مورد جستجو) پوشیده شده باشد.

یادآوری *– بر حسب نوع میکروارگانیسم یا میکروارگانیسم‌های مورد جستجو، محیط‌های کشت مختلفی موجود می باشد.*

۶-۳ سوآب

میله‌های چوبی یا پلاستیکی قابل شکستن که سر آن با پنبه یا مواد مصنوعی (از قبیل آلژینات یا ابریشم مصنوعی) پوشیده شده و در یک لوله یا پوشش سترون قرار گرفته باشند..

هر سوآب باید به صورت جداگانه در یک پوشش قرار گرفته و سترون شده باشد. مواد مورد استفاده در سوآب، باید عاری از مواد بازدارنده رشد میکروارگانیسم‌ها باشد.

یادآوری - دقت کنید در بعضی از سطوح، باقی‌مانده پنبه می تواند قسمت‌های داخلی را بعد از نمونه‌برداری آلوده کند.

۶-۴ پارچه[1]

مواد بافته مرطوب شده و عاری از مواد ضد میکروبی، که به‌طور جداگانه در پوشش‌های پلاستیکی بسته‌بندی و سترون می شوند و برای نمونه‌برداری از سطوح مساوی یا بزرگتر از۱۰۰ سانتیمتر مربع به‌کار می روند.

۶-۵ اسفنج[2]

مربع‌های اسفنجی مسطح مرطوب شده، عاری از مواد ضد میکروبی هستند که به‌طور جداگانه در پوشش‌های پلاستیکی بسته‌بندی و سترون می شوند و برای نمونه‌برداری از سطوح مساوی یا بزرگتر از ۱۰۰ سانتیمتر مربع به‌کار می روند.

۶-۶ ظروف

بطری‌ها، لوله‌ها یا ارلن‌های مناسب برای سترون‌سازی و نگهداری محیط‌های کشت می باشند.

1- Cloth
2- Sponge

۶-۷ جعبه خنک[1]

جعبه عایق‌بندی شده‌ای است که طی انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه قادر به نگهداری آنها در دمای پایین (۱ تا ٤ درجهٔ سلسیوس) می باشد.

۶-۸ پی‌پت‌های مدرج[2] سمپلر[3] پی‌پت‌های اتوماتیک[4]

۶-۸-۱ پی‌پت‌های مدرج

با دهانه پهن و حجم اسمی یک میلی‌لیتر، مدرج‌شده با تقسیمات ۰/۱ میلی‌لیتری

۶-۸-۲ سمپلر

با قابلیت انتقال حجم‌های صفر تا ۱۰۰ میکرولیتر

۶-۸-۳ پی‌پت‌های اتوماتیک

با قابلیت توزیع ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرولیتر

۶-۹ مخلوط کن

برای مخلوط‌کردن مایعات در لوله‌های کشت

۶-۱۰ همگن‌کننده ضربه‌ای[5] یا همگن‌کننده لرزشی[6]

1- Cool box
2- Graduated pipettes
3- Sampler
4- Automated pipettes
5- Peristaltic homogenizer
6- Homogenizer using horizontal shaking

این همگن‌کننده‌ها با حرکات ضربه‌ای یا چرخشی برای آماده‌سازی سوسپانسیون اولیه مورد استفاده قرار می گیرد.

۶-۱۱ کیسه‌های پلاستیکی مخصوص همگن‌کننده‌ها

این کیسه‌های پلاستیکی به صورت سترون و آماده در بازار قابل دسترسی است.

۶-۱۲ ظروف پتری

پلیت‌های پلاستیکی با قطر حداقل ٦٥ میلی‌متر

۶-۱۳ pH متر

با قابلیت خواندن ۰/۰۱± واحد pH، با دقت اندازه‌گیری ۰/۱ ± واحد pH در دمای ۱± ۲۵ درجهٔ سلسیوس

۶-۱۴ قالب[1]

تهیه شده از مواد ضد زنگ (برای مثال چهارچوب استیل ضد زنگ) که سطح ۲۰ تا ۱۰۰ سانتیمتر مربع را در بر می گیرد. تمیز کردن قالب‌ها باید آسان بوده و قابل سترون شدن باشند.

۷ روش‌های نمونه‌برداری

۷-۱ کلیات

1-Template

نمونه دریافت شده توسط آزمایشگاه، باید نشانگر سطح مورد آزمون بوده و در طی حمل و نقل، انبارش یا توسط باقی‌مانده‌های مواد ضد عفونی‌کننده، تغییری در آن ایجاد نشود.

عموماً مواد ضدعفونی‌کننده برای زمان تماس ۵ تا ۱۵ دقیقه تهیه می شوند. به منظور ارزیابی کارآیی برنامه تمیز یا ضدعفونی کردن سطوح مورد آزمون، قبل از بررسی این سطوح با سوآب یا پلیت تماسی، اجازه دهید زمان تماس لازم (مطابق با مشخصات ماده ضدعفونی‌کننده) طی شود.

۷-۲ روش پلیت تماسی

سطح آگار پلیت تماسی یا دیپ اسلاید را، بعد از خارج کردن از پوشش، به‌طور محکم و بدون هیچ‌گونه حرکت افقی روی سطح مورد آزمون، فشار دهید. بهترین زمان تماس برای پلیت‌های تماسی با سطح مورد نظر، مدت ۱۰ ثانیه و فشاری معادل فشار حاصل از یک وزنه ۵۰۰ گرمی می باشد. بلافاصله بعد از تماس، در پلیت تماسی یا دیپ اسلاید را بسته و آنها را به داخل پوشش برگردانید.

۷-۳ روش سوآب یا پارچه / اسفنج

۷-۳-۱ روش سوآب

سر سوآب را پس از خارج کردن از پوشش سترون در یک لوله حاوی محلول رقیق‌کننده سترون غوطه‌ور کنید. سپس سر سوآب را به طور چرخشی روی دیوارهٔ لوله فشار دهید تا محلول اضافی آن خارج شود.

لازم به ذکر است که در مورد سطوح مرطوب یا سوآب‌هایی که خود مرطوب می باشند، مرطوب کردن آن ضروری نیست.

سر پنبه‌ای سوآب را روی سطح مورد بررسی قرار داده و آن را در دو جهت عمود بر هم در سطح تقریبی ۲۰ تا ۱۰۰ سانتیمتر مربع، بغلطانید.

سوآب را در شرایط آسپتیک در لوله حاوی مایع رقیق‌کننده قرار داده و انتهای آن را بشکنید، سپس در لوله را ببندید.

۷-۳-۲ روش پارچه/ اسفنج

ظرف یا پوشش پلاستیکی حاوی پارچه یا اسفنج را باز کنید.

پارچه یا اسفنج را به‌طور آسپتیک با استفاده از پنس یا با دست پوشیده در دستکش سترون، از پوشش آن خارج کنید. این پارچه یا اسفنج را با مقدار کافی از رقیق‌کننده سترون (به گونه‌ای که آب اضافی نداشته باشد) خیس کنید.

قابل ذکر است در مورد سطوح مرطوب، خیس کردن پارچه یا اسفنج ضروری نمی باشد.

پارچه یا اسفنج فوق را به پوشش پلاستیکی یا ظرف اولیه برگردانده و در آن را به‌گونه‌ای ببندید که عاری از هر گونه نشتی باشد.

از سطح انتخابی، در دو خط عمودی با استفاده از کلیه سطوح پارچه یا اسفنج نمونه‌برداری کنید. پارچه یا اسفنج را در ظرف سترون قرار داده و به آن حجم کافی و معینی از رقیق‌کننده بیفزاید به‌طوری‌که پارچه یا اسفنج تا زمان آزمون هنوز مرطوب باشد. سپس در ظرف را ببندید.

در صورت عدم استفاده از پنس یا دستکش سترون، می توان پارچه یا اسفنج را از بیرون کیسه با دست گرفته و سپس پوشش را به گونه‌ای روی دست برگردانید که از تماس دست با پارچه یا اسفنج جلوگیری شود و به صورتی که شرح داده شد، از سطح انتخابی نمونه‌برداری کنید. سپس پوشش یا کیسه پلاستیکی را طوری ببندید که هیچ‌گونه نشتی نداشته باشد.

۸ انتقال به آزمایشگاه

نمونه‌های حاصل از پلیت تماسی و / یا دیپ اسلاید را حداکثر در فاصله زمانی ٤ ساعت و در شرایط عاری از هر گونه آلودگی، انتقال دهید.

نمونه‌های حاصل از روش سوآب یا پارچه / اسفنج را ترجیحاً در مدت ٤ ساعت و با استفاده از جعبه خنک در دمای یک تا ٤ درجهٔ سلسیوس به آزمایشگاه انتقال دهید.

در آزمایشگاه، نمونه‌ها در حداقل زمان ممکن و حداکثر تا ٢٤ ساعت پس از نمونه‌برداری، طبق بند ۹ باید مورد آزمون قرار گیرند.

۹ روش اجرای آزمون

۹-۱ روش پلیت تماسی

پلیت‌های تماسی یا دیپ اسلایدها را با توجه به نوع میکروارگانیسم‌های مورد نظر برای شمارش، گرمخانه‌گذاری کنید.

روش پلیت تماسی نباید برای شناسایی اختصاصی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا مورد استفاده قرار گیرد.

۹-۲ روش سوآب یا پارچه / اسفنج

۹-۲-۱ لوله‌های حاوی سوآب‌ها را با استفاده از مخلوط‌کن (بند ٦-۹) به مدت ۳۰ ثانیه مخلوط کنید. سرعت مخلوط کن را به‌گونه‌ای تنظیم کنید که محتویات لوله‌ها تا ارتفاع ۲ الی ۳ سانتیمتر پایین‌تر از سر لوله قرار گیرد.

۹-۲-۲ به کیسه‌های پلاستیکی حاوی اسفنج‌ها یا پارچه‌ها، بر اساس اندازه سطح مورد بررسی (برای مثال ۱۰۰ میلی‌لیتر برای ۱۰۰ سانتیمتر مربع)، مقداری محلول رقیق‌کننده (بند ٥-۱-۳) یا مایع خنثی‌کننده (بند ٥-۱-٤) اضافه کنید. سپس محتویات کیسه‌ها را با استفاده از یک همگن‌کننده دارای حرکات ضربه‌ای یا لرزشی (بند ٦-۱۰) به مدت ۳۰ ثانیه، همگن کنید. به این ترتیب سوسپانسیون اولیه آماده می شود.

اگر پیش‌بینی می شود که تعداد میکروارگانیسم‌های مورد جستجو غیر قابل شمارش است، رقت‌های دهدهی بعدی را با استفاده از رقیق‌کننده پپتون نمکی، تا رقتی تهیه کنید که تعداد قابل شمارشی از کلنی‌ها حاصل شود[1].

مطابق با روش‌های شمارش مورد استفاده[2]، پلیت‌های محیط‌های کشت را با سوسپانسیون اولیه به صورت دوتایی[3] تلقیح کنید. اگر از روش پور پلیت[4] استفاده شود، حجم مادهٔ تلقیحی باید یک میلی‌لیتر و در صورت استفاده از روش کشت سطحی[5]، حجم مادهٔ تلقیحی باید ۰/۱ میلی‌لیتر باشد. برای رقت‌های بعدی نیز به همین روش عمل کنید.

این پلیت‌ها را در دما و زمان مناسب برای هر یک از میکروارگانیسم‌های مورد جستجو گرمخانه‌گذاری کنید.

روش جایگزین برای روش‌های فوق، استفاده از روش کشت قطره‌ای[6] است. در این روش ابتدا از خشک بودن سطح پلیت اطمینان حاصل کنید، سپس از بالاترین رقت‌ها شروع کرده و با پیپت‌های سترون یا سمپلرهای با نوک سترون از سوسپانسیون اولیه (حاوی سوآب‌ها، پارچه‌ها یا اسفنج‌ها) و رقت‌های بعدی آنها، به صورت قطره قطره (هر قطره معادل ۰/۰۵ میلی‌لیتر است)، روی نقاط مختلف محیط کشت، که قبلاً در پشت پلیت علامت‌گذاری شده است، بریزید. پلیت‌های آگار تلقیح شده را به صورت افقی قرار داده و تا زمانی که قطره جذب سطح آگار نشده است، آن‌ها را حرکت ندهید.

به منظور تعیین وجود میکروارگانیسم‌های ویژه (برای مثال لیستریا منوسیتوژنز یا گونه‌های سالمونلا)، سطح مورد بررسی باید حداقل ۱۰۰ و ترجیحاً حدود ۱۰۰۰ سانتیمتر مربع باشد. در این صورت، سوآب، پارچه یا اسفنج را باید به آبگوشت غنی‌کننده مناسب انتقال داده و کاملاً مخلوط کنید.

I- برای کسب اطلاعات لازم از طرز تهیه رقت‌های اعشاری به استاندارد ملی ایران ۳۵۶ مراجعه کنید.

1- برای کسب اطلاعات بیشتر در مورد روش‌های شمارش به استاندارد ملی ایران ۲۳۲۵ یا استانداردهای ملی مربوط به شناسایی و شمارش میکروارگانیسم‌های مورد نظر، مراجعه کنید

3- Duplicate
4- Pour plate
5- Spread plate
6- Drop plate

۹-۳ شمارش و شناسایی کلنی‌ها

۹-۳-۱ روش پلیت تماسی

تعداد کلنی‌های رشد یافته روی سطح پلیت‌های تماسی یا دیپ اسلایدها را بلافاصله مستقیماً پس از زمان گرمخانه‌گذاری تعیین شده، شمارش کنید. در صورت لزوم مطابق با روش شناسایی میکروارگانیسم یا میکروارگانیسم‌های مورد جستجو، آزمون‌های تائیدی را انجام دهید.

۹-۳-۲ روش سوآب یا پارچه / اسفنج

۹-۳-۲-۱ روش پور پلیت – کشت سطحی

کلنی‌های هر پلیت را شمارش کنید و در صورت لزوم مطابق با روش شناسایی میکروارگانیسم یا میکروارگانیسم‌های مورد جستجو، آزمون‌های تائیدی را انجام دهید.

۹-۳-۲-۲ روش کشت قطره‌ای

کلنی‌های هدف را در پلیت‌هائی شمارش کنید که ۵ تا ۵۰ کلنی روی آنها رشد کرده است.

۹-۳-۲-۳ روش‌های غنی‌سازی

بعد از مرحله پیش‌غنی‌سازی، دستورالعمل‌ها را مطابق با روش شناسایی میکروارگانیسم یا میکروارگانیسم‌ها دنبال کنید.

۱۰ محاسبات و بیان نتایج

هشدار *- از آنجاییکه معمولاً نتایج آزمون در روش پلیت تماسی و روش سوآب یا پارچه / اسفنج مشابه نمی باشد، لازم است در گزارش نتایج آزمون، روش مورد استفاده ذکر شود.*

۱۰- ۱ محاسبات

۱۰-۱-۱ روش پلیت تماسی

تعداد کلنی‌های شمارش شده را بر سطح پلیت تقسیم کنید. تعداد کلنی‌ها را به صورت تعداد واحدهای تشکیل دهنده کلنی (CFU) در هر سانتیمتر مربع از سطح گزارش کنید.

۱۰-۱-۲ روش سواب یا پارچه / اسفنج

۱۰-۱-۲-۱ روش پور پلیت – کشت سطحی

۱۰-۱-۲-۱-۱ ابتدا تعداد واحدهای تشکیل‌دهنده کلنی (CFU) در هر میلی‌لیتر از سوسپانسیون اولیه (N) را مطابق با استاندارد ملی ایران ۲۳۲۵ و در صورت لزوم سایر استانداردهای ملی مربوطه محاسبه کنید.

۱۰-۱-۲-۱-۲ تعداد واحدهای تشکیل‌دهنده کلنی (CFU) در هر سانتیمتر مربع از سطح مورد بررسی (N_s) را با استفاده از فرمول شماره ۱ محاسبه کنید:

$$N_s = \frac{N \times F}{A} \times D$$ فرمول ۱

که در آن:

N تعداد واحدهای تشکیل‌دهنده کلنی در هر میلی‌لیتر محلول رقیق‌کننده (یا مایع خنثی‌کننده)

F حجم استفاده شده از محلول رقیق‌کننده (یا مایع خنثی‌کننده) در لوله یا کیسه همگن‌کننده برحسب میلی‌لیتر

A سطح مورد بررسی برحسب سانتیمتر مربع

D عکس رقت مورد استفاده

می باشد.

۱۰-۱-۳ روش کشت قطره‌ای

۱۰-۱-۳-۱ ابتدا تعداد واحدهای تشکیل‌دهنده کلنی (CFU) در هر میلی‌لیترمحلول سوسپانسیون (N) را با استفاده از فرمول شماره ۲ محاسبه کنید:

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0/1\, n_2)d}$$ فرمول ۲

که در آن :

$\sum C$ مجموع کلنی‌های شمارش شده در تمام قطره‌های حاصل از دو رقت متوالی که حداقل یکی از این رقت‌ها حاوی ۵ کلنی باشد.

V حجم مادهٔ تلقیحی در هر قطره (در این مورد ۵۰ میکرولیتر)

n_1 تعداد قطرات تلقیح شده در اولین رقت

n_2 تعداد قطرات تلقیح شده در دومین رقت

D فاکتور رقت بر اساس اولین رقت تلقیح شده

می باشد.

۱۰-۱-۳-۲ برای به دست آوردن تعداد واحدهای تشکیل‌دهنده کلنی در هر سانتیمترمربع از سطح، از فرمول شماره ۳ استفاده کنید:

$$Ns = \frac{N \times F}{A}$$ فرمول ۳

که در آن :

F حجم استفاده شده از محلول رقیق‌کننده یا مایع خنثی‌کننده در لوله یا کیسهٔ یکنواخت کننده برحسب میلی-لیتر

A سطح مورد بررسی برحسب سانتیمتر مربع

می باشد.

۱۰-۱-۳-۳ اگر سطح مورد بررسی در روش سوآب مشخص نشده باشد، تعداد واحدهای تشکیل‌دهنده کلنی در هر سوآب (N_{sw}) را با استفاده از فرمول شماره٤ محاسبه کنید.

$$N_{sw} = N \times F \times D$$ *فرمول ٤*

که در آن N ، F و D مطابق فرمول شماره ۱ می باشد .

۱۰-۲ بیان نتایج

۱۰-۲-۱ در صورت استفاده از روش‌های نیمه کمی، نتایج به دست آمده برحسب واحدهای تشکیل‌دهنده کلنی در هر سانتیمتر مربع از سطح را می توان به عنوان درجه‌ها یا امتیازهای بهداشتی مطرح در نظر گرفت. به دلیل اینکه این درجه‌ها یا امتیازها می توانند به‌طور وسیع با توجه به سطوح مورد آزمون متفاوت باشند، توصیه می شود که درجه‌بندی یا امتیازبندی با توافق مراجع ذی‌ربط و صلاحیت‌دار انجام گرفته و بین بخش‌های مختلف سازگاری ایجاد شود.

۱۰-۲-۲در مورد روش‌های غنی‌سازی، وجود یا عدم وجود میکروارگانیسم‌های مورد جستجو را که شناسایی شده یا نشده بر اساس سطح مورد بررسی در روش سوآب یا در صورتی که مساحت سطح مورد بررسی معین نشده باشد، به ازای هر بار سوآب کشیدن، گزارش کنید.

ICS: 07.100.30

صفحه : ۲۲