



جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran
سازمان ملی استاندارد ایران

Iranian National Standardization Organization



استاندارد ملی ایران
۴۲۰۷
تجدیدنظر دوم
۱۳۹۸

INSO
4207
2nd Revision
2020

Modification of
ISO 8199:
2018

کیفیت آب - راهنما و الزامات عمومی
آزمون‌های میکروبی با استفاده از روش
کشت - راهنما

Water quality
– General requirements and guidance for
microbiological examinations by culture –
Guidance

ICS: 07.100.20

استاندارد ملی ایران شماره ۴۲۰۷ (تجدیدنظر دوم): سال ۱۳۹۸

سازمان ملی استاندارد ایران

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

صندوق پستی: 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: ۸۱۱۴-۳۲۸۰۸ (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 ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه 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 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 باتوجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانه 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 پیشنهادهای در کمیته 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 در کمیته ملی طرح، بررسی و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می‌شود. بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می‌شود که بر اساس مقررات استاندارد ملی ایران شماره ۵ تدوین و در کمیته 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)^۱، کمیسیون بین‌المللی الکتروتکنیک (IEC)^۲ و سازمان بین‌المللی اندازه‌شناسی قانونی (OIML)^۳ است و به عنوان تنها رابط^۴ کمیسیون کدکس غذایی (CAC)^۵ 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 محیط‌زیستی 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 استانداردهای کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری کند. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده‌کنندگان از خدمات سازمان‌ها و مؤسسات فعال در زمینه مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدور گواهی سامانه‌های مدیریت کیفیت و مدیریت محیط‌زیستی، آزمایشگاه‌ها و مراکز واسنجی (کالیبراسیون) وسایل سنجش، سازمان ملی استاندارد این گونه سازمان‌ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می‌کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامه 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 ارتقاء 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

«کیفیت آب- راهنما و الزامات عمومی آزمون‌های میکروبی با استفاده از روش کشت- راهنما»

رئیس:

شریعتی، فاطمه
(دکتری بیولوژی دریا)

سمت و/یا محل اشتغال:

عضو هیأت علمی- دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان

دبیر:

فرحناک شهرستانی، لرحیا
(کارشناسی ارشد شیمی آلی)

کارشناس- انجمن کارشناسان استاندارد استان گیلان

اعضا: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)

برادران کتابچی، مریم
(کارشناسی ارشد میکروبیولوژی)

رئیس اداره هماهنگی و تدوین استاندارد- اداره کل استاندارد
گیلان

پورمحمدی، زهرا
(دکتری شیمی فیزیک)

کارشناس- اداره کل استاندارد گیلان

جواهرشناس، مهدی
(کارشناسی ارشد مهندسی بهداشت محیط)

کارشناس سلامت محیط- معاونت بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی
گیلان

حجازی، سیده ضحی
(دکتری شیمی آلی)

مدیر دفتر کنترل کیفیت- شرکت آب و فاضلاب شهری استان
گیلان

زبده فلاحتی، نسیم
(کارشناسی ارشد شیمی آلی)

کارشناس استاندارد

زمانی، حجت‌اله
(دکتری میکروبیولوژی)

عضو هیأت علمی- دانشگاه گیلان

شاملویی، شراره
(دکتری بیوشیمی)

شرکت آب و فاضلاب استان تهران (سهامی خاص)

شقاقی، غلامرضا
(کارشناسی ارشد مهندسی عمران- محیط زیست)

وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی- مرکز سلامت محیط
کار

صمدی، سحر
(کارشناسی ارشد میکروبیولوژی)

رئیس اداره آموزش- اداره کل استاندارد استان گیلان

اعضا: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)

سمت و/یا محل اشتغال:

فرازدل، آزاده (کارشناسی ارشد میکروبیولوژی)	کارشناس - شرکت آب و فاضلاب شهری استان گیلان
محمدی، اسداله (دکتری شیمی آلی)	عضو هیأت علمی - دانشگاه گیلان
مرات حقی، رافیه (دکتری میکروبیولوژی)	عضو مستقل
مسیحا، علیرضا (دکتری میکروبیولوژی)	عضو هیأت علمی - دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان
مقدمی، شهپر (کارشناسی ارشد میکروبیولوژی)	پژوهشگاه استاندارد - پژوهشکده صنایع غذایی و کشاورزی گروه پژوهشی میکروبیولوژی
موقر حسنی، فرحناز (کارشناسی مهندسی مکانیک)	کارشناس - شرکت آب و فاضلاب شهری استان گیلان
میرروشندل، اعظم السادات (دکتری شیمی تجزیه)	رئیس اداره امور آزمایشگاه‌ها - اداره کل حفاظت محیط زیست استان گیلان

ویراستار:

دولتشاهی، رضا (کارشناسی ارشد شیمی کاربردی)	معاون استاندارد سازی و آموزش اداره کل استاندارد استان اصفهان
---	---

فهرست مندرجات

صفحه	عنوان
ح	پیش‌گفتار
ط	مقدمه
۱	۱ هدف و دامنه کاربرد
۱	۲ مراجع الزامی
۲	۳ اصطلاحات و تعاریف
۶	۴ اصول
۶	۵ الزامات عمومی اندازه‌گیری
۶	۵-۱ یکنواختی دما
۷	۵-۲ زمان‌های گرمخانه‌گذاری
۷	۵-۳ حجم‌ها و وزن‌ها
۷	۶ رقیق‌کننده‌ها و محیط‌های کشت
۷	۶-۱ کلیات
۸	۶-۲ الزامات کیفی مواد تشکیل‌دهنده
۸	۶-۳ رقیق‌کننده‌ها
۸	۷ سترون‌سازی و آلودگی‌زدایی
۸	۷-۱ سترون‌سازی دستگاه‌ها و ظروف شیشه‌ای
۹	۷-۲ سترون‌سازی مواد مصرفی
۹	۷-۳ آلودگی‌زدایی ظروف شیشه‌ای و مواد پس از استفاده
۱۰	۷-۴ مدیریت پسماند
۱۰	۸ نمونه‌ها و جابه‌جایی نمونه‌ها
۱۰	۸-۱ نمونه‌برداری
۱۰	۸-۲ آماده‌سازی نمونه
۱۰	۸-۲-۱ آب و سایر ماتریس‌های آبی
۱۱	۸-۲-۲ سوآب‌ها
۱۲	۹ روش‌های شمارش (کمی)
۱۲	۹-۱ تلقیح آزمون‌ها در (یا روی) محیط کشت جامد
۱۲	۹-۱-۱ کلیات
۱۳	۹-۱-۲ روش کشت آمیخته
۱۴	۹-۱-۳ روش کشت سطحی
۱۶	۹-۱-۴ روش فیلتر غشائی

۱۹	۵-۱-۹ گرمخانه‌گذاری
۲۰	۶-۱-۹ شمارش و تایید از محیط کشت جامد
۲۱	۷-۱-۹ راهنمای کلی محاسبه نتایج
۲۳	۸-۱-۹ بیان نتایج
۳۵	۲-۹ شمارش با استفاده از محیط کشت مایع
۴۴	۱۰ روش‌های (کیفی) تشخیص
۴۴	۱-۱۰ کلیات
۴۴	۲-۱۰ روش اجرایی
۴۵	۳-۱۰ عدم قطعیت نتایج آزمون
۴۵	۱۱ ویژگی‌های عملکرد روش‌ها
۴۶	۱۲ کنترل کیفیت تجزیه‌ای
۴۶	۱-۱۲ کلیات
۴۷	۲-۱۲ کنترل کیفیت داخلی
۴۹	۳-۱۲ ارزیابی کیفیت خارجی
۵۰	پیوست الف (آگاهی‌دهنده) معیارهای انتخاب روش
۵۷	پیوست ب (آگاهی‌دهنده) فواصل اطمینان در روش شمارش کلنی و انتخاب روش محاسبه در موارد خاص
۶۱	پیوست پ (الزامی) شمارش و محاسبات با دو پتری دیش در هر رقت
۶۹	پیوست ت (الزامی) مواد تشکیل‌دهنده، آماده‌سازی و آزمون عملکرد رقیق‌کننده‌ها
۷۴	پیوست ث (آگاهی‌دهنده) جدول‌های MPN
۷۸	پیوست ج (آگاهی‌دهنده) تغییرات اعمال شده در این استاندارد در مقایسه با استاندارد منبع
۷۹	کتاب‌نامه

پیش‌گفتار

استاندارد «کیفیت آب- راهنما و الزامات عمومی آزمون‌های میکروبی با استفاده از روش کشت- راهنما» که نخستین بار در سال ۱۳۷۶ تدوین و منتشر شد، بر اساس پیشنهادهای دریافتی و بررسی و تأیید کمیسیون‌های مربوط برای دومین بار مورد تجدیدنظر قرار گرفت و در چهل و هشتمین اجلاس کمیته ملی استاندارد آب و آبفا مورخ ۹۸/۱۱/۵ تصویب شد. اینک این استاندارد به استناد بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن‌ماه ۱۳۷۱، به‌عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

استانداردهای ملی ایران بر اساس استاندارد ملی ایران شماره ۵ (استانداردهای ملی ایران- ساختار و شیوه 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 یا تکمیل این استانداردها ارائه شود، در هنگام تجدیدنظر در کمیسیون فنی مربوط، مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین، باید همواره از آخرین تجدیدنظر استانداردهای ملی ایران استفاده کرد.

این استاندارد جایگزین استاندارد ملی ایران شماره ۴۲۰۷: سال ۱۳۸۶ می‌شود.

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

ISO 8199: 2018, Water quality – General requirements and guidance for microbiological examinations by culture.

مقدمه

فنون تشخیص و شمارش میکروارگانیسم‌ها بر اساس توانایی آن‌ها برای رشد در محیط کشت مشخص شده، ابزاری مهم و گسترده برای ارزیابی میکروبی کیفیت آب است. هدف این استاندارد جمع‌آوری اطلاعات مشترک برای روش‌های مختلف در یک سند واحد است. این کار تکرار جزئیات فنی در استانداردهای مجزا را کاهش داده و انتخاب مناسب‌ترین روش برای یک وضعیت خاص را آسان می‌کند. در راهنماهای دیگر موضوعات کلی مرتبط با این فنون مانند کنترل کیفیت تجزیه‌ای، ویژگی‌های کارآمدی روش و عدم قطعیت نتایج آزمون، گنجانده شده است.

کیفیت آب - راهنما و الزامات عمومی آزمون‌های میکروبی با استفاده از روش کشت - راهنما

هشدار - در این استاندارد به تمام موارد ایمنی مرتبط با کاربرد آن اشاره نشده است. در صورت وجود چنین مواردی، مسئولیت برقراری ایمنی، سلامت و تعیین حدود قوانین کاربری قبل از استفاده به عهده کاربر می‌باشد. مهم - ضروری است که آزمون‌های انجام‌شده بر اساس این استاندارد توسط کارکنان مجرب آموزش‌دیده انجام شود.

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، تعیین الزامات و ارائه راهنما برای ایجاد مهارت‌های معمول برای هر روش کشت آزمون‌های میکروبی آب، به‌ویژه آماده‌سازی نمونه‌ها و محیط‌های کشت و لوازم عمومی و ظروف شیشه‌ای است، مگر این‌که در استاندارد خاصی غیر از آن مورد نیاز باشد. این استاندارد علاوه بر تشریح روش‌های مختلف موجود برای تشخیص و شمارش از طریق محیط کشت، معیارهایی را نیز برای تعیین روش مناسب ارائه می‌دهد.

این استاندارد بیشتر برای بررسی باکتری‌ها، مخمرها و کپک‌ها در نظر گرفته می‌شود، اما در برخی جنبه‌ها برای باکتریوفازها، ویروس‌ها و انگل‌ها نیز کاربرد دارد. این استاندارد فنونی را که مبتنی بر کشت میکروارگانیسم‌ها نیست مانند روش‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)^۱، در بر نمی‌گیرد.

۲ مراجع الزامی

در مراجع زیر ضوابطی وجود دارد که در متن این استاندارد به صورت الزامی به آن‌ها ارجاع داده شده است. بدین ترتیب، آن ضوابط جزئی از این استاندارد محسوب می‌شود.

در صورتی که به مرجعی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد، اصلاحیه‌ها و تجدید نظرهای بعدی آن برای این استاندارد الزام‌آور نیست. در مورد مراجعی که بدون ذکر تاریخ انتشار به آن‌ها ارجاع داده شده است، همواره آخرین تجدیدنظر و اصلاحیه‌های بعدی برای این استاندارد الزام‌آور است.

استفاده از مراجع زیر برای کاربرد این استاندارد الزامی است:

2-1 ISO 7704, Water quality — Evaluation of membrane filters used for microbiological analyses

1- Polymerase Chain Reaction

یادآوری - استاندارد ملی ایران شماره ۷۹۹۳: سال ۱۳۸۴، کیفیت آب- ارزیابی صافی های غشائی مورد استفاده برای آزمون های میکروبیولوژی، با استفاده از استاندارد ISO 7704: 1985، تدوین شده است.

2-2 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- آماده سازی، ساخت، ذخیره سازی و آزمون عملکرد محیط های کشت، با استفاده از استاندارد ISO 11133: 2014، تدوین شده است.

2-3 ISO 19458, Water quality — Sampling for microbiological analysis

یادآوری - استاندارد ملی ایران شماره ۴۲۰۸: سال ۱۳۸۶، کیفیت آب- نمونه برداری از آب برای آزمون های میکروبیولوژی- آئین کار، با استفاده از استاندارد ISO 19458: 2006، تدوین شده است.

۳ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد، اصطلاحات با تعاریف زیر به کار می رود^۱:

۱-۳

درستی

accuracy

نزدیکی مطابقت بین نتیجه آزمون و مقدار مرجع پذیرفته شده.

[منبع: برگرفته از زیربند 1 استاندارد ISO 6107-8:1993، تغییر یافته: یادآوری حذف شده است.]

۲-۳

اریبی

bias

اختلاف بین مقادیر مورد انتظار از نتایج آزمون و مقدار مرجع پذیرفته شده.

[منبع: برگرفته از زیربند ۳-۸ استاندارد ملی ایران شماره ۷۴۴۲-۱ سال ۱۳۸۳، تغییر یافته: یادآوری ۱ حذف شده است.]

۳-۳

شمارش تایید شده

confirmed count

شمارش (مطابق با زیربند ۳-۴) اصلاح شده برای شمارش های فرضی (مطابق با زیربند ۳-۹) تایید نشده از طریق آزمون بیشتر موارد فرضی.

۱- اصطلاحات و تعاریف به کار رفته در استانداردهای ISO و IEC در وبگاه های <http://www.iso.org/obp> و <http://www.electropedia.org> قابل دسترس است.

۴-۳

شمارش

count

«میکروبیولوژی» تعداد موارد مشاهده شده مانند کلنی‌ها یا سلول‌های تعیین شده از طریق شمارش مستقیم یا تخمین محتمل‌ترین تعداد (MPN)^۱ براساس محاسبه آماری با استفاده از تعداد واحدهای مثبت یا واحدهای مثبت احتمالی در یک سری رقیق‌سازی از نمونه آزمون (مطابق با زیربند ۳-۱۶)

[منبع: برگرفته از زیربند 22 استاندارد ISO 6107-6:2004، تغییر یافته: واحدهای مثبت احتمالی اضافه شده است.]

۵-۳

سطح تشخیص

detection level

کمینه غلظت ارگانیس‌هایی که وقتی در محیط کشت معینی تلقیح شده و تحت شرایط تعریف شده‌ای گرمخانه‌گذاری می‌شوند، شواهدی از رشد با احتمال $p = 0.95$ ظاهر می‌کنند.

یادآوری- از نظر تئوری این تعریف با میانگین سه سلول زنده در یک مایه تلقیح مطابقت دارد.

[منبع: برگرفته از زیربند ۳-۱۰ استاندارد ملی ایران شماره ۱۵۶۶۲ سال ۱۳۹۷]

۶-۳

تجدیدنظری بین آزمایشگاهی

دقت میانگین

intralaboratory reproducibility intermediate precision

نزدیکی توافق بین نتایج آزمون حاصل شده با روش یکسان بر روی مواد آزمون یکسان یا مشابه در آزمایشگاه یکسان با استفاده از تجهیزات مختلف توسط کاربران متفاوت.

۷-۳

حد تعیین

limit of determination

کمترین غلظت آنالیت در هر بخش تجزیه‌ای که در آن عدم قطعیت استاندارد نسبی مورد انتظار، برابر با یک مقدار مشخص شده است.

[منبع: برگرفته از زیربند ۳-۱۷ استاندارد ملی ایران شماره ۱۵۶۶۲ سال ۱۳۹۷]

۸-۳

دقت

precision

نزدیکی توافق بین نتایج حاصل از آزمون مستقل تحت شرایط مشخص.

[منبع: برگرفته از زیربند ۳-۱۲ استاندارد ملی ایران شماره ۱-۷۴۴۲ سال ۱۳۸۳، تغییر یافته: یادآوری ۱ تا ۳ حذف شده است]

۹-۳

شمارش فرضی

presumptive count

تخمین شمارش کلنی‌ها (مطابق با زیربند ۳-۴) یا محتمل‌ترین تعداد (MPN) بر اساس تعداد کلنی‌ها یا دیش واکنشی که نمود ظاهری دارند به عنوان نمونه‌ای از یک ارگانیزم هدف، قابل تفسیر است.

[منبع: برگرفته از زیربند 62 استاندارد ISO 6107-6:2004 تغییر یافته: دیش واکنش با لوله‌های تخمیر جایگزین شده است.]

۱۰-۳

انحراف معیار نسبی

u_{rel}

relative standard deviation

تخمینی از انحراف معیار جمعیت نمونه از n نتیجه به دست آمده تقسیم بر میانگین نمونه است.

[منبع: برگرفته از زیربند ۳-۳۰ استاندارد ملی ایران شماره ۱۵۶۶۲ سال ۱۳۹۷]

۱۱-۳

تکرارپذیری

تکرارپذیری اندازه‌گیری

repeatability

measurement repeatability

دقت (مطابق با زیربند ۳-۸) اندازه‌گیری تحت مجموعه‌ای از شرایط تکرارپذیری (مطابق با زیربند ۳-۱۲) اندازه‌گیری را گویند.

[منبع: برگرفته از زیربند ۳-۳۲ استاندارد ملی ایران شماره ۱۵۶۶۲ سال ۱۳۹۷]

۱۲-۳

شرایط تکرارپذیری

repeatability conditions

وضعیت اندازه‌گیری، از میان مجموعه شرایطی که در آن روش اندازه‌گیری، کاربران، سیستم اندازه‌گیری، شرایط عملیاتی و موقعیت مکانی یکسان است و اندازه‌گیری‌های تکراری روی نمونه‌های یکسان یا مشابه طی یک دوره کوتاه زمانی انجام می‌شود.

[منبع: برگرفته از زیربند ۳-۳۳ استاندارد ملی ایران شماره ۱۵۶۶۲ سال ۱۳۹۷]

۱۳-۳

تجدیدپذیری

تجدیدپذیری اندازه‌گیری

reproducibility

measurement reproducibility

دقت (مطابق با زیربند ۳-۸) اندازه‌گیری تحت شرایط تجدیدپذیری (مطابق با زیربند ۳-۱۴) اندازه‌گیری است.

یادآوری - اصطلاحات آماری مربوط در استانداردهای ملی ایران به شماره ۱-۷۴۴۲ و ۲-۷۴۴۲ ارائه شده است.

[منبع: برگرفته از زیربند ۳-۳۴ استاندارد ملی ایران شماره ۱۵۶۶۲ سال ۱۳۹۷]

۱۴-۳

شرایط تجدیدپذیری

reproducibility conditions

وضعیت اندازه‌گیری، از میان مجموعه شرایطی که در آن سیستم‌های اندازه‌گیری، کاربران و مکان‌های اندازه‌گیری متفاوت بوده و اندازه‌گیری‌های تکراری روی نمونه‌های یکسان یا مشابه انجام می‌شود.

[منبع: برگرفته از زیربند ۳-۳۵ استاندارد ملی ایران شماره ۱۵۶۶۲ سال ۱۳۹۷]

۱۵-۳

آزمونه

test portion

مقدار مشخصی از نمونه که برای آنالیز به کار می‌رود.

مثال:

۱ ml، ۰٫۱ ml، ۱ ml، ۱۰۰ ml نمونه.

۱۶-۳

نمونه آزمون

test sample

آزمونه (مطابق با زیربند ۳-۱۵) رقیق‌سازی نشده، رقیق‌سازی شده یا تهیه شده به هر روش دیگر از نمونه‌ای که قرار است آزمون شود، پس از اتمام کلیه مراحل آماده‌سازی مانند سانتریفوژ، فیلتراسیون، همگن‌سازی، تنظیم pH و تعیین قدرت یونی است.

[منبع: برگرفته از زیربند 92 استاندارد ISO 6107-6:2004، تغییر یافته: یادآوری ۱ حذف شده است.]

۱۷-۳

صحت

trueness

نزدیکی توافق بین مقدار میانگین به دست آمده یک مجموعه بزرگ از نتایج آزمون و یک مقدار مرجع پذیرفته شده است.

یادآوری - صحت به طور معمول بر حسب اریبی (مطابق با زیربند ۳-۲) بیان می شود.

[منبع: برگرفته از زیربند 63 استاندارد ISO 6107-8:1993]

۱۸-۳

عدم قطعیت شمارش

uncertainty of counting

انحراف معیار نسبی (مطابق با زیربند ۳-۱۰) نتایج شمارش مکرر کلنی ها یا ذرات پلیت (های) یا فیلد (های) یکسان تحت شرایط مشخص (همان شخص، اشخاص مختلف در یک آزمایشگاه یا آزمایشگاه های مختلف) است.

[منبع: برگرفته از زیربند 103 استاندارد ISO 6107-6: 2004، تغییر یافته: دامنه حذف شده است.]

۴ اصول

اصول کلی این روش ها شامل تلقیح آزمونه یک نمونه آب یا نمونه آزمون حاصل شده پس از فیلتراسیون غشائی یا سانتریفوژ، به محیط کشت (جامد یا مایع) است. فرض بر این است که پس از گرمخانه گذاری، هر میکروارگانیسم هدف، تکثیر می یابد که یا به طور مستقیم روی محیط کشت جامد، کلنی قابل مشاهده ایجاد می کند یا موجب تغییرات در ویژگی های ظاهری محیط کشت مایع می شود. انتخاب یک روش کشت خاص نه تنها به ماهیت و تعداد میکروارگانیسم های مورد جستجو، بلکه به ماهیت آب و دلایل بررسی نیز بستگی دارد.

۵ الزامات عمومی اندازه گیری

۱-۵ یکنواختی دما

در زیر، محدوده های پذیرفته شده دما و محدوده های آن ها برای گرمخانه گذاری یا ذخیره سازی ذکر شده است که برای ارگانیسم هدف مورد نظر مناسب بوده، مگر این که در استاندارد خاص، شرط لازم جز این باشد.

دماهای ذخیره سازی: $^{\circ}\text{C}$ (۵ ± ۳)؛ $^{\circ}\text{C}$ (۵ ± ۲۰)؛ $^{\circ}\text{C}$ (۱۰ ± ۷۰) -

دماهای گرمخانه گذاری: $^{\circ}\text{C}$ (۵ ± ۴۴)؛ $^{\circ}\text{C}$ (۲ ± ۳۶)؛ $^{\circ}\text{C}$ (۲ ± ۲۲)

دمای بازپخت محیط کشت^۱: ۴۴ °C تا ۴۷ °C

جهت حصول اطمینان از رشد مطلوب، محدوده‌های دمایی بالاتر گرمخانه‌گذاری باید به‌طور دقیق رعایت شود. محدوده‌های دمایی پایین‌تر ممکن است برای مدت کوتاهی افزایش یابد، برای مثال به دلیل باز کردن در گرمخانه، اما توصیه می‌شود به سرعت به دمای عملیاتی بازگردد.

۲-۵ زمان‌های گرمخانه‌گذاری

در زیر، محدوده‌های زمانی پذیرفته‌شده برای گرمخانه‌گذاری ذکر شده است که برای ارگانیسم هدف مورد نظر مناسب بوده، مگر این‌که در استاندارد خاص، شرط لازم جز این باشد.

زمان‌های گرمخانه‌گذاری: $(21 \pm 3) \text{ h}$ ؛ $(44 \pm 4) \text{ h}$ ؛ $(68 \pm 4) \text{ h}$

۳-۵ حجم‌ها و وزن‌ها

تجهیزات اندازه‌گیری باید متناسب با درستی و دقت مورد نیاز باشند. محدوده پذیرفته‌شده در جایی که مقدار اعلام‌شده برای کارایی روش و نتایج آزمون بسیار مهم است، $\pm 2\%$ و در مواردی که مقدار اعلام‌شده مهم نیست، $\pm 5\%$ می‌باشد. حجم ماده تلقیح و رقیق‌کننده، از جمله مقادیر مهمی هستند که به‌طور مستقیم بر نتایج آزمون تأثیر می‌گذارند. برای رواداری‌های مربوط به جرم اجزای مورد استفاده در تهیه محیط کشت، به استاندارد ISO 11133 مراجعه شود.

یادآوری - برای به‌حداقل رسیدن عدم قطعیت نتایج آزمون، رواداری‌های مهم در 2% تعیین شده است.

۶ رقیق‌کننده‌ها و محیط‌های کشت

۱-۶ کلیات

الزامات عمومی برای آماده‌سازی، تولید، سترون‌سازی، ذخیره‌سازی و استفاده محیط کشت در استاندارد ISO 11133 آمده است.

برای تهیه محیط کشت میکروبی، به جز در مواردی که استاندارد خاص هر میکروارگانیسم مشخص شده است، به جای این‌که اجزای ترکیبی را به حجم معینی برسانید باید حجم معینی از آب به آن‌ها اضافه کنید.

قبل از استفاده از محیط کشت یا رقیق‌کننده‌ها، با توجه به روش‌های توصیف‌شده در استانداردهای ISO 11133 و ISO 7704 یا مطابق استاندارد خاص، کیفیت محیط کشت، رقیق‌کننده‌ها، فیلترهای غشائی و واکنشگرها را بررسی کنید.

1- Media tempering temperature

برای کسب اطلاعات بیشتر در زمینه ذخیره سازی محیط کشت، به استاندارد ISO 11133 مراجعه شود.

۲-۶ الزامات کیفی مواد تشکیل دهنده

از اجزای سازنده با کیفیت یکنواخت و مواد شیمیایی با درجه خلوص تجزیه ای برای تهیه محیط کشت استفاده کنید. سایر رده های مواد شیمیایی، به شرطی که نتایج مشابهی را نشان دهند نیز می تواند مورد استفاده قرار گیرد. به عنوان جایگزین، از محیط های کشت کامل آب گیری شده^۱ یا رقیق کننده ها نیز می توانید استفاده کنید. دستورالعمل سازنده را به طور دقیق اجرا نمایید.

برای کسب اطلاعات بیشتر در زمینه کیفیت مواد تشکیل دهنده و کیفیت آب مورد استفاده برای آماده سازی محیط کشت، به استانداردهای ISO 11133 و ISO 3696 [6] مراجعه شود.

۳-۶ رقیق کننده ها

به طور معمول از رقیق کننده های زیر در میکروبیولوژی آب استفاده می شود. با این وجود، این فهرست جامع نیست و سایر رقیق کننده های مناسب نیز می توانند مورد استفاده قرار گیرند:

- محلول نمک؛

- رقیق کننده پپتون؛

- محلول نمک پپتون [رقیق کننده بیشینه بازیابی (MRD)]^۲؛

- محلول رینگر یک چهارم^۳؛

- محلول بافر فسفات.

دستورالعمل های فرمول بندی و آماده سازی، ذخیره سازی و اجرای آزمون ارائه شده در پیوست «ت» را برای این رقیق کننده ها رعایت کنید.

۷ سترون سازی و آلودگی زدایی

۱-۷ سترون سازی دستگاه ها و ظروف شیشه ای

دستگاه ها و ظروف شیشه ای غیرسترون را با یکی از روش های زیر سترون کنید:

الف- در یک آون، در دمای $(170 \pm 10)^\circ\text{C}$ حداقل به مدت ۱ h (به استثنای زمان پیش گرمایش)؛

ب- در یک اتوکلاو، در دمای $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ حداقل به مدت ۱۵ min.

1- Dehydrated media

2- Maximum Recovery Diluent

3- Quarter-strength Ringer's solution

ممکن است بعضی از مواد ناپایدار در برابر حرارت، نیاز به سترون سازی به روش های دیگر داشته باشند (برای مثال تابش یا نور ماوراء بنفش)، اما این روش ها در آزمایشگاه های متداول انجام نمی شود.

۲-۷ سترون سازی مواد مصرفی

در صورت مشابهت ویژگی ها، می توان از تجهیزات و کالاهای یک بار مصرف سترون به جای وسایل قابل استفاده مجدد (ظروف شیشه ای، پتری دیش^۱، پیپت ها، بطری ها، لوله ها، فیلدوپلاتین، سواب ها^۲ و غیره) استفاده کرد.

در صورت سترون نبودن فیلترهای غشایی، این فیلترها را به طور معمول با حرارت مرطوب بر اساس فرایند ب تشریح شده در زیربند ۷-۱ یا استفاده از دستورالعمل های شرکت سازنده، سترون کنید.

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

جهت آلودگی زدایی مواد و دفع آن ها، بهتر است در محفظه یا بسته های مناسب به طور مثال در کیسه های پلاستیکی قابل اتوکلاو، قرار داده شوند. اتوکلاو روش ترجیحی برای تمام فرایندهای آلودگی زدایی (حداقل ۳۰ min در دمای ۱۲۱ °C) است. اتوکلاو باید به گونه ای بارگذاری شود که نفوذ حرارت به محتویات داخل آن (به طور مثال، تعداد بسته ها بیش از ظرفیت اتوکلاو نباشد) به خوبی صورت گیرد. برای جلوگیری از فشردگی خطرناک و بیش از حد محفظه اتوکلاو، دقت کنید که کلاهک ها/سرپوش ها شل بوده و سر کیسه ها باز باشند، زیرا این مسئله می تواند منجر به شکستگی احتمالی بطری های شیشه ای یا انفجار آن ها شود. ممکن است اتوکلاوهای مدرن نیاز به شل کردن کلاهک نداشته باشند، اما دستورالعمل شرکت سازنده را به منظور اجتناب از فشردگی خطرناک و بیش از حد محفظه اتوکلاو به طور دقیق اجراء کنید.

از سایر روش های جایگزین می توان به جای اتوکلاو کردن استفاده کرد.

تمام تجهیزاتی که در تماس با محیط های کشت میکروبی (محیط های کشت جامد یا مایع) قرار دارند، از جمله ظروف قابل استفاده مجدد را قبل از شستن، اتوکلاو کنید.

به هنگام انجام آزمون، آلودگی زدایی لوازم کوچک و مقاوم در برابر خوردگی (همچون پیپت ها) از طریق غوطه وری در ماده گندزدای تازه تهیه شده با رقت صحیح، امکان پذیر است.

ممکن است تمیز کردن پیپت های پاستور دشوار باشد و به طور معمول پس از یک بار استفاده دور انداخته می شوند.

بیشتر مواد گندزدا دارای اثرات سمی هستند. به هنگام استفاده از مواد گندزدا، دستکش و محافظ چشم را بپوشید و دستورالعمل های سازنده را رعایت کنید.

1- Petri dishes

2- Swab

۴-۷ مدیریت پسماند

دفع صحیح مواد آلوده به طور مستقیم بر کیفیت آنالیز نمونه تاثیر نمی گذارد و این امر از مدیریت خوب آزمایشگاه است. توصیه می شود، سیستم شناسایی و جداسازی پسماند و بسته های آنها برای موارد زیر ایجاد شود:

- پسماندهای غیرآلوده (برای مثال نمونه های آب کشت نشده) که می توانند با استفاده از روش های معمولی پسماند دفع شوند؛
 - اسکالپل ها^۱، سوزن ها و شیشه های شکسته؛
 - مواد آلوده برای اتوکلاو کردن و بازیافت؛
 - مواد آلوده برای اتوکلاو کردن و دفع یا فقط برای دفع در صورتی که مواد باید سوزانده شود.
- مواد آلوده با میکروارگانیسم های دسته ریسک ۳ و ظروف آنها قبل از سوزاندن باید اتوکلاو شوند.

۸ نمونه ها و جابه جایی نمونه ها

۱-۸ نمونه برداری

نمونه برداری ها را طبق استاندارد ISO 19458 انجام دهید. نمونه های آب گندزدایی شده را در بطری های نمونه حاوی خنثی کننده های مناسب و کافی جمع آوری کنید.

۲-۸ آماده سازی نمونه

۱-۲-۸ آب و سایر ماتریس های آبی

بهتر است به منظور کاهش احتمالی آلودگی متقاطع، آب پاک و آب آلوده با استفاده از تجهیزات مجزا و در محلی مجزا از هم پردازش شوند. به طور جایگزین، سری های^۲ آب تمیز را قبل از آب کثیف پردازش کنید.

پیش از انجام آزمون، برای دستیابی به توزیع یکنواخت میکروارگانیسم ها و سایر ذرات، نمونه ها را با همزن به طور کامل مخلوط کنید. این کار را می توان با وارونگی بطری نمونه آب یا حرکت آن به جلو و عقب انجام داد. با توجه به ماهیت آب و محتوای میکروبی پیش بینی شده، در این مرحله رقت های لازم را تهیه کنید.

برای شمارش پلیت ها، به طور معمول از رقت های یک دهم استفاده می شود. برای فیلتراسیون غشائی (با سطح کوچک تر) استفاده از رقت های پایین تر توصیه می شود. در اکثر روش های محتمل ترین تعداد (MPN)، رقیق سازی بخشی ضروری از روش کار است. برای کسب اطلاعات بیشتر در خصوص

1- Scalpels

2- Batches

رقیق‌سازی‌ها در روش‌های MPN به زیربند ۹-۲-۳ مراجعه شود. برای تهیه رقت‌های سری، به استاندارد ISO 6887-1 [7] مراجعه شود.

برای رقت‌های ۱۰ برابر، در شرایط استریل ۹ حجم رقیق‌کننده و یک حجم نمونه آب را به بطری‌ها یا لوله‌های رقیق‌کننده سترون اضافه کنید. به‌عنوان جایگزین، از حجم‌های رقیق‌کننده از پیش سترون‌شده در بطری‌های درپيچ‌دار استفاده می‌شود و حجم‌ها پس از اتوکلاو کردن کنترل می‌شوند. با انتقال یک حجم از نمونه آب به ۹ حجم رقیق‌کننده، رقت‌های ۱۰ برابر یا بیشتر تهیه کنید. با استفاده از یک پيپت جدید یا ابزار مکانیکی، محلول را به‌طور کامل مخلوط کنید و یک حجم از این محلول را به ۹ حجم رقیق‌کننده دیگر انتقال دهید. مراحل فوق را چندین بار تا به‌دست آوردن رقت لازم تکرار کنید. برای تمام آزمون‌هایی که باید روی هر نمونه آب انجام شود، حجم‌های کافی از هر رقت را تهیه کنید.

برای رقت‌هایی غیر از ۱۰ برابر، حجم رقیق‌کننده به حجم نمونه براساس رقت مورد نظر تنظیم می‌شود. برای مثال در تهیه رقت‌های ۴ برابر مانند تهیه رقت‌های ۱۰ برابر عمل کنید فقط یک حجم نمونه آب را با ۳ حجم رقیق‌کننده مخلوط کنید. رویکرد دیگر این است که از یک سری رقت ده برابری استفاده کنید، اما هر دو حجم ۱۰ ml و ۳۰ ml را فیلتر کنید.

در صورتی که انتظار می‌رود غلظت ارگانیسم‌های هدف بالا باشد، مراحل رقیق‌سازی ۱۰۰ برابر را می‌توان از طریق مخلوط یک حجم نمونه آب با ۹۹ حجم رقیق‌کننده مورد استفاده قرار داد، اما چنین فواصل بزرگی بین اندازه‌گیری‌ها می‌تواند بر قابلیت اطمینان نتایج آزمون تاثیر نامطلوب بگذارد.

۸-۲-۲ سواب‌ها

۸-۲-۲-۱ کلیات

در برخی از مواقع، جهت ارزیابی کیفیت آب‌ها همچون بررسی بیوفیل‌ها و انجام روش‌های کمی یا کیفی آزمون‌ها از سواب‌ها استفاده می‌شود.

انواع مختلف سواب‌ها برای مقاصد خاص، از جمله سواب چوبی و اسفنجی، دارای عوامل خنثی‌کننده یا فاقد آن برای هرگونه مواد گندزدا در دسترس هستند. در مواردی که احتمال طولانی شدن زمان انتقال نمونه قبل از انجام آزمون، وجود داشته باشد توصیه می‌گردد از سواب‌های مخصوص انتقال که دارای قابلیت حفاظت از ارگانیسم‌های موجود هستند، استفاده شود. بهتر است، کلیه سواب‌ها قبل از استفاده ارزیابی شوند، زیرا مشخص شده است بعضی از آن‌ها بازدارنده برخی از میکروارگانیسم‌ها هستند. برای کسب اطلاعات بیشتر در مورد استفاده از سواب‌ها و فنون استفاده از سواب به استاندارد ISO 18593 [18] مراجعه شود.

یادآوری - سواب‌های خشک چوبی برای آزمون میکروبی مناسب نیستند زیرا آن‌ها هیچ‌گونه حفاظتی در برابر از دست‌دادن آب یا باقی‌مانده گندزداها برای میکروارگانیسم‌های موجود طی انتقال و ذخیره‌سازی، پیش از آزمون ندارند.

۸-۲-۲-۲ آماده‌سازی سوآب چوبی

سوآب‌های چوبی در محلول خنثی‌کننده، به‌صورت دستی یا چرخشی، به‌طور کامل با محلول مخلوط می‌شوند. سوآب‌های انتقال به آگار به‌دقت از بسته‌بندی خارج شده و در یک حجم (به‌طور معمول ۱۰ ml) رقیق‌کننده غوطه‌ور می‌شود. سپس چوب شکسته یا قطع می‌شود تا امکان اختلاط کامل در بطری یا لوله مهر و موم شده فراهم شود. به‌منظور بهینه‌سازی بازیابی هرگونه ارگانیسم‌های موجود، محلول را به‌صورت دستی یا هر روش دیگر، مانند چرخشی، تکان دادن یا فراصوت، مخلوط کنید.

در هر دو مورد، سوسپانسیون‌های حاصل به‌عنوان رقیق‌کننده اولیه مورد استفاده قرار می‌گیرد و نتایج مطابق با آن بیان می‌شود.

۸-۲-۲-۳ آماده‌سازی سوآب اسفنجی

برای انجام آزمون کیفی، سوآب‌های اسفنجی توصیه می‌شود تا اطمینان حاصل گردد که نمونه نمایانگر، برداشته شده و نتیجه «شناسایی نشده» بر اساس نمونه با حجم بزرگ‌تر، قابل اطمینان‌تر است. این سوآب‌ها حاوی مقداری از ماده خنثی‌کننده کافی برای محافظت از ارگانیسم‌های موجود طی انتقال است که باعث می‌شود استفاده از آن‌ها برای آزمون کمی مشکل‌ساز باشد، مگر این‌که این مقدار مشخص باشد و بتوان آن را در محاسبات بعدی در نظر گرفت.

هنگام پذیرش نمونه در آزمایشگاه، حجم بیش‌تری (به‌طور معمول ۱۰۰ ml) براث^۱ (محیط کشت مایع) به عنوان (پیش) غنی‌سازی به سوآب در بسته‌بندی اولیه اضافه می‌شود و آزمون مطابق با روش خاص ادامه می‌یابد.

۹ روش‌های شمارش (کمی)

۹-۱ تلقیح آزمون‌ها در (یا روی) محیط کشت جامد

۹-۱-۱ کلیات

آزمونه نمونه آب یا هر رقت تهیه‌شده به‌صورت مستقیم یا تغلیظ‌شده روی یک فیلتر غشایی، در سطح یک محیط کشت جامد مشخص یا در یک محیط کشت ذوب‌شده تلقیح می‌شود، تا پس از گرمخانه‌گذاری بر روی سطح محیط یا درون آن کلنی تشکیل شود.

به‌منظور اهداف عملی، هر کلنی منشاء یک میکروارگانیسم منفرد یا دسته‌ای از میکروارگانیسم‌های موجود در آزمون هنگام تلقیح است. با در نظر گرفتن حجم آزمون و تعداد کلنی‌های تشکیل‌شده، نتیجه

1- Broth

به صورت تعداد واحدهای تشکیل دهنده کلنی (cfu)^۱ یا ذرات تشکیل دهنده کلنی (cfp)^۲ در حجم معینی از نمونه (برای مثال ۱ ml یا ۱۰۰ ml) بیان می شود.

به طور عمده از سه روش برای تلقیح به محیط کشت جامد استفاده می شود و انتخاب روش بستگی به چندین عامل دارد. این عوامل شامل ویژگی های فیزیکی و شیمیایی آب و هم چنین ماهیت میکروارگانیسم های مورد نظر، غلظت احتمالی آن ها، بازیابی موثر میکروارگانیسم های تحت تنش یا بیش از حد آسیب دیده^۳ و دقت آزمون و حساسیت می باشد. موارد مربوط به حجم نمونه آب مورد استفاده در هر روش در زیربندهای ۲-۲-۱-۹، ۲-۳-۱-۹ و ۲-۴-۱-۹، ارائه شده است.

یادآوری ۱- محدودیت های اندازه گیری و درستی روش های مختلف در پیوست الف-۲ مورد بحث قرار می گیرد.

یادآوری ۲- ماهیت نمونه و ارگانیسم های مورد نظر در پیوست الف-۳ مورد بحث قرار می گیرد.

۲-۱-۹ روش کشت آمیخته

۱-۲-۱-۹ کلیات

در این روش آزمون به محیط کشتی که از قبل ذوب شده و تا دمای نزدیک به بسته شدن یعنی 44°C تا 47°C خنک شده (بازپخت)، مخلوط می شود به طوری که آسیب ناشی از گرما به ارگانیسم ها به حداقل برسد. پس از گرمخانه گذاری، کلنی های تشکیل شده روی سطح و درون محیط کشت شمارش می شوند.

۲-۲-۱-۹ آزمون

حجم آزمون یا رقتی از نمونه می تواند با توجه به اندازه پتری دیش و حجم محیط کشت مورد استفاده، بین ۰/۱ ml و ۵ ml متغیر باشد. بهتر است، رقت به گونه ای انتخاب شود که تعداد مورد انتظار کلنی های تشکیل شده روی پلیت هایی با قطر ۹۰ mm کمتر از ۳۰۰ و تعداد کلنی های هدف بیشتر از ۱۰ باشد.

بیشینه تعداد قابل قبول کلنی های هدف روی پلیت بستگی به روش خاص، اندازه کلنی، ماهیت کلنی ها (برای مثال پخش شدن آن ها) و حضور کلنی های غیرهدف دارد و ممکن است بر اساس نتایج عملیات صحه گذاری باشد. به عنوان راهنما، بیشینه تعداد کلنی های روی پلیت ۹۰ mm (هدف و/یا غیرهدف) به طور معمول ۳۰۰ در نظر گرفته می شود (به استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹ [۲] مراجعه شود). ظروف بزرگتر (مانند ۱۴۰ mm) نیاز به ملاحظات دیگری دارند (به زیربند ۲-۷-۱-۹ مراجعه شود).

1- Colony-forming units
2- Colony-forming particles
3- Sub-lethally

۹-۱-۲-۳ تلقیح

محیط کشت مورد نیاز را در آب جوش یا از طریق سایر فرایندها (مانند قراردادن در جریان بخار آزاد^۱ اتوکلاو یا آون ماکروویو، اگر ترکیب دما و زمان گرمادهی برای آماده‌سازی محیط کشت صحه‌گذاری شده است)، ذوب کنید. قبل از حرارت‌دادن درپوش‌ها را شل کنید، از بیش‌گرمایش محیط کشت خودداری کرده و آن را به محض ذوب‌شدن خارج کنید. محیط کشت ذوب‌شده را باتوجه به تعداد و حجم دیش، به‌مدت زمان کافی در حمام آب یا گرمخانه در دمای °C ۴۴ تا °C ۴۷ قرار دهید، به‌گونه‌ای که سراسر محیط کشت با این دما در تعادل باشد. زمان مورد نیاز به‌منظور بازپخت آگار را برای همهٔ مقادیر و حجم‌هایی که به‌طور معمول استفاده می‌شود، صحه‌گذاری کنید. محیط‌های کشت ذوب‌شدهٔ حساس به گرما را به‌مدت زمان بیشتر از ۴ h (یا بیشینه زمان بیان‌شده در استاندارد خاص) نگهداری نکنید زیرا ممکن است کیفیت آن‌ها بعد از این زمان کاهش یابد. محیط‌های کشت آگاردار را بیشتر از یک‌بار ذوب نکنید.

حمام‌های آب به احتمال زیاد حاوی میکروارگانیسم‌هایی است که می‌توانند منبع آلودگی محیط کشت ذوب‌شده باشد. به‌منظور به‌حداقل رساندن این ریسک، تعویض منظم آب و تمیزکردن آن توصیه می‌شود.

پتری دیش‌های مورد نیاز را با نمونه و سایر جزئیات تهیه و علامت‌گذاری کنید. رقت‌های لازم را مطابق با زیربند ۸-۲-۱ تهیه کنید. آزمون‌ها را پس از اختلاط کامل در دیش‌ها توزیع کنید.

هر یک از لوله‌ها و بالن‌های حاوی محیط کشت بازپخت‌شده را به نوبت از حمام آب خارج کنید و پس از خشک‌کردن قسمت بیرونی آن به‌طور کامل، دهانهٔ ظروف را از روی شعله عبور دهید. محیط کشت را بدون تأخیر به هر پتری دیش به‌گونه‌ای بیافزائید که ایجاد شوک حرارتی برای آزمون به حداقل برسد، سپس به‌منظور توزیع یکنواخت میکروارگانیسم‌ها، آزمون و محیط کشت را به‌طور کامل مخلوط کنید. به‌طور کلی، مقدار $ml (2 \pm 18)$ محیط کشت برای حداکثر یک میلی‌لیتر آزمون در پتری دیش‌های ۹۰ mm استفاده می‌شود. به‌طورجایگزین، در صورتی که آزمایشگاه تشخیص دهد که نمونه‌ها برای گرمخانه‌گذاری کیسه‌بندی^۲ شود از حداقل ۱۰ ml محیط کشت استفاده می‌شود. به‌منظور بسته‌شدن آگار، دیش‌ها را روی سطح افقی قرار دهید تا خنک شود. به‌محض بسته‌شدن آگار، دیش‌ها را طبق زیربند ۵-۱-۹ گرمخانه‌گذاری کنید.

سیستم‌های آماده‌کننده، ذوب‌ریزها^۳ و تکان‌دهنده‌های آگار برای آزمایشگاه‌هایی که دارای تعداد زیاد نمونه هستند، می‌تواند مفید باشد (به استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹ [۲] مراجعه شود).

۹-۱-۳ روش کشت سطحی

۹-۱-۳-۱ کلیات

1- Steam flow-through
2- Bagged
3- Pourers

آزمونه به وسیله یک ابزار سترون روی سطح خشک محیط آگار پخش می شود و کلنی هایی که پس از گرمخانه گذاری روی سطح ایجاد شده، شمارش می شوند.

۹-۱-۳-۲ آزمونه

بهتر است برای پتری دیش با قطر ۹۰ mm، حجم آزمونه یا رقت نمونه بین ۰/۱ ml تا حداکثر ۰/۵ ml باشد. برای دقت بهینه، رقت را به گونه ای انتخاب کنید که در آن تعداد مورد انتظار کلنی های تشکیل شده کمتر از ۳۰۰ و تعداد کلنی های هدف بیشتر از ۱۰ باشد.

بیشینه تعداد قابل قبول کلنی های هدف روی پلیت بستگی به روش خاص، اندازه کلنی، ماهیت کلنی ها (برای مثال گسترش یافتگی) و حضور کلنی های غیرهدف دارد و ممکن است بر اساس نتایج عملیات صحنه گذاری باشد. به عنوان راهنما، بیشینه تعداد کلنی های روی پلیت ۹۰ mm (هدف و/یا غیرهدف) به طور معمول ۳۰۰ در نظر گرفته می شود (به استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹ [۲] مراجعه شود). دیش های بزرگتر (مانند ۱۴۰ mm) نیاز به ملاحظات دیگری دارند (به زیربند ۹-۱-۷-۲ مراجعه شود).

دستگاه کشت دهنده مارپیچی^۱ از حجم های کمتری استفاده می کنند و در نتیجه محدوده بررسی افزایش می یابد. برای استفاده از دستگاه کشت دهنده مارپیچی، دستورالعمل شرکت سازنده را رعایت کنید. دستگاه کشت دهنده مارپیچی ممکن است برای قارچ ها مناسب نباشد.

۹-۱-۳-۳ تلقیح

پلیت های مورد نیاز که هر کدام دارای (2 ± 18) ml محیط کشت است را برای پتری دیش های ۹۰ mm، با نمونه و سایر جزئیات آماده و نشانه گذاری کنید. برای دوره های گرمخانه گذاری طولانی تر (برای مثال دوره های گرمخانه گذاری طولانی تر نسبت به آنچه در زیربند ۵-۲ آمده است)، ممکن است حجم بیشتری از محیط کشت مورد نیاز باشد. برای کسب اطلاعات بیشتر در زمینه حجم محیط کشت، به استاندارد ISO 11133 مراجعه شود. در صورت لزوم سطح محیط کشت را پیش از استفاده همان گونه که در زیر تشریح شده، خشک کنید. آزمونه را به وسیله پیپت روی سطح محیط کشت بریزید و سپس با استفاده از ابزار سترون یا وسیله مکانیکی مانند دستگاه کشت دهنده مارپیچی برای اجتناب از تماس با لبه های آگار، آن را روی سطح گسترش دهید. پلیت ها را روی سطح بگذارید تا ماده تلقیحی جذب شود (بیشینه زمان ۱۵ min است)، سپس پلیت ها را مطابق با زیربند ۹-۱-۵ گرمخانه گذاری کنید.

برای خشک کردن پلیت ها، توجه به نکات زیر دارای اهمیت است:

- میزان رطوبت در محیط کشت مهم است زیرا رشد بهینه میکروارگانیسم ها به شرایط رطوبت درون و سطح محیط کشت بستگی دارد. از دست دادن رطوبت زیاد ممکن است منجر به افزایش غلظت بازدارنده ها در محیط کشت انتخابی و کاهش فعالیت آب در سطح محیط کشت شود.

1- Spiral platers

- در مورد باکتری‌هایی که کلنی آن‌ها به سرعت روی محیط کشت گسترش نمی‌یابند و سطح محیط کشت در پلیت‌ها خشک به نظر می‌رسد، خشک کردن سطح پلیت‌ها ضرورت ندارد. در این موارد، می‌توانید از خشک کردن سطح پلیت‌ها صرف نظر کنید، زیرا باعث افزایش احتمال آلودگی و هدررفت بی‌مورد رطوبت می‌شود.

- دما و زمان خشک شدن را به گونه‌ای انتخاب کنید که احتمال آلودگی تا حد ممکن پایین نگه داشته شود و حرارت دادن اضافی کیفیت محیط کشت را کاهش ندهد. زمان خشک شدن به میزان بخار آبی که در پتری دیش قرار گرفته است بستگی دارد ولی باید تا حد امکان کوتاه نگه داشته شود.

برای پیش‌گیری از آلودگی هواژرد، پلیت‌ها باید در صورت امکان، با سطح محیط کشت به سمت پایین خشک شوند.

به‌طور معمول، داشتن پلیت‌هایی به اندازه کافی خشک، با قرار دادن آن‌ها در یک گرم‌خانه با در نیمه‌باز یا اتاقک خشک‌کن با دمای بین 25°C تا 50°C حاصل می‌شود. خشک کردن پلیت‌ها را تا زمان ناپدید شدن قطرات رطوبت از درپوش‌ها ادامه دهید ولی بیش از آن، خشک کردن را ادامه ندهید. همچنین می‌توانید دیش‌های آگار را در اتاقک ایمنی با جریان هوای لایه‌ای در دمای محیط به مدت ۳۰ min تا ۶۰ min یا روی سطح باز خشک کنید ولی ممکن است در این صورت زمان خشک کردن طولانی‌تر شود.

در صورتی که دیش‌ها به تازگی آمیخته و در پتری دیش‌ها تخلیه شده‌اند، ذخیره‌سازی دیش‌های وارونه با سرپوش که در طول شب در دمای اتاق قرار گرفته است، نیز موثر است.

۹-۱-۴ روش فیلتر غشایی

۹-۱-۴-۱ کلیات

آزمونه از یک فیلتر غشائی عبور داده می‌شود تا میکروارگانیسم‌های موجود در آن روی فیلتر حفظ شود. سپس فیلتر غشائی روی محیط کشت آگار قرار داده می‌شود. در گرمخانه‌گذاری، کلنی‌ها روی سطح فیلتر غشائی تشکیل می‌شوند. به‌طور جایگزین، برای ارگانیسم‌های خاص مانند بی‌هوازی‌ها، فیلتر غشائی را می‌توان به گونه‌ای در یک پتری دیش قرار داد که رویه آن به سمت پایین باشد یا در یک لایه نازک آگار قرار داد و با محیط کشت آگار ذوب شده پوشاند.

۹-۱-۴-۲ آزمونه

بیشینه حجم آزمونه به قابلیت صاف شدن نمونه آب و فیلترهای غشائی مورد استفاده بستگی دارد. این روش برای آب‌هایی مانند آب آشامیدنی که دارای مقادیر کمی از ذرات یا مواد کلوئیدی (مانند آهن) معلق هستند، مناسب است. امکان فیلتراسیون چندین لیتر از چنین آب‌هایی و در نتیجه دستیابی به حساسیت بالای آزمون وجود دارد. بهتر است حجم نمونه مورد آزمون یا رقتی از آن

به گونه‌ای انتخاب شود که تعداد مورد انتظار کلنی‌های تشکیل شده روی فیلتر غشائی با قطر ۴۷ mm تا ۵۰ mm کمتر از ۸۰ و تعداد کلنی‌های هدف بیشتر از ۱۰ باشد.

بیشینه تعداد قابل قبول کلنی‌های هدف روی پلیت بستگی به روش خاص، اندازه کلنی، ماهیت کلنی‌ها (برای مثال گسترش یافتگی) و حضور کلنی‌های غیرهدف دارد و ممکن است بر اساس نتایج عملیات صحه‌گذاری باشد. به عنوان راهنما، بیشینه تعداد کلنی‌های روی پلیت ۹۰ mm به طور معمول ۳۰۰ در نظر گرفته می‌شود. یک فیلتر غشائی با قطر ۴۷ mm به طور مثال بیشینه تعداد ۸۰ کلنی (هدف و غیرهدف) را بر اساس مساحت نسبی (مقایسه‌ای) می‌دهد.

۳-۴-۱-۹ وسایل فیلتراسیون

به طور معمول، فیلترهای غشائی با میانگین اندازه منفذ $0.45 \mu m$ در میکروبیولوژی آب استفاده می‌شود. ممکن است در استاندارد خاص، برای برخی از میکروارگانیسم‌ها، فیلتراسیون از طریق یک فیلتر غشائی با میانگین اندازه منفذ $0.2 \mu m$ مورد نیاز باشد. ارزیابی تناسب انواع و دسته‌های مختلف فیلترهای غشائی قبل از استفاده در استاندارد ISO 7704 تشریح شده است.

به طور معمول، دستگاه‌های فیلتراسیون شامل یک چندراهه^۱ فیلتراسیون با یک سوپاپ، پایه‌های فیلتر غشایی، قیف‌های فیلتر غشایی، یک منبع خلاء و یک مخزن برای جمع‌آوری آب فیلترشده است. بهتر است، منبع خلاء حدود ۷۰ kPa باشد. خلاء بیش از حد قوی، می‌تواند عملکرد فیلتر غشائی را تحت تاثیر قرار دهد. توصیه می‌شود قیف‌های فیلتر غشائی دارای درجه‌بندی‌های قابل مشاهده متناسب با حجم نمونه مورد آنالیز باشند. بهتر است، قیف‌های فیلتر غشائی قبل از استفاده با اتوکلاو سترون شوند یا می‌توان به صورت جایگزین از قیف یک‌بار مصرف سترون استفاده کرد. می‌توان در صورت نیاز، فیلترهای غشایی را با جوشاندن یا شعله مستقیم قبل از استفاده، گندزدایی کرد.

هنگام جستجوی ارگانیسم‌های اسپورزا (برای مثال *Clostridium perfringens*)، گندزدایی قیف‌های فیلتر غشایی با جوشاندن ممکن است تمام اسپورها را حذف نکند. بهتر است، از یک قیف فیلتر سترون جداگانه استفاده شود. به صورت جایگزین، اگر در استاندارد خاصی مشخص شده باشد یا مورد تایید قرار گرفته باشد، می‌توان از سایر فنون گندزدایی استفاده کرد.

۴-۴-۱-۹ فیلتراسیون

فیلتر غشایی سترون را روی صفحه متخلخل پایه فیلتر غشایی سترون به گونه‌ای قرار دهید که سطح شبکه‌ای آن به سمت بالا باشد. قسمت بیرونی صافی غشائی را با استفاده از گیره سرپهن محکم کنید. قیف سترون را به گونه‌ای مطمئن روی پایه فیلتر قرار دهید. یکی از آزمون‌های زیر را درون قیف پیپت کنید یا بریزید (در حالی که شیر مکش بسته است):

1- Manifold

الف- حجم مشخصی از نمونه یا رقتی از آن که به طور کامل مخلوط شده باشد (حداقل ۱۰ ml)؛

ب- محتویات ظرف بالن یا بطری حاوی آزمونه و مقدار کافی رقیق کننده برای رساندن حجم کل به حداقل ۱۰ ml؛

پ- حداقل ۱۰ ml رقیق کننده که آزمونه اندازه گیری شده با پیپت به طور مستقیم به آن اضافه شده و با پیپت مخلوط شده است.

شیر را به منظور ایجاد خلاء برای فیلتر کردن آب از طریق فیلتر غشائی باز کنید. به محض فیلتر شدن نمونه، پمپ خلاء را خاموش کنید. بهتر است قیف را در حالی که فیلتر هنوز برای حذف ارگانیسم های چسبیده به قیف در جای خود قرار دارد، با استفاده از ۱ تا ۳ قسمت ۱۰ ml تا ۳۰ ml رقیق کننده سترون، شستشو دهید. فشار مثبت نیز می تواند در شرایط خاصی مانند آزمون گونه لژیونلا^۱ استفاده شود.

۹-۱-۴-۵ انتقال فیلتر غشایی

پس از خاموش کردن پمپ خلاء، قیف را بردارید و فیلتر غشائی را با گیره سرپهن سترون به یکی از موارد زیر انتقال دهید، تا اطمینان حاصل شود که هیچ حباب هوایی بین فیلتر غشائی و محیط کشت وجود ندارد:

الف- به پتری دیش حاوی محیط کشت آگاردار با شبکه به سمت بالا؛

ب- به پتری دیش با شبکه به سمت بالا یا پایین یا بر روی ۵ ml تا ۱۰ ml محیط کشت آگار در یک پتری دیش ۵۰ mm یا ۹۰ mm (برای موجودات بی هوازی)، سپس فیلتر غشائی را با محیط کشت آگار ذوب شده (۴۴ °C تا ۴۷ °C) در سریع ترین زمان ممکن پوشش دهید تا از خشک شدن فیلتر غشائی و تماس بیش از حد با هوا جلوگیری شود.

برای حجم های مختلف نمونه یکسان، در صورتی که کمترین حجم و/یا رقیق ترین نمونه را ابتدا صاف کنید، می توان قیف را بدون گندزدایی، دوباره استفاده کرد. برای فیلتراسیون نمونه دیگر باید یا از وسایل سترون جداگانه ای استفاده کرد یا می توان قیف را به وسیله شعله مستقیم یا غوطه ور کردن در حمام آب جوش، گندزدایی کرد. توصیه می شود، برای گندزدایی قیف، مطابق با دستورالعمل های شرکت سازنده عمل کنید.

۹-۱-۴-۶ روش های انتقال غشاء با استفاده از محیط کشت مایع یا رقیق کننده ها

به عنوان یک روش جایگزین برای پلیت آگار، اگر در استاندارد مربوطه بیان شود، فیلتر غشائی می تواند با شبکه به سمت بالا روی پد جاذب سترون که با محیط کشت مایع از پیش اشباع شده یا پد محیط کشت

1- *Legionella spp*

آب‌گیری شده بازسازی شده با آب سترون در پتری دیش، قرار داده شود. برای جلوگیری از رشد تداخلی^۱، بهتر است به‌طور ترجیحی قبل از قرار دادن فیلتر غشائی روی پد، هرگونه مایع اضافی دور ریخته شود.

در بعضی روش‌ها، مانند کشت MPN و روش‌های کیفی، ممکن است لازم باشد که فیلتر غشائی به‌طور مستقیم به یک برات (محیط کشت مایع) غنی‌سازی یا پیش غنی‌سازی انتقال داده شود.

فیلتر غشائی را می‌توان به‌عنوان بخشی از یک سیستم تغلیظ استفاده کرد و برای به‌دست آوردن آزمونه جدید برای گسترش در سطح خشک محیط آگار (به زیربند ۹-۱-۳ مراجعه شود) (برای مثال آزمون گونه لژیونلا از طریق فیلتراسیون غشائی با شستشو) به کمک یک رقیق‌کننده شستشو داد (آبشویی کرد). بهتر است، فیلتر غشائی به‌طور مستقیم به رقیق‌کننده منتقل شود و سپس همان‌گونه که در استاندارد مربوطه مشخص شده، آبشویی شده و کشت داده شود.

۹-۱-۵ گرمخانه‌گذاری

دیش‌های آگار تلقیح‌شده را وارونه کنید و آن را در گرمخانه یا ظرف مقاوم به نفوذ آب در یک حمام آب قرار دهید. در صورت لزوم، پلیت‌ها را برای جلوگیری از خشک‌شدن محیط کشت (برای مثال زمانی که یک گرمخانه دارای تهویه استفاده می‌شود) در کیسه‌های پلاستیکی یا سایر ظروف بسته‌بندی کنید. برای حصول اطمینان از این که دمای پلیت‌ها سریعاً به دمای گرمخانه می‌رسد، نباید بیشتر از ۶ پتری دیش را در گرمخانه روی هم قرار دهید و فضایی را بین انباشت‌ها برای گردش هوا در نظر بگیرید. با این حال، هنگامی که گرمخانه‌های دارای فن گردش هوا مورد استفاده قرار گیرند و دماهای مناسب گرمخانه‌گذاری برای زمان‌های لازم مورد تایید باشد، می‌توان تعداد بیشتری پلیت را در قفسه‌ها یا جابجایی‌های طراحی‌شده مخصوص انباشته کرد.

پلیت‌هایی که حاوی فیلترهای غشائی روی پد جاذب هستند را برای پیشگیری از خشک‌شدن محیط کشت در ظرف مقاوم به نفوذ هوا و آب قرار دهید. پلیت‌های حاوی میکروارگانیسم‌های اسپورزا بار روی سطح آگار (مانند کپک‌ها یا آکتینومایست‌ها) نیز نباید وارونه شود.

یادآوری - اسپورهای کپک‌ها هنگام جابجایی پتری دیش می‌توانند از پتری دیش به دیش‌های مجاور یا گرمخانه گسترش یابند. بستن درپوش پتری دیش به پایه می‌تواند به جلوگیری از این کار کمک کند.

اگر لازم باشد گرمخانه‌گذاری بی‌هوازی انجام شود، بهتر است دیش‌های آگار تلقیح‌شده در یک گرمخانه بی‌هوازی یا جار بی‌هوازی مقاوم به نفوذ هوا حاوی مولد شرایط بی‌هوازی^۲ با اندازه مناسب با حجم جار قرار داده شود. علاوه بر این، هم‌چنین بهتر است یک وسیله مناسب برای ایجاد شرایط بی‌هوازی در جار یا گرمخانه گنجانده شود.

1- Confluent growth
2- Anaerobic generator

زمان و دمای گرمخانه‌گذاری را پس از مراجعه به روش استاندارد خاص مربوط به میکروارگانیسم‌ها یا گروهی از میکروارگانیسم‌های مورد جستجو انتخاب کنید.

فیلترهای غشائی گاهی اوقات برای یک دوره محدود (برای مثال ۲ h یا ۴ h) در یک محیط کشت احیا^۱ گرمخانه‌گذاری شده و به‌طور معمول سپس به محیط انتخابی دیگری برای گرمخانه‌گذاری بیشتر منتقل می‌شوند.

۹-۱-۶ شمارش و تایید از محیط کشت جامد

۹-۱-۶-۱ کلیات

پلیت‌ها یا فیلترهای غشائی را پس از گرمخانه‌گذاری هر چه زودتر مطابق با استاندارد خاص مربوطه بررسی کنید. در صورتی که این کار امکان‌پذیر نباشد، آن‌ها را می‌توان برای مدت کوتاهی (تا ۲۴ h) در دمای $^{\circ}\text{C}$ (5 ± 3) نگهداری کرد به شرط آن که بر تعداد، ظاهر میکروارگانیسم‌ها یا تایید نهایی کلنی‌ها تاثیر نگذارد. مدت زمان نگهداری قابل قبول باید برای هر نوع روش و نمونه صحنه‌گذاری شود.

در مواردی که کلنی‌های بزرگ (برای مثال سودوموناس آئروژینوزا)^۲ یا در حال گسترش، پیش‌بینی می‌شود، بررسی پلیت‌ها پس از یک دوره کوتاه‌تر گرمخانه‌گذاری، در حالی که کلنی‌های مجزا هنوز قابل مشاهده هستند می‌تواند مفید باشد، سپس گرمخانه‌گذاری را برای یک دوره مشخص قبل از شمارش نهایی ادامه دهید.

۹-۱-۶-۲ کلنی‌های مستلزم شمارش و تایید

برای شمارش‌های کلی روی محیط کشت غیرانتخابی، تمام کلنی‌ها شمارش می‌شوند. در محیط‌های انتخابی و افتراقی، فقط کلنی‌هایی که ظاهر نوعی میکروارگانیسم مورد جستجو را نشان می‌دهند، شمارش می‌شوند (به استاندارد خاص مربوطه مراجعه شود). در صورتی که اندازه کلنی کوچک و/یا تشخیص کلنی‌ها از سایر ذرات یا کلنی‌های غیرهدف مشکل باشد، می‌توان از بزرگ‌نمایی استفاده کرد (مگر این که غیر از این گفته شود). در برخی موارد ممکن است شمارش کلنی‌ها مشکل باشد (برای مثال در صورت وجود میکروارگانیسم‌های در حال گسترش). کلنی‌های گسترش‌یافته را به‌عنوان کلنی‌های تک در نظر بگیرید. اگر کمتر از یک چهارم پلیت از طریق رشد گسترش‌یافته دارای رشد بی‌رویه باشد شمارش را در قسمت‌هایی که تحت تاثیر قرار نگرفته، انجام دهید و تعداد نظری کلنی‌ها برای کل پلیت را از طریق برون‌یابی محاسبه کنید. اگر بیش از یک چهارم پلیت دارای رشد بی‌رویه باشد، شمارش را نادیده بگیرید. کلنی‌های زنجیره‌ای را به‌عنوان یک واحد تشکیل‌دهنده کلنی در نظر بگیرید. در عمل برای شمارش‌های انتخابی، مشخص کردن میکروارگانیسم‌هایی که فقط به یک گروه تعلق دارند معمول نیست،

1- Resuscitation

2- *Pseudomonas aeruginosa*

ولی، این تمایز می‌تواند مورد قبول باشد و نتایج در بعضی موارد به‌صورت فرضی بیان شود. برای تعیین ویژگی‌های دقیق‌تر، آزمون‌های تأییدی ضروری است.

هنگام انتخاب کلنی‌ها برای تأیید، بهتر است رویکرد اتخاذشده هدف آزمون را در نظر بگیرد. به‌عنوان مثال، در شرایط تحقیق یا انجام آزمون‌های مقایسه‌ای، ممکن است تأیید همه کلنی‌های موجود (هدف و غیرهدف) ترجیح داده شود. در شرایط دیگر (برای مثال پایش یا پژوهش) تعیین تنوع کلنی‌های هدف موجود نسبت به یک شمارش تأییدشده دقیق می‌تواند مهم‌تر باشد. با این وجود، بهتر است در بیشتر سناریوهای انجام آزمون، در صورت نیاز به شمارش تأییدشده، تأیید تمام (یا یک زیر مجموعه انتخاب‌شده تصادفی) کلنی‌های هدف فرضی، همان‌طور که در پاراگراف زیر تشریح‌شده، رویکرد اتخاذشده باشد.

اگر تعداد کلنی‌ها زیاد باشد، تأیید شناسایی همه آن‌ها در آنالیز معمول عملی نیست. در صورت وجود تعداد کل بین ۱ و ۱۰ همه کلنی‌ها و در صورتی که کل کلنی‌ها بیشتر از ۱۰ باشد، حداقل ۱۰ کلنی را جدا کنید. اگر کلنی‌های فرضی فقط یک نوع ظاهر ریخت‌شناسی^۱ را نشان دهند، برای اجتناب از ذهنیت در انتخاب بهتر است تمام کلنی‌های فرضی از زیرمجموعه پلیت یا غشای حاوی حداقل ۱۰ کلنی گرفته شود. اگر انواع مختلف کلنی‌های فرضی روی پلیت وجود داشته باشد، بهتر است هر نوع کلنی برای تأیید با تمام یا حداقل ۳ کلنی در هر نوع مورد آزمون قرار گیرد، مگر اینکه در استاندارد خاصی به‌گونه‌ای دیگر بیان شود.

با توجه به نوع و منبع (برای مثال آب آشامیدنی یا غیرآشامیدنی) نمونه و همچنین هدف آنالیز (برای مثال پایش بهداشتی یا پژوهش علمی)، یک زیرمجموعه از کلنی‌های فرضی برای مراحل تأیید می‌تواند انتخاب شود.

۷-۱-۹ راهنمای کلی محاسبه نتایج

۱-۷-۱-۹ کلیات

زیربندهای ۷-۱-۹ و ۸-۱-۹ و پیوست پ مربوطه به‌طور گسترده‌ای در صورت استفاده از پلیت‌های دوتایی، براساس استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹ [۳] و برای روش‌های میکروبی آب مانند فیلتراسیون غشائی و ارزیابی استفاده از رقت‌ها (ی مختلف) به‌جای رقت ده برابر تنظیم شده‌اند. روش‌های محاسبه زیر مواردی را که اغلب هنگام انجام آزمون‌ها مطابق با بهین‌آزمایی^۲ انجام می‌شود، پوشش می‌دهد. به‌ندرت، موارد خاصی (برای مثال اختلاف معنی‌دار بین تعداد کلنی‌ها در دو پلیت با رقت یکسان، همان‌طور که در پیوست پ گفته شده است، یا نسبت بسیار متفاوت با ضریب رقت بین پلیت‌های دو رقت متوالی) ممکن است اتفاق بیفتد. بنابراین، در صورت لزوم، نتایج حاصل از شمارش باید توسط یک میکروپشناس واجد شرایط بررسی، تفسیر و رد شود.

1- Morphological

2- Good laboratory practices

۹-۱-۷-۲ مورد کلی

قواعد محاسبه و مثال‌های ارائه‌شده در زیربند ۹-۱-۸، برای نتایج حاصل از پلیت‌های مجزا در هر رقت هنگامی که تعداد کلنی‌های تیپیک^۱ روی پلیت بین ۱۰ و ۳۰۰ (روش‌های کشت آمیخته و روش‌های کشت سطحی) یا بین ۱۰ و ۸۰ (روش فیلتراسیون غشایی) است، مورد استفاده قرار می‌گیرد.

همان‌گونه که در زیربندهای ۹-۱-۲، ۹-۱-۳ و ۹-۱-۴-۲ توصیف شده است، بیشینه تعداد قابل قبول کلنی‌های هدف و غیرهدف به عوامل متعددی، مانند روش خاص، اندازه کلنی و ماهیت کلنی‌ها (به عنوان مثال گسترش‌یافتگی) بستگی دارد و ممکن است بر اساس نتایج آزمون‌های تأییدی باشد. محدودیت‌های شمارش در مثال بالا برای کلنی‌های هدف و کل ممکن است برای یک پلیت ۹۰ mm، ۳۰۰ و برای یک فیلتر غشایی ۴۷ mm، ۸۰ در نظر گرفته شود.

زمانی که از دیش‌هایی با قطرهای مختلف استفاده می‌شود، بیشینه تعداد کلنی‌های مشخص‌شده برای شمارش، باید نسبت به سطح دیش‌ها (یا فیلترهای غشایی) افزایش یا کاهش یابد.

یادآوری- برای پلیت‌های آمیخته یا سطحی با قطر ۵۵ mm، بیشینه تعداد قابل شمارش کلنی‌ها ۱۱۰ (معادل کل تعداد cfu ۳۰۰ روی یک پتری دیش ۹۰ mm) خواهد بود. برای پلیت‌های آمیخته یا سطحی با قطر ۱۴۰ mm، بیشینه تعداد قابل شمارش کلنی‌ها ۷۳۰ (معادل کل تعداد cfu ۳۰۰ روی یک پتری دیش ۹۰ mm) خواهد بود.

در روش‌های مختلف محاسبه ارائه‌شده در زیربند ۹-۱-۸، باید دیش‌های فاقد کلنی را از نظر محل نگهداری آن‌ها در نظر گرفت. هنگام استفاده از یک دستگاه کشت‌دهنده مارپیچی، برای شمارش کلنی‌ها دستورالعمل‌های سازنده را رعایت کنید.

از آنجا که فرض بر این است که هر کلنی از یک میکروارگانیسم یا از یک تجمع میکروارگانیسم‌های تکی نشأت گرفته است، نتایج به صورت تعداد واحدهای تشکیل‌دهنده کلنی (cfu) یا ذرات تشکیل‌دهنده کلنی (cfp) در حجم معینی از نمونه (به طور معمول ۱۰۰ ml یا ۱ ml) بیان می‌شود.

استفاده از پلیت‌های دوتایی، دقت را افزایش می‌دهد و می‌تواند تشخیص انحراف از شمارش کلنی مورد انتظار را امکان‌پذیر کند یا آلودگی را به راحتی آشکار سازد. در صورت استفاده از پلیت‌های دوتایی، از قواعد محاسبه و مثال‌های ارائه‌شده در پیوست «پ»، پیروی کنید.

۹-۱-۷-۳ مورد همراه با تأیید

در مواردی که روش مورد استفاده مستلزم شناسایی یا تأیید باشد، بهتر است به طور ایده‌آل تمام کلنی‌های فرضی از هر پلیتی که برای شمارش کلنی‌ها نگهداری می‌شود، تلقیح شود. اگر این امر به علت تعداد زیاد غیرعملی باشد، بهتر است برای اجتناب از ذهنیت در انتخاب کلنی، همه کلنی‌های فرضی از زیرمجموعه‌ای از

پیش تعیین شده پلیت یا فیلتر غشائی بررسی شود. در صورت وجود انواع کلنی‌های فرضی، حداقل ۳ کلنی از هر نوع کلنی فرضی را مورد بررسی قرار دهید (به زیربند ۹-۱-۶-۲ مراجعه شود). پس از شناسایی یا تأیید، نتیجه تأیید شده برای هر پلیت را به صورت زیر محاسبه کنید:

الف- برای هر نوع کلنی یافت شده، نسبت کلنی‌های فرضی مطابق با معیارهای شناسایی یا تأیید را تعیین کنید (به زیربند ۹-۱-۸-۳ مراجعه شود)؛

ب- برای هر نوع کلنی، شمارش فرضی را در نسبت تأیید شده ضرب کنید تا به شمارش تأیید شده برسد؛

پ- همه شمارش‌های تأیید شده را جمع کنید.

۸-۱-۹ بیان نتایج

۹-۱-۸-۱ کلیات

در این زیربند با موارد کلی سر و کار داریم:

- تلقیح یک پتری دیش برای هر رقت، اگر دست کم دو رقت متوالی انجام شود؛

- بیشینه تعداد قابل شمارش کلنی‌های کل موجود با رعایت محدودیت‌های کلنی مثال بالایی که در زیربند ۹-۱-۷-۲ تشریح شده؛

- تعداد کلنی‌های فرضی تلقیح شده برای تأیید (به زیربند ۹-۱-۷-۳ مراجعه شود) در هر دیش که مطابق با معیارهای زیربند ۹-۱-۶-۲ نگهداری شده است.

اگر بیش از یک رقت از سری رقت ده برابری مورد استفاده قرار گیرد، انتظار می‌رود نسبت شمارش کلنی با رقت d_1 به شمارش کلنی با رقت d_2 ، ۱۰٪ باشد، اما به طور کلی بهتر است شمارش کلنی با رقت d_2 کمتر از ۵٪ یا بیشتر از ۲۰٪ شمارش کلنی با رقت d_1 نباشد. در غیر این صورت، نتیجه باید با احتیاط تفسیر شود (همچنین به استاندارد [14] ISO 14461-2 مراجعه شود). برای مثال، اگر شمارش کلنی با رقت d_1 ۲۵۰ باشد، بهتر است شمارش کلنی با رقت d_2 کمتر از ۱۲ یا بیشتر از ۵۰ نباشد. موارد خاص مانند این مورد در زیربند ۹-۱-۸-۶ تشریح شده است.

نتایج محاسبه شده را تا دو رقم معنی‌دار گرد کنید. هنگام انجام این کار، اگر رقم سوم کمتر از ۵ باشد، رقم ماقبل آن را تغییر ندهید؛ اگر رقم سوم بزرگتر یا مساوی ۵ باشد، رقم ماقبل را یک واحد افزایش دهید. نتایج را به صورت عددی بین ۱/۰ و ۹/۹ ضربدر توان مناسبی از ۱۰ یا تعداد کل با دو رقم معنی‌دار بیان کنید.

نتایج را به صورت تعداد N میکروارگانیزم‌ها در حجم مشخص (به طور کلی ۱ ml یا ۱۰۰ ml) گزارش دهید.

۹-۸-۱-۲ روش محاسبه: مورد کلی (شمارش کلنی‌های کل یا هدف)

برای دستیابی به نتیجه‌ای که از لحاظ کمی معتبر باشد، به‌طور کلی، شمارش کلنی‌ها دست کم در یک پتری دیش حاوی کمینه ۱۰ کلنی (کلنی‌های کل، کلنی‌های هدف یا کلنی‌های مطابق با معیارهای تأیید) (به زیربند ۹-۸-۱-۳ مراجعه شود) ضروری تلقی می‌شود. روش‌های محاسبه در حالتی که پتری دیش‌ها حاوی تعداد کمتری هستند در زیربند ۹-۸-۱-۴ شرح داده شده است.

تعداد N میکروارگانیسم‌های موجود در نمونه آزمون را به‌صورت میانگین وزنی دو رقت متوالی یا دو حجم خاص از یک رقت با استفاده از فرمول (۱) محاسبه کنید. ممکن است سطوح بیشتر رقت یا حجم بیشتری از یک رقت مورد استفاده قرار گیرد:

$$N = \frac{\sum C}{\sum V} \times V_s \quad (1)$$

که در آن:

V_s حجم مرجع انتخاب‌شده برای بیان غلظت میکروارگانیسم‌ها در نمونه، برحسب میلی‌لیتر، ml؛
 $\sum C$ مجموع کلنی‌های شمارش‌شده روی دیش به‌دست آمده از رقت‌های متوالی یا حجم خاص از یک رقت، که دست کم یکی از آن‌ها حاوی کمینه ۱۰ کلنی است؛
 $\sum V$ مجموع حجم‌های نمونه اولیه که در همه دیش‌ها با هم استفاده می‌شود، با توجه به هر رقت، برحسب میلی‌لیتر، ml که از فرمول (۲) محاسبه می‌شود:

$$\sum V = (V_1 \times d_1) + (V_2 \times d_2) + \dots + (V_i \times d_i) \quad (2)$$

که در آن:

$V_1, V_2, \dots, V_i$ حجم تلقیح از نمونه یا رقت‌های اولیه (برای مثال رقت اول، رقت دوم) قرار داده شده در دیش برحسب میلی‌لیتر، ml.

$d_1, d_2, \dots, d_i$ میزان رقت برای حجم‌های آزمون مربوطه در رقت اول، رقت دوم و غیره است ($d = 10^0 = 1$) وقتی که آزمون مایع رقیق‌نشده باقی می‌ماند. اغلب، اما نه به‌طور الزامی، d_2 یک رقت ده برابری از d_1 و غیره است.

مثال ۱: شمارش پلیت‌های آنالیزشده با استفاده از روش کشت آمیخته با حجم مرجع $V_s = 1$ ml نتایج زیر را حاصل می‌کند.

در اولین رقت باقی‌مانده ($d_1 = 10^{-2}$): ۱۶۸ کلنی.

در دومین رقت باقی‌مانده ($d_1 = 10^{-3}$): ۱۴ کلنی.

۱ ml از هر رقت به‌عنوان ماده تلقیحی استفاده می‌شود (V_1 و V_2 هر دو برابر با ۱ است).

بنابراین:

$$\begin{aligned}\sum V &= (1 \times 10^{-2}) + (1 \times 10^{-3}) \\ \sum V &= 0.01 + 0.001 = 0.011 \\ N &= \frac{\sum C}{\sum V} \times V_s = \frac{168+14}{0.011} \times 1 = \frac{182}{0.011} \times 1 \\ N &= 16545\end{aligned}$$

نتایج را همان گونه که در زیربند ۹-۱-۸-۱ مشخص شده است، گرد کنید، تعداد میکروارگانیسم ها عبارت است از:

$N = 17000$ یا $N = 1.7 \times 10^4$ واحد تشکیل دهنده کلنی (cfu) در هر میلی لیتر نمونه.

مثال ۲: شمارش پلیت های آنالیز شده با استفاده از روش فیلتراسیون غشائی با حجم مرجع $V_s = 100 \text{ ml}$ نتایج زیر را حاصل می کند.

آنالیز شده در حجم اولیه آزمون (100 ml): ۷۲ کلنی.

آنالیز شده در حجم دوم آزمون (10 ml): ۱۱ کلنی.

نمونه رقیق نشده برای هر دو حجم آزمون استفاده شد (d_1 و d_2 هر دو برابر با ۱ است).

بنابراین:

$$\begin{aligned}\sum V &= (100 \times 1) + (10 \times 1) \\ \sum V &= 100 + 10 = 110 \\ N &= \frac{\sum C}{\sum V} \times V_s = \frac{72+11}{110} \times 100 = \frac{83}{110} \times 100 \\ N &= 74.45\end{aligned}$$

نتایج را همان گونه که در زیربند ۹-۱-۸-۱ مشخص شده است، گرد کنید، تعداد میکروارگانیسم ها عبارت است از:

$N = 75$ یا $N = 7.5 \times 10^1$ در هر 100 ml نمونه.

۹-۱-۸-۳ روش محاسبه: مورد کلی همراه با تایید

هنگامی که روش مورد استفاده مستلزم تایید باشد، تعداد معلوم A (به طور کلی ۱۰) از کلنی های فرضی در هر پتری دیش که برای شمارش کلنی ها باقی مانده است، مطابق با زیربند ۹-۱-۶-۲، تایید می شود. بعد از تایید، برای هر یک از دیش ها، تعداد a از کلنی ها را مطابق با معیارهای تأیید، با استفاده از فرمول (۳) محاسبه کنید:

$$a = \frac{b}{A} \times C \quad (3)$$

که در آن:

A تعداد کلنی‌های فرضی تلقیح‌شده؛

b تعداد کلنی‌ها مطابق با معیارهای تأیید؛

C تعداد کل کلنی‌های فرضی شمارش‌شده روی دیش است.

نتایج محاسبه‌شده را به نزدیکترین عدد صحیح گرد کنید. هنگام انجام این کار، اگر رقم اول بعد از علامت اعشاری کمتر از ۵ باشد، رقم قبل از آن را تغییر ندهید؛ اگر رقم اول بعد از علامت اعشاری بزرگتر یا برابر ۵ است، رقم قبل از آن را یک واحد افزایش دهید.

با استفاده از فرمول (۴)، تعداد N میکروارگانیسیم‌های تأییدشده موجود در نمونه آزمون را با جایگزین کردن $\sum C$ با $\sum a$ در فرمول (۱) (مطابق با زیربند ۹-۱-۸-۲) محاسبه کنید:

$$N = \frac{\sum a}{\sum v} \times VS \quad (4)$$

که در آن $\sum a$ مجموع کلنی‌ها مطابق با معیارهای تایید از رقت‌های متوالی یا حجم‌های خاص از یک رقت است، که دست کم یکی از آن حاوی کمینه ۱۰ کلنی، می‌باشد.

نتایج را گرد کنید و همان‌گونه که در زیربند ۹-۱-۸-۱ مشخص شده، بیان کنید.

مثال ۱: شمارش پلیت‌های آنالیزشده با استفاده از روش کشت آمیخته با حجم مرجع $Vs = 1 \text{ ml}$ نتایج زیر را حاصل می‌کند.

در اولین رقت باقی‌مانده ($d_1 = 10^{-3}$): ۶۶ کلنی.

در دومین رقت باقی‌مانده ($d_2 = 10^{-4}$): ۴ کلنی.

تایید کلنی‌های انتخاب‌شده انجام شد:

- از ۶۶ کلنی، ۱۰ مورد آزمون شدند، ۶ مورد با معیارها مطابقت داشت، از این رو $a = 40$ ؛

- از ۴ کلنی، همه با معیارها مطابقت داشتند، از این رو $a = 4$.

$$\sum V = (1 \times 10^{-3}) + (1 \times 10^{-4}) = 0.0011$$

$$N = \frac{\sum c}{\sum v} \times V_s = \frac{40+4}{0.0011} \times 1$$

$$N = 40000$$

نتایج را همان‌گونه که در زیربند ۹-۱-۸-۱ مشخص شده است، گرد کنید، تعداد میکروارگانیسیم‌ها عبارت است از:

$N = 40000$ یا $N = 4 \times 10^4$ واحد تشکیل‌دهنده کلنی (cfu) در هر میلی‌لیتر نمونه.

مثال ۲: شمارش پلیت‌های آنالیزشده با استفاده از روش فیلتراسیون غشائی با حجم مرجع $V_s = 100 \text{ ml}$ نتایج زیر را حاصل می‌کند.

آنالیزشده در حجم اولیهٔ آزمون (100 ml): ۷۲ کلنی.

آنالیزشده در حجم دوم آزمون (50 ml): ۳۰ کلنی.

نمونه رقیق‌نشده برای هر دو حجم آزمون استفاده شد (d_1 و d_2 هر دو برابر با ۱ است).

تایید کلنی‌های انتخاب‌شده انجام شد:

– از ۷۲ کلنی، ۱۰ مورد آزمون شدند، ۴ مورد با معیارها مطابقت داشت، از این رو $a = 29$

– از ۳۰ کلنی، ۱۰ مورد آزمون شدند، ۶ مورد با معیارها مطابقت داشت، از این رو $a = 18$.

$$\sum v = (100 \times 1) + (50 \times 1) = 150$$

$$N = \frac{\sum a}{\sum v} \times V_s = \frac{29+18}{150} \times 100$$

$$N = 31.333$$

نتایج را همان‌گونه که در زیربند ۹-۱-۸-۱ مشخص شده است، گرد کنید، تعداد میکروارگانیسم‌ها عبارت است از:

$$N = 31 \text{ در هر } 100 \text{ ml نمونه.}$$

اگر چند نوع کلنی با ریخت‌شناسی گوناگون برای تایید برداشته شده باشد (به زیربند ۹-۱-۷-۳ مراجعه شود)، محاسبات مربوط به هر نوع ریخت‌شناسی را انجام دهید و نتایج را جمع کنید تا تعداد کل کلنی‌های مطابق با معیارهای تأیید حاصل شود.

۹-۱-۸-۴ روش محاسبه: تعداد کم

۹-۱-۸-۴-۱ موردی که پتری دیش حاوی کمتر از ۱۰ کلنی است

در صورتی که پتری دیش حاوی نمونهٔ آزمون (مایعات) یا سوسپانسیون اولیه (نمونه‌های دیگر) یا رقت اولیهٔ تلقیح‌شده یا باقی‌مانده حاوی کمتر از ۱۰ کلنی باشد، بهتر است نتایج به صورت زیر گزارش شود:

– برای ۳ تا ۹ کلنی، بهتر است نتایج به صورت تخمینی گزارش شود؛

– برای ۱ یا ۲ کلنی، بهتر است نتایج به همان صورتی که هست (بدون تخمین) گزارش شود.

شمارش‌های از ۱۰ تا حد بالایی (عملی) هر روش، در محدودهٔ دقت بهینه است. با کاهش تعداد کلنی‌ها به کمتر از ۱۰، دقت به سرعت کاهش می‌یابد. بنابراین، حد پایین‌تر تعیین، برای تعداد ۱۰ تعریف می‌شود.

مطابق با زیربند ۳-۱۷ استاندارد ملی ایران شماره ۱۵۶۶۲ [۴]، حد تعیین، به صورت «کمترین غلظت آنالیت [X] در هر قسمت تجزیه‌ای که در آن عدم قطعیت استاندارد نسبی مورد انتظار برابر با مقدار مشخص [RSD]^۱ است» تعریف می‌شود.

RSD انحراف معیار نسبی است که از تقسیم انحراف معیار تخمینی S جمعیتی از یک نمونه به میانگین نمونه $\bar{x}$ به دست می‌آید. به جای RSD، علامت u_{rel} برای انحراف معیار نسبی استفاده می‌شود. بنابراین $u_{rel} = \frac{s}{\bar{x}}$

در موارد توزیع پواسون^۲، X از فرمول ۵ محاسبه می‌شود.

$$x = \frac{1}{(u_{rel})^2} \quad (5)$$

در میکروبیولوژی، ۱۰ به طور کلی به عنوان کمترین تعداد قابل اطمینان و بنابراین حد پایین تر تعیین، قابل قبول است. دقت نسبی قابل قبول متناظر در حد تعیین ۱۰ می‌تواند به عنوان RSD (u_{rel}) در نظر گرفته شود که با استفاده از فرمول (۵) ۳۲٪ است:

$$u_{rel} = \sqrt{\frac{1}{x}}$$

$$u_{rel} = \sqrt{\frac{1}{10}} = 0.32 \text{ (یا } 32\%)$$

بنابراین بهتر است نتایجی که براساس شمارش کمتر از ۱۰ است، فقط به صورت تشخیص وجود ارگانیسم بیان شود.

به شرط غالب بودن توزیع پواسون، با میانگین شمارش ۳ ذره در هر نمونه، احتمال تشخیص وجود آنالیت (یعنی مشاهده کمینه ۱ کلنی) برابر با ۹۵٪ است. بنابراین، این میانگین شمارش ۳، سطح تشخیص است. این مسئله در زیر توضیح داده شده است.

احتمال نتیجه مثبت $p(+)$ در مواردی که توزیع پواسون غالب می‌شود به صورت زیر محاسبه می‌گردد:

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

حل فرمول برای X، فرمول (۶) را حاصل می‌کند:

1- Relative standard deviation

2- Poisson

$$x = -\ln[1 - p(+)] \quad (۶)$$

که در آن:

e پایه لگاریتم طبیعی؛

x تعداد ذرات در هر بخش تجزیه‌ای است.

$$\text{بر اساس فرمول بالا، } x = -\ln[1 - 0.95] = -\ln(0.05) = 3.0$$

به‌طور خلاصه، برای نتایج زیر سطح تشخیص، وجود ارگانسیم هدف نمی‌تواند به‌طور موثر قابل شناسایی باشد. برای نتایج زیر حد تعیین، اما برابر با یا بالاتر از سطح تشخیص، حضور ارگانسیم هدف می‌تواند به شکل کارآمد شناسایی شود، اما به شکل کارآمد اندازه‌گیری نمی‌شود. بنابراین، اگر پلیت حاوی کمتر از ۱۰، اما دست کم ۳ کلنی باشد، نتایج را با استفاده از فرمول ۷ محاسبه کنید:

$$N_E = \frac{C}{V \times d} \times V_S \quad (۷)$$

که در آن:

N_E تعداد تخمینی میکروارگانسیم‌ها در هر حجم آنالیزشده؛

C تعداد کلنی‌های شمارش‌شده باقی‌مانده روی دیش، حاوی دست کم ۳ کلنی؛

V حجم ماده تلقیحی یا نمونه مورد استفاده در دیش، برحسب میلی‌لیتر، ml؛

d رقت متناظر با رقیق‌سازی باقی‌مانده (در مواردی که آزمون به‌صورت مایع رقیق‌نشده باقی می‌ماند $d = 1$)؛

V_S حجم مرجع انتخاب‌شده برای بیان غلظت میکروارگانسیم‌ها در نمونه برحسب میلی‌لیتر، ml است.

بنابراین، هنگامی که ۳ تا ۹ کلنی یافت می‌شود، نتیجه را به‌صورت یک عدد تخمینی در حجم مورد مطالعه، گزارش دهید.

یادآوری- اصطلاح «عدد تخمینی» به‌معنی تخمین با دقت کمتر از مقدار واقعی است.

اگر مجموع ۱ یا ۲ باشد، دقت نتیجه بسیار کم است و نتیجه باید به‌صورت زیر گزارش شود:

«میکروارگانسیم‌ها در حجم مورد مطالعه وجود دارند».

اگر طبق قانون یک نتیجه عددی نیاز باشد، برای مثال به‌منظور اهداف پایشی، در این صورت یک مقدار عددی تخمینی با علامت عدم اطمینان آماری گزارش کنید.

۹-۱-۸-۴-۲ مورد مربوط به مواقعی که پتری دیش حاوی کلنی نیست

اگر پتری دیش حاوی نمونه آزمون (مایعات)، سوسپانسیون اولیه (نمونه‌های دیگر) یا رقت اولیه تلقیح‌شده یا باقی‌مانده، حاوی کلنی نباشد، نتیجه را به‌صورت زیر گزارش کنید:

«کمتر از $V_S \times \frac{1}{V \times d}$ میکروارگانیزم در هر میلی‌لیتر (های) V »

که در آن:

d فاکتور رقت نمونه آزمون، سوسپانسیون اولیه یا رقت اولیه تلقیح‌شده یا باقی‌مانده با $d = 10^0 = 1$ در صورتی که نمونه آزمون به‌طور مستقیم تلقیح‌شده از مایعات باقی‌مانده است؛

V حجم ماده تلقیح‌شده یا نمونه آزمون مورد استفاده در دیش، برحسب میلی‌لیتر، ml؛

V_S حجم مرجع انتخاب‌شده برای بیان غلظت میکروارگانیزم‌ها در نمونه، برحسب میلی‌لیتر، ml است.

اگر برای بیان نتیجه اطلاعاتی در مورد عدم قطعیت اندازه‌گیری (عدم دقت) لازم باشد، بهتر است به‌صورت زیر گزارش شود:

«در نمونه تجزیه‌ای تشخیص داده نشد».

(با توجه به توزیع پواسون، سطح شناسایی روش، سه ارگانیزم در هر نمونه تجزیه‌ای است).

۹-۱-۸-۵ موارد خاص

۹-۱-۸-۵-۱ کلیات

این دو مورد برای شمارش کلنی‌های هدف یا فرضی به‌کار می‌رود.

۹-۱-۸-۵-۲ مورد ۱: رشد زمینه‌ای بالا با کلنی‌های هدف

اگر تعداد کلنی‌های هدف و غیرهدف دیش حاوی نمونه آزمون یا رقت اولیه d_1 بیشتر از حدود شمارش راهنمای بالا (برای مثال ۳۰۰ برای روش‌های کشت سطحی یا آمیخته، ۸۰ برای روش‌های فیلتراسیون غشائی یا هر تعداد دیگر بیان‌شده در استاندارد خاص)، با کلنی‌های هدف قابل‌مشاهده یا کلنی‌های تایید شده باشد و اگر دیش حاوی حجم نمونه آزمون بعدی یا رقیق‌شده d_2 حاوی کمتر از حدود شمارش راهنمای بالا و هیچ کلنی هدف یا تاییدشده‌ای قابل مشاهده نباشد، نتیجه را به‌صورت زیر گزارش دهید:

«کمتر از $V_S \times \frac{1}{V_2 \times d_2}$ و بیشتر از $V_S \times \frac{1}{V_1 \times d_1}$ میکروارگانیزم» در هر حجم مرجع انتخاب‌شده

که در آن:

d_1 و d_2 فاکتور رقت مربوط به رقیق‌سازی d_1 و d_2 که در آن نمونه آزمون که به‌طور مستقیم تلقیح‌شده باقی می‌ماند؛

V_1 حجم ماده تلقیحی یا نمونه آزمون مورد استفاده در دیش با رقت اولیه d_1 ، برحسب میلی‌لیتر، ml؛

V_2 حجم ماده تلقیحی یا نمونه آزمون مورد استفاده در دیش با دومین رقت d_2 ، برحسب میلی‌لیتر، ml؛

V_S حجم مرجع انتخاب‌شده برای بیان غلظت میکروارگانیزم‌ها در نمونه، برحسب میلی‌لیتر، ml است.

مثال ۱: شمارش پلیت‌های آنالیزشده با استفاده از روش کشت آمیخته با حجم مرجع $V_s = 1 \text{ ml}$ نتایج زیر را حاصل می‌کند.

در رقت اولیه باقی‌مانده ($d_1 = 10^{-2}$): بیشتر از ۳۰۰ کلنی در دیش، با کلنی‌های هدف یا تاییدشده موجود؛

در دومین رقت باقی‌مانده ($d_2 = 10^{-3}$): ۳۳ کلنی، بدون هیچ کلنی هدف یا تاییدشده موجود.

۱ ml از هر رقت به‌عنوان مادهٔ تلقیحی استفاده می‌شود ($V_1 = V_2$).

نتیجه عبارت است از:

$$\frac{1}{1 \times 10^{-2}} \times 1 \text{ و بیشتر از } \frac{1}{1 \times 10^{-3}} \times 1$$

کمتر از ۱۰۰۰ و بیشتر از ۱۰۰ میکروارگانیزم در هر میلی‌لیتر نمونه را می‌دهد.

مثال ۲: شمارش پلیت‌های آنالیزشده با استفاده از روش فیلتراسیون غشائی با حجم مرجع $V_s = 100 \text{ ml}$ نتایج زیر را حاصل می‌کند.

آنالیزشده در حجم اولیهٔ آزمون (۱۰ ml): بیشتر از ۸۰ کلنی در دیش، با کلنی‌های هدف یا تاییدشده موجود.

آنالیزشده در حجم دوم آزمون (۱ ml): ۲۱ کلنی بدون هیچ گونه کلنی هدف یا تاییدشده.

نمونهٔ رقیق‌نشده برای هر دو حجم آزمون استفاده شد (d_1 و d_2 هر دو برابر با ۱ است).

نتیجه به‌صورت زیر است:

کمتر از $\frac{1}{1 \times 1} \times 100$ و بیشتر از $\frac{1}{10 \times 1} \times 100$ ، کمتر از ۱۰۰ و بیشتر از ۱۰، میکروارگانیزم در هر ۱۰۰ ml نمونه را می‌دهد.

۹-۱-۸-۵-۳ مورد ۲: رشد بالای زمینه بدون کلنی‌های هدف

اگر تعداد کلنی‌های دیش حاوی نمونهٔ آزمون یا رقت اولیه d_1 بیشتر از محدوده‌های شمارش راهنمای بالا (برای مثال ۳۰۰ برای روش‌های کشت سطحی یا آمیخته، ۸۰ برای روش‌های فیلتراسیون غشائی یا سایر تعداد بیان‌شده در استاندارد خاص)، بدون کلنی‌های هدف قابل‌مشاهده یا کلنی‌های تاییدشده باشد و اگر دیش حاوی حجم رقت d_2 نمونهٔ آزمون بعدی حاوی کمتر از محدودهٔ شمارش راهنمای بالا باشد و هیچ کلنی هدف یا تاییدشده‌ای قابل مشاهده نباشد، نتیجه را به‌صورت زیر گزارش دهید:

«کمتر از $\frac{1}{V_2 \times d_2} \times V_s$ میکروارگانیزم در هر حجم مرجع انتخاب‌شده»

که در آن:

d_2 فاکتور رقت مربوط به رقیق‌سازی $d_2 (d = 10^0 = 1)$ که در آن نمونهٔ آزمون تلقیح‌شده به‌طور مستقیم باقی می‌ماند؛

V_2 حجم مادهٔ تلقیحی یا نمونهٔ آزمون مورد استفاده در دیش با رقت دوم d_2 ، برحسب میلی‌لیتر، ml؛

V_s حجم مرجع انتخاب‌شده برای بیان غلظت میکروارگانیزم‌ها در نمونه، برحسب میلی‌لیتر، ml است.

مثال ۱: شمارش پلیت‌های آنالیزشده با استفاده از روش کشت آمیخته با حجم مرجع $V_s = 1 \text{ ml}$ نتایج زیر را حاصل می‌کند.

در رقت اولیه باقی مانده ($d_1 = 10^{-2}$): بیشتر از ۳۰۰ کلنی در دیش، با کلنی های هدف یا تایید شده موجود؛

در دومین رقت باقی مانده ($d_2 = 10^{-3}$): ۳۳ کلنی، بدون هیچ کلنی هدف یا تایید شده موجود.

۱ ml از هر رقت به عنوان ماده تلقیحی استفاده می شود ($V_1 = V_2$).

نتیجه عبارت است از:

$$\frac{1}{1 \times 10^{-5}} \times 1$$

کمتر از ۱۰۰۰ در هر میلی لیتر نمونه را می دهد.

مثال ۲: شمارش پلیت های آنالیز شده با استفاده از روش فیلتر غشائی با حجم مرجع $V_s = 100 \text{ ml}$ نتایج زیر را حاصل می کند.

آنالیز شده در حجم اولیه آزمون (10 ml): بیشتر از ۸۰ کلنی در دیش، بدون هیچ گونه کلنی هدف یا تایید شده موجود.

آنالیز شده در حجم دوم آزمون (1 ml): ۲۱ کلنی بدون هیچ گونه کلنی هدف یا تایید شده موجود.

از نمونه رقیق نشده برای هر دو حجم آزمون استفاده شد (d_1 و d_2 هر دو برابر با ۱ است).

نتیجه به صورت زیر است:

$$\frac{1}{1 \times 1} \times 100$$

کمتر از ۱۰۰ میکروارگانیسم در هر 100 ml نمونه را می دهد.

یادآوری - در مواردی که تعداد زیادی کلنی غیر هدف وجود دارد، کلنی های هدف می توانند با رشد بی رویه پوشیده شوند و ثبت یا گزارش آن و درخواست یک نمونه تکراری سودمند است.

۹-۱-۸-۶ روش های محاسبه: شمارهای غیر معمول، تخمینی و غیر قابل قبول

۹-۱-۸-۶-۱ کلیات

بعضی از مثال ها با قواعد مندرج در زیر بند ۹-۱-۸-۱ مطابقت ندارند. اگر تکرار آنالیز امکان پذیر نباشد، می توان نتایج را مطابق با زیر بند ۹-۱-۸-۱، محاسبه و بیان کرد که در این صورت دقت کاهش می یابد و این مسئله باید در گزارش آزمون نشان داده شود.

۹-۱-۸-۶-۲ نسبت های غیر منتظره هنگام استفاده از رقت ها

این وضعیت زمانی اتفاق می افتد که تعداد کلنی های شمارش شده (کلنی های کل، کلنی های هدف یا کلنی های فرضی) بیشتر از ۳۰۰ (یا هر عدد دیگر بیان شده در استاندارد خاص) در دیش حاوی رقت اول d_1 با تعداد کلنی (کلنی های کل، کلنی های هدف یا کلنی های مطابق با معیارهای تأیید) کمتر از ۱۰ برای دیش دارای رقت دوم d_2 باشد.

اگر تعداد کلنی ها برای دیش دارای رقت d_1 در فاصله ۳۰۰ تا ۳۳۴ (قسمت بالای فاصله اطمینان برای تعداد ۳۰۰ کلنی) و تعداد کلنی با رقت d_2 کمتر از ۸ (حد پایینی فاصله اطمینان ۱۵ کلنی) باشد، از روش

محاسبه برای موارد کلی (به زیربند ۹-۱-۸-۲ مراجعه شود) با استفاده از دیش برای دو رقت باقی مانده، استفاده کنید.

یادآوری - تعداد کلنی ۱۵ مطابق با ۵٪ از ۳۰۰ است.

برای کسب اطلاعات بیشتر در مورد فواصل اطمینان برای شمارش کلنی، به پیوست ب مراجعه شود.

مثال ۱: شمارش کلنی نتایج زیر را حاصل می کند.

در اولین رقت باقی مانده (10^{-2}): ۳۱۰ کلنی؛

در دومین رقت باقی مانده (10^{-3}): ۸ کلنی.

از روش محاسبه برای موارد کلی (مطابق با زیربند ۹-۱-۸-۲) با استفاده از دیش برای دو رقت باقی مانده، استفاده کنید.

اگر تعداد کلنی ها برای دیش دارای رقت d_1 بیشتر از ۳۳۴ (حد بالایی فاصله اطمینان برای شمارش کلنی ۳۰۰) و تعداد کلنی با رقت d_2 کمتر از ۸ (حد پایینی فاصله اطمینان ۱۵ کلنی) باشد، فقط نتایج مربوط به شمارش رقت d_2 را در نظر بگیرید و شمارش تخمینی را محاسبه کنید (به زیربند ۹-۱-۸-۴-۱ مراجعه شود).

مثال ۲: شمارش کلنی نتایج زیر را حاصل می کند.

در اولین رقت باقی مانده (10^{-2}): بیشتر از ۳۳۴ کلنی در دیش؛

در دومین رقت باقی مانده (10^{-3}): ۹ کلنی.

شمارش تخمینی از کلنی های شمارش شده در دیش برای رقت 10^{-3} (مطابق با زیربند ۹-۱-۸-۴-۱) گزارش کنید:

$$N_E = 9 \times 10^{-3}$$

اگر تعداد کلنی ها برای دیش دارای رقت d_1 بیشتر از ۳۳۴ (حد بالایی فاصله اطمینان برای شمارش کلنی ۳۰۰) و تعداد کلنی با رقت d_2 کمتر از ۸ (حد پایینی فاصله اطمینان ۱۵ کلنی) است، آن گاه اختلاف بین دو رقت غیرقابل قبول است.

مثال ۳: شمارش کلنی نتایج زیر را حاصل می کند.

در اولین رقت باقی مانده (10^{-2}): بیشتر از ۳۳۴ کلنی در دیش؛

در دومین رقت باقی مانده (10^{-3}): ۷ کلنی.

نتیجه این شمارش غیرقابل قبول است.

ارقام مربوط به فواصل اطمینان باید با بیشینه تعداد مشخص شده برای شمارش کلنی ها تطبیق یابد.

۹-۱-۸-۶-۳ تمام دیش ها بالاتر از محدوده شمارش بالایی

در مواردی که شمارش کلنی ها (کل کلنی ها، هدف یا فرضی) برای تمام دیش ها در همه حجم های نمونه آزمون یا رقت های ماده تلقیحی تعداد بیشتر از محدوده شمارش راهنمای بالا (برای مثال ۳۰۰ برای

روش‌های کشت سطحی یا آمیخته، ۸۰ برای روش‌های فیلتراسیون غشائی یا سایر تعداد بیان‌شده در استاندارد خاص) را تولید کند، نتایج را به شکل زیر گزارش کنید:

«بیشتر از $\frac{C_{max}}{V \times d} \times V_s$ » (در مورد کل کلنی‌ها یا هدف)

«بیشتر از $\frac{C_{max}}{V \times d} \times V_s \times \frac{b}{A}$ » (در مورد کلنی‌های تاییدشده)، بیان‌شده برحسب میکروارگانیزم‌ها در حجم مرجع انتخاب‌شده

که در آن:

C_{max} حد بالایی شمارش در یک دیش؛

d آخرین رقت مادهٔ تلقیحی رقیق‌سازی‌شده ($d = 10^0 = 1$) وقتی که در آن نمونه آزمون تلقیح‌شده به‌طور مستقیم باقی می‌ماند؛

V حجم مادهٔ تلقیحی یا نمونه آزمون مورد استفاده در هر دیش، برحسب میلی‌لیتر، ml؛

V_s حجم مرجع انتخاب‌شده برای بیان غلظت میکروارگانیزم‌ها در نمونه؛

b تعداد کلنی‌ها مطابق با معیارهای تأیید؛

A تعداد کلنی‌های فرضی تلقیحی برای تأیید است.

۹-۱-۸-۶-۴ فقط دیش با بالاترین رقت قابل شمارش است

در مواردی که فقط دیش حاوی آخرین رقت یا حجم نمونه آزمون قابل شمارش باشد و حاوی بیش از ۱۰ کلنی و کلنی‌های کمتر (کلنی‌های کل، هدف یا فرضی) نسبت به محدودهٔ شمارش راهنمای بالایی (برای مثال ۳۰۰ در روش‌های کشت سطحی یا آمیخته، ۸۰ برای روش‌های فیلتراسیون غشائی یا سایر تعداد بیان‌شده در استاندارد خاص) باشد، تعداد N' میکروارگانیزم‌های موجود را با استفاده از فرمول (۸) محاسبه کنید:

$$N' = \frac{C}{V \times d} \times V_s \quad (8)$$

که در آن:

C تعداد کلنی‌های شمارش‌شده در دیش؛

V حجم مادهٔ تلقیحی یا نمونه آزمون مورد استفاده در دیش، برحسب میلی‌لیتر، ml؛

d رقت مربوط به رقت باقی‌مانده ($d = 10^0 = 1$) در صورتی که نمونه آزمون تلقیح‌شده به‌طور مستقیم باقی مانده باشد؛

V_s حجم مرجع انتخاب‌شده برای بیان غلظت میکروارگانیزم‌ها در نمونه، برحسب میلی‌لیتر، ml است.

نتایج را طبق زیربند ۹-۱-۸ گرد کنید.

نتیجه را به صورت تعداد N' میکروارگانیسم‌ها در حجم مرجع انتخاب شده گزارش کنید.

مثال ۱: شمارش پلیت‌های آنالیز شده با استفاده از روش کشت آمیخته با حجم مرجع $V_s = 1 \text{ ml}$ و حجم‌های ماده تلقیحی ($V = 1 \text{ ml}$) نتایج زیر را حاصل می‌کند.

در آخرین رقت ($d = 10^{-4}$): ۱۲۰ کلنی در دیش.

بنابراین:

$$N' = \frac{120}{1 \times 10^{-4}} \times 1 = 1\,200\,000$$

گرد کردن نتایج طبق زیربند ۹-۱-۸-۱، می‌دهد:

$N' = 1\,200\,000$ یا $N' = 1,2 \times 10^6$ واحد تشکیل دهنده کلنی (cfu) در هر میلی لیتر نمونه.

مثال ۲: شمارش پلیت‌های آنالیز شده با استفاده از روش فیلتراسیون غشائی با حجم مرجع $V_s = 100 \text{ ml}$ نتایج زیر را حاصل می‌کند.

در حجم فیلترشده (V) ۰,۱ ml: ۲۱ کلنی در دیش.

بنابراین:

$$N' = \frac{21}{0.1 \times 1} \times 100 = 21\,000$$

گرد کردن نتایج طبق زیربند ۹-۱-۸-۱، می‌دهد:

$N' = 21\,000$ یا $N' = 2,1 \times 10^4$ واحد تشکیل دهنده کلنی (cfu) در هر ۱۰۰ ml نمونه.

۹-۱-۸-۷ عدم قطعیت نتایج آزمون

برای کسب اطلاعات بیشتر در خصوص تخمین و بیان عدم قطعیت نتایج آزمون از روش‌های کمی، به پیوست الف-۲ و استاندارد [20] ISO 29201 مراجعه شود.

۹-۲ شمارش با استفاده از محیط کشت مایع

۹-۲-۱ کلیات

آزمونه‌ها به محیط کشت مایع تلقیح می‌شوند تا از رشد یک میکروارگانیسم خاص یا گروهی از میکروارگانیسم‌ها اطمینان حاصل شود. این محیط‌ها اغلب برای جلوگیری از تکثیر میکروارگانیسم‌های غیرهدف نیز مشخص می‌شوند.

برای تعیین این که آیا رشد میکروارگانیسم‌های هدف رخ داده است، می‌توان از معیارهای مختلف استفاده کرد، برای مثال تشخیص چشمی کدورت، تولید گاز، تغییرات رنگ، جداسازی متعاقب میکروارگانیسم‌ها در یک محیط کشت آگار انتخابی. ترکیب محیط کشت رشد و معیارهای متمایزکننده بین نتایج مثبت و منفی در استانداردهای خاص تعریف شده است.

با استفاده از این رویکرد، تنها یک مقدار کیفی می‌تواند به هر آزمون نسبت داده شود، یعنی نتیجه یا مثبت است یا منفی. برای به‌دست آوردن تخمینی از مقدار میکروارگانیسم‌های موجود، لازم است چندین آزمون را بررسی کرده و از روش‌های آماری برای تعیین MPN استفاده شود. این بخش‌ها ممکن است در لوله‌ها، بطری‌ها، یا پلیت‌های چندچاهکی^۱ یا میکروول^۲ (به استاندارد [11] ISO 7899-1، [12] ISO 9308-2 و ISO [13] 9308-3 مراجعه شود) مطابق با روش مورد استفاده، وجود داشته باشد.

در صورت به‌کارگیری یک محیط کشت انتخابی، بهتر است اضافه‌کردن آزمون، خواص انتخابی را کاهش ندهد، زیرا از این طریق امکان رشد میکروارگانیسم‌های غیرهدف فراهم می‌شود.

یادآوری- در بیشتر استانداردها، اطلاعات مربوط به سازگاری ماتریس خاص و محیط کشت مایع در دامنه شرح داده شده است، اما ناسازگاری می‌تواند به دلیل ترکیب بیولوژیکی ماتریس مانند نمونه‌های محیطی بسیار آلوده باشد. برای چنین ماتریس‌های مشکل‌ساز، اسپایک کردن^۳ آزمون‌ها با استفاده از میکروارگانیسم‌های نمایانگر می‌تواند انجام شود تا مناسب‌بودن این روش برای ماتریس تایید شود.

۹-۲-۲ روش اجرایی

غیر از مواردی که در استانداردهای خاص تصریح شده است، به‌طور معمول حجم آزمون‌های کمتر از ۱ ml یا برابر با آن به ۵ تا ۱۰ برابر حجم یک محیط کشت با غلظت معمولی^۴ اضافه می‌شود. آزمون‌های بیشتر از ۱ ml و بیشینه تا ۱۰۰ ml، به‌طور معمول به حجم برابر از محیط کشت با غلظت دو برابر^۵ افزوده می‌شود.

برای حجم‌های بیشتر از ۱۰۰ ml، می‌توان از محیط کشت غلیظ‌تر استفاده نمود. همان‌گونه که در زیربند ۹-۴-۱-۶ توضیح داده شده است، حجم‌های آزمون بزرگتر نیز می‌تواند با استفاده از تغلیظ از طریق فیلتراسیون غشائی و در ادامه انتقال مستقیم فیلتر غشائی به محیط کشت مایع از لحاظ حضور/فقدان یا شمارش MPN مورد آنالیز قرار گیرد. آزمون‌ها با توجه به اندازه، به لوله یا بطری‌های حاوی مقدار لازم محیط کشت مایع تلقیح می‌شوند. برای آزمون‌های کوچک نیز از پلیت‌های چندچاهکی استفاده می‌شود.

برای مقاصد خاص، می‌توان محیط کشت آب‌گیری شده سترون را در نمونه خنک (یا از پیش گرم‌شده تا دمای ۳۰ °C) حل کرد تا مورد آزمون قرار گیرد. علاوه بر این، حجم‌هایی از نمونه را می‌توان به پلیت‌های چندچاهکی حاوی محیط کشت آب‌گیری شده اضافه کرد. بهتر است زمان سپری‌شده بین آماده‌سازی رقت اولیه یک نمونه و تلقیح آخرین لوله، بطری یا پلیت چند چاهکی کمتر از ۱۵ min باشد، مگر خلاف آن بیان شود.

برای هر رقت باید از یک پیپت سترون جدید استفاده شود مگر این‌که رقیق‌ترین نمونه در ابتدا پیپت شود.

1- Multiwell plates
2- Microwell plates
3- Spiking
4- Single-strength
5- Double-strength

۳-۲-۹ انتخاب سیستم تلقیح

۱-۳-۲-۹ کلیات

ماهیت روش MPN، رقیق‌سازی یک نمونه به اندازه‌ای است که ماده تلقیحی گاهی اوقات، اما نه همیشه حاوی میکروارگانیسم‌های زنده باشد. نتیجه، یعنی تعداد ماده تلقیحی که در هر رقت رشد ایجاد می‌کند، تخمینی از غلظت اولیه باکتری‌ها در نمونه را می‌دهد. برای به‌دست آوردن تخمین‌ها در طیف وسیعی از غلظت‌های احتمالی، از رقت‌های سری استفاده می‌شود و در هر رقت، چندین لوله (یا پلیت و غیره) تلقیح می‌شود. MPN میکروارگانیسم‌های موجود در نمونه اصلی و دقت تخمین، را می‌توان از طریق روش‌های آماری بر اساس تعداد لوله‌های مثبت و منفی مشاهده‌شده پس از تلقیح، محاسبه کرد.

پیکربندی‌های مختلف MPN موجود را با توجه به ملاحظات زیر انتخاب کنید:

- تعداد مورد انتظار میکروارگانیسم‌ها در نمونه تحت بررسی؛

- الزامات قانونی؛

- دقت مورد نیاز؛

- هرگونه ملاحظات عملی دیگر.

نظر به این‌که عدم قطعیت شمارش کلنی به تعداد کلنی‌های یک پلیت بستگی دارد، عدم قطعیت نتایج آزمون MPN نیز به تعداد آزمون‌های مثبت مشاهده‌شده به روش مشابه بستگی دارد. عدم قطعیت به‌صورت تابعی از جذر تعداد لوله‌های مورد استفاده تغییر می‌کند، زیرا دقت با افزایش تعداد آزمون‌های تکراری افزایش می‌یابد؛ با این حال، برای کاهش پنجاه درصدی عدم قطعیت، تعداد لوله‌ها باید چهار برابر شود. زمانی که سیستم فقط از تعداد کم لوله تکرار تشکیل شود، عدم قطعیت نسبی بالا خواهد بود.

۲-۳-۲-۹ سیستم رقت منفرد^۱

هنگامی که غلظت مورد انتظار میکروارگانیسم‌ها کم است یا انتظار می‌رود که به آرامی تغییر کند، مناسب‌ترین روش تلقیح سری منفرد آزمون‌های یکسان است. در صورتی که نسبت مورد انتظار بین بیشینه و کمینه تعداد میکروارگانیسم‌ها کمتر از ۲۵ باشد، ۱۰ آزمون موازی، کمترین تعداد مورد انتظار برای ارائه اطلاعات مفید است (کمترین تعدادی است که باید آزمون شود). زمانی که این نسبت تا ۲۰۰ باشد ۵۰ لوله موازی مورد نیاز است. اگر غلظت واقعی نزدیک به مقادیر انتهایی MPN پذیرفتنی باشد، احتمال این‌که تمام لوله‌ها مثبت یا منفی باشند خیلی زیاد است.

1- Single-dilution

۹-۲-۳-۳ سیستم چند رقتی

۹-۲-۳-۳-۱ کلیات

هنگامی که غلظت میکروارگانیزم‌ها در نمونه ناشناخته است یا اگر تغییرات زیادی پیش‌بینی شده باشد، در این صورت ممکن است لازم باشد مجموعه‌ای از لوله‌ها را از چندین رقت تلقیح کنیم. برای اطمینان از روشی با نتایج مثبت و منفی، تعداد کافی از رقت‌ها را تلقیح کنید. تعداد رقت‌های مورد استفاده نیز به روش محاسبه به کار رفته برای تخمین مقدار MPN بستگی دارد. در صورت استفاده از جداول MPN، ترکیب روش‌ها محدود به موارد موجود در جداول می‌شود. در صورت استفاده از برنامه‌های رایانه‌ای، تعداد رقت‌ها و لوله‌های موازی نامحدود است، که این مسئله در رابطه با استفاده از کیت‌های تجاری آزمون MPN اهمیت دارد.

۹-۲-۳-۳-۲ سیستم رقت متقارن

معمول‌ترین سیستم MPN متقارن استفاده از سه یا پنج لوله موازی در هر رقت است. دقت به‌دست آمده با این سیستم‌ها با تعداد کم لوله‌ها در هر رقت، بسیار پایین است. نتایج حاصل از سیستم سه لوله‌ای به‌ندرت بیشتر از شاخص‌های مربوط به مقدار غلظت است. اگر دقت بیشتری لازم باشد، توصیه می‌شود که سیستم‌های موازی پنج لوله‌ای یا بیشتر انتخاب شود.

به عنوان یک روش جایگزین، می‌توان از سیستم‌های کوچک‌شده یا پلیت‌های چندچاهی به‌طور معمول برای انواع خاصی از آب (مانند آب سطحی و فاضلاب) استفاده کرد، به استاندارد ISO 7899-1 [11] و [13] ISO 9308-3 مراجعه شود.

۹-۲-۳-۳-۳ سیستم رقت نامتقارن

سیستم‌های نامتقارن دارای تعداد متفاوت لوله در رقت‌های مختلف هستند و بهتر است فقط برای تخمین تعداد میکروارگانیزم‌ها در یک محدوده معین استفاده شوند. گاهی اوقات ممکن است یک لوله از بین برود یا شکسته شود که منجر به یک سیستم نامتقارن ناخواسته شود. با این حال، برخی از کیت‌های تجاری آزمون بر اساس سیستم‌های نامتقارن هستند (به استاندارد [12] ISO 9308-2 مراجعه شود). بهتر است داده‌های این سیستم‌ها با استفاده از یک برنامه نرم‌افزار رایانه‌ای مناسب ارزیابی شود (به زیربند ۹-۲-۳-۴ مراجعه شود).

۹-۲-۴ گرمخانه‌گذاری

لوله‌ها، بالن‌ها یا بطری‌ها تلقیح‌شده را در گرم‌خانه یا حمام آب قرار دهید. پلیت‌های چندچاهی و میکروول را در گرم‌خانه قرار دهید تا اطمینان حاصل شود که آن‌ها به‌اندازه کافی در برابر آب‌گیری شدن محافظت می‌شوند.

مدت زمان و دمای مورد نیاز گرمخانه‌گذاری را با روش استاندارد خاص انتخاب کنید، زیرا به میکروارگانیسم یا گروه میکروارگانیسم‌های مورد جستجو بستگی دارد.

برای برخی از میکروارگانیسم‌ها، یک روش گرمخانه‌گذاری دو مرحله‌ای و/یا یک مرحله‌تایید می‌تواند ضروری باشد. برای کسب اطلاعات بیشتر به استانداردهای مربوطه مراجعه شود، اما توجه داشته باشید که این موضوع می‌تواند یک پیچیدگی را به استنتاج مقادیر MPN اضافه کند [22].

۵-۲-۹ تفسیر نتایج

معیارهایی که نتایج مثبت را از نتایج منفی تشخیص می‌دهند، با هر میکروارگانیسم یا گروه میکروارگانیسم‌ها تغییر می‌کند و در استانداردهای خاص تعریف می‌شوند. با استفاده از این معیارها، تعداد نتایج مثبت حاصل از تمام آزمون‌های مشتق‌شده از یک نمونه را شمارش و ثبت کنید.

۶-۲-۹ عدم قطعیت نتایج آزمون

برای کسب اطلاعات بیشتر در زمینه تخمین و بیان عدم قطعیت نتایج آزمون حاصل از روش‌های کمی، به پیوست الف-۲ و استاندارد [20] ISO 29201 مراجعه شود.

۷-۲-۹ تعیین مقادیر MPN

۱-۷-۲-۹ کلیات

سه گزینه مختلف برای تعیین مقادیر MPN وجود دارد: محاسبه با استفاده از فرمول‌های ریاضی، استفاده از جداول MPN منتشرشده، یا استفاده از برنامه‌های رایانه‌ای خاص. به شرط آن که این برنامه‌ها بر اساس ملاحظات آماری مشابه باشند، به همان اندازه معتبر هستند. جداول MPN منتشرشده، به‌طور معمول دارای ۹۵٪ حدود اطمینان هستند. این موارد همچنین از طریق دو گزینه دیگر نیز به‌دست می‌آید. این سه رویکرد در زیر تشریح شده است.

از آنجاکه مقادیر MPN بر اساس آنالیز آماری تعداد واکنش‌های مثبت از یک نمونه است، آن‌ها اغلب در جداول قابل‌دسترس با یک رقم اعشار نشان داده می‌شوند. با این حال، هنگام گزارش مقادیر MPN باید آن‌ها را به صورت نزدیک‌ترین عدد صحیح ذکر کرد.

۲-۷-۲-۹ فرمول‌های ریاضی

۱-۲-۷-۲-۹ فرمول یک‌سری از لوله‌ها

مقدار MPN در هر میلی‌لیتر برای یک سری منفرد از لوله‌ها با استفاده از فرمول (۹) به‌دست می‌آید:

$$MPN = -\frac{1}{m} \ln \left[\frac{S}{N} \right] \quad (9)$$

که در آن:

m حجم، برحسب میلی لیتر نمونه در هر لوله از سری؛

S تعداد لوله ها با واکنش منفی؛

N تعداد لوله ها در سری، است.

۹-۲-۷-۲ تخمین های دقیق برای سنجش های رقت منفرد

حدود اطمینان ۹۵٪ برای تخمین MPN را می توان از MPN مشتق شده و انحراف معیار $\log(MPN)$ با استفاده از روش هالدین^۱ منبع شماره [26] به طور تقریبی محاسبه کرد، همان گونه که در BAM^۲ منبع شماره [34] کتاب نامه توصیف شده است. همچنین به بلاجت^۳ منبع شماره [22] کتاب نامه مراجعه شود.

انحراف معیار MPN با استفاده از فرمول (۱۰) محاسبه می شود:

$$SD(\log_{10}M) = \frac{(1 - e^{-Mm})}{2.303 \times Mm \sqrt{G \times e^{-Mm}}} \quad (10)$$

که در آن:

M MPN؛

m حجم یا جرم ماده تلقیحی در هر لوله؛

G تعداد لوله های نشان دهنده رشد؛

e پایه لگاریتم طبیعی ($e = ۲٫۸۱۷۳$) است.

تقریب نرمال حدود اطمینان از طریق $M \pm 1.96 \times SD(\log_{10}M)$ نشان داده می شود.

مثال: اگر ۰٫۱ ml نمونه (m) به هر کدام از $n = ۲۰$ لوله تلقیح شود و $G = ۴$ نتیجه مثبت حاصل شود (از این رو ۱۶ نتیجه منفی وجود دارد)، MPN/ml یا MPN/g از طریق فرمول زیر نشان داده می شود:

$$M = -\frac{1}{m} \ln \left[\frac{S}{N} \right] = -\frac{1}{0.1} \times \ln \left[\frac{16}{20} \right] = -10 \times \ln(0.8) = 2.23$$

و بنابراین:

$$SD(\log_{10}M) = \frac{(1 - e^{-Mm})}{2.303 \times Mm \sqrt{G \times e^{-Mm}}} = \frac{(1 - e^{-0.223})}{2.303 \times 0.223 \sqrt{4 \times e^{-0.223}}} = \frac{(1 - 0.80)}{0.5136 + \sqrt{3.2}} = \frac{0.20}{0.9187} = 0.22$$

حالا، $\log_{10}M = ۰٫۳۵$

و تقریب نرمال حدود اطمینان از طریق $M \pm 1.96 \times SD(\log_{10}M)$ نشان داده می شود.

1- Haldane
2- Bacteriological Analytical Manual
3 - Blodgett

$$\text{حد پایینی } (\log_{10} M) = 0.35 - (1.96 \times 0.22) = 0.35 - 0.43 = -0.08$$

$$\text{حد بالایی } (\log_{10} M) = 0.35 + 0.43 = 0.78$$

بنابراین حد پایینی:

$$(M) = \text{antilog}(-0.08) = 0.83$$

و حد بالایی:

$$(M) = \text{antilog}(0.78) = 6.0$$

با این وجود، لازم نیست این محاسبات را به صورت دستی انجام دهید، زیرا می توان با استفاده از محاسبه گر MPN آن ها را تعیین نمود (مطابق با زیربند ۹-۲-۷-۴).

۹-۲-۷-۳ تخمین های دقیق برای سنجش های چندرقتی متقارن

عدم قطعیت استاندارد $\log_{10}$ یک سیستم MPN چندرقتی منظم را می توان از تقریب کوکران^۱ [23]، فرمول (۱۱) به دست آورد:

$$SD = 0.58 \sqrt{\frac{\log_{10} f}{N}} \quad (11)$$

که در آن:

SD انحراف معیار $\log_{10}$ MPN؛

f فاکتور رقت بین رقت های متوالی (به طور معمول ۱۰)؛

N تعداد لوله ها در هر رقت است.

حدود اطمینان ۹۵٪ بالایی و پایینی را به ترتیب، با ضرب و تقسیم تخمین MPN در آنتی لگاریتم $SD \times 2$ می توان تقریب زد. این روش گرایش به بزرگ نمایی حد اطمینان بالایی دارد. تخمین دقیق تر را می توان با استفاده از محاسبه گر MPN (مطابق با زیربند ۹-۲-۷-۴) به دست آورد.

۹-۲-۷-۳ جداول MPN

۹-۲-۷-۳-۱ جداول سیستم های با رقت منفرد

جداول منتشر شده (برای مثال به منابع شماره [22]، [27] و [30] کتاب نامه مراجعه شود) مقادیر MPN و حدود اطمینان ۹۵٪ هر آزمون با شماره های مختلف مانند ۱۵، ۲۰، ۱۰ و ۲۵ لوله های موازی را نشان می دهد (فرض بر این است که هر لوله با حجم یکسان رقت منفرد تلقیح شده است).

برای بیان نتیجه در حجم مرجع نمونه، مقادیر MPN و حد اطمینان ۹۵٪ در نسبت «حجم مرجع به حجم آزمونه» ضرب می‌شود. عدم قطعیت استاندارد لگاریتمی ضرب نشود. در میکروبیولوژی آب حجم مرجع به‌طور معمول ۱ ml و ۱۰۰ ml است. حجم آزمونه مطابق با مقدار نمونه‌ای (برحسب میلی‌لیتر) است که در حجم مورد استفاده برای تلقیح به لوله‌ها وجود دارد، برای مثال ۰/۱ ml در صورتی که ۱ ml از رقت 10^{-1} استفاده شده است.

مثال: به منبع شماره [30] کتاب‌نامه مراجعه شود.

مقدار ۵ ml از نمونه با رقت ده برابری (۰/۱ ml/ml) به بیست لوله حاوی محیط کشت مایع با غلظت مضاعف تلقیح شد. پس از گرمخانه‌گذاری، در ۱۶ لوله آثار رشد مشاهده شد. بیشترین تعداد احتمالی باکتری‌ها (مانند میکروارگانیسم‌ها در هر میلی‌لیتر)، مطابق جداول، ۱/۱۶ ارگانیسم در هر لوله معین شده است، که در حدود اطمینان ۹۵٪ پایینی و بالایی ۰/۹۳ و ۲/۷۷ قرار دارد.

هر لوله حاوی ۵ ml آزمونه است که این مقدار مطابق با ۰/۵ ml نمونه می‌باشد. بنابراین MPN میکروارگانیسم‌ها در ۱ ml نمونه برابر است با:

$$\text{MPN} = \frac{1.61}{0.5} \text{ در هر میلی‌لیتر} = 3.22$$

با حدود اطمینان ۹۵٪

$$\begin{aligned} \text{حد } 2/5 \text{ \% پایینی} &= \frac{0.93}{0.5} = 1.9 \text{ } l^{-1} \\ \text{حد } 97/5 \text{ \% بالایی} &= \frac{2.77}{0.5} = 5.5 \text{ } l^{-1} \end{aligned}$$

۹-۲-۷-۳-۲ جداول سیستم‌های چند رقتی: سه رقت متوالی

با سیستم‌های متقارن، به‌طور معمول سه رقت متوالی با سه، پنج یا ۱۰ تکرار استفاده می‌شود. تعداد نتایج مثبت را برای هر مجموعه از لوله‌ها ثبت کنید و از جدول MPN مناسب برای سیستم تلقیح مورد استفاده، MPN میکروارگانیسم‌های موجود در حجم مرجع نمونه را بخوانید.

در بعضی جداول $\log \text{MPN}$ ، $\text{SD } \log \text{MPN}$ ، حدود اطمینان پایینی و بالایی فواصل اطمینان ۹۵٪ اطمینان همراه با مقدار کمیابی و طبقه‌بندی کمیابی فراهم شده است. مقدار کمیابی (به منابع شماره [21] [22] و [25] کتاب‌نامه مراجعه شود) رویکرد ساده‌تری را برای ارزیابی احتمال این که نتیجه مشاهده‌شده در آزمون حاصل خواهد شد، فراهم می‌کند.

بعضی از ترکیبات لوله‌های مثبت بیشتر از سایرین رخ می‌دهد؛ برای مثال، ترکیبی از نتایج مثبت ۰ - ۰ - ۳ بسیار کمتر از ترکیب ۳ - ۲ - ۱ اتفاق می‌افتد. برای تعیین این احتمال، شاخص کمیابی به‌صورت نسبت دو مقدار احتمالی محاسبه می‌شود:

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

که در آن:

$L(\hat{\mu})$ احتمال نتایج مشاهده شده $x_1, x_2, \dots, x_k$ آزمون رقت سری؛

$L_0(\hat{\mu})$ احتمال این که نتیجه به احتمال زیاد، تحت غلظت μ برابر با مقدار تخمینی $\hat{\mu}$ از غلظت μ باشد.

جزئیات کامل روش محاسبه توابع احتمال در منبع شماره [28] کتابنامه ارائه شده است.

شاخص کمیابی عددی بین ۰ و ۱ است. اگر نتیجه آزمون رقت سری محتمل ترین غلظت برابر با MPN تخمینی باشد، این مقدار ۱ است. چنانچه در حدود صفر باشد، نتیجه آزمون رقت سری برای غلظت برابر MPN تخمینی، بسیار غیرمحتمل است. با توجه به رویکرد در منابع شماره [23] و [24] کتابنامه، سه طبقه بندی کمیابی زیر استفاده می شود:

- طبقه بندی ۱: مقدار MPN به طور احتمالی در صورتی رخ می دهد که مقدار کمیابی آن در محدوده ۰٫۰۵ تا ۱٫۰۰ $(0.05 \leq r \leq 1.00)$ باشد، یعنی ممکن است چنین نتیجه ای در ۹۵٪ موارد رخ دهد؛

- طبقه بندی ۲: انتظار می رود مقدار MPN به ندرت اتفاق افتد، اگر مقدار کمیابی آن در محدوده ۰٫۰۱ تا ۰٫۰۵ $(0.01 \leq r \leq 0.05)$ باشد؛ چنین نتیجه ای به طور احتمالی با فراوانی کمتر از ۵٪ رخ می دهد؛

- طبقه بندی ۳: انتظار می رود مقدار MPN به ندرت اتفاق افتد اگر مقدار کمیابی آن در محدوده ۰ تا ۰٫۰۱ $(0 < r < 0.01)$ باشد؛ یعنی انتظار می رود چنین نتیجه ای با احتمال کمتر از یک بار در ۱۰۰ آزمون رخ دهد.

بیشتر جداول فقط ترکیبی از نتایج را نشان می دهند که در طبقه بندی های ۱ و ۲ قرار دارند.

در کلیه شرایط، در صورتی که بیش از سه رقت ساخته می شود، تمام مقادیر داده های اندازه گیری شده باید مورد استفاده قرار گیرد. در فرضیه انتخاب هیچ ترکیبی از مقادیری که این مقادیر از سایر ترکیبات صحیح تر باشد، از لحاظ علمی درست نیست. بهتر است نتایج حاصل از همه ترکیبات احتمالی لوله های مثبت ثبت شود و از محاسبه گر MPN (مطابق با زیربند ۹-۲-۷-۴) برای استخراج مقادیر MPN استفاده شود.

۹-۲-۷-۴ تعیین مقادیر MPN با استفاده از محاسبه گر MPN

بهتر است از محاسبه گر MPN برای تعیین مقادیر MPN حاصل از ترکیب لوله های مثبت و منفی، بالن ها یا چاهک های میکروپلیت در هر رقت استفاده شود. چنین محاسبه گرهایی امکان ورود نتایج حاصل از تمام آزمون ها را به جای محدود کردن استفاده از تعداد معینی از رقت ها و تکرارها، همانند جداول MPN، فراهم می کند. بهتر است خروجی این محاسبه گر شامل تخمین فواصل اطمینان ۹۵٪ برای MPN همراه با شاخص احتمال وقوع ترکیب نتایج حاصل از MPN باشد (این ممکن است به صورت یک شاخص کمیابی و/یا طبقه بندی کمیابی باشد؛ به زیربند ۹-۲-۷-۳ مراجعه شود). برای کسب اطلاعات بیشتر در خصوص محاسبه گری که این الزامات را برآورده کند به وب گاه <http://standards.iso.org/iso/8199> مراجعه شود.

این صفحه گسترده^۱ می‌تواند تا ۱۰ سطح رقت سری را اداره کند. جزئیات این محاسبه‌ها در منبع شماره [28] کتاب‌نامه تشریح شده است.

برخی از استانداردهای خاص (برای مثال [12] ISO 9308-2) شامل یک محاسبه‌گر MPN است که پس از ضمن رعایت این استاندارد مورد استفاده قرار می‌گیرد.

بهتر است از نتایج مثبت و منفی حاصل از تمام لوله‌ها یا چاهک‌هایی که در همه رقت‌ها آزمون شده‌اند برای تعیین مقدار MPN در محاسبه‌گر MPN استفاده شوند. انتخاب زیرمجموعه‌ای از رقت‌ها به‌منظور تعیین مقدار مناسب نیست.

محاسبه‌گر MPN همچنین لگاریتم اعشار مقدار MPN، انحراف معیار آن (SD)، حدود اطمینان پایینی و بالای تقریبی فواصل اطمینان ۹۵٪ را با شاخص کمیابی و یک طبقه‌بندی کمیابی ارائه می‌دهد. کاربرد شاخص کمیابی در زیربند ۹-۲-۷-۳-۲ شرح داده شده است.

اگر محاسبه‌گر MPN ترکیبی از لوله را به‌عنوان غیرمحمّل به‌شکل برجسته نشان دهد (یعنی طبقه‌بندی ۳ گفته‌شده در زیربند ۹-۲-۷-۳-۲)، بهتر است مقدار MPN مربوطه گزارش نشود. در صورت لزوم، توصیه می‌شود ارسال نمونه تکراری درخواست شود.

۱۰ روش‌های (کیفی) تشخیص

۱-۱۰ کلیات

روش‌های تشخیص وجود یا فقدان میکروارگانیسم‌های خاص در یک مقدار مشخص نمونه را در سطح معین از تشخیص، تعیین می‌کند.

۲-۱۰ روش اجرایی

مقدار p ml نمونه تحت بررسی را با $9 \times P$ ml یک براث انتخابگر و/یا انتخابی مخلوط کنید، مگر در استاندارد بین‌المللی خاص خلاف آن گفته شود.

به‌طور متناوب، حجم‌هایی از نمونه‌های آب را تا جایی که کدورت اجازه می‌دهد از میان فیلترهای غشائی عبور دهید و فیلترهای غشائی را به‌صورت مستقیم در یک براث انتخابگر و/یا انتخابی قرار دهید.

به‌منظور تسهیل بازیابی میکروارگانیسم‌های تحت تنش، به‌طور معمول نمونه‌ها در یک براث غیرانتخابی پیش غنی‌سازی شده و به دنبال آن غنی‌سازی انتخابی در یک براث و جداسازی در محیط کشت آگار انتخابی/افتراقی صورت می‌گیرد.

استفاده از دو برات غنی‌سازی متفاوت و همچنین دو یا چند محیط کشت انتخابی آگار، حساسیت روش را افزایش می‌دهد.

برات‌های غنی‌سازی گرمخانه‌گذاری شده می‌تواند تنها پس از ارزیابی اثر سردسازی بر نتایج و فقط در صورت تصریح در گزارش آزمون، سرد شود، مگر خلاف آن گفته شود.

پس از گرمخانه‌گذاری، یک حلقه از کلنی حاصل در سطح محیط کشت آگار انتخابی/افتراقی برای به‌دست آوردن کلنی‌های جداشده برداشته شود.

سپس با استفاده از روش‌های تأیید مناسب (به‌طور کلی پنج عدد در هر دیش آگار، مگر در استاندارد خاص خلاف آن گفته شود) تعداد کلنی به دست آمده پس از گرمخانه‌گذاری مشخص شود. بهتر است انتخاب کلنی‌ها برای تأیید، انواع کلنی‌های نمایانگر مشکوک را پوشش دهد.

۱۰-۳ عدم قطعیت نتایج آزمون

نتایج روش تشخیص نیز در معرض عدم قطعیت هستند زیرا ممکن است میکروارگانیسم‌های هدف از دست بروند (منفی کاذب یا کاهش حساسیت آزمون) یا میکروارگانیسم‌های غیرهدف به اشتباه شناسایی شود (مثبت کاذب یا کاهش اختصاصیت آزمون). این مفاهیم در پیوست الف-۲-۲ به همراه سطح تشخیص، مورد بحث قرار می‌گیرند که عامل مهمی در عدم قطعیت نتایج کیفی است.

۱۱ ویژگی‌های عملکرد روش‌ها

ویژگی‌های عملکرد برای آزمون میکروبیولوژی در استاندارد ملی ایران شماره ۱۵۶۶۲ [۴] تعریف شده است. تعیین ویژگی فرایند اکتشافی با هدف تعیین محدوده احتمالی ویژگی‌های عملکرد یک روش جدید، اصلاح‌شده یا در غیراین‌صورت یک روش توصیفی نامناسب است. در مرحله اول از طریق یک آزمایشگاه واحد به‌منظور تعیین عملکرد احتمالی یک روش آزمون کمی انجام می‌شود.

بهتر است ویژگی‌های عملکرد تعیین‌شده در روش‌های آزمون استاندارد بین‌المللی ذکر شوند تا آزمایشگاه‌های کاربر بتوانند ویژگی‌های منتشرشده را با نتایج خود برای بررسی عملکرد آزمون آزمایشگاهی مقایسه کنند.

ویژگی‌های عملکرد تشریح‌شده برای فرایند تعیین ویژگی عبارتند از:

- عملکردهای رسته‌ای: حساسیت، اختصاصیت، انتخاب‌پذیری، نرخ مثبت کاذب و نرخ منفی کاذب؛
- عملکردهای سیستم تشخیص: محدوده کاری، خطی‌بودن، پایداری، کارایی بازیابی؛
- عدم قطعیت و دقت در اجرای روش: عدم قطعیت شمارش، تکرارپذیری، تجدیدپذیری.

صحه‌گذاری روی جمع‌آوری شواهد مبنی بر این که آزمایشگاه قادر به تولید داده‌های عملکردی مشابه آنچه که در تعیین ویژگی مشخص شده است، تمرکز می‌کند. به‌طور معمول، صحه‌گذاری از شکل‌های انتخابی و ساده‌شده روش‌های اجرایی مشابه مورد استفاده در تعیین ویژگی روش، اما به‌طور بالقوه تعمیم‌یافته در زمان طولانی‌تر، استفاده می‌کند.

اگر روش‌های تأیید جایگزین برای دسته‌ای مشخص در استانداردهای مجزا، توسط یک آزمایشگاه مورد استفاده قرار گیرند (برای مثال فنون PCR یا MALDI-TOF)، بهتر است آزمایشگاه اطمینان حاصل کند که مناسب بودن روش‌های جایگزین، اثبات شده است. استاندارد ملی ایران شماره ۱۵۶۶۲ [۴] یادآور می‌شود که آزمایشگاه‌ها با ایجاد تغییراتی در روش‌های استاندارد می‌توانند مراحل تعیین ویژگی را انجام دهند. علاوه بر این، مجموعه استانداردهای ISO16140 (همه قسمت‌ها) [15] راهنمای اصول کلی و پروتکل‌های فنی صحه‌گذاری روش‌های جایگزین، اغلب اختصاصی، از جمله روش‌های جایگزین برای تأیید میکروبیولوژیکی و روش‌های اجرایی تعیین نوع را ارائه می‌دهد.

برای کسب اطلاعات بیشتر در مورد ویژگی‌های عملکردی خاص در روش‌های آزمون آب به پیوست الف و استاندارد [17] ISO 17994 مراجعه شود.

۱۲ کنترل کیفیت تجزیه‌ای

۱-۱۲ کلیات

استفاده از روش‌های معتبر در حدود قابل اطمینان مشخص‌شده آن‌ها به‌طور خودکار نتایج معتبر را تضمین نمی‌کند. کنترل کیفیت تجزیه‌ای (AQC)^۱ مورد استفاده همراه با آنالیز معمول برای پایش و کنترل عملکرد یک روش ضروری است.

ضروری است که تمام جنبه‌ها در شمارش و شناسایی میکروارگانیسم‌ها در آب، دارای روش مناسب AQC در محل، طبق توصیه استاندارد [16] ISO/IEC 17025، باشد. AQC بخش مهمی از یک برنامه تضمین کیفیت آزمایشگاهی است که به کسب اطمینان از نتایج تولیدشده کمک می‌کند. AQC مناسب باید به‌طور سیستماتیک برای بررسی هر مرحله از فرایند آزمون به‌منظور کسب اطمینان از این که یک آزمایشگاه قادر به جداسازی، شناسایی دقیق و شمارش میکروارگانیسم‌های هدف در یک نمونه است، استفاده شود. اجزای کلیدی برنامه AQC کنترل کیفیت داخلی در زمان آنالیز نمونه و تضمین کیفیت خارجی از طریق مشارکت در یک طرح‌واره آزمون مناسب و به‌طور ترجیحی آزمون مهارت معتبر اعمال می‌شود.

1- Analytical quality control

۱۲-۲ کنترل کیفیت داخلی

۱۲-۲-۱ کلیات

انواع زیادی از آزمون‌های کنترل کیفیت داخلی (IQC)^۱ در آزمایشگاه‌های مجزا برای ارزیابی اثربخشی روش‌های اجرایی جداسازی، شمارش و تایید مورد استفاده برای نمونه‌های معمول آن‌ها در دسترس هستند. این آزمون‌ها برای مقاصد مختلف به کار گرفته می‌شوند و این بند برخی از گزینه‌های موجود را شرح می‌دهد. بهتر است تمام نمونه‌های کنترل کیفیت حاوی میکروارگانیزم‌های هدف مشابه با دسته مورد جستجو با روش‌های خاص و در صورت لزوم، میکروارگانیزم‌های غیرهدف باشد که عملکرد آزمون را به چالش می‌کشد. نتایج انواع مختلف آزمون‌های IQC نیز یک منبع با ارزش داده برای تخمین عدم قطعیت نتایج آزمون معمول در آزمایشگاه است.

۱۲-۲-۲ کنترل‌های فرایند

۱۲-۲-۲-۱ کلیات

آزمون اولیه IQC با استفاده از کنترل‌های روزانه فرایند در کنار آزمون‌های معمول انجام می‌شود. این موارد عبارتند از:

- الف- کنترل مثبت: سویه‌ای از میکروارگانیزم یکسان یا مشابه موارد مورد جستجو، که بر روی آگار (یا واکنش‌های مثبت در برات) و در صورت مناسب بودن، در آزمون‌های تایید کلنی‌های هدف را تولید می‌کند؛
- ب- کنترل منفی (غیرهدف): سویه‌ای از میکروارگانیزم که قادر به رشد در محیط کشت آزمون است، اما کلنی‌های غیرهدف (یا واکنش‌ها در برات) و در صورت مناسب بودن، در آزمون‌های تایید تولید می‌کند؛
- پ- کنترل منفی (مهار): سویه‌ای از میکروارگانیزم‌ها که رشد آن به وسیله محیط آزمون مورد استفاده، مهار می‌شود.
- ت- شاهد: یک جزء نمونه سترون که هیچ کلنی روی آگار یا واکنشی در برات تولید نمی‌کند.

۱۲-۲-۲-۲ آزمون تکرار

تکرار آزمون نمونه‌های معمول شاخص تکرارپذیری معمول یا عملکرد متخصص فنی را زمانی که نمونه کافی در دسترس است یا از نمونه‌بردارها درخواست می‌شود، نشان می‌دهد. از داده‌های دوتایی بیشترین استفاده می‌شود، اما در برخی شرایط ممکن است تکرارهای چندگانه نیز مورد توجه قرار گیرد. نتایج چنین IQC نیز ممکن است با تخمین‌های عدم قطعیت نتایج آزمون به عنوان یک منبع تکمیلی داده، ترکیب شود.

1- Internal quality control

۱۲-۲-۳ نمونه‌های اسپایک شده

در مواردی که میکروارگانسیم‌های هدف طی آزمون نمونه‌های معمول، به ندرت از هم جدا می‌شوند، بهتر است از نمونه‌های اسپایک شده استفاده شود. این نمونه‌ها با استفاده از ارگانسیم‌های هدف و/یا غیرهدف یا سویه‌ها، مطابق با زیربند ۱۲-۲-۲ آماده و توسط تمام کارکنان آزمایشگاه به صورت نامعلوم^۱ آزمون می‌شوند. یک برنامه منظم از نمونه اسپایک شده هنگام آموزش یا به روزرسانی متخصصین فنی در روش‌های معمول، به عنوان مکمل آزمون‌های ارزیابی کیفیت خارجی، که می‌تواند به ندرت و هزینه‌بر باشد، مفید است.

۱۲-۲-۴ میکروارگانسیم‌ها برای کنترل کیفیت داخلی

جزئیات میکروارگانسیم‌های مورد نیاز برای آزمون عملکرد همه محیط‌های مورد استفاده در استانداردهای بین‌المللی برای میکروبیولوژی آب در استاندارد ISO 11133: 2014، پیوست پ یا استانداردهای خاص ارائه شده است و همچنین می‌تواند برای سایر جنبه‌های IQC مورد بحث در بالا مورد استفاده قرار گیرد.

میکروارگانسیم‌های کنترل کیفیت که در آزمایشگاه نگهداری می‌شوند، باید تا جای ممکن، برگرفته از مواد خشک شده به روش انجماد^۲ یا سایر مواد مرجع تولید شده از سویه‌های مرجع نسل اول حاصل از منابع شناخته شده (مجموعه‌های کشت یا تامین کنندگان معتبر مواد مرجع) باشند. تهیه محلول‌های مادر مرجع آزمایشگاهی و محیط‌های کشت کاری باید مطابق با استاندارد ISO 11133 باشد.

یادآوری ۱- در بعضی موارد خاص، میکروارگانسیم‌هایی که به روش‌های دیگر باقی می‌مانند، می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد، در صورتی که نشان داده شود شرایط ذکر شده در بالا نامناسب است یا منجر به عملکرد ضعیف آزمون می‌شود.

یادآوری ۲- همچنین به چالش کشیدن عملکرد معمول آزمون با جدایه‌های وحشی می‌تواند مفید باشد، برای مثال زمانی که چنین جدایه‌هایی در یک منبع آب یا نوعی از نمونه خاص ارسال شده به آزمایشگاه، رایج باشند.

۱۲-۲-۵ ارزیابی نتایج کنترل کیفیت داخلی

IQC بر اساس روش‌های کیفی و/یا کمی انجام می‌شود و اثربخشی نتایج ارزیابی می‌شود تا هرگونه مشکلات مربوط به عملکرد آزمون برجسته شود.

از آزمون کیفی برای روش‌های تشخیص و آزمون‌های تأیید استفاده می‌شود، بنابراین نتایج حاصل از آزمون کیفی به صورت درست یا غلط امتیازآوری می‌شوند.

داده‌های حاصل از ارزیابی‌های روش کمی را می‌توان در نمودارهای کنترل مانند آن چیزی که برای کنترل کیفیت در تولید توسط شوچارت^۳ [32] و [33] تشریح شد، ترسیم کرد. حدود هشدار و اقدام از طریق روش‌های مشخص شده برای هشدار به آزمایشگاه نسبت به مشکلات بالقوه با دقت روش‌شناسی (به استاندارد

1- Blind

2- Freeze- dried

3- Shewhart

ملی ایران شماره ۸۶۶۳ مراجعه شود) تعیین می‌شود. این حدود همچنین می‌تواند از داده‌های حاصل طی تعیین ویژگی عملکرد طبق استاندارد ملی ایران شماره ۱۵۶۶۲ [۴] به‌دست آید.

۱۲-۳ ارزیابی کیفیت خارجی

طرح‌های ارزیابی کیفی خارجی بین آزمایشگاهی (EQAs)^۱ یا آزمون مهارت (PT)^۲ معتبر قابل‌دسترس برای آزمایشگاه‌هایی که آزمون میکروبیولوژی آب را انجام می‌دهند، وجود دارد. این طرح‌ها شامل بررسی نمونه‌های با ترکیب نامعلوم است که به‌وسیله یک تامین‌کننده مستقل خارجی توزیع شده است.

نتایج حاصل از هر توزیع ارزیابی شده و به‌طور مداوم برای تعیین هرگونه روند یا اریبی بررسی می‌شود؛ ترسیم نتایج متوالی که از هر روش آزمون به‌دست می‌آید، به ارزیابی اریبی سیستماتیک کمک می‌کند.

برای کسب جزئیات بیشتر در این خصوص به استاندارد [19] ISO/TS 22117 مراجعه شود.

آزمون مشارکت از طریق ILC به‌طور گسترده‌ای برای آزمون ویژگی‌های عملکرد روش‌های شیمیایی و سیستم‌های مشابه مفید برای میکروبی‌شناسی، به‌خصوص اگر هیچ طرح مناسب EQA در دسترس نباشد، مورد استفاده قرار گرفته است. آزمایشگاه سازماندهی ILC باید از تجربه کافی برای تهیه مواد آزمون و دستورالعمل‌های روشن برای تمام آزمایشگاه‌های شرکت‌کننده برخوردار باشد (برای سایر جنبه‌های ILC به [19] ISO/TS 22117 مراجعه شود).

1- External quality assessments

2- Proficiency testing

پیوست الف

(آگاهی‌دهنده)

معیارهای انتخاب روش

الف-۱ کلیات

بیشتر میکروارگانيسم‌های قابل کشت در آب را می‌توانید از طریق هر چهار روش اجرایی اصلی تشریح‌شده در بندهای ۹ یا ۱۰ این استاندارد شمارش کنید. عوامل موثر در انتخاب روش اجرایی به شرح زیر طبقه‌بندی می‌شود:

الف- عوامل مربوط به کیفیت نتایج (به پیوست الف-۲ مراجعه شود)

ب- عوامل مربوط به ماهیت نمونه (به پیوست الف-۳ مراجعه شود)

در این پیوست عوامل فوق از نظر کلی بررسی می‌شود زیرا آن‌ها بر انتخاب روش‌های آزمون که برای اهداف خاص مورد استفاده قرار می‌گیرند، تاثیر می‌گذارد.

الف-۲ عوامل مربوط به کیفیت نتایج

الف-۲-۱ کلیات

کیفیت نتایج به‌دست آمده از هر آزمون شمارش را می‌توان از لحاظ ویژگی‌های ذکرشده در ادامه تعریف کرد: عدم قطعیت، درستی (شامل صحت و دقت) و حد تعیین. روش‌های تشخیص به‌طور معمول براساس سطح تشخیص، حساسیت و اختصاصیت تعیین می‌شوند.

الف-۲-۲ عدم قطعیت نتایج آزمون

هیچ نتیجه‌ای کامل نیست و دارای عدم قطعیتی است که از عوامل بسیاری از جمله خطاها و تجدیدپذیری ناقص ناشی می‌شود. بهتر است به‌طور ایده‌آل هر نتیجه همراه با علامت عدم قطعیت، اغلب به‌صورت $\pm$ عدد یا فاصله اطمینان بیان شود، بنابراین تصمیمات مبتنی بر نتیجه، آگاهانه هستند (به استاندارد ISO 29201 [20] مراجعه شود). برای کسب جزئیات بیشتر درخصوص تخمین عدم قطعیت نتایج آزمون شمارش به Niemela منبع شماره [31] کتاب‌نامه مراجعه شود.

عدم قطعیت شمارش به‌صورت انحراف معیار نسبی نتایج حاصل از تکرار شمارش کلنی‌ها یا ذرات در یک پلیت (های) یا میدان (های) تحت شرایط مشخص، تعریف شده است.

یادآوری- شرایط مشخص ممکن است همان فرد یا افراد دیگر در یک آزمایشگاه یا آزمایشگاه‌های مختلف باشد.

الف-۲-۳ درستی

الف-۲-۳-۱ اصول

درستی یک نتیجه نزدیکی توافق بین یک نتیجه آزمون و مقدار مرجع پذیرفته شده است. مطابق نظر لایتفوت و مایر^۱ منبع شماره [29] کتابنامه، درستی ارتباط معکوسی با عدم قطعیت کلی دارد که تفاوت بین نتیجه و مقدار واقعی است. تصور می‌شود که عدم قطعیت کلی یک نتیجه منفرد شامل دو جزء سیستماتیک (مانند اریبی) و تصادفی (مانند عدم دقت) باشد:

$$\text{عدم دقت} + \text{اریبی} = \text{عدم قطعیت}$$

این ساده‌سازی وضعیت است. در میکروبیولوژی به‌طور معمول سهم‌هایی در عدم قطعیت وجود دارد که در این طبقه‌بندی قرار نمی‌گیرد مانند نوسان غیرقابل انتظار که از نظر ریاضی قابل الگوبرداری نیست. در مقابل صحت روش، اریبی قرار دارد. این ویژگی روش استفاده‌شده برای آنالیز است و به ماهیت نمونه نیز بستگی دارد. صحت به خطا در کاربرد روش در آزمایشگاه‌های منفرد مربوط نیست. این موارد در خطای تصادفی نتیجه قرار می‌گیرد و به‌وسیله تفاوت‌های بین آزمایشگاه‌ها یا در یک آزمایشگاه مجزا ایجاد می‌شود. دقت در مقابل خطای تصادفی، قرار می‌گیرد. از این رو، رابطه مشابه در بالا بیشتر به‌صورت زیر بیان می‌شود:

$$\text{دقت} + \text{صحت} = \text{درستی}$$

الف-۲-۳-۲ صحت

الف-۲-۳-۲-۱ کلیات

مطابق با استانداردهای ISO 3534-1[5] و ISO 6107-8[9]، صحت عبارت است از نزدیکی توافق بین میانگین مقدار به‌دست آمده از مجموعه بزرگ نتایج آزمون و یک مقدار پذیرفته شده. استاندارد ISO 3534-1[5] همچنین نشان می‌دهد که مقدار صحت به‌طور معمول از لحاظ اریبی بیان می‌شود، که در آن اریبی، تفاوت بین نتایج آزمون قابل انتظار و مقدار مرجع پذیرفته‌شده است.

به‌طور کلی، در آنالیزهای میکروبیولوژیکی، غلظت واقعی یک جزء، شناخته‌شده نیست و فقط به‌عنوان هدف فرضی به‌کار برده می‌شود. بنابراین خطای سیستماتیک با استفاده از یک روش مطلق تعیین نمی‌شود. از نظر تئوری، خطای سیستماتیک با بررسی همان نمونه به‌صورت مکرر و با استفاده از روش‌های مختلف قابل دستیابی است. به‌دلیل این که روش‌های میکروبیولوژیکی از نظر ماهیت مخرب هستند (یعنی نمونه طی آنالیز از بین می‌رود)، بنابراین لازم است از مواد آزمون به‌طور کامل مخلوط‌شده، که در آن باکتری‌ها به‌طور تصادفی توزیع شده است و/یا گروه بزرگی از چندین آزمایشگاه استفاده شود (به منبع شماره [29] کتابنامه مراجعه شود).

1- Lightfoot and Maier

خطاها ممکن است کمی یا کیفی باشد. خطاهای کمی هنگامی اتفاق می‌افتد که برای مثال میکروارگانیزم‌های شمارش شده متعلق به گروه مورد جستجو باشند، ولی نتایج شمارش نهایی کمتر از مقدار واقعی تخمین زده شود (برخی از منفی‌های کاذب یا حساسیت کاهش یافته). خطاهای کیفی هنگامی اتفاق می‌افتد که برای مثال، تعدادی از میکروارگانیزم‌هایی که متعلق به گروه مورد جستجو نیستند، شمارش شوند به گونه‌ای که مقدار نهایی بزرگ‌تر از مقدار واقعی باشد (برخی از مثبت‌های کاذب یا اختصاصیت کاهش یافته). هر دو نوع خطا می‌توانند به‌طور هم‌زمان رخ دهند.

الف-۲-۳-۲ خطاهای کمی

برخی از خطاها مستقل از روش اجرایی شمارش هستند. در صورت وجود ذرات معلق، میکروارگانیزم‌ها ممکن است جذب سطحی شوند و علی‌رغم اختلاط شدید قابل جداسازی نباشند؛ این مسئله فرض تشکیل یک کلنی یا کدورت در محیط کشت مایع تلقیح شده با حجم کمی از نمونه که می‌تواند از یک میکروارگانیزم منفرد به‌دست آید را بی‌اعتبار می‌سازد.

عملکرد یک محیط کشت انتخابی ممکن است اثر بازدارندگی زیادی داشته باشد و در نتیجه نه‌تنها در رشد میکروارگانیزم‌های زمینه بلکه هم‌چنین میکروارگانیزم‌هایی که باید شمارش شوند تداخل ایجاد کند.

سایر خطاها مربوط به ماهیت نمونه آب است. اجزای فیزیکی شیمیایی مانند مواد سمی یا غلظت‌های زیاد نمک با تاثیر بر محیط‌های کشت، از رشد میکروارگانیزم‌ها ممانعت می‌کند. این اثر به ویژه در صورت زیادبودن حجم آزمونه استفاده شده در مقایسه با حجم محیط کشت استفاده شده (برای مثال در روش‌های MPN که در آن محیط کشت با غلظت دو یا چند برابر یا محیط کشت آب‌گیری شده محلول در نمونه، آزمون می‌شود)، دارای اهمیت است. ضمن استفاده از فیلتراسیون غشائی برای جداسازی میکروارگانیزم‌ها از نمونه می‌تواند در غلبه بر این مشکل کمک کند مگر این که مواد بازدارنده روی فیلتر غشائی حفظ شود.

اجزای بیولوژیکی مانند میکروارگانیزم‌های زمینه ممکن است از طریق رقابت بیولوژیکی با رشد میکروارگانیزم‌های مورد جستجو تداخل داشته باشد. این اثر به‌ویژه در محیط‌های کشت مایع اتفاق می‌افتد. در سایر روش‌های آزمون که میکروارگانیزم‌ها کلنی‌های جداگانه ایجاد می‌کنند، این رقابت بیولوژیکی محدود می‌شود به‌شرطی که هیچ گسترش یا رشد زیاد کلنی‌ها روی پلیت وجود نداشته باشد.

الف-۳-۲-۳ خطاهای کیفی

خطاهای کیفی هنگامی اتفاق می‌افتد که بین تعریف میکروارگانیزم‌های مورد جستجو و شناسایی میکروارگانیزم‌های جدا شده تفاوت‌هایی وجود داشته باشد. وقتی که تعریف دقیق است، مانند اعضای جداگانه یک جنس یا گونه، به‌طوراستثنا یک مشاهده منفرد برای فراهم کردن اطلاعات کافی به‌منظور ارائه نتایج نهایی درست کفایت می‌کند و اغلب انجام تمام آزمون‌های بعدی لازم برای شناسایی عملی نیست.

بنابراین بهتر است روش‌های اجرایی تلقیح و محیط کشت مورد استفاده تا حد امکان دارای اطلاعات تشخیصی زیادی باشد.

الف-۲-۳-۳ دقت

مطابق با استانداردهای [5] ISO 3534-1، استانداردهای ملی ایران به شماره‌های ۷۴۴۲-۱ [۱] و ۱۵۶۶۲ [۴] دقت، نزدیکی توافق بین نتایج آزمون مستقل به‌دست آمده تحت شرایط مشخص است. استاندارد [5] ISO 3534-1 همچنین نشان می‌دهد که مقدار دقت، به‌طور معمول از لحاظ عدم دقت بیان شده و به‌صورت انحراف معیار از نتایج آزمون محاسبه می‌شود. دقت کمتر، با انحراف معیار بزرگ‌تر نشان داده می‌شود.

اصول کلی توصیف ویژگی دقت روش‌های آزمون در استانداردهای ملی ایران به شماره‌های ۷۴۴۲-۱ [۱] و ۱۵۶۶۲ [۴] و استاندارد [15] ISO 16140-1 شرح داده شده است. دو معیار دقت در این استاندارد شرح داده شده است: تکرارپذیری (r) و تجدیدپذیری (R). تعاریف در زیربندهای ۱۱-۳ و ۱۳-۳ آورده شده است.

یادآوری- معیار سوم دقت برای ارزیابی نتایج کمی در یک آزمایشگاه مجزا می‌تواند مفید باشد: دقت متوسط، که برای بیان تجدیدپذیری بین آزمایشگاهی استفاده می‌شود. این دقت برای ارزیابی نتایج حاصل از متخصصین فنی در یک آزمایشگاه مجزا به‌منظور ارائه بهتر مولفه دقت در عدم قطعیت نتایج آزمون در آن آزمایشگاه مناسب است. در میکروبیولوژی، امکان تهیه مواد آزمون به راحتی یکسان وجود ندارد. توزیع تصادفی میکروارگانیسم‌ها بهترین هدف ممکن است و میزان دستیابی به آن برای تعیین r و R مهم است. هرگونه تفاوت بیش از حد در مواد آزمون، تغییرپذیری نتایج آزمون را افزایش می‌دهد.

عوامل متعددی روی دقت اثر می‌گذارد، ولی در این استاندارد فقط عواملی که به توزیع تصادفی میکروارگانیسم‌ها در نمونه مربوط می‌شود، بررسی خواهد شد.

توزیع تصادفی میکروارگانیسم‌ها در نمونه باعث عدم دقت در نتایج می‌شود که این مشکل را می‌توان با کاربرد سیستم تلقیح مناسب کاهش داد.

در روش MPN، دقت با افزایش تعداد لوله‌های تلقیح‌شده چندتایی در هر سری حجم آزمون افزایش می‌یابد. دقت نسبی به الگوی نتایج مثبت به‌دست آمده بستگی دارد.

در روش شمارش کلنی، دقت به تعداد کل کلنی‌های شمارش‌شده بستگی دارد و در نتیجه با افزایش تعداد پلیت‌ها یا فیلترهای غشائی کشت داده‌شده، افزایش می‌یابد (مضاعف، تکراری و غیره). دقت همچنین با افزایش تعداد کلنی‌های شمارش‌شده تا بیشینه حدود ۳۰۰ کلنی در هر پلیت ۹۰ mm برای روش شمارش پلیت آمیخته و سطحی و حدود ۸۰ کلنی در هر فیلتر غشائی ۴۷ mm برای روش فیلتراسیون غشائی افزایش می‌یابد. برای کسب اطلاعات بیشتر در خصوص محدوده شمارش مثال بالا به زیربندهای ۹-۱-۲-۲، ۹-۱-۳-۲ و ۹-۱-۴-۲ مراجعه شود.

الف-۲-۴ سطح تشخیص

الف-۲-۴-۱ اصول

مطابق استاندارد ملی ایران شماره ۱۵۶۶۲ [۴] حد تشخیص به صورت تعداد ذرات X (در حجم مورد آزمون) تعیین می شود که در آن احتمال تشخیص وجود آنالیت برابر 95% $[p(+)=0.95]$ است.

الف-۲-۴-۲ حد تشخیص در روش شمارش کلنی

احتمال نتیجه مثبت $p(+)$ وقتی توزیع پواسون غالب می شود را می توان با استفاده از فرمول (الف-۱) محاسبه کرد:

$$p(+)=1-e^{-x} \quad (\text{الف-۱})$$

که با حل این فرمول x می شود:

$$x=-\ln [1-p(+)]$$

که در آن:

$$e \text{ پایه لگاریتم طبیعی } (e=2.7183);$$

x تعداد میانگین ذرات در هر حجم مورد آزمون، است.

مثال: با توجه به فرمول بالا، $x=-\ln (1-0.95)=-\ln (0.05)=3.0$ است. بنابراین، در تعداد میانگین ۳ (ذرات در هر آزمون)، شانس تشخیص وجود آنالیت برابر با ۰/۹۵ (به شرطی که از توزیع پواسون تبعیت کند) است.

سطح تشخیص یک ویژگی سوسپانسیون ها است و یک روش را از روش های دیگر متمایز نمی کند و برای همه روش های شمارش کلنی یکسان است.

الف-۲-۴-۳ سطح تشخیص با روش های MPN

سطح تشخیص روش های MPN را می توان به روش یکسان با آنچه برای روش های شمارش کلنی گفته شد، استدلال کرد. صرف نظر از پیکربندی هندسی، متوسط تعداد ذرات مشابه در سیستم برای اطمینان از تشخیص آنالیت با احتمال انتخاب شده مورد نیاز است.

الف-۲-۵ اثرات نوع و دسته های فیلتر غشایی

نشان داده شده است که انواع و دسته های فیلترهای غشائی مورد استفاده برای روش هایی که نمونه های آزمون قبل از گرمخانه گذاری روی محیط های خاص فیلتر شده اند، نتایج آزمون این روش ها را تحت تاثیر قرار داده است. برای کسب اطلاعات بیشتر در مورد انواع فیلترهای غشائی که برای روش خاص استفاده می شوند، به استانداردهای خاص مراجعه کنید. برای کسب اطلاعات در زمینه روش های ارزیابی و تایید تناسب فیلترهای غشائی قبل از استفاده، به استاندارد ISO 7704 مراجعه شود.

الف-۳ الزامات مربوط به ماهیت نمونه

الف-۳-۱ ماهیت میکروارگانیسم‌ها

علاوه بر میکروارگانیسم‌های تحت شناسایی، رشد میکروارگانیسم‌های دیگر در همان محیط کشت نیز می‌تواند انتخاب روش را تحت تاثیر قرار دهد.

برای مثال برخی از میکروارگانیسم‌ها هوازی مطلق هستند و در شمارش آن‌ها استفاده از روش کشت سطحی یا فیلتر غشائی بر روش کشت آمیخته ارجح است. برای میکروارگانیسم‌هایی که شرایط بی‌هوازی را ترجیح دهند یا تحمل کنند، استفاده از روش کشت آمیخته ارجح است (مطابق با زیربند ۹-۱-۲). اگر برای کشت میکروارگانیسم‌های بی‌هوازی مطلق و حذف میکروارگانیسم‌های هوازی مطلق، شرایط بی‌هوازی بیشتری مورد نیاز باشد، می‌توان از روش کشت عمقی در لوله استفاده کرد یا این محیط‌های کشت را در جارهای بی‌هوازی کشت نمود.

برخی از میکروارگانیسم‌ها قادر به تحمل شوک حرارتی ایجادشده به‌وسیله نمونه در حال مخلوط‌شدن با محیط کشت آگار ذوب‌شده در دمای 44°C تا 47°C نیستند و نباید برای شمارش آن‌ها از روش کشت آمیخته استفاده کرد؛ اگرچه، این روش برای باکتری‌های موجود در دریاچه‌ها و سایر آب‌های سطحی کاربرد دارد.

برای تشخیص میکروارگانیسم‌هایی که به‌طور طبیعی در درجه حرارت بالاتر زندگی می‌کنند (برای مثال ارگانیسم‌های شاخص مدفوعی) و مقاومت حرارتی بیشتری دارند، استفاده از روش کشت آمیخته دارای مزایای انتخابی بیشتری است.

الف-۳-۲ اجزای نمونه‌های آب

مواد معلق سبب تداخل می‌شوند، به‌ویژه در روش فیلتر غشایی، انسداد فیلتر غشایی، فیلترکردن و در نتیجه حساسیت روش را محدود می‌کند. انسداد جزیی فیلترها، گاهی به‌طور ناخواسته، می‌تواند با کاهش تبادل مواد مغذی، از تشکیل کلنی روی صافی جلوگیری کند. این انسداد می‌تواند اغلب به‌وسیله ارگانیسم‌های زنده مانند میکروپلانکتون یا حتی باکتری‌هایی که در روزه‌های فیلتر تکثیر می‌یابند، ایجاد شود.

گاهی اوقات ممکن است در روش کشت آمیخته، ذرات بزرگ با کلنی اشتباه گرفته شوند. استفاده از بزرگ‌نمایی می‌تواند به تشخیص کلنی‌ها از ذرات دیگر کمک کند.

برای آب‌های خیلی کدر، کاربرد روش کشت سطحی حساسیت کافی را ندارد و ممکن است روش MPN تنها روش قابل‌استفاده باشد.

مواد محلول ممکن است با تغییر ترکیب محیط‌های کشت انتخابی یا به‌دلیل سمیت، در رشد میکروارگانیسم‌ها اختلال ایجاد کند. این تداخل به‌ویژه در مواردی که حجم نمونه نسبت به حجم محیط

کشت مورد استفاده زیاد است ایجاد می‌شود. گاهی اوقات برخی از مواد موجود در نمونه، می‌توانند با اجزای محیط کشت، واکنش دهد و اثرات نامطلوب بر واکنش‌های مشخصه میکروارگانیسم‌های مورد جستجو بدون تداخل در رشد آن‌ها داشته باشد. یک مثال، تغییر pH در محیط کشت پس از تخمیر قند قابل تخمیر تازه ایجاد شده است که در محیط کشت اصلی وجود ندارد. روش فیلتر غشائی می‌تواند به غلبه بر چنین معایبی کمک کند.

پیوست ب

(آگاهی‌دهنده)

فواصل اطمینان در روش شمارش کلنی و انتخاب روش محاسبه در موارد خاص

ب-۱ فواصل اطمینان برای روش شمارش کلنی

برای ارزیابی اعتبار نتایج و به‌منظور جلوگیری از تفسیرهای بیش از حد دقیق، لازم است که عدم قطعیت یا در صورت عدم دسترسی به آن، فاصله اطمینان تعیین‌کننده توزیع آماری میکروبی را تخمین بزنیم.

یادآوری - حدود اطمینان محاسبه‌شده در این پیوست صرفاً براساس عدم قطعیت توزیع است. سایر اجزاء عدم قطعیت در نظر گرفته نمی‌شوند. در مواردی که یک مقدار عدم قطعیت فنی موجود است، گنجاندن این تغییرپذیری عملیاتی در محاسبات منجر به یک فاصله اطمینان وسیع‌تر می‌شود (به استاندارد [20] ISO 29201 مراجعه شود).

هنگامی که مقدار عدم قطعیت در دسترس نیست، فاصله اطمینان δ ، که پراکندگی میکروبی را مشخص می‌کند، می‌توان با استفاده از فرمول (ب-۱) (با احتمال ۹۵٪) محاسبه کرد.

$$\delta = \left[\frac{\sum c}{B} + \frac{1.92}{B} \pm \frac{1.96\sqrt{\sum c}}{B} \right] \frac{1}{d} \times V_s \quad (\text{ب-۱})$$

با

$$B = V(n_1 + 0.1 n_2)$$

که در آن:

$\sum c$ مجموع کلنی‌های شمارش‌شده روی تمام دیش‌ها که از دو رقت متوالی باقی می‌ماند؛

V حجم ماده تلقیحی قرارداده‌شده در هر دیش، برحسب میلی‌لیتر، ml؛

n_1 تعداد دیش باقی‌مانده در رقت اول؛

n_2 تعداد دیش باقی‌مانده در رقت دوم؛

d رقت مربوط به رقت اول باقی‌مانده؛

V_s حجم مرجع انتخاب‌شده برای بیان غلظت میکروارگانیسم‌ها در نمونه، است.

مثال ۱: شمارش، نتایج زیر را حاصل می‌کند (سیستم با یک دیش در هر رقت):

- در اولین رقت باقی‌مانده (10^{-2}): ۲۱۵ کلنی؛

- در دومین رقت باقی‌مانده (10^{-3}): ۱۴ کلنی.

تعداد میکروارگانیسم‌ها N به‌صورت زیر محاسبه می‌شود:

$$N = \frac{\sum c}{V \times [n_1 + (0.1 \times n_2)] \times d} = \frac{215 + 14}{1 \times [1 + (0.1 \times 1)] \times 10^{-2}} = \frac{229}{0.011} = 20818$$

نتیجه را مطابق با زیربند ۹-۱-۸-۱ گرد کنید، تعداد میکروارگانیزم‌ها ۲۱۰۰۰ یا 2.1×10^4 در هر میلی‌لیتر نمونه است.

با $N = 2.1 \times 10^4$ در هر میلی‌لیتر، برای ۲۲۹ کلنی شمارش‌شده، فاصله اطمینان δ برابر است با:

$$\delta = \left[\frac{229}{1.1} + \frac{1.92}{1.1} \pm \frac{1.96\sqrt{229}}{1.1} \right] \times \frac{1}{10^{-2}}$$

$$\delta = (208.18 + 1.75 \pm 26.96) \times 10^2$$

بنابراین، حدود فاصله اطمینان عبارتند از:

$$\delta_l = 1.8 \times 10^4 \quad , \quad \delta_r = 2.4 \times 10^4$$

مثال ۲: شمارش، نتایج زیر را حاصل می‌کند (سیستم با دو دیش در هر رقت):

- در اولین رقت باقی‌مانده (10^{-2}): ۱۶۸ کلنی و ۲۱۵ کلنی؛

- در دومین رقت باقی‌مانده (10^{-3}): ۱۴ کلنی و ۲۵ کلنی.

$$N = \frac{\sum c}{V \times [n_1 + (0.1 \times n_2)] \times d} = \frac{168 + 215 + 14 + 25}{1 \times [2 + (0.1 \times 2)] \times 10^{-2}} = \frac{422}{0.022} = 19182$$

نتیجه را مطابق با زیربند ۹-۱-۸-۱ گرد کنید، تعداد میکروارگانیزم‌ها ۱۹۰۰۰ یا 1.9×10^4 در هر میلی‌لیتر نمونه است.

با $N = 1.9 \times 10^4$ در هر میلی‌لیتر یا در گرم، برای ۴۲۲ کلنی شمارش‌شده، فاصله اطمینان δ برابر است با:

$$\delta = \left[\frac{422}{2.2} + \frac{1.92}{2.2} \pm \frac{1.96\sqrt{422}}{2.2} \right] \times \frac{1}{10^{-2}}$$

$$\delta = (191.82 + 0.87 \pm 18.30) \times 10^2$$

بنابراین، حدود فاصله اطمینان عبارتند از:

$$\delta_l = 1.7 \times 10^4 \quad , \quad \delta_r = 2.1 \times 10^4$$

جدول ب-۱ میانگین‌های وزنی و فواصل اطمینان δ را برای تعداد کلنی‌های مربوطه ارائه می‌دهد.

جدول ب-۱ میانگین‌های وزنی و فواصل اطمینان δ برای تعداد کلنی‌های مربوطه

سیستم: ۲ دیش در هر رقت	سیستم: ۱ دیش در هر رقت	میانگین وزنی تعداد کلنی‌های شمارش‌شده در دو رقت متوالی
فاصله اطمینان δ	فاصله اطمینان δ	
۲۷۸ تا ۳۲۴	۲۷۰ تا ۳۳۴	۳۰۰
۱۳۵ تا ۱۶۷	۱۲۹ تا ۱۷۵	۱۵۰
۱۰ تا ۲۱	۸ تا ۲۵	۱۵
۷ تا ۱۵	۶ تا ۱۸	۱۰
۴ تا ۱۲	۳ تا ۱۴	۷

ب-۲ انتخاب روش محاسبه در موارد خاص، با یک دیش در هر رقت

ب-۲-۱ موارد خاص نه تنها با تعداد کم

با توجه به فواصل اطمینان بیشینه تعداد کلنی‌های مورد نیاز شمارش‌شده بر روی دیش، جداول ب-۲ و ب-۳ روش محاسبه را در موارد خاص برای بیشینه تعداد ۳۰۰ یا ۱۵۰ کلنی در هر دیش توصیف می‌کند.

جدول ب-۲ انتخاب روش محاسبه، موارد با یک دیش در هر رقت و بیشینه تعداد کلنی‌ها در هر دیش = ۳۰۰

بیشینه تعداد کلنی‌ها در هر دیش = ۳۰۰ (فاصله اطمینان δ برای میانگین وزنی ۳۰۰ کلنی: ۲۷۰ تا ۳۳۴) حد پایین: ۵٪ از ۳۰۰ = ۱۵ کلنی (فاصله اطمینان δ برای میانگین وزنی ۱۵ کلنی: ۸ تا ۲۵)		
d_1 بیش از ۳۳۴ کلنی	d_2 کمتر از ۱۵ کلنی: دو احتمال: به ۲ ردیف زیر مراجعه شود.	
بیش از ۳۳۴ کلنی	مطابق با حد پایینی: کمینه ۸ کلنی	روش محاسبه تعداد تخمینی (مطابق با زیربند ۹-۱-۸-۶-۲) (با بیان خاص نتیجه اگر تعداد ۸ است)
بیش از ۳۳۴ کلنی	با حد پایینی مطابقت ندارد: کمتر از ۸ کلنی	روش محاسبه: N/A (تفاوت بین دو رقت غیر قابل قبول)

جدول ب-۳ انتخاب روش محاسبه، موارد با یک دیش در هر رقت و بیشینه تعداد کلنی‌ها در هر دیش = ۱۵۰

بیشینه تعداد کلنی‌ها در هر پلیت = ۱۵۰ فاصله اطمینان δ برای میانگین وزنی ۱۵۰ کلنی: ۱۲۹۰ تا ۱۷۵ حد پایینی: ۵٪ از ۱۵۰ = ۷ کلنی فاصله اطمینان δ برای میانگین وزنی ۷ کلنی: ۳ تا ۱۴		
	d_2 کمتر از ۷ کلنی: دو احتمال: به ۲ ردیف زیر مراجعه شود.	d_1 بیش از ۱۷۵ کلنی
روش محاسبه تعداد تخمینی (مطابق با زیربند ۱-۹-۸-۶-۲) (با بیان خاص نتیجه اگر تعداد ۳ است)	مطابق با حد پایینی: کمینه ۳ کلنی	بیش از ۱۷۵ کلنی
روش محاسبه: N/A (تفاوت بین دو رقت غیر قابل قبول)	با حد پایینی مطابقت ندارد: کمتر از ۳ کلنی	بیش از ۱۷۵ کلنی

ب-۲-۲ موارد خاص با تعداد کم

فواصل اطمینان در جدول ب-۴ آورده شده است.

جدول ب-۴ فواصل اطمینان برای شمارش با یک دیش در هر رقت، مورد با تعداد کم

درصد خطا برای حد ^b		حد اطمینان ۹۵٪		تعداد میکروارگان‌های ^a
بالا	پایین	بالا	پایین	
+۴۵۷	-۹۷	۶	< ۱	۱
+۲۶۱	-۸۸	۷	< ۱	۲
+۱۹۲	-۷۹	۹	< ۱	۳
+۱۵۶	-۷۳	۱۰	۱	۴
+۱۳۳	-۶۸	۱۲	۲	۵
+۱۱۸	-۶۳	۱۳	۲	۶
+۱۰۶	-۶۰	۱۴	۳	۷
+۹۷	-۵۷	۱۶	۳	۸
+۹۰	-۵۴	۱۷	۴	۹
+۸۴	-۵۲	۱۸	۵	۱۰
+۷۹	-۵۰	۲۰	۶	۱۱
+۷۵	-۴۸	۲۱	۶	۱۲
+۷۱	-۴۷	۲۲	۷	۱۳
+۶۸	-۴۵	۲۴	۸	۱۴
+۶۵	-۴۴	۲۵	۸	۱۵

^a برابر با تعداد کلنی‌ها.
^b در مقایسه با تعداد کلنی‌ها (ستون اول).

پیوست پ

(الزامی)

شمارش و محاسبات با دو پتری دیش در هر رقت

پ-۱ شمارش کلنی‌ها

پس از دوره گرمخانه‌گذاری به شیوه‌ای که در استاندارد خاص بیان شده، کلنی‌ها (کل کلنی‌ها، کلنی‌های هدف یا کلنی‌های فرضی) را برای هر دیش حاوی کمتر از ۳۰۰ کلنی (یا هر عدد دیگری که در استاندارد خاص آمده است) شمارش کنید.

در روش‌های مختلف محاسبه ارائه شده در زیربند ۹-۱-۸ باید دیش بدون کلنی را در صورتی که این دیش باقی‌مانده باشد، در نظر گرفت.

هنگام شمارش کلنی‌های هدف یا فرضی، بیشینه تعداد همه کلنی‌های هدف یا غیرهدف موجود در یک دیش نباید بیش از ۳۰۰ (یا هر عدد دیگر که در استاندارد خاص ذکر شده است) باشد.

یادآوری ۱- در برخی موارد ممکن است شمارش کلنی‌ها (برای مثال در مواردی که میکروارگانیسم‌های در حال گسترش موجود هستند) دشوار باشد. این موارد در استانداردهای خاص مورد بررسی قرار می‌گیرند.

یادآوری ۲- هنگام شمارش کلنی‌های هدف یا فرضی، توصیف کلنی‌ها در استاندارد خاص مشخص می‌شود.

در این بند، به موارد مربوط به حالت‌های کلی زیر پرداخته می‌شود:

- تلقیح دو پتری دیش، با قطر ۹۰ mm، در هر رقت؛
 - بیشینه تعداد شمارش کلنی‌های کل ۳۰۰ در هر دیش است؛
 - بیشینه تعداد کل کلنی‌های هدف و غیرهدف موجود در یک دیش هنگام شمارش کلنی‌های هدف یا فرضی ۳۰۰ در هر دیش است؛
 - یک سری رقت ده برابری استفاده می‌شود؛
 - تعداد کلنی‌های فرضی (مطابق با زیربند ۹-۱-۷-۳) تلقیح شده برای تایید، از هر دیش باقی‌مانده ۱۰ است؛
 - کمینه تعداد کلنی‌ها [کل کلنی‌ها، کلنی‌های هدف یا کلنی‌های مطابق با استانداردهای تأیید (مطابق با زیربند ۹-۱-۷-۳)] در دست کم یک دیش ۱۰ است.
- این ارقام در استانداردهای خاص معین شده است.
- هنگامی که دیش با قطر متفاوت ۹۰ mm استفاده می‌شود، بیشینه تعداد کلنی‌ها باید متناسب با سطح دیش افزایش یابد (به زیربند ۹-۱-۸ مراجعه شود).

روش‌های محاسبه تعیین‌شده در زیر، مواردی را که اغلب آزمون‌ها مطابق با بهین‌آزمایی انجام می‌شود، مورد توجه قرار می‌دهند. ممکن است موارد خاص نادر اتفاق بیفتد (برای مثال، اختلاف قابل توجه بین تعداد کلنی‌ها در دو دیش با رقت یکسان یا نسبت بسیار متفاوت نسبت به فاکتور رقت بین دیش دو رقت متوالی) و در نتیجه، نتایج حاصل از شمارش باید توسط یک میکروبی‌شناس واجد شرایط بررسی، تفسیر یا رد شود.

پ-۲ روش محاسبه: مورد کلی (شمارش کلنی‌های کل یا هدف)

برای یک نتیجه معتبر، به‌طور کلی لازم است که کلنی‌ها را دست کم در یک دیش حاوی کمینه ۱۰ کلنی {کل کلنی‌ها، هدف یا کلنی‌های مطابق با معیار تایید (مطابق با زیربند ۹-۱-۷-۳)}، شمارش کنید.

تعداد N میکروارگانیسم‌های موجود در نمونه آزمون را به‌صورت میانگین وزنی دو رقت ده برابری متوالی، با استفاده از فرمول (پ-۱) محاسبه کنید:

$$N = \frac{\sum c}{V \times [n_1 + (0.1 \times n_2)] \times d} \quad (\text{پ-۱})$$

که در آن:

$\sum c$ مجموع کلنی‌های شمارش‌شده روی تمام دیش که از دو رقت متوالی باقی می‌ماند و در آن دست کم یک دیش کمینه حاوی ۱۰ کلنی است؛

V حجم ماده تلقیحی قرارداده‌شده در هر دیش، برحسب میلی‌لیتر، ml؛

n_1 تعداد دیش باقی‌مانده در رقت اول؛

n_2 تعداد دیش باقی‌مانده در رقت دوم؛

d فاکتور رقت مربوط به رقت اول باقی‌مانده ($d = 1$ در مواردی که نمونه مایع رقیق نشده استفاده می‌شود)؛

نتایج محاسبه‌شده را با دو رقم معنی‌دار گرد کنید. برای انجام این کار، اگر رقم سوم کمتر از ۵ باشد، رقم قبل را تغییر ندهید؛ اگر رقم سوم بزرگتر یا برابر ۵ باشد، رقم قبل را یک واحد افزایش دهید.

به‌عنوان نتیجه یک عدد بین ۱/۰ و ۹/۹ ضرب‌در توان مناسب ۱۰ یا یک عدد صحیح با دو رقم معنی‌دار در نظر بگیرید.

نتیجه را به‌صورت زیر بیان کنید:

« N تعداد میکروارگانیسم‌ها در هر میلی‌لیتر»

مثال: شمارش کلنی نتایج زیر را حاصل می‌کند:

- در اولین رقت باقی‌مانده (10^{-2}): ۱۶۸ و ۲۱۵ کلنی؛

- در دومین رقت باقی مانده (10^{-3}): ۱۴ کلنی و ۲۵ کلنی.

$$N = \frac{\sum c}{V \times [n_1 + (0.1 \times n_2)] \times d} = \frac{168 + 215 + 14 + 25}{1 \times [2 + (0.1 \times 2)] \times 10^{-2}} = \frac{422}{0.022} = 19182$$

نتیجه را مطابق موارد تشریح شده در بالا گرد کنید، تعداد میکروارگانسیم‌ها ۱۹۰۰۰ یا 1.9×10^4 در هر میلی‌لیتر نمونه است.

پ-۳ روش محاسبه: مورد پس از تایید

در مواردی که استفاده از روشی خاص مستلزم تایید است، تعداد معلوم، A (به‌طور کلی ۱۰)، از کلنی‌های فرضی هر یک از دیش باقی مانده برای شمارش کلنی‌ها تلقیح می‌شود. پس از تایید، برای هر یک از دیش، تعداد، a ، کلنی‌های مطابق با معیارهای تایید را با استفاده از فرمول (پ-۲) محاسبه کنید:

$$a = \frac{b}{A} \times c \quad (\text{پ-۲})$$

که در آن:

A تعداد کلنی‌های فرضی تلقیح شده؛

b تعداد کلنی‌های مطابق با معیارهای شناسایی یا تایید؛

c کل تعداد کلنی‌های فرضی شمارش شده روی دیش است.

نتایج محاسبه شده را با تقریب یک عدد صحیح گرد کنید. برای انجام این کار، اگر رقم اول بعد از علامت اعشار کمتر از ۵ باشد، رقم قبل را تغییر ندهید؛ اگر رقم اول بعد از علامت اعشار بزرگتر یا برابر ۵ باشد، رقم قبل را یک واحد افزایش دهید.

تعداد N میکروارگانسیم‌های شناسایی شده یا تایید شده موجود در نمونه آزمون را، از طریق جایگزین کردن $\sum a$ با $\sum c$ ، با استفاده از فرمول ارائه شده در زیربند ۹-۱-۸-۳، محاسبه کنید.

نتیجه را همان‌طور که در بالا توصیه شد، گرد کنید.

نتیجه را همان‌طور که در زیربند ۹-۱-۸-۳ توصیه شده است، بیان کنید.

مثال: شمارش کلنی نتایج زیر را حاصل می‌کند:

- در اولین رقت باقی مانده (10^{-3}): ۶۶ و ۸۰ کلنی؛

- در دومین رقت باقی مانده (10^{-4}): ۴ کلنی و ۷ کلنی.

آزمون کلنی‌های انتخاب شده انجام شد:

- برای ۶۶ کلنی، ۱۰ کلنی، که ۶ مورد از آن‌ها با معیارها مطابقت داشتند؛ از این‌رو $a = 40$ ؛

- برای ۸۰ کلنی، ۱۰ کلنی، که ۶ مورد از آن‌ها با معیارها مطابقت داشتند؛ از این‌رو $a = 48$ ؛

- برای ۷ کلنی، ۷ کلنی، که ۴ مورد از آن‌ها با معیارها مطابقت داشتند؛ از این‌رو $a = 4$ ؛

- برای ۴ کلنی، هر ۴ مورد با معیارها مطابقت داشتند؛ از این‌رو $a = 4$.

$$N = \frac{\sum a}{V \times [n_1 + (0.1 \times n_2)] \times d} = \frac{40 + 48 + 4 + 4}{1 \times [2 + (0.1 \times 2)] \times 10^{-3}} = \frac{96}{0.0022} = 43636$$

نتیجه را مطابق موارد تشریح‌شده در بالا گرد کنید، تعداد میکروارگانیسم‌ها 44×10^4 یا $4,4 \times 10^4$ در هر میلی‌لیتر نمونه است.

پ-۴ روش محاسبه: شمارش‌های تخمینی

پ-۴-۱ مورد با دو دیش (نمونه آزمون یا سوسپانسیون اولیه یا رقت اول) حاوی کمتر از ۱۰ کلنی

اگر دو دیش از نمونه آزمون، سوسپانسیون اولیه یا رقت اول، تلقیح‌شده یا باقی‌مانده شامل کمتر از ۱۰ کلنی باشد (کل کلنی‌ها، هدف یا کلنی‌های مطابق با معیارهای تأیید)، تعداد تخمینی N_E میکروارگانیسم‌های موجود در نمونه آزمون را به‌صورت میانگین حسابی کلنی‌های شمارش‌شده روی دو دیش با استفاده از فرمول (پ-۳) محاسبه کنید:

$$N_E = \frac{\sum c}{V \times n \times d} \quad (\text{پ-۳})$$

که در آن:

$\sum c$ مجموع کلنی‌های شمارش‌شده روی دو دیش؛

V حجم ماده تلقیحی به‌کاررفته در هر دیش، برحسب میلی‌لیتر، ml؛

n تعداد دیش باقی‌مانده (در این مورد $n = 2$)؛

d فاکتور رقت مربوط به سوسپانسیون اولیه یا رقت اول، تلقیح‌شده یا باقی‌مانده ($d = 1$ در مواردی که فرآورده مایع رقیق‌نشده (نمونه آزمون) استفاده می‌شود)؛

نتایج را همان‌طور که در پ-۳ توصیه شده است، گرد کنید.

نتیجه را به‌صورت زیر بیان کنید:

«تعداد تخمینی N_E میکروارگانیسم‌ها در هر میلی‌لیتر»

مثال: شمارش کلنی نتایج زیر را حاصل می‌کند:

- در اولین رقت باقی‌مانده (10^{-2}): ۸ و ۹ کلنی شمارش شدند.

$$N_E = \frac{8 + 9}{1 \times 2 \times 10^{-2}} = \frac{17}{0.02} = 850$$

با گرد کردن نتیجه، همان‌طور که در پ-۳ توصیه شده است، تعداد تخمینی N_E میکروارگانیسم‌ها 850 یا $8,5 \times 10^2$ در هر میلی‌لیتر نمونه است.

پ-۴-۲ مورد با دو دیش (نمونه آزمون یا سوسپانسیون اولیه یا رقت اول) بدون کلنی

اگر دو دیش از نمونه آزمون، سوسپانسیون اولیه یا رقت اول، تلقیح شده یا باقی مانده بدون کلنی باشد نتیجه را به صورت زیر بیان کنید:

«کمتر از $1/d$ میکروارگانیزمها در هر میلی لیتر»

که در آن d رقت مربوط به سوسپانسیون اولیه یا رقت اول، تلقیح شده یا باقی مانده ($d = 1$ در مواردی که فرآورده مایع رقیق نشده (نمونه آزمون) استفاده می شود $d = 0.1$ وقتی که رقت 10^{-1} استفاده می شود).

پ-۵ موارد ویژه (شمارش کلنی های هدف یا فرضی)

پ-۵-۱ در صورتی که تعداد کلنی های هدف و غیرهدف برای دو دیش حاوی رقت اول d_1 بیشتر از ۳۰۰ (یا هر عدد دیگر بیان شده در استاندارد خاص) باشد، بدون کلنی های هدف قابل مشاهده یا تایید شده و اگر برای دو دیش با رقت d_2 حاوی کمتر از ۳۰۰ کلنی (یا هر عدد دیگر که در استاندارد خاص ذکر شده است) باشد، هیچ کلنی هدف یا تایید شده را نمی توان شمارش کرد که نتیجه آن به صورت زیر بیان می شود:

«کمتر از $1/d_2$ و بیشتر از $1/d_1$ میکروارگانیزمها در هر میلی لیتر»

که در آن d_1 و d_2 فاکتورهای رقت مربوط به رقت های d_1 و d_2 است.

مثال: شمارش کلنی نتایج زیر را حاصل می کند:

- در اولین رقت باقی مانده (10^{-2}): بیشتر از ۳۰۰ کلنی در هر یک از دو دیش، با کلنی های هدف یا تایید شده موجود؛

- در دومین رقت باقی مانده (10^{-3}): ۳۳ و ۳۵ کلنی بدون کلنی های هدف یا تایید شده موجود.

نتیجه بیان شده در میکروارگانیزمها کمتر از ۱۰۰۰ و بیشتر از ۱۰۰ در هر میلی لیتر نمونه است.

پ-۵-۲ در صورتی که تعداد کلنی های هدف و غیرهدف برای دو دیش حاوی رقت اول d_1 بیشتر از ۳۰۰ (یا هر عدد دیگر بیان شده در استاندارد خاص) باشد، بدون کلنی های هدف قابل مشاهده یا تایید شده و اگر برای دو دیش با رقت d_2 حاوی کمتر از ۳۰۰ کلنی (یا هر عدد دیگر که در استاندارد خاص ذکر شده است) باشد، هیچ کلنی هدف یا تایید شده را نمی توان شمارش کرد که نتیجه به صورت زیر بیان می شود:

«کمتر از $1/d_2$ میکروارگانیزمها در هر میلی لیتر»

که در d_2 فاکتور رقت مربوط به رقت d_2 است.

مثال: شمارش کلنی نتایج زیر را حاصل می کند:

- در اولین رقت باقی مانده (10^{-2}): بیشتر از ۳۰۰ کلنی در هر یک از دو دیش، بدون کلنی های هدف یا تایید شده موجود؛

- در دومین رقت باقی مانده (10^{-3}): ۳۳ و ۳۵ کلنی، بدون کلنی های هدف یا تایید شده موجود؛

نتیجه بیان شده در میکروارگانیزمها کمتر از ۱۰۰۰ در هر میلی لیتر نمونه است.

پ-۶ روش محاسبه: موارد ویژه

پ-۶-۱ در صورتی که تعداد کلنی‌های شمارش شده (کل کلنی‌ها، هدف یا کلنی‌های فرضی) برای دو دیش حاوی رقت اول d_1 بیشتر از ۳۰۰ (یا هر عدد دیگر بیان شده در استاندارد خاص) باشد، با تعداد کلنی (کل کلنی‌ها، هدف یا کلنی‌های مطابق با معیارهای تایید) کمتر از ۱۰ کلنی برای دو دیش با رقت d_2 :
- اگر تعداد کلنی‌ها برای هر یک از دو دیش حاوی رقت d_1 در فاصله بین ۳۲۴ تا ۳۰۰ قرار داشته باشد (بخش بالای فاصله اطمینان برای میانگین وزنی برابر ۳۰۰)، از روش محاسبه برای موارد کلی استفاده کنید (مطابق با پیوست پ-۲)؛

- اگر تعداد کلنی‌ها برای هر یک از دو دیش حاوی رقت d_1 بیشتر از ۳۲۴ باشد (حد بالای حدود اطمینان برای میانگین وزنی ۳۰۰)، فقط نتیجه شمارش رقت d_2 را در نظر بگیرید و سپس با شمارش تخمینی ادامه دهید (مطابق با زیربند ۹-۱-۸-۴)؛ به جز مواردی که به بیشینه تعداد در ۳۰۰ برای شمارش کلنی‌ها اشاره شود، اگر نتیجه دوم کمتر از ۷ باشد (حد پایینی فاصله اطمینان برای میانگین وزنی برابر ۱۰)، بنابراین تفاوت بین دو رقت در آن صورت غیر قابل قبول است.

بهتر است ارقام مربوط به فواصل اطمینان مطابق با بیشینه تعداد اعلام شده برای شمارش کلنی‌ها باشد.

مثال ۱: شمارش کلنی نتایج زیر را حاصل می‌کند:

- در اولین رقت باقی مانده (10^{-2}): ۳۱۰ و ۳۲۲ کلنی؛

- در دومین رقت باقی مانده (10^{-3}): ۸ و ۱۲ کلنی.

از روش محاسبه برای موارد کلی با استفاده از دیش دو رقت باقی مانده پیروی کنید.

مثال ۲: شمارش کلنی نتایج زیر را حاصل می‌کند:

- در اولین رقت باقی مانده (10^{-2}): بیشتر از ۳۲۴ کلنی در هر یک از دیش؛

- در دومین رقت باقی مانده (10^{-3}): ۶ و ۸ کلنی.

شمارش تخمینی را براساس کلنی‌های شمارش شده روی دو دیش از رقت 10^{-3} شروع کنید.

مثال ۳: شمارش کلنی (هنگامی که بیشینه تعداد ۳۰۰ برای شمارش کلنی‌ها تعیین شده است) نتایج زیر را حاصل می‌کند:

- در اولین رقت باقی مانده (10^{-2}): بیش از ۳۲۴ کلنی بر روی هر یک از دو دیش؛

- در رقت دوم باقی مانده (10^{-3}): ۸ و ۶ کلنی.

نتیجه این شمارش غیر قابل قبول است.

- اگر تعداد کلنی‌ها برای هر یک از دو دیش حاوی رقت d_1 بیشتر از ۱۶۷ باشد (حد بالای حدود اطمینان برای میانگین وزنی ۱۵۰)، فقط نتیجه شمارش رقت d_2 را در نظر بگیرید و سپس با شمارش تخمینی ادامه دهید (مطابق با زیربند ۹-۱-۸-۴)؛ به جز مواردی که به بیشینه تعداد در ۱۵۰ برای شمارش کلنی‌ها اشاره

شود، اگر نتیجه دوم کمتر از ۴ باشد (حد پایینی فاصله اطمینان برای میانگین وزنی برابر ۸)، بنابراین تفاوت بین دو رقت در آن صورت غیرقابل قبول است.

مثال ۴: شمارش کلنی (هنگامی که بیشینه تعداد ۱۵۰ برای شمارش کلنی‌ها تعیین شده است) نتایج زیر را حاصل می‌کند:
- در اولین رقت باقی‌مانده (10^{-2}): بیشتر از ۱۶۷ کلنی بر روی هر یک از دو دیش (حد بالای حدود اطمینان با میانگین وزنی ۱۵۰)؛

- در رقت دوم باقی‌مانده (10^{-3}): ۸ و ۶ کلنی.

شمارش تخمینی را براساس کلنی‌های شمارش‌شده روی دو دیش از رقت 10^{-3} شروع کنید.

پ-۶-۲ در صورتی که شمارش کلنی‌ها (کل کلنی‌ها، کلنی‌های هدف یا فرضی) در هر یک از دیش‌ها برای همه رقت‌های تلقیح‌شده تعداد بیشتر از ۳۰۰ (یا هر عدد دیگر بیان‌شده در استاندارد خاص) باشد، نتایج را به صورت زیر بیان کنید:

«بیشتر از $300/d$ (مورد کلنی‌های کل یا هدف) یا بیشتر از $1/d \times b/A \times 300$ (مورد کلنی‌های تاییدشده) میکروارگانیسم‌ها در هر میلی‌لیتر»

d فاکتور رقت آخرین رقت تلقیح‌شده؛

b تعداد کلنی‌های مطابق با معیارهای تأیید در میان کلنی‌های فرضی تلقیح‌شده، A است.

پ-۶-۳ در مواردی که فقط دو دیش با آخرین رقت تلقیح‌شده حاوی کمتر از ۳۰۰ (یا هر عدد دیگر بیان‌شده در استاندارد خاص) کلنی (کل کلنی‌ها، کلنی‌های هدف یا فرضی) باشد، تعداد N میکروارگانیسم‌های موجود در نمونه آزمون را به صورت میانگین حسابی کلنی‌های شمارش‌شده بر روی دو دیش، با استفاده از فرمول (پ-۴) محاسبه کنید:

$$N = \frac{\sum c}{V \times n \times d} \quad (\text{پ-۴})$$

که در آن:

$\sum c$ مجموع کلنی‌های شمارش‌شده روی دو دیش، دست کم حاوی تعداد کمینه ۱۰ کلنی؛

V حجم ماده تلقیحی به کاررفته در هر دیش، بر حسب میلی‌لیتر، ml؛

n تعداد دیش باقی‌مانده (در این مورد $n=2$)؛

d فاکتور رقت مربوط به رقت باقی‌مانده، است.

نتایج را همان‌طور که در پ-۳ توصیه شده است، گرد کنید.

نتیجه را به صورت زیر بیان کنید:

«تعداد N میکروارگانیسم‌ها در هر میلی‌لیتر»

مثال: شمارش کلنی نتایج زیر را حاصل می‌کند:

- در اولین رقت باقی‌مانده (10^{-4}): ۱۲۰ و ۱۳۰.

$$N = \frac{120 + 130}{1 \times 2 \times 10^{-4}} = \frac{250}{0.0002} = 1250000$$

با گرد کردن نتیجه، همان‌طور که در پ-۳ توصیه شده است، تعداد N میکروارگانیسم‌ها $1\ 300\ 000$ یا 1.3×10^6 در هر میلی‌لیتر نمونه است.

پیوست ت

(الزامی)

مواد تشکیل دهنده، آماده سازی و آزمون عملکرد رقیق کننده ها

ت-۱ کلیات

ویژگی های کلی استاندارد ISO 11133 برای آماده سازی و آزمون عملکرد رقیق کننده های توصیف شده در این پیوست، به کار برده می شود. اگر رقیق کننده ها از محیط های کشت/واکنشگرهای کامل آب گیری شده، آماده شده باشند یا اگر از رقیق کننده ها/محیط های کشت/واکنشگرهای آماده استفاده می شود، دستورالعمل های سازنده را در خصوص آماده سازی، شرایط ذخیره سازی، تاریخ مصرف و انقضا رعایت کنید. رقیق کننده های فهرست شده در این پیوست به طور معمول در میکروبیولوژی آب استفاده می شود. بهتر است مناسب ترین رقیق کننده برای روش های خاص انتخاب شود تا اطمینان حاصل شود که هیچ تاثیری بر عملکرد روش ندارد. ممکن است همچنین در بعضی از روش ها نیاز به رقیق کننده هایی باشد که در این پیوست گنجانده نشده است. برای کسب راهنمایی بیشتر به استانداردهای خاص مراجعه کنید.

آزمون عملکرد به منظور تضمین کیفیت رقیق کننده ها در ت-۴ شرح داده شده است.

ت-۲ مواد تشکیل دهنده و آماده سازی

ت-۲-۱ محلول نمکی

ت-۲-۱-۱ مواد تشکیل دهنده

سدیم کلراید (NaCl) (CAS No.7647-14-5) ۸/۵ g

آب (به زیربند ۶-۲ مراجعه شود) ۱۰۰۰ ml

ت-۲-۱-۲ آماده سازی

ترکیبات فوق را در آب حل کرده و در صورت لزوم از حرارت استفاده کنید. با افزودن محلول سدیم هیدروکسید [$c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$] یا هیدروکلریک اسید [$c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}$] pH را به گونه ای تنظیم کنید که پس از سترون سازی، برابر 7 ± 0.2 در دمای 25°C شود.

یادآوری - محلول نمکی آماده حاوی ۹ گرم سدیم کلراید در ۱۰۰۰ ml آب (۰/۹٪) نیز به صورت تجاری در دسترس است. در صورتی که توسط آزمایشگاه تایید شود که این محلول قابل قبول است، می توان آن را مورد استفاده قرار داد.

ت-۲-۲ رقیق کننده پیتون

ت-۲-۲-۱ مواد تشکیل دهنده

کازئین هضم شده آنزیمی	۱۰ g
آب (به زیربند ۶-۲ مراجعه شود)	۱۰۰۰ ml

ت-۲-۲-۲ آماده سازی

ترکیبات فوق را در آب حل کرده و در صورت لزوم از حرارت استفاده کنید. با افزودن محلول سدیم هیدروکسید $[c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}]$ یا هیدروکلریک اسید $[c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}]$ pH را به گونه ای تنظیم کنید که پس از سترون سازی، برابر 7 ± 0.2 در دمای 25°C شود.

ت-۲-۳ محلول پپتون نمکی (بیشینه بازیابی رقیق کننده (MRD))

ت-۲-۳-۱ مواد تشکیل دهنده

کازئین هضم شده آنزیمی	۱۰ g
سدیم کلراید (CAS No.7647-14-5) (NaCl)	۸.۵ g
آب (به زیربند ۶-۲ مراجعه شود)	۱۰۰۰ ml

ت-۲-۳-۲ آماده سازی

ترکیبات فوق را در آب حل کرده و در صورت لزوم از حرارت استفاده کنید با افزودن محلول سدیم هیدروکسید $[c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}]$ یا هیدروکلریک اسید $[c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}]$ pH را به گونه ای تنظیم کنید که پس از سترون سازی، برابر 7 ± 0.2 در دمای 25°C شود.

ت-۲-۴ محلول رینگر یک چهارم

ت-۲-۴-۱ مواد تشکیل دهنده

سدیم کلراید (CAS No.7647-14-5) (NaCl)	۲۲۵ g
پتاسیم کلراید (CAS No.7447-40-7) (KCl)	۰.۱۰۵ g
کلسیم کلراید (بدون آب) (CAS No.10043-52-4) (CaCl_2)	۰.۰۶ g
سدیم هیدروژن کربنات (CAS No.144-55-8) (NaHCO_3)	۰.۰۵ g
آب (به زیربند ۶-۲ مراجعه شود)	۱۰۰۰ ml

به طور جایگزین، جرم معادل (۰.۱۲ g) کلسیم کلراید شش آبه ($\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) را می توان مورد استفاده قرار داد.

ت-۲-۴-۲ آماده سازی

ترکیبات فوق را در آب حل کرده و در صورت لزوم از حرارت استفاده کنید. با افزودن محلول سدیم هیدروکسید $[c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}]$ یا هیدروکلریک اسید $[c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}]$ pH را به گونه ای تنظیم کنید که پس از سترون سازی، برابر 0.2 ± 7 در دمای 25°C شود.

ت-۲-۵ محلول بافر فسفات

ت-۲-۵-۱ محلول فسفات

ت-۲-۵-۱-۱ مواد تشکیل دهنده

پتاسیم دی هیدروژن ارتوفسفات (بدون آب) (KH_2PO_4) (CAS No.7778-77-0) ۳۴ g

آب (به زیربند ۲-۶ مراجعه شود) ۱۰۰۰ ml

ت-۲-۵-۱-۲ آماده سازی

پتاسیم دی هیدروژن ارتوفسفات را در ۵۰۰ ml آب مقطر حل کنید. با افزودن محلول سدیم هیدروکسید $[c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}]$ یا هیدروکلریک اسید $[c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}]$ pH را به گونه ای تنظیم کنید که برابر 0.2 ± 7.2 شود. تا مقدار ۱۰۰۰ ml آب مقطر اضافه کنید. در صورتی که محلول فوق قبل از استفاده ذخیره می شود، محلول را سترون کنید.

ت-۲-۵-۲ محلول منیزیم کلراید

ت-۲-۵-۲-۱ مواد تشکیل دهنده

منیزیم کلراید (بدون آب) (MgCl_2) (CAS No.7786-30-3) ۳۸ g

آب (به زیربند ۲-۶ مراجعه شود) ۱۰۰۰ ml

به طور جایگزین، جرم معادل (۸۱٫۱ g) منیزیم کلراید شش آبه $(\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O})$ را می توان مورد استفاده قرار داد.

ت-۲-۵-۲-۲ آماده سازی

منیزیم کلراید را در آب حل کنید. در صورتی که محلول فوق قبل از استفاده ذخیره می شود، محلول را سترون کنید.

ت-۲-۵-۳ محلول نهایی

ت-۲-۵-۳-۱ مواد تشکیل دهنده

۱٫۲۵ ml	محلول فسفات (a)
۵٫۰ ml	محلول منیزیم کلراید (b)
۱ ۰۰۰ ml	آب (به زیربند ۶-۲ مراجعه شود)

ت-۲-۳-۵-۲ آماده‌سازی

محلول فسفات (a) و محلول منیزیم کلراید (b) را به آب بیافزائید. پس از توزیع محلول فوق در حجم‌های مناسب آن را سترون کنید. pH نهایی باید 7 ± 0.2 در دمای 25°C شود.

ت-۳ سترون‌سازی و ذخیره‌سازی

پس از آماده‌سازی، هر محلول را در بطری‌ها توزیع کرده و سترون کنید (برای مثال با اتوکلاو در دمای $121 \pm 3^{\circ}\text{C}$ به مدت ۱۵ min). برای بیشینه شش ماه در دمای اتاق یا در یخچال $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ قرار دهید. به‌طور جایگزین، رقیق‌کننده را می‌توان پس از سترون‌سازی و ذخیره‌سازی در یخچال به مدت حداکثر یک ماه، تحت شرایط اسپتیک^۱ توزیع کرد. چنانچه هرگونه تغییری در ظاهر طبیعی به‌عنوان مثال ابری شدن در رقیق‌کننده‌های به‌طور معمول شفاف ایجاد شود، آن‌ها نباید مورد استفاده قرار گیرد.

ت-۴ آزمون عملکرد

الزامات آزمون عملکرد برای تضمین کیفیت رقیق‌کننده‌ها در جدول ت-۱ نشان داده شده است.

1- Aseptically

جدول ت-۱ آزمون عملکرد برای تضمین کیفیت رقیق‌کننده‌ها

رقیق کننده	عملکرد	گرمخانه گذاری	سویه های کنترل	شماره های WDCM ^a	محیط کشت مرجع	روش کنترل	معیار ^d	
محلول نمکی	رقیق کننده	۴۵ min تا ۱ h / ۲۰ °C تا ۲۵ °C	اشریشیا کلی ^c	یا ۰۰۰۱۲ ۰۰۰۱۳	TSA	کمی	۳۰٪ ± کلنی ها T ⁰	
								رقیق کننده پپتون
								محلول پپتون نمکی
								محلول رینگر یک چهارم
								محلول فسفات بافری
^a برای کسب اطلاعات در مورد شماره سویه های جمع آوری محیط کشت و جزئیات تماس، به کاتالوگ سویه مرجع در وبسایت http://www.wfcc.info مراجعه کنید. WDCM: مرکز داده های جهانی میکروارگانیسم ها. ^b سویه به عنوان کمینه استفاده می شود. ^c سویه اختیاری؛ یکی از سویه ها باید به عنوان کمینه استفاده شود. ^d بهتر است شمارش پس از گرمخانه گذاری حدود ۳۰٪ شمارش حاصل از رقیق کننده قبل از گرمخانه گذاری باشد (بنابراین ۳۰٪ ± شمارش اولیه). برای توضیحات بیشتر به استاندارد ISO 11133 مراجعه شود.								

پیوست ث

(آگاهی‌دهنده)

جدول‌های MPN

جدول ث-۱- مقدار MPN در ۱۰۰ ml نمونه با حد اطمینان ۹۵٪ برای سری ۵ لوله‌ای

(۵ لوله ۲۰ ml)

حد اطمینان ۹۵٪ (دقیق)		مقدار MPN (در ۱۰۰ ml)	تعداد لوله‌های دارای واکنش مثبت زیر ۵ (در ۲۰ ml)
حد بالایی	حد پایینی		
۳/۵	-	$< ۱/۱$	۰
۵/۴	۰/۰۵۱	۱/۱	۱
۸/۴	۰/۴۰	۲/۶	۲
۱۳	۱/۰	۴/۶	۳
۲۳	۲/۱	۸/۰	۴
-	۳/۴	$> ۸/۰$	۵

جدول ث-۲- مقدار MPN در ۱۰۰ ml نمونه با حد اطمینان ۹۵٪ برای سری ۵ لوله‌ای

(۱۰ لوله ۱۰ ml)

حد اطمینان ۹۵٪ (دقیق)		مقدار MPN (در ۱۰۰ ml)	تعداد لوله‌های دارای واکنش مثبت زیر ۱۰ (در ۱۰ ml)
حد بالایی	حد پایینی		
۳/۴	-	$< ۱/۱$	۰
۵/۹	۰/۰۵۱	۱/۱	۱
۸/۲	۰/۳۷	۲/۲	۲
۹/۷	۰/۹۱	۳/۶	۳
۱۳	۱/۶	۵/۱	۴
۱۵	۲/۵	۶/۹	۵
۱۹	۳/۳	۹/۲	۶
۲۴	۴/۸	۱۲	۷
۳۴	۵/۸	۱۶	۸
۵۳	۸/۱	۲۳	۹
-	۱۳	> ۲۳	۱۰

جدول ث-۳- مقدار MPN در ۱۰۰ ml نمونه با حد اطمینان ۹۵٪

(۵ لوله ۱۰ ml، ۵ لوله ۱ ml و ۵ لوله ۰٫۱ ml)

حد اطمینان ۹۵٪		MPN (در ۱۰۰ ml)	تعداد لوله‌های دارای واکنش مثبت		
حد بالایی	حد پایینی		۵ لوله ۰٫۱ ml	۵ لوله ۱ ml	۵ لوله ۱۰ ml
۶٫۸	-	< ۱٫۸	۰	۰	۰
۶٫۸	۰٫۰۹۰	۱٫۸	۱	۰	۰
۶٫۹	۰٫۰۹۰	۱٫۸	۰	۱	۰
۱۰	۰٫۷۰	۳٫۶	۱	۱	۰
۱۰	۰٫۷۰	۳٫۷	۰	۲	۰
۱۵	۱٫۸	۵٫۵	۱	۲	۰
۱۵	۱٫۸	۵٫۶	۰	۳	۰
۱۰	۰٫۱۰	۲٫۰	۰	۰	۱
۱۰	۰٫۷۰	۴٫۰	۱	۰	۱
۱۵	۱٫۸	۶٫۰	۲	۰	۱
۱۲	۰٫۷۱	۴٫۰	۰	۱	۱
۱۵	۱٫۸	۶٫۱	۱	۱	۱
۲۲	۳٫۴	۸٫۱	۲	۱	۱
۱۵	۱٫۸	۶٫۱	۰	۲	۱
۲۲	۳٫۴	۸٫۲	۱	۲	۱
۲۲	۳٫۴	۸٫۳	۰	۳	۱
۲۲	۳٫۵	۱۰	۱	۳	۱
۲۲	۳٫۵	۱۰	۰	۴	۱
۱۵	۰٫۷۹	۴٫۵	۰	۰	۲
۱۵	۱٫۸	۶٫۸	۱	۰	۲
۲۲	۳٫۴	۹٫۱	۲	۰	۲
۱۷	۱٫۸	۶٫۸	۰	۱	۲
۲۲	۳٫۴	۹٫۲	۱	۱	۲
۲۶	۴٫۱	۱۲	۲	۱	۲
۲۲	۳٫۴	۹٫۳	۰	۲	۲
۲۶	۴٫۱	۱۲	۱	۲	۲
۳۶	۵٫۹	۱۴	۲	۲	۲
۲۶	۴٫۱	۱۲	۰	۳	۲
۳۶	۵٫۹	۱۴	۱	۳	۲
۳۶	۵٫۹	۱۵	۰	۴	۲
۲۲	۲٫۱	۷٫۸	۰	۰	۳

حد اطمینان ۹۵ %		MPN (در ۱۰۰ ml)	تعداد لوله‌های دارای واکنش مثبت		
حد بالایی	حد پایینی		۵ لوله ۱ ml	۵ لوله ۱ ml	۵ لوله ۱۰ ml
۲۳	۳٫۵	۱۱	۱	۰	۳
۳۵	۵٫۶	۱۳	۲	۰	۳
۲۶	۳٫۵	۱۱	۰	۱	۳
۳۶	۵٫۶	۱۴	۱	۱	۳
۳۶	۶٫۰	۱۷	۲	۱	۳
۳۶	۵٫۷	۱۴	۰	۲	۳
۴۰	۶٫۸	۱۷	۱	۲	۳
۴۰	۶٫۸	۲۰	۲	۲	۳
۴۰	۶٫۸	۱۷	۰	۳	۳
۴۰	۶٫۸	۲۱	۱	۳	۳
۷۰	۹٫۸	۲۴	۲	۳	۳
۴۰	۶٫۸	۲۱	۰	۴	۳
۷۰	۹٫۸	۲۴	۱	۴	۳
۷۰	۹٫۸	۲۵	۰	۵	۳
۳۵	۴٫۱	۱۳	۰	۰	۴
۳۶	۵٫۹	۱۷	۱	۰	۴
۴۰	۶٫۸	۲۱	۲	۰	۴
۷۰	۹٫۸	۲۵	۳	۰	۴
۴۰	۶٫۰	۱۷	۰	۱	۴
۴۲	۶٫۸	۲۱	۱	۱	۴
۷۰	۹٫۸	۲۶	۲	۱	۴
۷۰	۱۰	۳۱	۳	۱	۴
۵۰	۶٫۸	۲۲	۰	۲	۴
۷۰	۹٫۸	۲۶	۱	۲	۴
۷۰	۱۰	۳۲	۲	۲	۴
۱۰۰	۱۴	۳۸	۳	۲	۴
۷۰	۹٫۹	۲۷	۰	۳	۴
۷۰	۱۰	۳۳	۱	۳	۴
۱۰۰	۱۴	۳۹	۲	۳	۴
۱۰۰	۱۴	۳۴	۰	۴	۴
۱۰۰	۱۴	۴۰	۱	۴	۴
۱۲۰	۱۵	۴۷	۲	۴	۴
۱۰۰	۱۴	۴۱	۰	۵	۴
۱۲۰	۱۵	۴۸	۱	۵	۴
۷۰	۶٫۸	۲۳	۰	۰	۵

حد اطمینان ۹۵ %		MPN (در ۱۰۰ ml)	تعداد لوله‌های دارای واکنش مثبت		
حد بالایی	حد پایینی		۵ لوله ۱ ml	۵ لوله ۱ ml	۵ لوله ۱۰ ml
۷۰	۱۰	۳۱	۱	۰	۵
۱۰۰	۱۴	۴۳	۲	۰	۵
۱۵۰	۲۲	۵۸	۳	۰	۵
۱۰۰	۱۰	۳۳	۰	۱	۵
۱۲۰	۱۴	۴۶	۱	۱	۵
۱۵۰	۲۲	۶۳	۲	۱	۵
۲۲۰	۱۰	۸۴	۳	۱	۵
۱۵۰	۱۴	۴۹	۰	۲	۵
۱۷۰	۲۲	۷۰	۱	۲	۵
۲۳۰	۳۴	۹۴	۲	۲	۵
۲۵۰	۳۶	۱۲۰	۳	۲	۵
۴۰۰	۵۸	۱۵۰	۴	۲	۵
۲۲۰	۲۲	۷۹	۰	۳	۵
۲۵۰	۳۴	۱۱۰	۱	۳	۵
۴۰۰	۵۲	۱۴۰	۲	۳	۵
۴۰۰	۷۰	۱۷۰	۳	۳	۵
۴۰۰	۷۰	۲۱۰	۴	۳	۵
۴۰۰	۳۶	۱۳۰	۰	۴	۵
۴۰۰	۵۸	۱۷۰	۱	۴	۵
۴۴۰	۷۰	۲۲۰	۲	۴	۵
۷۱۰	۱۰۰	۲۸۰	۳	۴	۵
۷۱۰	۱۰۰	۳۵۰	۴	۴	۵
۱۱۰۰	۱۵۰	۴۳۰	۵	۴	۵
۷۱۰	۷۰	۲۴۰	۰	۵	۵
۱۱۰۰	۱۰۰	۳۵۰	۱	۵	۵
۱۷۰۰	۱۵۰	۵۴۰	۲	۵	۵
۲۶۰۰	۲۲۰	۹۲۰	۳	۵	۵
۴۶۰۰	۴۰۰	۱۶۰۰	۴	۵	۵
-	۷۰۰	>۱۶۰۰	۵	۵	۵

پیوست ج
(آگاهی دهنده)

تغییرات اعمال شده در این استاندارد ملی در مقایسه با استاندارد منبع

پیوست ث از کتاب microbiological examination (9000) اضافه شده است.

کتابنامه

- [۱] استاندارد ملی ایران به شماره ۷۴۴۲-۱: سال ۱۳۸۳، درستی (صحت و دقت) روش‌ها و نتایج اندازه‌گیری قسمت اول: تعاریف و اصول کلی.
- [۲] استاندارد ملی ایران به شماره ۹۸۹۹: سال ۱۳۸۶، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- الزامات کلی و راهنما برای آزمون‌های میکروبیولوژی.
- [۳] استاندارد ملی ایران به شماره ۹۸۹۹: سال ۱۳۹۴، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- الزامات کلی و راهنما برای آزمون‌های میکروبیولوژی (اصلاحیه اول).
- [۴] استاندارد ملی ایران به شماره ۱۵۶۶۲: سال ۱۳۹۷، کیفیت آب- الزامات استقرار ویژگی‌های عملکردی روش‌های کمی میکروبیولوژی.
- [5] ISO 3534-1, Statistics — Vocabulary and symbols — Part 1: General statistical terms and terms used in probability
- یادآوری- استاندارد ملی ایران به شماره ۹۴۰-۱: سال ۱۳۷۱، واژه‌ها و نمادهای آماری، ق ۱- واژه‌های عمومی آمار، با استفاده از استاندارد ISO 3534-1:1977 تدوین شده است.
- [6] ISO 3696, Water for analytical laboratory use — Specification and test methods.
- [7] ISO 5725-2, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method
- یادآوری- استاندارد ملی ایران به شماره ۷۴۴۲-۲: سال ۱۳۸۴، درستی (صحت و دقت) روش‌ها و نتایج اندازه‌گیری- قسمت دوم: روش پایه برای تعیین تکرارپذیری و تجدیدپذیری روش اندازه‌گیری استاندارد، با استفاده از استاندارد ISO 5725-2:1994 تدوین شده است.
- [8] ISO 6107-6:2004, Water quality — Vocabulary — Part 6
- [9] ISO 6107-8:1993, Water quality — Vocabulary — Part 8
- [10] ISO 6887-1, Microbiology of the food chain — 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 به شماره ۸۹۲۳-۱: سال ۱۳۹۷، میکروبیولوژی زنجیره غذایی- آماده‌سازی آزمایش، سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری برای آزمون‌های میکروبیولوژی- قسمت ۱: مقررات کلی برای آماده‌سازی سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری، با استفاده از استاندارد ISO 6887-1:1999 تدوین شده است.
- [11] ISO 7899-1, Water quality — Detection and enumeration of intestinal enterococci — Part 1: Miniaturized method (Most Probable Number) for surface and waste water
- یادآوری- استاندارد ملی ایران به شماره ۱۹۸۴۹-۱: سال ۱۳۹۳، کیفیت آب- جستجو و شمارش انتروکوکوس‌های رودی- قسمت ۱- روش مینیاتوری محتمل‌ترین تعداد (mpn) برای آب‌های سطحی و پساب، با استفاده از استاندارد ISO 7899-1:1998 تدوین شده است.

- [12] ISO 9308-2, Water quality — Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria — Part 2: Most probable number method

یادآوری - استاندارد ملی ایران به شماره ۳۷۵۹: سال ۱۳۵۷، جستجو و شمارش کلی فرمها در آب به روش چند لوله‌ای، با استفاده از استاندارد ISO 9308-2:1990 تدوین شده است.

- [13] ISO 9308-3, Water quality — Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria — Part 3: Miniaturized method (Most Probable Number) for the detection and enumeration of *E. coli* in surface and waste water

یادآوری - استاندارد ملی ایران به شماره ۷۷۲۵-۳: سال ۱۳۸۷، کیفیت آب- جستجو، شناسایی و شمارش اشیریشیا کلی و باکتری‌های کلی فرم- قسمت سوم- شمارش اشیریشیا کلی با استفاده از مدل کوچک‌سازی (بیشترین تعداد احتمالی)

در

آب‌های سطحی و فاضلاب، با استفاده از استاندارد ISO 9308-3:1998 تدوین شده است.

- [14] ISO 14461-2, Milk and milk products - Quality control in microbiological laboratories. determination of the reliability of colony counts of parallel plates and subsequent dilution steps

یادآوری - استاندارد ملی ایران به شماره ۱۴۱۳۰-۲: سال ۱۳۹۰، شیر و فراورده‌های آن- کنترل کیفیت در آزمایشگاه‌های میکروبیولوژیک- قسمت ۲- تعیین قابلیت اطمینان شمارش کلنی پلیت‌های موازی و مراحل متوالی رقت، با استفاده از استاندارد ISO 14461-2:2005 تدوین شده است.

- [15] ISO 16140 (all parts), Microbiology of food and animal feed — Method validation

یادآوری - مجموعه استانداردهای ملی ایران به شماره ۱۰۵۲۷، میکروبیولوژی زنجیره غذایی- صحه گذاری روش ها، با استفاده از برخی قسمت‌های مجموعه استاندارد ISO 16140 تدوین شده است.

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

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

- [17] ISO 17994, Water quality — Requirements for the comparison of the relative recovery of microorganisms by two quantitative

یادآوری - استاندارد ملی ایران به شماره ۱۰۱۵۳: سال ۱۳۹۶، کیفیت آب- مقایسه احیاء نسبی میکروارگانیسم‌ها با استفاده از دو روش کمی- الزامات، با استفاده از استاندارد ISO 17994:2014 تدوین شده است.

- [18] ISO 18593, Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs

یادآوری - استاندارد ملی ایران به شماره ۴۸۰۶: سال ۱۳۸۶، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- روش‌های جامع نمونه‌برداری از سطوح با استفاده از پلیت‌های تماسی و سواب، با استفاده از استاندارد ISO 18593: 2004 تدوین شده است.

- [19] ISO/TS 22117, Microbiology of food and animal feeding stuffs — Specific requirements and guidance for proficiency testing by interlaboratory comparison

- [20] ISO 29201, Water quality — The variability of test results and the uncertainty of measurement of microbiological enumeration methods

- [21] Blodgett R. Measuring improbability of outcomes from a serial dilution test. *Communications in Statistics: Theory and Methods*. 2002, **31**(12), 2209–2223
- [22] Blodgett R. Serial dilution with a confirmation step. *Food Microbiol.* 2005, **22**, 547–552
- [23] Cochran W.G. Estimation of bacterial densities by means of the “Most Probable Number”. *Biometrics*. 1950, **6**, 105–116
- [24] De Man J.C. MPN tables (corrected). *Eur. J. Appl. Biotechnol.* 1983, **17**, 301–305
- [25] Garthright W.E., & Blodgett R.J. FDA’s preferred MPN methods for standard, large or unusual tests, with a spreadsheet. *Food Microbiol.* 2003, **20**, 439–445
- [26] Haldane J.B.S. Sampling errors in the determination of bacterial or virus density by the dilution method. *J. Hygiene*. 1939, **39**, 289–293
- [27] Hurley M.A., & Roscoe M.E. Automated statistical analysis of microbial enumeration by dilution series. *J. Appl. Bacteriol.* 1983, **55**, 159–164
- [28] Jarvis B, Wilrich C., Wilrich P.-T. Reconsideration of the derivation of Most Probable Numbers, their standard deviations, confidence bounds and rarity values. *J Appl. Microbiol.* 2010, **109**, 1660–1667
- [29] Lightfoot N.F., & Maier E.A. *Microbiological Analysis of Food and Water: Guidelines for Quality Assurance*. Amsterdam: Elsevier, 1998
- [30] Niemelä S. Statistical evaluation of results from quantitative microbiological examinations. Report No. 1, 2nd edition. Uppsala: Nordic Committee on Food Analysis (NMKL), 1983
- [31] Niemelä S. Uncertainty of quantitative determinations derived by cultivation of microorganisms. Publication J4/2003, 82 pp. Helsinki: Centre for Metrology and Accreditation. (www.mikes.fi)
- [32] Shewhart W.A. *Economic control of quality of manufactured product*. New York: Van Nostrand, 1931
- [33] Shewhart W.A. *Statistical method from the viewpoint of quality control*. Mineola, NY: Dover Publications, 1981
- [34] US FDA. *Bacteriological Analytical Manual Online*. Appendix 2: Most Probable Number from Serial Dilutions, 2006. Available from: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm109656.htm>