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

استاندارد ملی ایران
۱۱۰۶۸
تجدیدنظر اول
۱۳۹۸

INSO
11068
1st Revision
2020

Identical with:
ISO 21148: 2017

میکروبیولوژی- فراورده‌های آرایشی بهداشتی- راهنمای کلی برای آزمون-های میکروبیولوژی

Microbiology- Cosmetics- General instructions for microbiological examination

ICS: 07.100.99; 71.100.70

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.gov.ir

وبگاه: http://www.isiri.gov.ir

Iranian National Standardization Organization (INSO)

No. 2592 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.gov.ir

Website: http://www.isiri.gov.ir

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 صدور گواهی 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- فراورده‌های آرایشی بهداشتی راهنمای کلی برای آزمون‌های میکروبیولوژی»

رئیس:	**سمت و/یا محل اشتغال:**
حجتی، محمد (دکتری علوم و صنایع غذایی)	هیأت علمی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان
دبیر:	
اسکندری، مقداد (کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی)	اداره کل استاندارد استان خوزستان
اعضا: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)	
افرازه، مجتبی (دکتری علوم و صنایع غذایی)	عضو مستقل
انصاری، حسین (دکتری میکروبیولوژی)	شرکت کشت و صنعت دهخدا
بغدادی، سارا (کارشناسی شیمی صنایع غذایی)	شرکت هدیه بهبهان
پورجواهر، سیمین (کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی)	آرد خوزستان
خیاط، محسن (کارشناسی علوم و صنایع غذایی)	اداره کل استاندارد استان خوزستان
دهقان، حسن (کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی)	معاونت غذا و دارو دانشگاه علوم پزشکی آبادان
سپیدنامه، مرضیه (دکتری بهداشت مواد غذایی)	شرکت تیام چای
سروریان، ریحانه (دکتری علوم و صنایع غذایی)	عضو مستقل
عسکراوی، مریم (کارشناسی ارشد میکروبیولوژی)	آزمایشگاه آبان کیمیای جنوب

اعضا: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)	**سمت و/یا محل اشتغال:**
زارع، زهرا (کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی)	شرکت لبنیات میهن
عظیمی، مسعود (کارشناسی ارشد مهندسی مواد)	اداره کل استاندارد استان خوزستان
محمدی نسب، پویا (کارشناس ارشد میکروبیولوژی)	شرکت خمیرمایه خوزستان
موسوی، سید مصطفی (کارشناس علوم و صنایع غذایی)	شرکت بهنوش ایران واحد خرمشهر
ویراستار:	
فلاح، مهین (کارشناسی ارشد باکتری‌شناسی)	اداره کل استاندارد استان خوزستان

.

فهرست مندرجات

عنوان **صفحه**

مقدمه ی
پیش‌گفتار ط
۱ هدف و دامنه کاربرد ۱
۲ مراجع الزامی ۱
۳ اصطلاحات و تعاریف ۱
۴ ساختمان ۲
۴-۱ فضاهای آزمون ۲
۴-۲ سایر فضاها ۲
۴-۳ موقعیت ساختمان ۲
۴-۴ تجهیز ساختمان ۳
۴-۵ نگه‌داری ۴
۵ تجهیزات ۴
۵-۱ کلیات ۴
۵-۲ اتاقک‌های میکروبیولوژی ۴
۵-۳ ترازوی آزمایشگاهی ۵
۵-۴ همگن‌کننده ۵
۵-۵ pH متر ۵
۵-۶ اتوکلاو ۵
۵-۷ گرمخانه ۵
۵-۸ حمام آب ۶
۵-۹ یخچال یا سردخانه ۶
۵-۱۰ فریزر ۶
۵-۱۱ آون سترون‌سازی ۶
۵-۱۲ دستگاه کلونی‌شمار ۶
۵-۱۳ سایر وسایل ۷
۶ سویه‌های میکروارگانیسم‌ها ۷
۷ کارکنان ۸
۷-۱ صلاحیت ۸
۷-۲ بهداشت ۸

عنوان **صفحه**

۸ آماده‌سازی لوازم و وسایل شیشه‌ای ۸
۸-۱ آماده‌سازی ۸
۸-۲ سترون‌سازی ۹
۸-۲-۱ سترون‌سازی با حرارت خشک ۹
۸-۲-۲ سترون‌سازی با حرارت مرطوب ۹
۸-۳ وسایل یک‌بار مصرف ۹
۸-۴ مدیریت لوازم و وسایل شیشه‌ای تمیز ۹
۸-۵ مدیرت لوازم و وسایل شیشه‌ای سترون ۹
۸-۶ تیمار مواد آلوده ۱۰
۸-۷ شستشو ۱۰
۹ آماده‌سازی و سترون‌سازی محیط‌های کشت و واکنشگرها ۱۰
۹-۱ کلیات ۱۰
۹-۲ آب ۱۱
۹-۳ آماده‌سازی محیط کشت ۱۱
۹-۳-۱ کلیات ۱۱
۹-۳-۲ افزودن آب ۱۱
۹-۳-۳ اندازه‌گیری pH ۱۱
۹-۳-۴ توزیع محیط‌های کشت ۱۲
۹-۴ سترون‌سازی ۱۲
۹-۴-۱ کلیات ۱۲
۹-۴-۲ سترون‌سازی با استفاده از حرارت مرطوب ۱۲
۹-۴-۳ سترون‌سازی با استفاده از صاف کردن ۱۲
۹-۵ انبارش ۱۳
۹-۵-۱ کلیات ۱۳
۹-۵-۲ محیط‌های کشت و واکنشگرهای آماده‌شده در آزمایشگاه ۱۳
۹-۵-۳ محیط‌های کشت و واکنشگرهای آماده مصرف ۱۳
۹-۶ ذوب کردن محیط‌های کشت آگاری ۱۳
۹-۷ آماده‌سازی پتری‌دیش‌ها ۱۴
۱۰ نمونه‌های آزمایشگاهی ۱۴
۱۰-۱ کلیات ۱۴
۱۰-۲ نمونه‌برداری از فراورده‌های آرایشی بهداشتی ۱۴

عنوان **صفحه**

۱۰-۳ حمل و نقل نمونه ۱۴
۱۰-۴ دریافت و انبارش نمونه ۱۵
۱۰-۵ نحوه کار با فراورده‌ها و نمونه‌ها ۱۵
۱۰-۶ نگه‌داری و امحاء فراورده‌ها ۱۵
۱۱ راهکارهای عملیاتی ۱۶
۱۱-۱ اقدامات احتیاطی در حین آزمون ۱۶
۱۱-۲ آماده‌سازی سوسپانسیون اولیه و رقت‌های نمونه ۱۷
۱۱-۲-۱ کلیات ۱۷
۱۱-۲-۲ فراورده‌های محلول در آب ۱۷
۱۱-۲-۳ فراورده‌های غیرمحلول در آب ۱۷
۱۱-۳ روش‌های شمارش ۱۸
۱۱-۴ روش‌های تشخیص ۱۸
۱۲ بیان نتایج ۱۸
۱۳ خنثی‌سازی خواص ضدمیکروبی فراورده‌ها ۱۸
پیوست الف (آگاهی‌دهنده) روش‌های پایه شناسایی میکروارگانیسم‌ها ۱۹
پیوست ب (آگاهی‌دهنده) روش‌های پایه برای شمارش و تلقیح باکتری‌ها ۲۵
پیوست پ (آگاهی‌دهنده) آماده‌سازی و کالیبراسیون مواد تلقیحی ۲۶
کتاب‌نامه ۲۷

پیش‌گفتار

استاندارد «میکروبیولوژی- فراورده‌های آرایشی بهداشتی- راهنمای کلی برای آزمون‌های میکروبیولوژی» که نخستین‌بار در سال ۱۳۸۷ تدوین و منتشر شد، بر اساس پیشنهادهای دریافتی و بررسی و تأیید کمیسیون‌های مربوط بر مبنای پذیرش استانداردهای بین‌المللی/منطقه‌ای به عنوان استاندارد ملی ایران به روش اشاره شده در مورد پ، بند ۷، استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ برای اولین بار مورد تجدیدنظر قرار گرفت و در پانصد و سی و چهارمین اجلاسیه کمیتهٔ ملی استاندارد بیولوژی و میکروبیولوژی مورخ ۱۳۹۸/۱۱/۱۶ تصویب 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 می‌شود.

استانداردهای ملی ایران بر اساس استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ (استانداردهای ملی ایران- ساختار و شیوهٔ نگارش) تدوین می‌شوند. برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت‌های ملی و جهانی در زمینه صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در صورت لزوم تجدیدنظر خواهند شد و هر پیشنهادی که برای اصلاح و تکمیل این استانداردها ارائه شود، هنگام تجدیدنظر در کمیسیون فنی مربوط موردتوجه قرار خواهد گرفت. بنابراین، باید همواره از آخرین تجدیدنظر استانداردهای ملی ایران استفاده کرد.

این استاندارد جایگزین استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۱۰۶۸: سال ۱۳۸۷ می‌شود.

این استاندارد ملی بر مبنای پذیرش استاندارد بین‌المللی زیر به روش «معادل یکسان» تهیه و تدوین شده و شامل ترجمه تخصصی کامل متن آن به زبان فارسی همراه با اعمال تغییرات با توجه به مقتضیات کشور است:

ISO 21148: 2017, Microbiology- Cosmetics- General instructions for microbiological examination

مقدمه

هدف از این استاندارد کمک به حصول اطمینان از یکسان بودن روش‌های کلی برای آزمون‌های میکروبیولوژی آرایشی در آزمایشگاه‌هایی است که این استانداردها را اتخاذ کرده‌اند و همچنین تسهیل دست‌یابی به نتایج هماهنگ در آزمایشگاه‌های مختلف جهت پیشگیری از خطر عفونت و حفظ سلامت کارکنان آزمایشگاه می‌باشد. هنگام انجام آزمون‌های میکروبیولوژی فرآوده‌های آرایشی بهداشتی توجه به نکات زیر حائز اهمیت است:

– فقط میکروارگانیسم‌های موجود در نمونه جداسازی یا شمارش شوند؛

– میکروارگانیسم‌ها باعث آلودگی محیط نشوند؛

به منظور دست‌یابی به موارد فوق باید تا حد امکان به بهداشت فردی توجه شود و روش‌هایی که از آلودگی‌های خارجی[1] پیشگیری می‌کنند، به‌کار رود.

در این استاندارد برای اقدامات احتیاطی در طول آزمون، تعداد محدودی مثال ارائه می‌شود. بنابراین داشتن اطلاعات در زمینه روش‌های میکروبیولوژی و میکروارگانیسم‌ها ضروری است. هم‌چنین انجام آزمون‌ها و شمارش میکروارگانیسم‌ها به طریقی صحیح حائز اهمیت است.

با توجه به اینکه دست‌کاری[2] زیاد نمونه‌ها هنگام آزمون ممکن است به‌طور ناخواسته سبب آلودگی ثانویه[3] شود، آزمون‌کننده باید صحت نتایج روش‌های خود را تصدیق کند. انجام اقدامات احتیاطی خاص نه تنها به دلایل بهداشتی بلکه برای حصول اطمینان از تجدیدپذیری خوب نتایج، ضرورت است. تعیین اقدامات احتیاطی در همه شرایط امکان‌پذیر نیست، ولی این استاندارد حداقل اقدامات اصلی را که باید هنگام آماده‌سازی، سترون‌سازی و انبارش محیط‌های کشت و تجهیزات در نظر گرفته شود، تعیین می‌کند.

توصیه‌های ارائه‌شده، شمارش و جست‌وجوی میکروارگانیسم‌های مزوفیل را که ممکن است تحت شرایط هوازی رشد کنند، امکان‌پذیر می‌سازد. این توصیه‌ها برای تعیین عدم وجود و یا وقوع محدود میکروارگانیسم‌های خاص فراورده‌های آرایشی بهداشتی می‌باشد.

روش‌های آزمون در استانداردهای جداگانه شرح داده شده است. روش‌های آزمون میکروبیولوژی جایگزین را می‌توان به‌شرط آن‌که اثبات برابری آن‌ها با روش‌های استاندارد و یا روش‌هایی که مناسب بودن آن‌ها ثابت شده است استفاده کرد. انتخاب یک روش خاص، یا ترکیبی از روش‌های ارائه‌شده در استانداردهای ذکرشده به هدف انجام آزمون بستگی دارد و تصمیم‌گیری برای کاربرد بهترین روش با کاربر است.

1-External contamination
2-Manipulation
3-Cross contamination

میکروبیولوژی- فراورده‌های آرایشی بهداشتی راهنمای کلی برای آزمون‌های میکروبیولوژی

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، تعیین راهنمای کلی برای آزمون فراورده‌های آرایشی بهداشتی مطابق با تجزیه و تحلیل خطر مناسب، به منظور حصول اطمینان از کیفیت و ایمنی فراورده‌ها (مانند فراورده‌های دارای فعالیت آبی پایین، فراورده‌های آبی- الکلی و فراورده‌هایی با pH بالا) می‌باشد.

به دلیل این‌که دامنه کاربرد این استاندارد، انواع زیادی از فراورده‌های آرایشی بهداشتی را در برمی‌گیرد، تمام جزئیات آن برای برخی از فراورده‌ها مانند فراورده‌های غیر محلول در آب مناسب نمی‌باشد.

۲ مراجع الزامی

این استاندارد مراجع الزامی ندارد.

۳ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد، اصطلاحات و تعاریف زیر به‌کار می‌رود[۱]:

۳-۱

فراورده

product

منظور قسمتی از فراورده آرایشی بهداشتی مشخص است که آزمایشگاه برای آزمون آن را دریافت می‌کند.

۳-۲

نمونه

sample

قسمتی از فراورده (زیربند ۳-۱) است (حداقل ۱ g یا ۱ ml) که برای آماده‌سازی سوسپانسیون اولیه (زیربند ۳-۳) از آن استفاده می‌شود.

۱- اصطلاحات و تعاریف به‌کار رفته در استانداردهای ISO و IEC در وبگاه‌های www.iso.org/obp و www.electropedia.org/ قابل‌دسترس است.

۳-۳

سوسپانسیون اولیه

initial suspension

سوسپانسیون یا محلولی از نمونه (زیربند ۳-۲) در حجم معینی از محیط کشت آبگوشتی[1] غنی شده است.

۴-۳

رقت نمونه

sample dilution

رقتی از سوسپانسیون اولیه (زیربند ۳-۳) است.

۴ ساختمان

۴-۱ فضاهای آزمون

فضاهای مورد نیاز برای انجام عملیات خاص در آزمایشگاه میکروبیولوژی به شرح زیر می‌باشد:

- محلی برای دریافت، انبارش، آماده‌سازی و فرآوری نمونه‌ها؛
- محلی برای آماده‌سازی و سترون‌سازی محیط‌های کشت، وسایل و لوازم شیشه‌ای؛
- محل انجام آزمون، توزین، تهیه رقت‌ها، تلقیح، کشت بعدی، گرمخانه‌گذاری و نگه‌داری سویه‌ها و غیره؛
- محل زدودن آلودگی‌ها، تمیز کردن وسایل و لوازم شیشه‌ای و فرآوری پسماندهای آزمایشگاهی.

۴-۲ سایر فضاها

سایر فضاها به شرح زیر می‌باشند:

- ورودی، راه‌رو، راه پله، بالابر؛
- اتاق‌های اداری (مانند: اتاق منشی، دفتر کار، اتاق مستندسازی و غیره)؛
- رختکن، دستشویی و سرویس بهداشتی؛
- اتاق بایگانی؛
- انبار.

۴-۳ موقعیت ساختمان

محیطی که در آن آزمایشات میکروبیولوژی انجام می‌شود، نباید قابلیت اعتبار آزمون‌ها را تحت تأثیر

1- Broth

قرار دهد.

برای پیشگیری از خطر آلودگی ثانویه، در تعیین مکان ساختمان باید دقت شود.

برای حصول اطمینان از حفاظت در برابر شرایط نامناسب مانند دمای بالا، گرد و غبار، رطوبت، بخار، سر و صدا، لرزش و تابش مستقیم نور خورشید و غیره نیز باید دقت شود.

به منظور تمیز کردن و منظم نگه‌داشتن مناطق کار، سطح فضای کاری باید به اندازه کافی بزرگ باشد. دسترسی به مناطق آزمون، باید فقط محدود به افراد آزمون‌کننده باشد.

اتاق‌ها و یا فضاهای جداگانه و یا اختصاصی برای موضوع‌های به شرح زیر بهتر است در نظر گرفته شود:

- دریافت، انبارش و آماده‌سازی نمونه‌ها؛
- کار با کشت‌های میکروبی؛
- آماده‌سازی و سترون‌سازی محیط‌های کشت و لوازم و وسائل شیشه‌ای؛
- محل زدودن آلودگی و شستشو؛
- سترون‌سازی؛
- گرمخانه‌ها، یخچال‌ها و فریزرها؛

۴-۴ تجهیز ساختمان

۴-۴-۱ به منظور کاهش خطر آلودگی با گرد و غبار و در نتیجه میکروارگانیسم‌ها، فضای آزمون باید شرایط زیر را دارا باشد:

- دیوار، کف و سقف باید صاف، بدون خلل و فرج، مقاوم به مواد شوینده و ضدعفونی‌کننده مورد استفاده در آزمایشگاه بوده و به راحتی قابل تمیز کردن باشند؛
- از نصب لوله‌های حاوی مایعات در قسمت بالای فضای کار خودداری شود، مگر آن که لوله‌ها به صورت غیر قابل‌نفوذ پوشیده شده باشند؛
- درصورت استفاده از سایبان، تا حد امکان باید آن‌ها را در خارج از پنجره‌ها نصب کرد؛
- به‌منظور به حداقل رساندن جریان هوا، پنجره‌ها و درها باید قابل بسته شدن باشد. به‌علاوه برای پیشگیری از تجمع گرد و غبار، پنجره‌ها باید طوری طراحی شوند که پاک کردن آن‌ها به آسانی امکان‌پذیر باشد.

۴-۴-۲ دمای محیط و کیفیت هوا (شامل میکروارگانیسم‌های موجود، رطوبت، میزان پراکندگی گرد و غبار و غیره) باید با انجام آزمون متناسب باشد.

برای این منظور بر حسب نیاز استفاده از فیلتر تهویه هوا یا اتاقک میکروبیولوژی توصیه می‌شود.

۴-۴-۳ سطوح میزها و صندلی‌های آزمایشگاه باید صاف، بدون تخلخل، غیر قابل نفوذ و به آسانی قابل تمیز و ضدعفونی کردن باشد. کابینت و وسایل روی آن باید به‌راحتی قابل تمیز شدن باشد. مبلمان آزمایشگاهی غیرثابت باید به‌گونه‌ای طراحی شوند که تمیز کردن کف به سهولت انجام شود. مدارک و کتاب‌هایی که به‌طور مرتب استفاده نمی‌شوند، بهتر است در خارج از محل آزمون نگه‌داری شوند.

۴-۵ نگه‌داری

دیوار، کف، سقف و سطوح میزها و سایر وسایل آزمایشگاه باید در شرایط خوبی نگه‌داری شوند تا از ایجاد ترک که به‌ویژه موجب تجمع کثیفی و در نتیجه منبع آلودگی است، پیشگیری شود.

به‌منظور حفظ شرایط مناسب جهت انجام آزمون‌ها نظافت منظم و درصورت لزوم ضدعفونی و سترون‌زایی انجام پذیرد.

سیستم‌های تهویه و فیلترهای آن‌ها لازم است به‌طور مرتب بررسی شود و در صورت لزوم فیلترها تعویض شوند.

۵ تجهیزات

۵-۱ کلیات

به‌طورکلی تمام تجهیزات باید تمیز و در شرایط کاری مناسب باشند.

عملیات نگه‌داری باید پایش شود. تجهیزات و وسایل اندازه‌گیری باید به‌طور منظم مطابق با جدول زمان‌بندی و نتایج ثبت شده، تصدیق شود.

۵-۲ اتاقک‌های میکروبیولوژی[1]

دو نوع اتاقک میکروبیولوژی وجود دارد:

الف- اتاقک هوای تمیز[2]، که برای حفاظت فراورده مورد آزمون از آلودگی‌های بیرونی و نیز به حداقل رساندن آلودگی‌هایی ناشی از آزمون‌کننده به‌کار می‌رود؛

ب- اتاقک ایمنی[3]، که برای حفاظت فراورده مورد آزمون از آلودگی‌های بیرونی و هم‌چنین آزمون‌کننده و محیط به‌کار می‌رود.

از هر دو اتاقک می‌توان استفاده کرد. به‌منظور انجام عملیات مخاطره‌آمیز برای آزمون‌کننده، بهتر است از اتاقک‌های ایمنی استفاده شود.

1- Microbiological cabinets
2- Clean-air cabinet
3- Safety cabinet

یک اتاقک، محل کاری بدون گرد و غبار و مجهز به جریان هوای عمودی لایه‌ای می‌باشد. در میکروبیولوژی، اتاقک ایمنی برای باقی ماندن میکروارگانیسم‌ها روی صافی‌ها به‌کار می‌رود.

۵-۳ ترازوی آزمایشگاهی

آزمایشگاه میکروبیولوژی به‌منظور آزمون فراورده‌های آرایشی بهداشتی باید مجهز به ترازوهایی با دقت و گستره لازم برای توزین فراورده‌های مختلف باشد. معمولاً دقت لازم برای توزین نمونه‌ها و برخی از اجزای محیط‌های کشت و واکنشگرها[1] ۰٫۰۱ g± می‌باشد.

۵-۴ همگن‌کننده[2]

این وسیله (مانند: آسیاب، استومیکر[3] و غیره) برای آماده‌سازی سوسپانسیون اولیه از نمونه‌های غیرمایع به‌کار می‌رود.

۵-۵ pH متر

pH متر باید دارای قابلیت اندازه‌گیری با دقت ۰٫۱ ± واحد pH باشد و حداقل آستانه سنجش آن ۰٫۰۱ واحد pH باشد.

۵-۶ اتوکلاو

اتوکلاو باید در شرایط مطلوبی نگه‌داری شود و توسط سازمان‌های ذی‌صلاح، مطابق با دستور کار سازنده به‌طور منظم بازرسی شده و نتایج آن به‌طور صحیح ثبت و مستند شود.

اتوکلاو نباید به‌طور همزمان برای سترون‌سازی مواد تمیز و آلودگی‌زدایی مواد آلوده به‌کار رود. تا حد امکان، بهتر است از اتوکلاوهای جداگانه برای دو منظور فوق استفاده شود.

۵-۷ گرمخانه

گرمخانه باید مجهز به یک سیستم تنظیم‌کننده باشد که درجه حرارت را در دمای مورد نظر حفظ کند و در تمام دوره کامل کاری پایدار بماند، مجهز باشد.

اگر دمای محیط، نزدیک به دمای گرمخانه یا بیش‌تر از آن باشد، استفاده از گرمخانه مجهز به سیستم خنک‌کننده ضروری است.

گرمخانه‌ها باید از تابش نور مستقیم خورشید حفاظت شوند.

در صورت امکان در یک عملیات کاری گرمخانه‌ها نباید به طور کامل پر شوند، زیرا صرف‌نظر از نوع

1- Reagents
2- Homogenizer
3- Stomacher

گرمخانه‌ای که به‌کار می‌رود (مانند گرمخانه دارای سیستم همرفت هوای تحت فشار[1])، زمان زیادی طول می‌کشد تا دمای محیط‌های کشت با دمای گرمخانه یکسان شود.

دمای گرمخانه باید حداقل در هر روز کاری بررسی و ثبت شود.

۵-۸ حمام آب

دو نوع حمام آب وجود دارد:

- حمام آب با دمای کنترل‌شده به‌وسیله تنظیم‌کننده حرارت که برای گرمخانه‌گذاری محیط‌های کشت تلقیح شده و آزمون‌های تشخیصی و سایر موارد مناسب می‌باشد؛
- حمام آب با حرارت کنترل‌شده که برای نگه‌داری محیط‌های کشت آگاردار سترون به حالت ذوب‌شده برای کاربردهای بعدی در فرایندهای مشخص به‌کار می‌رود.

درجه حرارت و دقت مورد نیاز در هر یک از روش‌های آزمون، تعیین شده است.

۵-۹ یخچال یا سردخانه

دمای یخچال به‌جز در مواردی که تعیین شده است باید $^{\circ}C$ (۳ ± ۵) باشد.

۵-۱۰ فریزر

دمای فریزر، به جز در مواردی که تعیین شده است باید کمتر از $^{\circ}C$ ۱۸- باشد.

۵-۱۱ آون سترون‌سازی

آون سترون‌سازی اتاقکی است که در آن با استفاده از حرارت خشک، میکروارگانیسم‌ها را از بین می‌برند.

حرارت باید در تمام قسمت‌های اتاقک به‌طور یکنواخت منتشر شود.

آون سترون‌سازی باید مجهز به وسایل زیر باشد:

- دماپا[2]؛
- دماسنج یا ترموکوپل ثبت‌کننده[3]؛
- نشانگر زمان یا برنامه تنظیم‌کننده زمان؛

۵-۱۲ دستگاه کلونی‌شمار

برای شمارش کلونی‌ها ممکن است از دستگاه کلونی‌شمار استفاده شود.

1- Forced –air convection
2- Thermostat
3- Recording thermocouple

۵-۱۳ سایر وسایل

هشدار- ظرف شیشه‌ای حجم‌سنجی[1] نباید در آون سترون شود.

سایر تجهیزات و وسایل برای استفاده روزانه شامل موارد زیر است:

الف- تجهیزات فیلتراسیون (به زیر مراجعه شود)؛

ب- ظروف شیشه‌ای یا پلاستیکی (لوله‌های آزمایش، فلاسک، بطری‌ها)؛

پ- پتری‌دیش شیشه‌ای یا پلاستیکی (معمولا با قطر ۸۵ mm تا ۱۰۰ mm)؛

ت- پی‌پت‌های شیشه‌ای یا پلاستیکی (۱ ml, ۲ ml, ۱۰ ml)، پی‌پت‌های خودکار؛

ث- وسایل نمونه‌برداری؛

ث- سیم‌ها و لوپ‌های کشت (از جنس نیکل-کروم[2]، پلاتین- ایریدیوم[3] یا پلاستیکی یک‌بار مصرف و غیره)؛

ج- میکروسکوپ نوری؛

چ- شعله گاز و کوره مخصوص سیم کشت؛

ح- وسایل توزیع‌کننده محیط‌های کشت و واکنشگرها؛

خ- همزن مکانیکی؛

اگر از روش فیلتراسیون غشایی استفاده شود، تجهیز باید شامل موارد زیر باشد:

- سیستم فیلتراسیون غشایی یا دستگاه صاف کردن که از مواد مناسب ساخته شده باشد و دارای نگه‌دارنده صافی با گنجایش حداقل ۵۰ ml و مناسب برای کاربرد در صافی‌هایی با قطر ۴۷ mm تا ۵۰ mm و اندازه روزنه حداکثر ۰٫۴۵ µm؛
- جنس صافی غشایی باید به‌گونه‌ای انتخاب شود که مواد باقی‌مانده از نمونه مورد آزمون، تأثیری بر باکتری‌ها نداشته باشد؛
- منبع خلاء با قابلیت نرخ جریان صاف کردن یکنواخت (دستگاه باید به‌گونه‌ای تنظیم شود که امکان صاف کردن ۱۰۰ ml مایع در کمتر از ۲ min وجود داشته باشد).

۶ سویه‌های میکروارگانیسم‌ها

در کاربرد هر روش، سویه‌های موردنیاز برای صحه‌گذاری روش، متناسب در روش ضمیمه‌شده نشان داده شده است.

1- Volumetric
2- Nickle/Chromium
3- Platinium/ Iridium

۷ کارکنان

۷-۱ صلاحیت

تمام افرادی که در آزمایشگاه میکروبیولوژی کار می‌کنند، باید آموزش‌های لازم را تا حد احراز توانایی صحیح انجام آزمون‌هایی که بر عهده آن گذاشته شده است، گذرانده باشند.

افرادی که آزمون‌ها را انجام می‌دهند باید اطلاعات خوب و تجربه عملی کافی در زمینه روش‌های آزمون میکروبیولوژی و میکروارگانیسم‌های مورد جست‌وجو داشته باشند. افراد مسئول برای دست‌یابی به نتایج قابل قبول باید قادر به تفسیر دقت و صحت لازم باشند.

۷-۲ بهداشت

به‌منظور پیشگیری از آلودگی نمونه‌ها و محیط‌های کشت و همچنین پیشگیری از خطر عفونت کارکنان، اقدامات احتیاطی زیر در زمینه بهداشت کارکنان باید انجام شود:

- لباس آزمایشگاهی در رنگ‌های روشن، تمیز و با شرایط خوب و تهیه‌شده از موادی با قابلیت اشتعال کم باشد. لباس آزمایشگاهی نباید خارج از محیط آزمایشگاه پوشیده شود؛
- ناخن‌ها کاملاً تمیز و مرتب شده و ترجیحاً کوتاه باشد؛
- پیش و پس از انجام آزمون‌های میکروبیولوژی و بلافاصله پس از توالت رفتن یا خوردن، دست‌ها شسته شوند، برای خشک کردن دست‌ها، از دستمال کاغذی یا حوله‌های پارچه‌ای یک‌بار مصرف استفاده شود؛
- هنگام تلقیح، از صحبت کردن، سرفه کردن و غیره خودداری شود؛
- در فضای آزمایشگاه از خوردن، آشامیدن و سیگار کشیدن خودداری شود؛
- غذای مورد مصرف کارکنان نباید در یخچال‌های آزمایشگاه قرار داده شود؛
- افرادی که دارای عفونت یا بیماری هستند، موجب احتمال آلودگی نمونه با میکروارگانیسم‌ها و در نتیجه عدم اعتبار نتایج آزمون می‌شوند، بنابراین در این موارد اقدامات احتیاطی خاصی باید انجام شود.

۸ آماده‌سازی لوازم و وسایل شیشه‌ای

۸-۱ آماده‌سازی

آماده‌سازی لوازم و وسایل مورد استفاده در میکروبیولوژی باید به گونه‌ای باشد که تمیزی و/ یا سترونی آن‌ها را تا زمان استفاده، تضمین کند.

لوله‌های آزمایش و بطری‌ها پیش از سترون‌سازی با مواد مناسب درپوش‌گذاری شوند.

سر پی‌پت‌ها نیز با استفاده از پنبه یا هر ماده مناسب دیگر، پوشانده شوند.

در صورت لزوم، لوازم و وسایل سترون‌شدنی در ظروف مخصوص یا در پوششی از مواد مناسب (مانند کاغذهای مخصوص، کاغذ آلومینیوم و غیره) قرار داده شوند.

۸-۲ سترون‌سازی

۸-۲-۱ سترون‌سازی با حرارت خشک

وسایل را حداقل به مدت ۱ h در دمای ۱۷۰ °C تا ۱۸۰ °C قرار دهید و یا ترکیب دیگری از زمان و درجه حرارت را در صورتی که متناسب بودن آن اثبات شده باشد به‌کار ببرید.

به‌منظور حصول اطمینان از دست‌یابی به سترونی از شناساگر[1] استفاده کنید.

۸-۲-۲ سترون‌سازی با حرارت مرطوب

وسایل را در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ °C به مدت حداقل ۱۵ min، سترون کنید. به‌منظور حصول اطمینان از دست‌یابی به سترونی، از شناساگر استفاده کنید.

۸-۳ وسایل یک‌بار مصرف[2]

به جای وسایل شیشه‌ای چند بار مصرف[3] (مانند پتری‌دیش، پی‌پت، لوله و غیره) می توان از وسایل یک‌بار مصرف در صورت داشتن ویژگی‌های مشابه استفاده کرد.

در این صورت، به‌منظور اطمینان از مناسب بودن وسایل یک‌بار مصرف برای کاربرد در میکروبیولوژی (به ویژه در سترونی) و هم‌چنین عدم وجود مواد ممانعت‌کننده از رشد میکروارگانیسم‌ها، با سازنده آن‌ها تماس گرفته شود.

وسایل یک‌بار مصرف باید پیش از دفع (دورانداختن) تیمار شوند. علاوه بر روش‌های تعیین شده در زیربند ۸-۶ این استاندارد روش سوزاندن را نیز می‌توان استفاده کرد. در صورت وجود کوره در ساختمان، عملیات دفع و تیمار ممکن است در یک مرحله قابل دست‌یابی باشد.

۸-۴ مدیریت لوازم و وسایل شیشه‌ای تمیز

در طی انبارش لوازم و وسایل شیشه‌ای، باید ضمن حفظ تمیزی آن‌ها از آلودگی خارجی حفاظت شوند.

۸-۵ مدیریت لوازم و وسایل شیشه‌ای سترون

لوازم و وسایل شیشه‌ای باید پیش از استفاده، تحت شرایطی نگه‌داری شوند که سترونی آن‌ها حفظ شود. لوازم و وسایل شیشه‌ای یک بار مصرف باید مطابق با مشخصات تعیین‌شده توسط سازنده، بدون هیچ‌گونه

1- Indicator
2- Disposable
3- Re-usable

آسیبی به بسته‌بندی آن نگه‌داری شوند. لوازم و وسایل آماده‌شده در آزمایشگاه باید در ظروف تمیز نگه‌داری شوند.

هنگام سترون‌سازی لوازم و وسایل شیشه‌ای مورد استفاده در آزمایشگاه میکروبیولوژی، تاریخ سپری شدن زمان مصرف (یا تاریخ تولید) باید روی بسته‌بندی درج شود. لوازم و وسایل شیشه‌ای غیر قابل نفوذ را می‌توان حداکثر تا مدت سه ماه پیش از استفاده نگه‌داری کرد، مگر در مواردی که زمان خاصی تعیین شده باشد.

۸-۶ تیمار مواد آلوده

به‌منظور از بین بردن میکروارگانسیم‌ها، لوازم و وسایل شیشه‌ای و محتویات آن‌ها باید پس از استفاده (کشت میکروارگانیسم‌ها یا مواد در تماس با میکروارگانیسم‌ها) و پیش از تمیز کردن یا دفع، تیمار شوند.

با توجه به ماهیت مواد، می‌توان از روش ضدعفونی (به زیربند ۱۱-۱ مراجعه شود) و روش سترون‌سازی (به زیربند ۸-۲ مراجعه شود) یا سوزاندن مواد دور ریختنی (به زیربند ۸-۳ مراجعه شود) استفاده کرد.

۸-۷ شستشو

لوازم و وسایل شیشه‌ای را پس از تیمار کردن، بشویید (به زیربند ۸-۶ مراجعه شود).

محتویات ظروف را تخلیه کنید.

در صورت لزوم پیش از شستشو در پوش‌ها را از ظروف جدا کنید.

با استفاده از آب شیر[1]، باقی‌مانده ماده پاک‌کننده را از وسایل آب‌کشی کنید. وسایل تمیز را با آب، آب‌کشی کنید (به زیربند ۹-۲ مراجعه شود).

در موارد عدم دسترسی به مواد پاک‌کننده تجاری، می‌توان از محلول سدیم کربنات ٪ ۰٫۱۲۵ (به صورت کسر جرمی) استفاده کرد که متعاقب آن باید غوطه‌ورسازی در اسید رقیق (مانند هیدروکلریک اسید ۰٫۱ mol/l) انجام شود.

به‌منظور تسهیل عملیات شستشو (مانند موارد کاربرد پی‌پت‌شور، ماشین ظرف‌شویی، حمام‌های فراصوت[2] و غیره) می‌توان از وسایل و لوازم شیشه‌ای خاصی استفاده کرد.

۹ آماده‌سازی و سترون‌سازی محیط‌های کشت و واکنشگرها

۹-۱ کلیات

یکی از مراحل اساسی در آزمون‌های میکروبیولوژی، آماده‌سازی صحیح محیط‌های کشت است که باید با دقت خاصی انجام شود.

1- Tap water
2- Ultrasonic baths

۹-۲ آب

هشدار- آب حاصل از مبدل‌های یونی (آب یون‌زدایی‌شده) ممکن است دارای میکروارگانیسم‌های زیادی باشد، بنابراین توصیه می‌شود، از چنین آبی در صورت تایید کم بودن تعداد میکروارگانیسم‌های آن، استفاده کنید. برای آگاهی از بهترین روش برای به حداقل رساندن آلودگی میکروبی، با سازنده مشورت کنید. آب یون‌زدایی‌شده، با آلودگی زیاد که به‌وسیله صافی سترون شده است ممکن است هنوز حاوی مواد بازدارنده رشد برخی از میکروارگانیسم‌ها باشد.

از آب مقطر یا آبی با کیفیت مشابه آن مانند آب خالص یا آب یون‌زدایی‌شده استفاده کنید. در صورتی که آب مقطر از آب‌های کلردار تهیه می‌شود، پیش از تقطیر، کلر آن را خنثی کنید.

آب باید در ظروف ساخته‌شده از مواد خنثی (مانند شیشه خنثی، پلی‌اتیلن و غیره) نگه‌داری شود.

۹-۳ آماده‌سازی محیط کشت

۹-۳-۱ کلیات

برای آماده‌سازی محیط‌های کشت دو روش وجود دارد:

– استفاده از مواد تشکیل‌دهنده اصلی، به‌صورت خشک و به‌صورت‌های دیگر؛

– استفاده از محیط‌های کشت کامل بدون آب.

محیط‌های کشت را طبق شرایط انبارش تعیین‌شده توسط سازنده و با توجه به تاریخ سپری‌شده زمان مصرف استفاده کنید.

از محیط‌های کشت که تاریخ مصرف آن‌ها گذشته است، استفاده نکنید؛

انبارش و مصرف محیط‌های کشتی که به‌صورت خشک هستند باید به گونه‌ای باشد که از جذب رطوبت اضافی محیط محافظت شوند.

۹-۳-۲ افزودن آب

برای افزودن آب به محیط‌های کشت مطابق با توصیه‌های سازنده عمل کنید.

۹-۳-۳ اندازه‌گیری pH

با استفاده از pH متر (زیربند ۵-۵) pH محیط‌های کشت را اندازه‌گیری و در صورت لزوم به‌گونه‌ای تنظیم کنید که پس از سترون‌سازی و سرد کردن آن تا دمای آزمایشگاه، محیط کشت دارای pH مورد نظر ۰٫۲± واحد اندازه‌گیری باشد، مگر آن‌که مورد دیگری باشد.

یادآوری- تنظیم pH معمولاً با استفاده از محلول ۴۰ g/l (حدود ۱ mol/l) سدیم هیدروکسید یا هیدروکلریک اسید ۳۶٫۵ g/l (حدود ۱ mol/l) انجام می‌شود.

۹-۳-۴ توزیع محیط‌های کشت

محیط‌های کشت را به صورت دستی یا با استفاده از وسایل خودکار در ظروف مناسب تقسیم کنید.

۹-۴ سترون‌سازی

۹-۴-۱ کلیات

سترون‌سازی محیط‌های کشت و معرف‌ها را می‌توان با استفاده از روش‌های مختلف شامل روش‌های زیر انجام داد:

– سترون‌سازی با استفاده از حرارت مرطوب؛

– سترون‌سازی با استفاده از صاف کردن.

مطابق با روش‌های استفاده‌شده، محیط‌های کشت سترون به‌ویژه از نظر pH، رنگ، سترونی و کارایی میکروبیولوژی باید پایش شوند.

۹-۴-۲ سترون‌سازی با استفاده از حرارت مرطوب

برای سترون‌سازی از اتوکلاو (زیربند ۵-۶) استفاده کنید. به‌طور کلی مراحل سترون‌سازی ۱۵ min یا بیش‌تر در دمای ۱۲۱ °C طول می‌کشد. در صورت لزوم، با توجه به حجم و تعداد ظروف، نحوه برگزاری و نوع محیط کشت، چرخه سترونی[1] را تنظیم کنید.

کارایی سترون‌سازی باید به‌روشی مناسب تائید شود.

۹-۴-۳ سترون‌سازی با استفاده از صاف کردن

سترون‌سازی به‌وسیله صاف کردن می‌تواند تحت خلاء یا فشار انجام شود.

از صافی‌های غشایی سترون‌کننده و اجزای صافی با اندازه روزنه ۰٫۲۲ µm (به‌غیر از موارد خاصی که صافی ۰٫۴۵ µm استفاده می‌شود) استفاده کنید. برای استفاده از صافی‌های غشایی و اجزای صافی که به صورت سترون خریداری شده است، به دستور کار سازنده مراجعه کنید.

اجزای مختلف دستگاه صافی را در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ °C، به‌مدت ۱۵ min سترون کنید. در صورت لزوم پس از سترون‌سازی، اجزای دستگاه را تحت شرایط اسپتیک به‌هم وصل کنید. دستگاه‌های خاصی نیز ممکن است به صورت سترون در دسترس باشد.

1- Sterilization cycle

۹-۵ انبارش

۹-۵-۱ کلیات

هر بسته از بطری‌ها، لوله‌ها و پتری‌دیش‌ها باید با جزئیات زیر برچسب‌گذاری شود:

– نام محیط کشت؛

– تاریخ آماده‌سازی و/ یا تاریخ انقضا.

۹-۵-۲ محیط‌های کشت و واکنشگرهای آماده‌شده در آزمایشگاه

محیط‌های کشت و واکنشگرهای توزیع‌شده در لوله و بطری که بلافاصله مصرف نمی‌شوند، باید با استفاده از درپوش‌های پیچی (با پوشش داخلی بی‌اثر یا خنثی)، در برابر نور و خشک شدن محافظت شوند.

محیط‌های کشت و معرف‌ها را باید تحت شرایطی که ترکیبات آن‌ها تغییر نکند، نگه‌داری کرد.

هرگز از محیط‌های کشت آماده‌ای که رطوبت خود را از دست داده‌اند، استفاده نکنید.

جز در موارد تعیین شده، بهتر است پیش از استفاده، دمای محیط کشت به دمای آزمایشگاه برسد.

مثال:

محیط کشت TSA[1] (آماده‌شده در آزمایشگاه) در ارلن و در تاریکی برای مدت حداکثر دو ماه قابل نگه‌داری است، مگر در موارد خاص که تعیین شده باشد.

۹-۵-۳ محیط‌های کشت و واکنشگرهای آماده مصرف

انبارش محیط‌های کشت و واکنشگرهای آماده مصرف باید با توجه به موارد زیر و مطابق با دستور کار سازنده باشد:

– تاریخ انقضا؛

– درجه حرارت و شرایط انبارش؛

– شرایط استفاده (pH و غیره)؛

– کنترل کارایی.

۹-۶ ذوب کردن محیط‌های کشت آگاری

محیط‌های کشت جامد را با قرار دادن در حمام آب جوش ذوب کنید یا از سایر فرآیندهایی که نتایج یکسان داشته باشند (مانند جریان بخار، بدون فشار در اتوکلاو) نیز می‌توان استفاده کرد.

1- Tryptone soya agar

به‌محض ذوب شدن محیط کشت از حرارت دادن زیاد آن خودداری کنید. محیط را پس از ذوب شدن تا زمان استفاده، در حمام آب با حداکثر دمای $48\ ^{\circ}C$ در حالت ذوب شده نگه‌داری کنید. از محیط کشت ذوب شده بیش از $8\ h$ نگه‌داری نشود. درمورد محیط‌های حساس به حرارت، مدت زمان ذوب شدن باید کوتاه‌تر باشد.

محیط‌های کشت ذوب‌شده و استفاده‌نشده را نباید برای استفاده‌های بعدی، مجددا ذوب کرد.

۹-۷ آماده‌سازی پتری‌دیش‌ها

محیط‌های کشت آگاردار ذوب‌شده را به ضخامت حداقل ۳ mm تا ۴ mm در پتری‌دیش‌های سترون بریزید (برای مثال برای پتری‌دیش‌هایی با قطر ۹۰ mm، حداقل ۱۵ ml تا ۲۰ ml محیط کشت لازم است).

پلیت‌ها را روی سطح افقی و سرد قرار دهید تا آگار آن‌ها ببندد.

محیط‌های کشت آماده‌شده به طریق فوق را سریعاً استفاده کنید یا در شرایطی که از تغییر ترکیبات آن‌ها پیشگیری شود (در تاریکی در دما و زمان مناسب) نگه‌داری کنید. پتری‌دیش‌ها را مطابق زیربند ۵-۹ برچسب‌گذاری کنید.

پیش از استفاده ممکن است خشک کردن پتری‌دیش‌ها لازم باشد.

محیط‌های کشت آگاردار آماده‌شده به‌صورت تجاری در دسترس هستند. این پتری‌دیش‌ها را مطابق دستور کار سازنده نگه‌داری و استفاده کنید.

۱۰ نمونه‌های آزمایشگاهی

۱۰-۱ کلیات

فراورده و نمونه به ترتیب در زیربندهای ۱-۳ و ۲-۳ تعریف شده است.

۱۰-۲ نمونه‌برداری از فراورده‌های آرایشی بهداشتی

نمونه دریافت‌شده توسط آزمایشگاه باید نمایانگر واقعی فراورده‌های آرایشی بهداشتی باشد و هنگام حمل و نقل یا انبارش آسیب ندیده باشند.

نمونه‌برداری باید مطابق با مستندات مناسب و خاصی انجام شود. در صورت عدم وجود مستندات خاص، توصیه می‌شود نمونه‌برداری از محموله براساس توافق انجام شود.

۱۰-۳ حمل و نقل نمونه

هنگام حمل و نقل نمونه به آزمایشگاه، نمونه‌ها باید در شرایطی که تغییرات محتوای میکروبی را به حداقل برساند، نگه‌داری شوند.

۱۰-۴ دریافت و انبارش نمونه

کارکنان آزمایشگاه باید شرایط فراورده‌ها را هنگام دریافت کنترل کنند و مناسب بودن شرایط و تعداد آن را تائید کنند. در صورتی که شرایط رضایت‌بخش نیست و یا مقدار نمونه کافی نیست، انجام آزمون‌های مقرر امکان‌پذیر نیست.

اگرچه در وضعیت‌های خاص در صورت انجام آزمون، کارکنان آزمایشگاه باید شرایط فراورده و دلیل آزمون را ثبت کنند.

فراورده‌هایی که برای آزمون در آزمایشگاه پذیرفته می‌شوند، باید به طریقی مستند شوند که امکان مراحل پایش آن تا زمان تهیه گزارش آزمون وجود داشته باشد.

موارد زیر باید ثبت شود:

- تاریخ دریافت نمونه؛
- مشخصات عملیات نمونه‌برداری (تاریخ نمونه‌برداری، شرایط نمونه‌برداری و غیره)؛
- نام، مرجع و مبدأ و متقاضی محموله؛
- مشخصات فراورده.

فراورده‌های مورد آزمون را در صورت لزوم در درجه حرارت اتاق نگه‌داری کنید. پیش و پس از انجام آزمون از قرار دادن فراورده‌ها و نمونه‌ها در گرمخانه، یخچال و فریزرخودداری کنید.

۱۰-۵ نحوه کار با فراورده‌ها و نمونه‌ها

با فراورده‌ها به‌گونه‌ای کار کنید تا از خطر آلودگی محیط، فراورده و نمونه پیشگیری شود. برای این منظور، از روش‌های اسپتیک[1] شامل مثال‌های زیر استفاده کنید:

- هر وسیله‌ای که برای باز کردن بسته‌بندی‌ها استفاده می‌شود باید سترون باشد؛
- هر وسیله‌ای که برای برداشتن نمونه از فراورده استفاده می‌شود باید سترون باشد؛
- در صورت لزوم بسته‌بندی و پوشش آن را ضدعفونی کنید.

۱۰-۶ نگه‌داری و امحاء فراورده‌ها

به‌جز در موارد خاص، فراورده‌ها را تا زمان حصول کامل نتایج آزمون یا در صورت لزوم تا مدت زمان بیش‌تر نگه‌داری کنید.

1- Aseptic

فراورده‌هایی که از آن نمونه برداشت می‌کنید را دور بریزید، به‌جز در مواردی که ماهیت و میزان آلودگی، به‌گونه‌ای است که توجیه کافی برای طرز عمل با آن به عنوان ماده آلوده، وجود داشته باشد (به زیربند ۸-۶ مراجعه شود).

۱۱ راهکارهای عملیاتی

۱۱-۱ اقدامات احتیاطی در حین آزمون

تا حد امکان، برای انجام آزمون تحت شرایط اسپتیک، اقدامات احتیاطی باید در نظر گرفته شود. برای مثال:

الف- از تمیز بودن محل‌های کار و عدم وجود جریان هوا در آن (بسته بودن درها و پنجره‌ها) اطمینان حاصل شود؛

ب- پیش و پس از انجام کار، سطوح کاری با استفاده از ماده ضدعفونی‌کننده مناسب آلودگی‌زدایی شود؛

پ- پیش از شروع کار، از در دسترس بودن هر آن‌چه که برای آزمون لازم است، اطمینان حاصل شود؛

ت- در مواردی که کار در اتاقک میکروبیولوژی انجام می‌شود، پیش از شروع کار از دستکش سترون استفاده کنید یا دست‌ها را ضدعفونی کنید. از برخورد دست‌ها با بازوها خودداری کنید؛

ث- هنگامی‌که کار در اتاقک میکروبیولوژی انجام نمی‌شود، ظرف نمونه را در مجاور شعله، باز کنید و تا حد امکان آن را در وضعیت مایل نگه دارید؛

ج- بدون انجام هیچ حرکت غیر ضروری، تا حد امکان کار را سریع انجام دهید؛

چ- اگر در طی آزمون، کل محتویات ظرف پی‌پت‌ها و پتری‌دیش‌های یک‌بار مصرف و غیره استفاده نمی‌شود، اطمینان یابید که پس از برداشت پی‌پت و پتری‌دیش، در ظروف به‌طور مناسبی بسته شده است؛

ح- پیش و پس از استفاده، لوپ‌ها و سیم‌های کشت و غیره را به‌وسیله شعله سترون کنید. به‌منظور پیشگیری از پخش شدن مواد و میکروارگانیسم‌ها ترجیحاً از کوره مخصوص سیم کشت و یا از لوپ‌ها و سیم‌های کشت یک‌بار مصرف استفاده کنید؛

خ- پیش از آماده‌سازی، پی‌پت‌ها و قاشقک‌ها[1] و سایر قطعات استفاده‌شده را در ظروف مخصوص که حاوی مواد ضدعفونی‌کننده مناسب (مانند محلول سدیم هیپوکلریت[2] برای پی‌پت‌ها) است قرار دهید (به زیربند ۸-۶ مراجعه شود)؛

د- پیش از عملیات سترون‌سازی، تجهیزات چندبار مصرف را که ممکن است حاوی میکروارگانیسم‌ها باشد به ظروف مخصوص شستشو منتقل کنید؛

1-Spatula
2-Sodium hypochlorite

ذ- پیش از سترون‌سازی یا سوزاندن، وسایل یک‌بار مصرف استفاده‌شده را در ظروف مناسبی قرار دهید (به زیربند ۶-۸ مراجعه شود)؛

ر- با استفاده از دستمال‌های نخی یا هر پارچه مناسب دیگر آغشته به مواد ضدعفونی‌کننده، مواد ریخته‌شده را پاک کنید. سپس قبل از ادامه، سطح کار را تمیزکرده و ضدعفونی کنید.

به‌دلیل احتمال وجود باکتری‌های بیماری‌زا کار با فراورده‌ها و کشت‌های بعدی، نیاز به اقدامات احتیاطی ویژه دارد. برای این منظور استفاده از وسایل زیر توصیه می‌شود:

– اتاقک میکروبیولوژی برای تمام کارهایی که به‌منظور انجام آزمون لازم است؛

– پی‌پت‌های خودکار (پی‌پت کردن با استفاده از مکش دهانی اکیداً ممنوع)؛

یادآوری- دلیل اصلی آلودگی محیطی و عفونت، قطرات ریز هستند. بنابراین به حداقل رساندن تشکیل آن‌ها ضرورت است. برای مثال قطرات ممکن است در موارد زیر تشکیل شوند:

– هنگام استفاده از شیکر و سرنگ و غیره؛

– هنگام تخلیه پی‌پت با دمیدن؛

– هنگام سترون‌سازی مرطوب سیم‌ها و لوپ‌های تلقیح‌شده.

بنابراین ضروریست تا تشکیل آن‌ها به حداقل رسانده شود.

۱۱-۲ آماده‌سازی سوسپانسیون اولیه و رقت‌های نمونه

۱۱-۲-۱ کلیات

هنگام آماده‌سازی سوسپانسیون اولیه و رقت‌های نمونه زمان بین پایان آماده‌سازی تا لحظه تماس ماده تلقیحی با محیط‌های کشت نباید بیش از ۴۵ min باشد، مگر به‌طور خاص در استانداردهای مربوط تعیین شده باشد. سوسپانسیون اولیه از حداقل ۱ g یا ۱ ml از فراورده مورد آزمون که خوب مخلوط شده است تهیه می‌شود.

جرم یا حجم دقیق نمونه (S) را ثبت کنید.

۱۱-۲-۲ فراورده‌های محلول در آب

نمونه (S) آماده‌شده از فراورده را به یک ظرف مناسب منتقل کنید. سپس رقت مناسب و دقیق را مطابق با استاندارد مورد استفاده تهیه کنید.

ضریب رقت (d) را ثبت کنید.

۱۱-۲-۳ فراورده‌های غیر محلول در آب

نمونه (S) آماده‌شده از فراورده را به ظرفی که حاوی مقدار مناسبی از ماده محلول‌کننده (مانند پلی‌سوربات ۸۰[1]) است، منتقل کنید. سپس رقت مناسب و دقیق را مطابق با استاندارد مورد استفاده تهیه کنید.

ضریب رقت (d) را ثبت کنید.

۱۱-۳ روش‌های شمارش

برای شمارش میکروارگانیسم‌ها مطابق با روش‌های استاندارد عمل کنید. برای آگاهی از روش‌های استاندارد شمارش به پیوست **ب** مراجعه شود.

۱۱-۴ روش‌های تشخیص

برای تشخیص میکروارگانیسم‌ها مطابق با روش‌های استاندارد عمل کنید.

۱۲ بیان نتایج

برای بیان نتایج مطابق با روش‌های استاندارد عمل کنید.

۱۳ خنثی‌سازی خواص ضدمیکروبی فراورده‌ها

پیش از تشخیص و شمارش میکروارگانیسم‌های زنده در فراورده‌های آرایشی بهداشتی به دلیل امکان وجود عوامل بازدارنده، ممانعت احتمالی رشد میکروبی به‌وسیله نمونه باید خنثی شود. در تمام موارد و در روش خنثی‌سازی، خصوصیات ضدمیکروبی فراورده‌ها باید بررسی و اثبات شود.

برای خنثی‌سازی خصوصیات ضدمیکروبی فراورده، مطابق با روش‌های استاندارد عمل کنید.

1-Polysorbate 80

پیوست الف

(آگاهی‌دهنده)

روش‌های پایه شناسایی

الف-۱ آماده‌سازی کشت خالص

الف-۱-۱ کلیات

آماده‌سازی کشت خالص را با انتخاب یک کلونی موجود رو یا درون یک محیط کشت آگاردار که با رقتی از آزمایه یا یک کشت تلقیح شده است شروع کنید.

سپس کلونی انتخاب‌شده را روی محیط کشت آگاردار غیر انتخابی تلقیح کنید. بعد از گرمخانه‌گذاری یک کلونی را که به‌خوبی جدا شده است، انتخاب کرده و در صورت لزوم عملیات فوق را تکرار کنید.

از روش کشت خطی مطابق با زیربند الف-۱-۲ استفاده کنید. در موارد خاص، ممکن است کاربرد روش‌های مختلف دیگر لازم باشد.

الف-۱-۲ کشت روی پلیت[1]

الف- ۱-۲-۱ کلیات

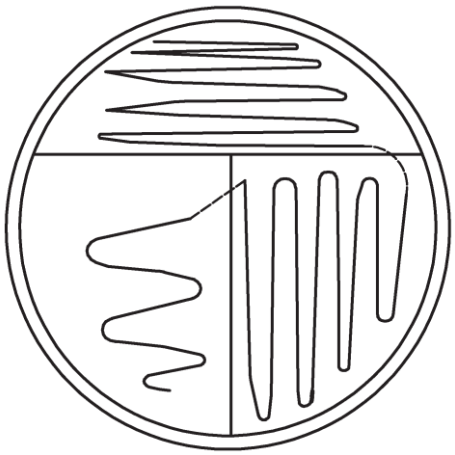
با استفاده از لوپ کشت سترون، مقدار کمی از یک کلونی منفرد را از سطح محیط کشت آگاردار بردارید.

سپس به‌صورت مستقیم با استفاده از سلول‌های موجود در لوپ کشت (به زیربند الف-۱-۲-۲ مراجعه شود) و یا پس از آماده‌سازی سوسپانسیون سلول‌ها (به زیربند الف-۱-۲-۳ مراجعه شود) آن را به‌صورت خطی کشت دهید.

الف-۱-۲-۲ روش مستقیم: مثال

به‌وسیله نوک لوپ کشت، حدود یک سوم سطح آگار را در خطوط نزدیک به‌هم تلقیح کنید. لوپ کشت را سترون و سرد کنید. از کنار سطح تلقیح‌شده، سری دیگری از کشت‌های خطی را تهیه کنید که کم‌تر از اولین خطوط به‌هم نزدیک باشد، بیش از نصف پلیت نباید تلقیح شده باشد. عملیات فوق را روی سطح باقی‌مانده تکرار کنید (به شکل الف-۱ مراجعه شود).

1-Plating out



شکل الف- ۱- شمایی از کشت روی پلیت به‌روش مستقیم

الف-۱-۲-۳ روش استفاده از رقت

با استفاده از لوپ کشت، سلول‌های میکروارگانیسم را در ۱ ml تا ۲ ml از رقت انتخاب‌شده، با سایش لوپ بر دیواره لوله آزمایش در سطح مایع رقیق‌کننده حل کنید. سپس به‌خوبی آن را مخلوط کنید.

لوپ کشت را سترون و خنک کنید. با استفاده از لوپ کشت مقدار کمی از سوسپانسیون میکروبی را برداشته و مطابق بند الف ۱-۲-۲ عمل کنید.

الف-۱-۳ گرمخانه‌گذاری

پتری‌دیش‌های تلقیح‌شده را در مدت زمان و دمای تعیین شده به‌صورت وارونه در گرمخانه قرار دهید.

الف-۱-۴ انتخاب کلونی

پس از پایان زمان گرمخانه‌گذاری، یک کلونی را که به‌خوبی مجزا شده است، برای انجام کشت خطی و آزمون‌ها، انتخاب کنید.

در صورت امکان، بهتر است آزمون نهایی با استفاده از سلول‌های به‌دست آمده از یک کلونی منفرد انجام شود. در صورت ناکافی بودن مواد سلولی در یک کلونی بهتر است ابتدا روی یک محیط کشت مایع یا آگار شیب‌دار، مجدداً کشت داده و از آن برای انجام آزمون‌ها استفاده کنید.

الف-۲ رنگ‌آمیزی گرم[1] (روش اصلاح‌شده هاکر)[2]

الف-۲-۱ کلیات

با این روش رنگ‌آمیزی، امکان توصیف خصوصیات ریخت‌شناسی باکتری‌ها و طبقه‌بندی آن‌ها به دو گروه

1- Gram staining
2- Modified Hucker technique

وجود دارد که بر مبنای عملکرد آن‌ها در توانایی یا عدم توانایی برای حفظ رنگ بنفش کریستال ویوله تحت شرایط آزمون می‌باشد. به‌طورکلی این تقسیم‌بندی به‌دلیل تفاوت در ساختار دیواره سلولی دو گروه و هم‌چنین تفاوت‌های اصلی دیگر است. روش‌های مختلفی برای رنگ‌آمیزی گرم وجود دارد ولی در تمام آن‌ها توالی مراحل مطابق مراحل زیر می‌باشد.

الف-۲-۲ محلول‌ها

الف-۲-۲-۱ کلیات

از محلول‌هایی که به‌صورت تجاری در دسترس هستند، می‌توان استفاده کرد. به‌عنوان مثال روش زیر توصیه می‌گردد:

الف-۲-۲-۲ محلول کریستال ویوله

الف-۲-۲-۲-۱ مواد تشکیل‌دهنده

کریستال ویوله	۲٫۰ g
اتانول (٪ ۹۵)	۲۰ ml
آمونیوم اگزالات ($C_2H_8N_2O_4$)	۰٫۸ g
آب مقطر	۸۰ ml

الف-۲-۲-۲-۲ آماده‌سازی

کریستال ویوله را در اتانول و آمونیوم اگزالات را در آب مقطر حل کنید. پس از مخلوط کردن کامل دو محلول فوق، آن را پیش از استفاده به مدت ۲۴ h بگذارید بماند.

الف-۲-۲-۳ محلول ید

الف-۲-۲-۳-۱ مواد تشکیل‌دهنده

ید	۱ g
پتاسیم یدید (KI)	۲ g
آب مقطر	۱۰۰ ml

الف-۲-۲-۳-۲ آماده‌سازی

پتاسیم یدید را در ۱۰ ml آب مقطر حل کرده و ید را به‌تدریج به آن اضافه کنید. پس از حل شدن کامل، آن را در یک بالن حجم‌سنجی به حجم ۱۰۰ ml برسانید.

الف-۲-۲-۴ محلول سافرانین

الف-۲-۲-۴-۱ مواد تشکیل‌دهنده

سافرانین O	۰٫۲۵ g
اتانول (٪ ۹۵)	۱۰ ml
آب مقطر	۱۰۰ ml

الف-۲-۲-۴-۲ آماده‌سازی

سافرانین را در اتانول حل کرده و با آب مقطر مخلوط کنید. سپس حجم آن را در یک بالن حجم‌سنجی به ۱۰۰ ml برسانید.

در صورتی که کریستال ویوله استفاده می‌شود. پایداری رنگ باید تصدیق شود. برای تصدیق، یک قطره از محلول کریستال ویوله را با یک قطره از محلول ید روی یک لام شیشه‌ای کاملاً مخلوط کنید و واکنش شیمیایی را بررسی کنید. در صورت تشکیل بلور روی لام، محلول کریستال ویوله را استفاده نکنید.

الف-۲-۲-۵ روش رنگ‌آمیزی

از کشت ۱۸ h تا ۲۴ h یا پس از ایجاد کدورت در آبگوشت، گستره‌ای از باکتریایی را روی یک لام میکروسکوپ تهیه کنید. پس از تثبیت لایه فوق روی لام (برای مثال با شعله) آن را با لایه‌ای از محلول کریستال بنفش (به زیربند الف-۲-۲-۲ مراجعه شود) بپوشانید و به مدت یک دقیقه صبر کنید تا با آن واکنش انجام دهد.

در حالی‌که لام را به‌صورت مایل نگه داشته‌اید، آن را به آرامی با آب برای چند ثانیه شستشو دهید.

سپس محلول ید را روی آن بریزید تا سطح آن پوشیده شود (به زیربند الف-۲-۲-۳ مراجعه شود) و یک دقیقه صبر کنید و سپس به آرامی با آب به‌مدت چند ثانیه شستشو دهید.

به آرامی و به‌صورت پیوسته، در حالی که آن را به‌طور مایل نگه داشته‌اید، لایه‌ای از اتانول (٪ ۹۵) را روی لام بریزید. (حداکثر به مدت ۳۰ s تا زمانی که رنگ بنفش شسته شود).

برای حذف اتانول، در حالی که لام را به‌صورت مایل نگه داشته‌اید، به آرامی آن را با آب شستشو دهید.

لام را با محلول سافرانین (به زیربند الف-۲-۲-۴ مراجعه شود) به مدت ۱۰ s بپوشانید.

در حالی که لام را به‌صورت مایل نگه داشته‌اید، به آرامی آن را با آب شستشو دهید.

سپس لام را خشک کنید.

الف-۲-۲-۶ تفسیر

لام را زیر میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی بالا بررسی کنید (زیربند ۱۳-۵). باکتری‌هایی که سلول آن به رنگ آبی و بنفش به نظر می‌رسند گرم مثبت و آن‌هایی که به رنگ صورتی تیره تا قرمز در آمده‌اند، گرم منفی نامیده می‌شوند.

در یک زمینه میکروسکوپ، برای کشت خالص انواع باکتری‌های خاص، هم سلول‌های گرم منفی و هم سلول‌های گرم مثبت قابل مشاهده است.

یادآوری- سلول‌های متراکم‌شده، ممکن است ایجاد پاسخ نامشخص کنند.

الف-۳ آزمایش کاتالاز

الف-۳-۱ کلیات

آنزیم کاتالاز، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) را به آب و اکسیژن تجزیه می‌کند. شناسایی این آنزیم را می‌توان با استفاده از کشت آبگوشتی، کشت آگاردار یا یک تک کلونی در محیط آگاردار انجام داد.

الف-۳-۲ از محیط کشت آبگوشتی

مقدار ۰٫۵ ml از محلول پراکسید هیدروژن ۱۰ حجم (٪ ۳ کسر جرمی) را به ۱ ml از محیط کشت اضافه کنید. تشکیل حباب‌های اکسیژن (کاتالاز مثبت) یا عدم تشکیل حباب‌های اکسیژن (کاتالاز منفی) را مشاهده کنید.

الف-۳-۳ از محیط کشت آگاردار

محیط کشت را با ۱ ml تا ۲ ml از محلول پراکسید هیدروژن ده حجم (٪ ۳ کسر جرمی) بپوشانید. بلافاصله و پس از ۵ min تشکیل یا عدم تشکیل حباب‌های اکسیژن را مشاهده کنید.

الف-۳-۴ از یک کلونی

به‌طور جداگانه دو قطره از محلول پراکسید هیدروژن ده حجم را روی لام میکروسکوپ قرار دهید.
با استفاده از میله شیشه‌ای یا پلاستیکی سترون (به‌ویژه از جنس فلز نباشد) یک کلونی را برداشته و به آرامی در یکی از آن دو قطره حل کنید. بلافاصله و پس از چند دقیقه (حداقل یک دقیقه)، تشکیل یا عدم تشکیل حباب‌های اکسیژن را مشاهده کنید. در صورتی که شک دارید، هر قطره را با یک لام بپوشانید تا زیر هر دو لام ایجاد حباب را مقایسه کنید.
مشاهده حباب‌های اکسیژن ممکن است به روش ماکروسکوپی یا با استفاده از میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی کم انجام شود.

الف-۴ آزمون اکسیداز

الف-۴-۱ کلیات

شناسایی آنزیم اکسیداز به وسیله ایجاد تغییر رنگ یک ترکیب در زمان اکسایش[1] ناشی از فعالیت این آنزیم، انجام می‌شود.

الف-۴-۲ واکنشگر

الف-۴-۲-۱ مواد تشکیل‌دهنده

N´,N´,N,N-تترا متیل ۳-*پارا*-فنیلن‌دی‌آمین دی‌هیدروکلراید[2] ($C_{10}H_{16}N_2.2HCl$)	۱ g
آب مقطر	۱۰۰ ml

الف-۴-۲-۲ آماده‌سازی

واکنشگر فوق را در آب سرد حل کنید. این محلول را بلافاصله پیش از مصرف تهیه کنید.

دیسک‌های آماده یا نوارهای تجاری ممکن است استفاده شود. در این صورت مطابق با توصیه‌های سازنده عمل کنید.

الف-۴-۲-۳ روش

تکه‌ای از کاغذ صافی را با واکنشگر مرطوب کنید. با استفاده از سیم کشت پلاتینی یا میله شیشه‌ای یا پلاستیکی، نمونه‌ای از کشت باکتریایی را از محیط کشت آگاردار برداشته و روی کاغذ صافی مرطوب‌شده قرار دهید (کاربرد سیم کشت از جنس کروم، نیکل پاسخ مثبت کاذب ایجاد می‌کند).

الف-۴-۲-۴ تفسیر نتایج

در صورت وجود آنزیم اکسیداز، ۵ s تا ۱۰ s رنگ بنفش مایل به ارغوانی ظاهر می‌شود. در صورتی که پس از ۱۰ ثانیه تغییر رنگ مشاهده نشود، آزمون اکسیداز، منفی در نظر گرفته می‌شود.

الف-۵ آزمون‌های بیوشیمیائی جهت شناسایی میکروارگانیسم‌ها

برای شناسایی میکروارگانیسم‌ها ممکن است از آزمون‌های بیوشیمیایی در دسترس استفاده شود. اما به‌دلیل اینکه آزمون‌های تجاری از سطح اعتبار یکسانی برخوردار نیستند، کارآیی آزمون‌ها باید پیش از استفاده ارزیابی شود، مگر در مواردی که به‌وسیله سازنده و/ یا سازمان مستقل مناسب بودن آن اثبات شده باشد.

1-Oxidation
2-N,N,N´,N´ Tetramethyl-3-*p*-phenylenediamine dihydrochloride

پیوست ب

(آگاهی‌دهنده)

روش‌های پایه برای شمارش و کشت پلیت

ب-۱ تلقیح به‌روش کشت آمیخته

محیط‌های کشت، پتری‌دیش‌ها، محلول‌های رقیق‌کننده و رقت‌های مورد آزمون را در مقادیر و تعداد متناسب با طرح تلقیح، آماده کنید.

حجم‌های معین از رقت‌های مورد آزمون را در پتری‌دیش‌های برچسب‌گذاری‌شده تلقیح کنید. مطابق با زیربند ۷-۹ حجم معینی از محیط کشت را به هر پتری‌دیش اضافه کنید. بلافاصله محیط کشت ذوب‌شده را با ماده تلقیحی به‌گونه‌ای مخلوط کنید که توزیع یکنواختی از میکروارگانیسم‌ها در کل محیط به‌دست آید. با قراردادن پتری دیش‌ها در یک سطح افقی و خنک صبر کنید تا آگار بسته شود (زمان جامد شدن آگار نباید از ۱۰ min بیش‌تر شود).

ب-۲ تلقیح سطحی

ماده تلقیحی را در مرکز پتری دیش برچسب‌گذاری‌شده روی سطح محیط کشت آگار قرار دهید (آماده‌سازی به روش زیربند ۹-۷). با استفاده از پخش‌کننده شیشه‌ای یا پلاستیکی، ماده تلقیحی را به‌سرعت و به‌طور یکنواخت در سطح محیط کشت پخش کنید و یا پتری‌دیش را تا زمانی که مایع قابل مشاهده روی سطح آگار باقی نماند، بچرخانید.

ب-۳ فیلتراسیون غشایی

با استفاده از مقدار مناسبی از محلول رقیق‌کننده سترون، مقدار مناسبی از نمونه آماده‌شده برای صحه‌گذاری را مرطوب و بلافاصله صاف کنید. سپس مطابق با دستور کار ارائه‌شده برای هر روش آن را شستشو دهید.

صافی غشایی را به سطح پتری‌دیش حاوی محیط کشت آگاردار منتقل کنید.

پیوست پ

(آگاهی‌دهنده)

آماده‌سازی و کالیبراسیون مایع تلقیحی

پ-۱ کشت سویه‌های مرجع

برای بهبود تکرارپذیری و تجدیدپذیری نتایج، توصیه می‌شود از سومین (یا حداقل دومین) کشت مجدد باکتری‌هایی که در محیط کشت آگاردار رشد کرده‌اند و کشت‌های نگه‌داری و آماده شده مطابق استاندارد EN 12353، استفاده کنید. هنگام استفاده از سویه‌های *اشریشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس*، کشت مجدد را در فواصل زمانی ۱۸ h تا ۲۴ h انجام دهید. هنگام استفاده از *کاندیدا آلبیکانس*، نخستین یا دومین کشت بعدی که در مدت زمان ۳۶ h تا ۴۸ h رشد نشان داده است، مناسب می‌باشد.

پ-۲ آماده‌سازی سوسپانسیون‌های سلول

مقدار ۱۰ ml از محلول رقیق‌کننده را در ارلن سترون ۱۰۰ ml حاوی ۵ g سنگ جوش بریزید. یک کلونی کامل به‌دست آمده از محیط کشت آگار را به محلول رقیق‌کننده منتقل کنید. برای جدا شدن سلول‌ها باید از طریق غوطه‌ورسازی لوپ کشت در محلول رقیق‌کننده و ساییدن آن به دیواره لوله آزمایش آن را به‌حالت تعلیق درآورید. لوله آزمایش را به مدت ۲ min تا ۳ min تکان دهید (در صورت امکان از شیکر مکانیکی استفاده کنید). ضمن خودداری از تماس با گویچه‌های شیشه‌ای، بخش رویی سوسپانسیون را برداشته و آن را به ظرف سترون منتقل کنید.

پ-۳ کالیبراسیون سوسپانسیون

با استفاده از محلول رقیق‌کننده و مطابق با داده‌های کالیبراسیون که در آزمایشگاه تهیه شده است، تعداد سلول‌های سوسپانسیون را حدود 1×10^{8} cfu/ml تا 3×10^{8} (برای *کاندیدا آلبیکناس* حدود 1×10^{7} cfu/ml تا 3×10^{7} cfu/ml) تنظیم کنید. برای مثال از دستگاه طیف‌سنجی (با طول موج ۶۲۰ nm ± ۲۰ nm) و سلول‌های شیشه‌ای یک‌بار مصرف ۱۰ mm استفاده کنید. میزان جذب سوسپانسیون را اندازه‌گیری کنید و در صورت لزوم برای رساندن میزان جذب در حد تعیین‌شده، آن را رقیق کنید. مقدار چگالی نوری مناسب، مطابق با سویه مورد استفاده بین ۰٫۱۵۰ تا ۰٫۴۶۰ می‌باشد.

کتاب‌نامه

[1] ISO 6887-1, Microbiology of food and animal feeding stuffs — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۱-۸۹۲۳: سال ۱۳۹۷، میکروبیولوژی زنجیره غذایی- آماده‌سازی آزمایه، سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری برای آزمون‌های میکروبیولوژی- قسمت ۱: مقررات کلی برای آماده‌سازی سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری، با استفاده از استاندارد ISO 6887-1:2017 تدوین شده است.

[2] ISO 7218, Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹: سال ۱۳۹۴، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- الزامات کلی و راهنما برای آزمون‌های میکروبیولوژی، با استفاده از استاندارد ISO 7218:2007+AMD 1:2013 تدوین شده است.

[3] ISO 11133, Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۸۶۶۳: سال ۱۳۹۴، میکروبیولوژی مواد غذایی، خوراک دام و آب- آماده‌سازی، ساخت، ذخیره‌سازی و آزمون عملکرد محیط‌های کشت، با استفاده از استاندارد ISO 11133:2014 تدوین شده است.

[4] ISO/IEC 17025, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ISIRI-ISO-IEC ۱۷۰۲۵: سال ۱۳۸۶، الزامات عمومی برای احراز صلاحیت آزمایشگاه‌های آزمون و کالیبراسیون، با استفاده از استاندارد ISO/IEC 17025:2005 تدوین شده است.

[5] EN 12353, Chemical disinfectants and antiseptics — Preservation of test organisms used for the determination of bactericidal, mycobactericidal, sporicidal and fungicidal activity

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۱۰۵۰۵: سال ۱۳۹۵، ضدعفونی‌کننده‌ها و گندزداهای شیمیایی- نگه‌داری ارگانیسم‌های آزمون مورد استفاده در تعیین فعالیت باکتری‌کشی (شامل لژیونلا)، مایکوباکتری‌کشی ،اسپورکشی ،قارچ‌کشی و ویروس‌کشی (شامل باکتریوفاژها)، با استفاده از استاندارد DIN EN 12353:2013 تدوین شده است.

[6] CTFA. Microbiology Guidelines, pub. Cosmetic, Toiletry and Fragrance Assn., ISBN 1-88261-32-8, 2001

[7] EP. Microbiological examination of non-sterile products (2.6.12 to 2.6.13). European Pharmacopoeia, Fourth Edition, 2002

[8] FDA. Bacteriological Analytical Manual. U.S. Food and Drug Administration, Eighth Edition, 1995

[9] J.P 14:2001, General tests — Microbial limit test, pub. Japanese Pharmacopoeia

[10] JCIA. Microbial test methods for cosmetics, pub. Japanese Cosmetic Industry Association, 1997

[11] USP 28:2005, Microbial limit test ⟨61⟩, pub. U.S. Pharmacopoeia