INSO
4207
2nd Revision
2020

Modification of
ISO 8199:
2018

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

استاندارد ملی ایران
۴۲۰۷
تجدیدنظر دوم
۱۳۹۸

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

سازمان ملی استاندارد ایران

تهران، ضلع جنوب‌غربی میدان ونک، خیابان ولیعصر، پلاک ۲۵۹۲

صندوق‌پستی: ۶۱۳۹-۱۴۱۵۵ تهران- ایران

تلفن: ۵-۸۸۸۷۹۴۶۱

دورنگار: ۸۸۸۸۷۰۸۰ و ۸۸۸۸۷۱۰۳

کرج، شهر صنعتی، میدان استاندارد

صندوق پستی: ۱۶۳-۳۱۵۸۵ کرج - ایران

تلفن: ۸-۳۲۸۰۶۰۳۱(۰۲۶)

دورنگار: ۳۲۸۰۸۱۱۴(۰۲۶)

رایانامه: standard@isiri.gov.ir

وب‌گاه: http://www.isiri.gov.ir

Iranian National Standardization Organization (INSO)

No.2592 Valiasr Ave., South western corner of Vanak Sq., Tehran, Iran

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

Tel: + 98 (21) 88879461-5

Fax: + 98 (21) 88887080, 88887103

Standard Square, Karaj, Iran

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

Tel: + 98 (26) 32806031-8

Fax: + 98 (26) 32808114

Email: standard@isiri.gov.ir

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

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

سازمان ملی استاندارد ایران به‌موجب بند یک مادهٔ ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفهٔ تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) ایران را به‌عهده 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 باتوجه‌به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانهٔ صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف‌کنندگان، صادرکنندگان و واردکنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان‌های دولتی و غیردولتی حاصل می‌شود. پیش‌نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی‌نفع و اعضای کمیسیون‌های مربوط ارسال می‌شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادها در کمیتهٔ ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب، به‌عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایران چاپ و منتشر می‌شود.

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

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

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 به‌منظور حفظ بازارهای بین‌المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری کند. هم‌چنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده‌کنندگان از خدمات سازمان‌ها و مؤسسات فعال در زمینهٔ مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدورگواهی سامانه‌های مدیریت کیفیت و مدیریت محیط‌زیستی، آزمایشگاه‌ها و مراکز واسنجی (کالیبراسیون) وسایل سنجش، سازمان ملی استاندارد این‌گونه سازمان‌ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می‌کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامهٔ تأیید صلاحیت به آن‌ها اعطا و بر عملکرد آن‌ها نظارت می‌کند. ترویج دستگاه بین‌المللی یکاها، واسنجی وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای 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:	**سمت و/یا محل اشتغال:**
شریعتی، فاطمه (دکتری بیولوژی دریا)	عضو هیأت علمی- دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان
دبیر:	
فرحناک شهرستانی، لحیا (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 شیمی‌فیزیک)	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
موقرحسنی، 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 محیط‌زیست استان گیلان
ویراستار:	
دولتشاهی، رضا (کارشناسی ارشد شیمی کاربردی)	معاون استاندارد سازی و آموزش اداره کل استاندارد استان اصفهان

فهرست مندرجات

عنوان **صفحه**

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

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

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 تأئید کمیسیون‌های مربوط برای دومین بار مورد تجدیدنظر قرار گرفت و در چهل و هشتمین اجلاسیه کمیتهٔ ملی استاندارد آب و آبفا مورخ ۹۸/۱۱/۵ تصویب شد. اینک این استاندارد به استناد بند یک مادهٔ 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 شمارهٔ ۵ (استانداردهای ملی ایران- ساختار و شیوهٔ نگارش) تدوین می‌شوند. برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت‌های ملی و جهانی در زمینه صنایع، علوم وخدمات، 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 شمارهٔ ۴۲۰۷: سال ۱۳۸۶ می‌شود.

منبع و مآخذی که برای تهیه و تدوین این استاندارد مورد استفاده قرارگرفته 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 مشخص‌شده، 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 دامنهٔ کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، تعیین الزامات و ارائهٔ 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 باکتریوفاژها، ویروس‌ها و انگل‌ها نیز کاربرد دارد. این استاندارد فنونی را که مبتنی بر کشت میکروارگانیسم‌ها نیست مانند روش‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)[1]، 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 می شود.

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 شمارهٔ ۷۹۹۳: سال ۱۳۸۴، کیفیت آب- ارزیابی صافی های غشائی مورد استفاده برای آزمون‌های 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 شمارهٔ ۸۶۶۳: سال ۱۳۹۴، میکروبیولوژی مواد غذایی، خوراک دام و آب- آماده سازی، ساخت، ذخیره‌سازی و آزمون عملکرد محیط‌های 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 شمارهٔ ۴۲۰۸: سال ۱۳۸۶، کیفیت آب- نمونه‌برداری از آب برای آزمون‌های میکروبیولوژی- آئین‌کار، با استفاده از استاندارد ISO 19458: 2006، تدوین شده است.

۳ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد، اصطلاحات با تعاریف زیر به‌کارمی‌رود[۱]:

۳-۱

درستی

accuracy

نزدیکی مطابقت بین نتیجهٔ آزمون و مقدار مرجع پذیرفته‌شده.

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

۳-۲

اریبی

bias

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

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

۳-۳

شمارش تاییدشده

confirmed count

شمارش (مطابق با زیربند ۳-۴) اصلاح‌شده برای شمارش‌های فرضی (مطابق با زیربند ۳-۹) تاییدنشده از طریق آزمون بیشتر موارد فرضی.

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

۴-۳

شمارش

count

«میکروبیولوژی» تعداد موارد مشاهده‌شده مانند کلنی‌ها یا سلول‌های تعیین‌شده از طریق شمارش مستقیم یا تخمین محتمل‌ترین تعداد (MPN)[1] براساس محاسبهٔ آماری با استفاده از تعداد واحدهای مثبت یا واحدهای مثبت احتمالی در یک سری رقیق‌سازی از نمونهٔ آزمون (مطابق با زیربند ۳-۱۶)

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

۵-۳

سطح تشخیص

detection level

کمینه غلظت ارگانیسم‌هایی که وقتی در محیط کشت معینی تلقیح شده و تحت شرایط تعریف شده‌ای گرمخانه‌گذاری می‌شوند، شواهدی از رشد با احتمال $p = ۰/۹۵$ ظاهر می‌کنند.

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

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

۶-۳

تجدیدپذیری بین‌آزمایشگاهی

دقت میانگین

intralaboratory reproducibility
intermediate precision

نزدیکی توافق بین نتایج آزمون حاصل‌شده 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 شمارهٔ ۱۵۶۶۲ سال ۱۳۹۷]

1- Most Probable Number

۳-۸

دقت

precision

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

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

۳-۹

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 ارگانیسم هدف، قابل تفسیر است.

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

۳-۱۰

انحراف معیار نسبی

u_{rel}

relative standard deviation

تخمینی از انحراف معیار جمعیت نمونه از n نتیجهٔ به‌دست آمده تقسیم بر میانگین نمونه است.

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

۳-۱۱

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 شمارهٔ ۱۵۶۶۲ سال ۱۳۹۷]

۳-۱۲

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 دورهٔ کوتاه زمانی انجام می‌شود.

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

۳-۱۳

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 شمارهٔ ۱-۷۴۴۲ و ۲-۷۴۴۲ ارائه شده است.

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

۳-۱۴

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 شمارهٔ ۱۵۶۶۲ سال ۱۳۹۷]

۳-۱۵

آزمونه

test portion

مقدار مشخصی از نمونه که برای آنالیز به‌کار می‌رود.

مثال:

۰٫۱ ml، ۱ ml، ۱۰۰ ml نمونه.

۳-۱۶

نمونهٔ آزمون

test sample

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

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

۳-۱۷

صحت

trueness

نزدیکی توافق بین مقدار میانگین به‌دست آمده یک مجموعهٔ بزرگ از نتایج آزمون و یک مقدار مرجع پذیرفته‌شده است.

یادآوری- صحت به‌طور معمول بر حسب اریبی (مطابق با زیربند ۳-۲) بیان می‌شود.

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

۳-۱۸

عدم قطعیت شمارش

uncertainty of counting

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

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

۴ اصول

اصول کلی این روش‌ها شامل تلقیح آزمونهٔ یک نمونه آب یا نمونهٔ آزمون حاصل‌شده پس از فیلتراسیون غشائی یا سانتریفوژ، به محیط کشت (جامد یا مایع) است. فرض بر این است که پس از گرمخانه‌گذاری، هر میکروارگانیسم هدف، تکثیر می‌یابد که یا به‌طور مستقیم روی محیط کشت جامد، کلنی قابل مشاهده ایجاد می‌کند یا موجب تغییرات در ویژگی‌های ظاهری محیط کشت مایع می‌شود. انتخاب یک روش کشت خاص نه تنها به ماهیت و تعداد میکروارگانیسم‌های مورد جستجو، بلکه به ماهیت آب و دلایل بررسی نیز بستگی دارد.

۵ الزامات عمومی اندازه‌گیری

۵-۱ یکنواختی دما

در زیر، محدوده‌های پذیرفته‌شدهٔ دما و محدوده‌های آن‌ها برای گرمخانه‌گذاری یا ذخیره‌سازی ذکر شده است که برای ارگانیسم هدف مورد نظر مناسب بوده، مگر این‌که در استاندارد خاص، شرط لازم جز این باشد.

دماهای ذخیره‌سازی: $(-70 \pm 10)\ °C$؛ $(-20 \pm 5)\ °C$؛ $(5 \pm 3)\ °C$

دماهای گرمخانه‌گذاری: $(22 \pm 2)\ °C$؛ $(36 \pm 2)\ °C$؛ $(44 \pm 0{,}5)\ °C$

دمای بازپخت محیط کشت[1]: 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.

۵-۲ 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: (۲۱ ±۳) h ؛ (۴۴ ± ۴) h؛ (۶۸ ± ۴) h

۵-۳ حجم‌ها و وزن‌ها

تجهیزات اندازه‌گیری باید متناسب با درستی و دقت مورد نیاز باشند. محدودهٔ پذیرفته‌شده در جایی‌که مقدار اعلام‌شده برای کارایی روش و نتایج آزمون بسیار مهم است، ٪ ۲ ± و در مواردی‌که مقدار اعلام‌شده مهم نیست، ٪ ۵ ± می‌باشد. حجم مادهٔ 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 تهیهٔ محیط کشت، به استاندارد ISO 11133 مراجعه شود.

یادآوری- برای به‌حداقل رسیدن عدم قطعیت نتایج آزمون، رواداری‌های مهم در ٪ ۲ تعیین شده است.

۶ رقیق‌کننده‌ها و محیط‌های کشت

۶-۱ کلیات

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

برای تهیهٔ محیط کشت میکروبی، به جز در مواردی‌که 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 زمینهٔ ذخیره‌سازی محیط کشت، به استاندارد ISO 11133 مراجعه شود.

۶-۲ الزامات کیفی مواد تشکیل‌دهنده

از اجزای سازنده با کیفیت یکنواخت و مواد شیمیایی با درجهٔ خلوص تجزیه‌ای برای تهیهٔ محیط کشت استفاده کنید. سایر رده‌های مواد شیمیایی، به شرطی‌که نتایج مشابهی را نشان دهند نیز می‌توانند مورد استفاده قرار گیرد. به‌عنوان جایگزین، از محیط‌های کشت کاملِ آب‌گیری‌شده[1] یا رقیق‌کننده‌ها نیز می‌توانید استفاده کنید. دستورالعمل سازنده را به‌طور دقیق اجرا نمایید.

برای کسب اطلاعات بیشتر در زمینهٔ کیفیت مواد تشکیل‌دهنده و کیفیت آب مورد استفاده برای آماده‌سازی محیط کشت، به استانداردهای ISO 11133 و ISO 3696 [6] مراجعه شود.

۶-۳ رقیق‌کننده‌ها

به‌طور معمول از رقیق‌کننده‌های زیر در میکروبیولوژی آب استفاده می‌شود. با این وجود، این فهرست جامع نیست و سایر رقیق‌کننده‌های مناسب نیز می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند:

- محلول نمک؛
- رقیق‌کنندهٔ پپتون؛
- محلول نمک پپتون [رقیق‌کنندهٔ بیشینه بازیابی (MRD)[2]]؛
- محلول رینگر یک چهارم[3]؛
- محلول بافر فسفات.

دستورالعمل‌های فرمول‌بندی و آماده‌سازی، ذخیره‌سازی و اجرای آزمون ارائه‌شده در پیوست «ت» را برای این رقیق‌کننده‌ها رعایت کنید.

۷ سترون‌سازی و آلودگی‌زدایی

۷-۱ سترون‌سازی دستگاه‌ها و ظروف شیشه‌ای

دستگاه‌ها و ظروف شیشه‌ای غیرسترون را با یکی از روش‌های زیر سترون کنید:

الف- در یک آون، در دمای °C (۱۰ ± ۱۷۰) حداقل به مدت h ۱ (به استثنای زمان پیش‌گرمایش)؛

ب- در یک اتوکلاو، در دمای °C (۳ ± ۱۲۱) حداقل به مدت min ۱۵.

1- Dehydrated media
2- Maximum Recovery Diluent
3- Quarter-strength Ringer’s solution

ممکن است بعضی از مواد ناپایدار در برابر حرارت، نیاز به سترون‌سازی به روش‌های دیگر داشته باشند (برای مثال تابش یا نور ماوراء بنفش)، اما این روش‌ها در آزمایشگاه‌های متداول انجام نمی‌شود.

۷-۲ سترون‌سازی مواد مصرفی

در صورت مشابهت ویژگی‌ها، می‌توان از تجهیزات و کالاهای یک‌بار مصرف سترون به‌جای وسایل قابل استفادهٔ مجدد (ظروف شیشه‌ای، پتری دیش[1]، پیپت‌ها، بطری‌ها، لوله‌ها، فیلدوپلاتین، سواب‌ها[2] و غیره) استفاده کرد.

در صورت سترون‌نبودن فیلترهای غشایی، این فیلترها را به‌طور معمول با حرارت مرطوب بر اساس فرایند ب تشریح‌شده در زیربند ۷-۱ یا استفاده از دستورالعمل‌های شرکت سازنده، سترون کنید.

۷-۳ آلودگی‌زدایی ظروف شیشه‌ای و مواد پس از استفاده

جهت آلودگی‌زدایی مواد و دفع آن‌ها، بهتر است در محفظه یا بسته‌های مناسب به‌طور مثال در کیسه‌های پلاستیکی قابل اتوکلاو، قرار داده شوند. اتوکلاو روش ترجیحی برای تمام فرایندهای آلودگی‌زدایی (حداقل ۳۰ min در دمای ۱۲۱ °C) است. اتوکلاو باید به گونه‌ای بارگذاری شود که نفوذ حرارت به محتویات داخل آن (به‌طور مثال، تعداد بسته‌ها بیش از ظرفیت اتوکلاو نباشد) به خوبی صورت گیرد. برای جلوگیری از فشردگی خطرناک و بیش از حد محفظهٔ اتوکلاو، دقت کنید که کلاهک‌ها/سرپوش‌ها شل بوده و سر کیسه‌ها باز باشند، زیرا این مسئله می‌تواند منجر به شکستگی احتمالی بطری‌های شیشه‌ای یا انفجار آن‌ها شود. ممکن است اتوکلاوهای مدرن نیاز به شل‌کردن کلاهک نداشته باشند، اما دستورالعمل شرکت سازنده را به‌منظور اجتناب از فشردگی خطرناک و بیش از حد محفظهٔ اتوکلاو به‌طور دقیق اجراء کنید.

از سایر روش‌های جایگزین می‌توان به‌جای اتوکلاوکردن استفاده کرد.

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

به هنگام انجام آزمون، آلودگی‌زدایی لوازم کوچک و مقاوم در برابر خوردگی (همچون پیپت‌ها) از طریق غوطه‌وری در مادهٔ گندزدای تازه تهیه‌شده با رقت صحیح، امکان‌پذیر است.

ممکن است تمیزکردن پیپت‌های پاستور دشوار باشد و به‌طور معمول پس از یک بار استفاده دور انداخته می‌شوند.

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

1- Petri dishes
2- Swab

۴-۷ مدیریت پسماند

دفع صحیح مواد آلوده به‌طور مستقیم بر کیفیت آنالیز نمونه تاثیر نمی‌گذارد و این امر از مدیریت خوب آزمایشگاه است. توصیه می‌شود، سیستم شناسایی و جداسازی پسماند و بسته‌های آن‌ها برای موارد زیر ایجاد شود:

- پسماندهای غیرآلوده (برای مثال نمونه‌های آب کشت‌نشده) که می‌توانند با استفاده از روش‌های معمولی پسماند دفع شوند؛

- اسکالپل‌ها[1]، سوزن‌ها و شیشه‌های شکسته؛

- مواد آلوده برای اتوکلاوکردن و بازیافت؛

- مواد آلوده برای اتوکلاوکردن و دفع یا فقط برای دفع در صورتی‌که مواد باید سوزانده شود.

مواد آلوده با میکروارگانیسم‌های دستهٔ ریسک ۳ و ظروف آن‌ها قبل از سوزاندن باید اتوکلاو شوند.

۸ نمونه‌ها و جابه‌جایی نمونه‌ها

۸-۱ نمونه‌برداری

نمونه‌برداری‌ها را طبق استاندارد ISO 19458 انجام دهید. نمونه‌های آب گندزدایی‌شده را در بطری‌های نمونه حاوی خنثی‌کننده‌های مناسب و کافی جمع‌آوری کنید.

۸-۲ آماده‌سازی نمونه

۸-۲-۱ آب و سایر ماتریس‌های آبی

بهتر است به‌منظور کاهش احتمالی آلودگی متقاطع، آب پاک و آب آلوده با استفاده از تجهیزات مجزا و در محلی مجزا از هم پردازش شوند. به‌طور جایگزین، سری‌های[2] آب تمیز را قبل از آب کثیف پردازش کنید.

پیش از انجام آزمون، برای دستیابی به توزیع یکنواخت میکروارگانیسم‌ها و سایر ذرات، نمونه‌ها را با همزن به‌طورکامل مخلوط کنید. این کار را می‌توان با وارونگی بطری نمونهٔ آب یا حرکت آن به جلو و عقب انجام داد. با توجه به ماهیت آب و محتوای میکروبی پیش‌بینی‌شده، در این مرحله رقت‌های لازم را تهیه کنید.

برای شمارش پلیت‌ها، به‌طورمعمول از رقت‌های یک‌دهم استفاده می‌شود. برای فیلتراسیون غشائی (با سطح کوچک‌تر) استفاده از رقت‌های پایین‌تر توصیه می‌شود. در اکثر روش‌های محتمل‌ترین تعداد (MPN)، رقیق‌سازی بخشی ضروری از روش‌کار 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 نمونهٔ آب را به بطری‌ها یا لوله‌های رقیق‌کنندهٔ سترون اضافه کنید. به‌عنوان جایگزین، از حجم‌های رقیق‌کنندهٔ از پیش سترون‌شده در بطری‌های درپیچ‌دار استفاده می‌شود و حجم‌ها پس از اتوکلاوکردن کنترل می‌شوند. با انتقال یک حجم از نمونهٔ آب به ۹ حجم رقیق‌کننده، رقت‌های ۱۰ برابر یا بیشتر تهیه کنید. با استفاده از یک پیپت جدید یا ابزار مکانیکی، محلول را به‌طورکامل مخلوط کنید و یک حجم از این محلول را به ۹ حجم رقیق‌کنندهٔ دیگر انتقال دهید. مراحل فوق را چندین بار تا به‌دست آوردن رقت لازم تکرار کنید. برای تمام آزمون‌هایی که باید روی هر نمونهٔ 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 تهیهٔ رقت‌های ۴ برابر مانند تهیهٔ رقت‌های ۱۰ برابر عمل کنید فقط یک حجم نمونهٔ 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 صورتی‌که 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 سوآب‌ها

۸-۲-۲-۱ کلیات

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

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

یادآوری- سوآب‌های خشک چوبی برای آزمون میکروبی مناسب نیستند زیرا آن‌ها هیچ‌گونه حفاظتی در برابر از دست‌دادن آب یا باقی‌ماندهٔ 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، به‌طورکامل با محلول مخلوط می‌شوند. سوآب‌های انتقال به آگار به‌دقت از بسته‌بندی خارج شده و در یک حجم (به‌طورمعمول ml ۱۰) رقیق‌کننده غوطه‌ور می‌شود. سپس چوب شکسته یا قطع می‌شود تا امکان اختلاط کامل در بطری یا لولهٔ مهر و موم شده فراهم شود. به‌منظور بهینه‌سازی بازیابی هرگونه ارگانیسم‌های موجود، محلول را به‌صورت دستی یا هر روش دیگر، مانند چرخشی، تکان‌دادن یا فراصوت، مخلوط کنید.

در هر دو مورد، سوسپانسیون‌های حاصل به‌عنوان رقیق‌کنندهٔ 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 نمونهٔ نمایانگر، برداشته شده و نتیجهٔ «شناسایی نشده» بر اساس نمونهٔ با حجم بزرگ‌تر، قابل اطمینان‌تر است. این سوآب‌ها حاوی مقداری از مادهٔ خنثی‌کنندهٔ 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 درنظر گرفت.

هنگام پذیرش نمونه در آزمایشگاه، حجم بیش‌تری (به‌طور معمول ml ۱۰۰) براث[1] (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 آزمونه‌ها در (یا روی) محیط کشت جامد

۹-۱-۱ کلیات

آزمونهٔ 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 آزمونه هنگام تلقیح است. با در نظر گرفتن حجم آزمونه و تعداد کلنی‌های تشکیل‌شده، نتیجه

1- Broth

به‌صورت تعداد واحدهای تشکیل‌دهندهٔ کلنی (cfu)[1] یا ذرات تشکیل‌دهندهٔ کلنی (cfp)[2] در حجم معینی از نمونه (برای مثال ۱ ml یا ۱۰۰ ml) بیان می‌شود.

به‌طور عمده از سه روش برای تلقیح به محیط کشت جامد استفاده می‌شود و انتخاب روش بستگی به چندین عامل دارد. این عوامل شامل ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آب و هم‌چنین ماهیت میکروارگانیسم‌های مورد نظر، غلظت احتمالی آن‌ها، بازیابی موثر میکروارگانیسم‌های تحت تنش یا بیش از حد آسیب‌دیده[3] و دقت آزمون و حساسیت می‌باشد. موارد مربوط به حجم نمونهٔ آب مورد استفاده در هر روش در زیربندهای ۹-۱-۲-۲، ۹-۱-۳-۲ و ۹-۱-۴-۲، ارائه شده است.

یادآوری ۱- محدودیت‌های اندازه‌گیری و درستی روش‌های مختلف در پیوست الف-۲ مورد بحث قرار می‌گیرد.

یادآوری ۲- ماهیت نمونه و ارگانیسم‌های مورد نظر در پیوست الف-۳ مورد بحث قرار می‌گیرد.

۹-۱-۲ روش کشت آمیخته

۹-۱-۲-۱ کلیات

در این روش آزمونه با محیط کشتی که از قبل ذوب‌شده و تا دمای نزدیک به بسته‌شدن یعنی ۴۴ °C تا ۴۷ °C خنک شده (بازپخت)، مخلوط می‌شود به‌طوری‌که آسیب ناشی از گرما به ارگانیسم‌ها به حداقل برسد. پس از گرمخانه‌گذاری، کلنی‌های تشکیل‌شده روی سطح و درون محیط کشت شمارش می‌شوند.

۹-۱-۲-۲ آزمونه

حجم آزمونه یا رقتی از نمونه می‌تواند با توجه به اندازهٔ پتری دیش و حجم محیط کشت مورد استفاده، بین ۰٫۱ ml و ۵ ml متغیر باشد. بهتر است، رقت به‌گونه‌ای انتخاب شود که تعداد مورد انتظار کلنی‌های تشکیل‌شده روی پلیت‌هایی با قطر ۹۰ mm کمتر از ۳۰۰ و تعداد کلنی‌های هدف بیشتر از ۱۰ باشد.

بیشینه تعداد قابل‌قبول کلنی‌های هدف روی پلیت بستگی به روش خاص، اندازهٔ کلنی، ماهیت کلنی‌ها (برای مثال پخش‌شدن آن‌ها) و حضور کلنی‌های غیرهدف دارد و ممکن است بر اساس نتایج عملیات صحه‌گذاری باشد. به‌عنوان راهنما، بیشینه تعداد کلنی‌های روی پلیت ۹۰ mm (هدف و/یا غیرهدف) به‌طور معمول ۳۰۰ در نظرگرفته می‌شود (به استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۸۹۹ [۲] مراجعه شود). ظروف بزرگتر (مانند ۱۴۰ mm) نیاز به ملاحظات دیگری دارند (به زیربند ۹-۱-۷-۲ 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[1] 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 ۴۴ °C تا ۴۷ °C 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. آزمونه‌ها 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 آزمونه به حداقل برسد، سپس به‌منظور توزیع یکنواخت میکروارگانیسم‌ها، آزمونه و محیط کشت را به‌طورکامل مخلوط کنید. به‌طور کلی، مقدار ml (۲ ± ۱۸) محیط کشت برای حداکثر یک میلی‌لیتر آزمونه در پتری دیش‌های mm ۹۰ استفاده می‌شود. به‌طورجایگزین، در صورتی‌که آزمایشگاه تشخیص دهد که نمونه‌ها برای گرمخانه‌گذاری کیسه‌بندی[2] شود از حداقل ml ۱۰ 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[3] و تکان‌دهنده‌های آگار برای آزمایشگاه‌هایی که دارای تعداد زیاد نمونه هستند، می‌تواند مفید باشد (به استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۸۹۹ [۲] مراجعه شود).

۹-۱-۳ روش کشت سطحی

۹-۱-۳-۱ کلیات

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

آزمونه به‌وسیلهٔ یک ابزار سترون روی سطح خشک محیط آگار پخش می‌شود و کلنی‌هایی که پس از گرمخانه‌گذاری روی سطح ایجاد شده، شمارش می‌شوند.

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 به‌گونه‌ای انتخاب کنید که در آن تعداد مورد انتظار کلنی‌های تشکیل‌شده کمتر از ۳۰۰ و تعداد کلنی‌های هدف بیشتر از ۱۰ باشد.

بیشینه تعداد قابل‌قبول کلنی‌های هدف روی پلیت بستگی به روش خاص، اندازهٔ کلنی، ماهیت کلنی‌ها (برای مثال گسترش‌یافتگی) و حضور کلنی‌های غیرهدف دارد و ممکن است بر اساس نتایج عملیات صحه‌گذاری باشد. به‌عنوان راهنما، بیشینه تعداد کلنی‌های روی پلیت ۹۰ mm (هدف و/یا غیرهدف) به‌طور معمول ۳۰۰ در نظرگرفته می‌شود (به استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۸۹۹ [۲] مراجعه شود). دیش‌های بزرگتر (مانند ۱۴۰ mm) نیاز به ملاحظات دیگری دارند (به زیربند ۹-۱-۷-۲ مراجعه شود).

دستگاه کشت‌دهندهٔ مارپیچی[1] از حجم‌های کمتری استفاده می‌کنند و در نتیجه محدودهٔ بررسی افزایش می‌یابد. برای استفاده از دستگاه کشت‌دهندهٔ مارپیچی، دستورالعمل شرکت سازنده را رعایت کنید. دستگاه کشت‌دهندهٔ مارپیچی ممکن است برای قارچ‌ها مناسب نباشد.

۹-۱-۳-۳ تلقیح

پلیت‌های مورد نیاز که هر کدام دارای ml (۲ ± ۱۸) محیط کشت است را برای پتری دیش‌های ۹۰ mm، با نمونه و سایر جزئیات آماده و نشانه‌گذاری کنید. برای دوره‌های گرمخانه‌گذاری طولانی‌تر (برای مثال دوره‌های گرمخانه‌گذاری طولانی‌تر نسبت به آنچه در زیربند ۵-۲ آمده است)، ممکن است حجم بیشتری از محیط کشت مورد نیاز باشد. برای کسب اطلاعات بیشتر در زمینهٔ حجم محیط کشت، به استاندارد ISO 11133 مراجعه شود. در صورت لزوم سطح محیط کشت را پیش از استفاده همان‌گونه که در زیر تشریح‌شده، خشک کنید. آزمونه را به‌وسیلهٔ پیپت روی سطح محیط کشت بریزید و سپس با استفاده از ابزار سترون یا وسیلهٔ مکانیکی مانند دستگاه کشت‌دهندهٔ مارپیچی برای اجتناب از تماس با لبه‌های آگار، آن را روی سطح گسترش دهید. پلیت‌ها را روی سطح بگذارید تا مادهٔ تلقیحی جذب شود (بیشینه زمان ۱۵ min است)، سپس پلیت‌ها را مطابق با زیربند ۹-۱-۵ گرمخانه‌گذاری کنید.

برای خشک‌کردن پلیت‌ها، توجه به نکات زیر دارای اهمیت است:

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

1- Spiral platers

- در مورد باکتری‌هایی که کلنی آن‌ها به‌سرعت روی محیط کشت گسترش نمی‌یابند و سطح محیط کشت در پلیت‌ها خشک به‌نظر می‌رسد، خشک‌کردن سطح پلیت‌ها ضرورت ندارد. در این موارد، می‌توانید از خشک‌کردن سطح پلیت‌ها صرف‌نظر کنید، زیرا باعث افزایش احتمال آلودگی و هدررفت بی‌مورد رطوبت می‌شود.
- دما و زمان خشک‌شدن را به‌گونه‌ای انتخاب کنید که احتمال آلودگی تا حد ممکن پایین نگه داشته شود و حرارت‌دادن اضافی کیفیت محیط کشت را کاهش ندهد. زمان خشک‌شدن به میزان بخار آبی که در پتری‌دیش قرار گرفته است بستگی دارد ولی باید تا حد امکان کوتاه نگه داشته شود.

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

به‌طور معمول، داشتن پلیت‌هایی به‌اندازهٔ کافی خشک، با قرار دادن آن‌ها در یک گرم‌خانه با در نیمه‌باز یا اتاقک خشک‌کن با دمای بین ۲۵ °C تا ۵۰ °C حاصل می‌شود. خشک‌کردن پلیت‌ها را تا زمان ناپدید شدن قطرات رطوبت از درپوش‌ها ادامه دهید ولی بیش از آن، خشک‌کردن را ادامه ندهید. همچنین می‌توانید دیش‌های آگار را در اتاقک ایمنی با جریان هوای لایه‌ای در دمای محیط به‌مدت ۳۰ min تا ۶۰ min یا روی سطح باز خشک کنید ولی ممکن است در این‌صورت زمان‌خشک‌کردن طولانی‌تر شود.

در صورتی‌که دیش‌ها به‌تازگی 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. به‌طورجایگزین، برای ارگانیسم‌های خاص مانند بی‌هوازی‌ها، فیلتر غشائی را می‌توان به‌گونه‌ای در یک پتری دیش قرار داد که رویهٔ آن به سمت پایین باشد یا در یک لایهٔ نازک آگار قرار داد و با محیط کشت آگار ذوب‌شده پوشاند.

۹-۱-۴-۲ آزمونه

بیشینه حجم آزمونه به قابلیت صاف‌شدن نمونهٔ 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 نمونهٔ مورد آزمون یا رقتی از آن

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

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

۹-۱-۴-۳ وسایل فیلتراسیون

به‌طورمعمول، فیلترهای غشائی با میانگین اندازه منفذ µm ۰٫۴۵ در میکروبیولوژی آب استفاده می‌شود. ممکن است در استاندارد خاص، برای برخی از میکروارگانیسم‌ها، فیلتراسیون از طریق یک فیلتر غشائی با میانگین اندازه منفذ µm ۰٫۲ مورد نیاز باشد. ارزیابی تناسب انواع و دسته‌های مختلف فیلترهای غشائی قبل از استفاده در استاندارد ISO 7704 تشریح شده است.

به‌طور معمول، دستگاه‌های فیلتراسیون شامل یک چندراهه[1] 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 kPa ۷۰ 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 نمونهٔ مورد آنالیز باشند. بهتر است، قیف‌های فیلتر غشائی قبل از استفاده با اتوکلاو سترون شوند یا می‌توان به‌صورت جایگزین از قیف یک‌بار مصرف سترون استفاده کرد. می‌توان در صورت نیاز، فیلترهای غشایی را با جوشاندن یا شعلهٔ 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. به‌صورت جایگزین، اگر در استاندارد خاصی مشخص شده باشد یا مورد تایید قرار گرفته باشد، می‌توان از سایر فنون گندزدایی استفاده کرد.

۹-۱-۴-۴ فیلتراسیون

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

1- Manifold

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

ب- محتویات ظرف بالن یا بطری حاوی آزمونه و مقدار کافی رقیق‌کننده برای رساندن حجم کل به‌حداقل ml ۱۰؛

پ- حداقل ml ۱۰ رقیق‌کننده که آزمونهٔ اندازه‌گیری شده با پیپت به‌طور مستقیم به آن اضافه شده و با پیپت مخلوط شده است.

شیر را به‌منظور ایجاد خلاء برای فیلترکردن آب از طریق فیلتر غشائی بازکنید. به محض فیلترشدن نمونه، پمپ خلاء را خاموش کنید. بهتر است قیف را در حالی‌که فیلتر هنوز برای حذف ارگانیسم‌های چسبیده به قیف در جای خود قرار دارد، با استفاده از ۱ تا ۳ قسمت ml ۱۰ تا ml ۳۰ رقیق‌کنندهٔ سترون، شستشو دهید. فشار مثبت نیز می‌تواند در شرایط خاصی مانند آزمون گونهٔ لژیونلا[1] استفاده شود.

۹-۱-۴-۵ انتقال فیلتر غشایی

پس از خاموش کردن پمپ خلاء، قیف را بردارید و فیلتر غشائی را با گیرهٔ 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 شبکهٔ به سمت بالا؛

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

برای حجم‌های مختلف نمونهٔ یکسان، در صورتی‌که کمترین حجم و/یا رقیق‌ترین نمونه را ابتدا صاف کنید، می‌توان قیف را بدون گندزدایی، دوباره استفاده کرد. برای فیلتراسیون نمونهٔ دیگر باید یا از وسایل سترون جداگانه‌ای استفاده کرد یا می‌توان قیف را به‌وسیلهٔ شعلهٔ مستقیم یا غوطه‌ورکردن در حمام آب جوش، گندزدایی کرد. توصیه می‌شود، برای گندزدایی قیف، مطابق با دستورالعمل‌های شرکت سازنده عمل کنید.

۹-۱-۴-۶ روش‌های انتقال غشاء با استفاده از محیط کشت مایع یا رقیق‌کننده‌ها

به‌عنوان یک روش جایگزین برای پلیت آگار، اگر در استاندارد مربوطه بیان شود، فیلتر غشائی می‌تواند با شبکهٔ به سمت بالا روی پد جاذب سترون که با محیط کشت مایع از پیش اشباع‌شده یا پد محیط کشت

1- Legionella spp

آب‌گیری‌شده بازسازی‌شده با آب سترون در پتری دیش، قرار داده شود. برای جلوگیری از رشد تداخلی[1]، بهتر است به‌طورترجیحی 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 براث (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 آزمونهٔ جدید برای گسترش در سطح خشک محیط آگار (به زیربند ۹-۱-۳ مراجعه شود) (برای مثال آزمون گونهٔ 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 زمانی‌که یک گرمخانهٔ دارای تهویه استفاده می‌شود) در کیسه‌های پلاستیکی یا سایر ظروف بسته‌بندی کنید. برای حصول اطمینان از این‌که 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، هنگامی‌که 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 جارهای طراحی‌شدهٔ 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 گرمخانه گذاری بی‌هوازی انجام شود، بهتر است دیش‌های آگار تلقیح‌شده در یک گرمخانهٔ بی‌هوازی یا جار بی‌هوازی مقاوم به نفوذ هوا حاوی مولد شرایط بی‌هوازی[2] با اندازهٔ مناسب با حجم جار قرار داده شود. علاوه بر این، هم‌چنین بهتر است یک وسیلهٔ 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 دورهٔ محدود (برای مثال ۲ h یا ۴ h) در یک محیط کشت احیا[1] 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 صورتی‌که این کار امکان‌پذیر نباشد، آن‌ها را می‌توان برای مدت کوتاهی (تا ۲۴ h) در دمای (۳۵ ± ۳) °C نگهداری کرد به شرط آن‌که بر تعداد، ظاهر میکروارگانیسم‌ها یا تایید نهایی کلنی‌ها تاثیر نگذارد. مدت زمان نگه‌داری قابل‌قبول باید برای هر نوع روش و نمونه صحه‌گذاری شود.

در مواردی‌که کلنی‌های بزرگ (برای مثال سودوموناس آئروژینوزا)[2] یا در حال گسترش، پیش‌بینی می‌شود، بررسی پلیت‌ها پس از یک دورهٔ کوتاه‌تر گرمخانه‌گذاری، در حالی‌که کلنی‌های مجزا هنوز قابل مشاهده هستند می‌تواند مفید باشد، سپس گرمخانه‌گذاری را برای یک دورهٔ 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 صورتی‌که اندازهٔ کلنی کوچک و/یا تشخیص کلنی‌ها از سایر ذرات یا کلنی‌های غیرهدف مشکل باشد، می‌توان از بزرگ‌نمایی استفاده کرد (مگر این‌که 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 تشکیل‌دهندهٔ کلنی در نظر بگیرید. در عمل برای شمارش‌های انتخابی، مشخص‌کردن 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 تائیدی 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 تایید همهٔ 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 تأییدشدهٔ دقیق می‌تواند مهمتر باشد. با این وجود، بهتر است در بیشتر سناریوهای انجام آزمون، در صورت نیاز به شمارش تاییدشده، تأیید تمام (یا یک زیر مجموعه انتخاب‌شدهٔ تصادفی) کلنی‌های هدف فرضی، همان‌طور که در پاراگراف زیر تشریح‌شده، رویکرد اتخاذشده باشد.

اگر تعداد کلنی‌ها زیاد باشد، تائید شناسایی همهٔ آن‌ها در آنالیز معمول عملی نیست. در صورت وجود تعداد کل بین ۱ و ۱۰ همهٔ کلنی‌ها و در صورتی که کل کلنی‌ها بیشتر از ۱۰ باشد، حداقل ۱۰ کلنی را جدا کنید. اگرکلنی‌های فرضی فقط یک نوع ظاهر ریخت‌شناسی[1] را نشان دهند، برای اجتناب از ذهنیت در انتخاب بهتر است تمام کلنی‌های فرضی از زیرمجموعهٔ 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 تایید 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 تایید می‌تواند انتخاب شود.

۹-۱-۷ راهنمای کلی محاسبهٔ نتایج

۹-۱-۷-۱ کلیات

زیربندهای ۹-۱-۷ و ۹-۱-۸ و پیوست پ مربوطه به‌طور گسترده‌ای در صورت استفاده از پلیت‌های دوتایی، براساس استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۸۹۹[۳] و برای روش‌های میکروبی آب مانند فیلتراسیون غشائی و ارزیابی استفاده از رقت‌ها (ی مختلف) به‌جای رقت ده برابر تنظیم شده‌اند. روش‌های محاسبهٔ زیر مواردی را که اغلب هنگام انجام آزمون‌ها مطابق با بهین‌آزمایی[2] 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 میکروب‌شناس 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 هنگامی‌که تعداد کلنی‌های تیپیک[1]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 ۹-۱-۲-۲، ۹-۱-۳-۲ و ۹-۱-۴-۲ توصیف شده است، بیشینه تعداد قابل‌قبول کلنی‌های هدف و غیرهدف به عوامل متعددی، مانند روش خاص، اندازهٔ 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 mm ۹۰، ۳۰۰ و برای یک فیلتر غشائی mm ۴۷، ۸۰ در نظر گرفته شود.

زمانی‌که 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 mm ۵۵، بیشینه تعداد قابل‌شمارش کلنی‌ها ۱۱۰ (معادل کل تعداد cfu ۳۰۰ روی یک پتری دیش mm ۹۰) خواهد بود. برای پلیت‌های آمیخته یا سطحی با قطر mm ۱۴۰، بیشینه تعداد قابل‌شمارش کلنی‌ها ۷۳۰ (معادل کل تعداد cfu ۳۰۰ روی یک پتری دیش mm ۹۰) 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 کشت‌دهندهٔ 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 به‌صورت تعداد واحدهای تشکیل‌دهندهٔ کلنی (cfu) یا ذرات تشکیل‌دهندهٔ کلنی (cfp) در حجم معینی از نمونه (به‌طور معمول ml ۱۰۰ یا ml ۱) 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 به‌راحتی 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 مواردی‌که روش مورد استفاده مستلزم شناسایی یا تأیید باشد، بهتر است به‌طور ایده‌ال 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، همهٔ کلنی‌های فرضی از زیرمجموعهٔ از

1- Typical

پیش تعیین‌شدهٔ 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، نتیجهٔ تاییدشده برای هر پلیت را به‌صورت زیر محاسبه کنید:

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

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

پ- همهٔ شمارش‌های تاییدشده را جمع کنید.

۹-۱-۸ 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 تشریح‌شده؛

- تعداد کلنی‌های فرضی تلقیح‌شده برای تایید (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 به‌طور 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 ISO 14461-2 [14] 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 محاسبه‌شده را تا دو رقم معنی‌دار گرد کنید. هنگام انجام این کار، اگر رقم سوم کمتر از ۵ باشد، رقم ما قبل آن را تغییر ندهید؛ اگر رقم سوم بزرگتر یا مساوی ۵ باشد، رقم ماقبل را یک واحد افزایش دهید. نتایج را به‌صورت عددی بین ۱٫۰ و ۹٫۹ ضرب‌در توان مناسبی از ۱۰ یا تعداد کل با دو رقم معنی‌دار بیان کنید.

نتایج را به‌صورت تعداد N میکروارگانیسم‌ها در حجم مشخص (به‌طور کلی ۱ ml یا ۱۰۰ ml) گزارش دهید.

۹-۱-۸-۲ 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 ۹-۱-۸-۳ مراجعه شود) ضروری تلقی می‌شود. روش‌های محاسبه در حالتی‌که پتری دیش‌ها حاوی تعداد کمتری هستند در زیربند ۹-۱-۸-۴ شرح داده شده است.

تعداد N میکروارگانیسم‌های موجود در نمونهٔ 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:

$$N = \frac{\sum C}{\sum \mathrm{V}} \times V_S \qquad (۱)$$

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 نمونهٔ اولیه که در همهٔ دیش‌ها با هم استفاده می‌شود، با توجه به هر رقت، برحسب میلی‌لیتر، ml که از فرمول (۲) محاسبه می‌شود:

$$\sum V = (V_1 \times d_1) + (V_2 \times d_2) + \cdots + (V_i \times d_i) \qquad (۲)$$

که در آن:

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

$d_1, d_2, \ldots, d_i$ میزان رقت برای حجم‌های آزمون مربوطه در رقت اول، رقت دوم و غیره است ($d = 10^0 = 1$ وقتی‌که آزمونه 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 ml ۱ = V_s نتایج زیر را حاصل می‌کند.

در اولین رقت باقی‌مانده ($d_1 = ۱۰^{-۲}$): ۱۶۸ کلنی.

در دومین رقت باقی‌مانده ($d_1 = ۱۰^{-۳}$): ۱۴ کلنی.

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

بنابراین:

$$\sum V = (1 \times 10^{-2}) + (1 \times 10^{-3})$$

$$\sum V = 0.01 + 0.001 = 0.011$$

$$N = \frac{\sum C}{\sum V} \times V_s = \frac{168+14}{0.011} \times 1 = \frac{182}{0.011} \times 1$$

$$N = 16545$$

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

$N = 17000$ یا $N = 1.7 \times 10^4$ واحد تشکیل‌دهندهٔ کلنی (cfu) در هر میلی‌لیتر نمونه.

مثال ۲: شمارش پلیت‌های آنالیزشده با استفاده از روش فیلتراسیون غشائی با حجم مرجع ۱۰۰ ml = V_s نتایج زیر را حاصل می‌کند.

آنالیزشده در حجم اولیهٔ آزمون (۱۰۰ ml): ۷۲ کلنی.

آنالیزشده در حجم دوم آزمون (۱۰ ml): ۱۱ کلنی.

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

بنابراین:

$$\sum V = (100 \times 1) + (10 \times 1)$$

$$\sum V = 100 + 10 = 110$$

$$N = \frac{\sum C}{\sum V} \times V_s = \frac{72+11}{110} \times 100 = \frac{83}{110} \times 100$$

$$N = 74.45$$

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

$N = 75$ یا $N = 7.5 \times 10^1$ در هر ۱۰۰ ml نمونه.

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

هنگامی‌که روش مورد استفاده مستلزم تایید باشد، تعداد معلوم A (به‌طور کلی ۱۰) از کلنی‌های فرضی در هر پتری دیش که برای شمارش کلنی‌ها باقی‌مانده است، مطابق با زیربند ۹-۱-۶-۲، تایید می‌شود. بعد از تایید، برای هر یک از دیش‌ها، تعداد a از کلنی‌ها را مطابق با معیارهای تأیید، با استفاده از فرمول (۳) محاسبه کنید:

$$a = \frac{b}{A} \times C \qquad (۳)$$

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 میکروارگانیسم‌های تأییدشدهٔ 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:

$$N = \frac{\sum a}{\sum \mathrm{v}} \times \mathrm{VS} \qquad (۴)$$

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 $Vs = 1$ ml نتایج زیر را حاصل می‌کند.

در اولین رقت باقی‌مانده ($d_1 = ۱۰^{-۳}$): ۶۶ کلنی.

در دومین رقت باقی‌مانده ($d_2 = ۱۰^{-۴}$): ۴ کلنی.

تایید کلنی‌های انتخاب‌شده انجام شد:

- از ۶۶ کلنی، ۱۰ مورد آزمون شدند، ۶ مورد با معیارها مطابقت داشت، از این رو $a = ۴۰$؛
- از ۴ کلنی، همه با معیارها مطابقت داشتند، از این رو $a = ۴$.

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

$$N = \frac{\sum C}{\sum \mathrm{v}} \times V_S = \frac{40+4}{0.0011} \times 1$$

$$N = ۴۰۰۰۰$$

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

$N = ۴۰۰۰۰$ یا $N = ۴ \times ۱۰^{۴}$ واحد تشکیل‌دهندهٔ کلنی (cfu) در هر میلی‌لیتر نمونه.

مثال ۲: شمارش پلیت‌های آنالیزشده با استفاده از روش فیلتراسیون غشائی با حجم مرجع V_s = ۱۰۰ ml نتایج زیر را حاصل می‌کند.

آنالیزشده در حجم اولیهٔ آزمون (۱۰۰ ml): ۷۲ کلنی.

آنالیزشده در حجم دوم آزمون (۵۰ 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 = ۲۹؛

- از ۳۰ کلنی، ۱۰ مورد آزمون شدند، ۶ مورد با معیارها مطابقت داشت، از این رو a = ۱۸.

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

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

$$N = 31.333$$

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

N = ۳۱ در هر ml ۱۰۰ 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

درصورتی‌که 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 به‌همان 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 شمارهٔ ۱۵۶۶۲ [۴]، حد تعیین، به‌صورت «کمترین غلظت آنالیت [x] در هر قسمت تجزیه‌ای که در آن عدم قطعیت استاندارد نسبی مورد انتظار برابر با مقدار مشخص[RSD][1] است» تعریف می‌شود.

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

در موارد توزیع پواسون[2]، x از فرمول ۵ محاسبه می‌شود.

$$x = \frac{1}{(u_{rel})^2} \qquad (۵)$$

در میکروبیولوژی، ۱۰ به‌طور کلی به‌عنوان کمترین تعداد قابل‌اطمینان و بنابراین حد پایین‌تر تعیین، قابل‌قبول است. دقت نسبی قابل‌قبول متناظر در حد تعیین ۱۰ می‌تواند به‌عنوان 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 به‌صورت تشخیص وجود ارگانیسم بیان شود.

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

احتمال نتیجهٔ مثبت $p(+)$ در مواردی‌که توزیع پواسون غالب می‌شود به‌صورت زیر محاسبه می‌گردد:

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

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

1- Relative standard deviation
2- Poisson

$$x = -\ln[1 - p(+)] \qquad (۶)$$

که در آن:

e پایهٔ لگاریتم طبیعی؛

x تعداد ذرات در هر بخش تجزیه‌ای است.

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

به‌طور خلاصه، برای نتایج زیر سطح تشخیص، وجود ارگانیسم هدف نمی‌تواند به‌طور موثر قابل شناسایی باشد. برای نتایج زیر حد تعیین، اما برابر با یا بالاتر از سطح تشخیص، حضور ارگانیسم 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:

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

که در آن:

N_E تعداد تخمینی میکروارگانیسم‌ها در هر حجم آنالیزشده؛

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

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

d رقت متناظر با رقیق‌سازی باقی‌مانده (در مواردی‌که آزمونه به‌صورت مایع رقیق‌نشده باقی می‌ماند $d = 1$)؛

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

بنابراین، هنگامی‌که 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:

«میکروارگانیسم‌ها در حجم مورد مطالعه وجود دارند».

اگر طبق قانون یک نتیجهٔ 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 مواقعی‌که پتری دیش حاوی کلنی نیست

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

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

که در آن:

d فاکتور رقت نمونهٔ آزمون، سوسپانسیون اولیه یا رقت اولیهٔ تلقیح‌شده یا باقی‌مانده با $d = 10^0 = 1$) در صورتی‌که نمونهٔ آزمون به‌طور مستقیم تلقیح‌شده از مایعات باقی مانده است)؛

V حجم مادهٔ تلقیح‌شده یا نمونهٔ آزمون مورد استفاده در دیش، برحسب میلی‌لیتر، ml؛

V_S حجم مرجع انتخاب‌شده برای بیان غلظت میکروارگانیسم‌ها 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 آزمونهٔ تجزیه‌ای تشخیص داده نشد».

(با توجه به توزیع پواسون، سطح شناسایی روش، سه ارگانیسم در هر آزمونهٔ 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 نمونهٔ 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 نمونهٔ آزمون بعدی یا رقیق‌شدهٔ 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 $\frac{1}{V_2 \times d_2} \times V_S$ و بیشتر از $\frac{1}{V_1 \times d_1} \times V_S$ میکروارگانیسم» در هر حجم مرجع انتخاب‌شده

که در آن:

d_1 و d_2 فاکتور رقت مربوط به رقیق‌سازی d_1 و d_2 ($d = 10^0 = 1$ که در آن نمونه آزمون که به‌طورمستقیم تلقیح‌شده باقی می‌ماند)؛

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

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

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

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

در رقت اولیهٔ باقی‌مانده ($d_1 = ۱۰^{-۲}$): بیشتر از ۳۰۰ کلنی در دیش، با کلنی‌های هدف یا تاییدشدهٔ موجود؛

در دومین رقت باقی‌مانده ($d_2 = ۱۰^{-۳}$): ۳۳ کلنی، بدون هیچ کلنی هدف یا تاییدشدهٔ موجود.

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

نتیجه عبارت است از:

کمتر از $\frac{1}{1\times10^{-3}} \times 1$ و بیشتر از $\frac{1}{1\times10^{-2}} \times 1$

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

مثال ۲: شمارش پلیت‌های آنالیزشده با استفاده از روش فیلتراسیون غشائی با حجم مرجع V_s = ۱۰۰ ml نتایج زیر را حاصل می‌کند.

آنالیزشده در حجم اولیهٔ آزمون (۱۰ ml): بیشتر از ۸۰ کلنی در دیش، با کلنی‌های هدف یا تاییدشدهٔ 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 $\frac{1}{1\times1} \times 100$ و بیشتر از $\frac{1}{10\times1} \times 100$، کمتر از ۱۰۰ و بیشتر از ۱۰، میکروارگانیسم در هر ml ۱۰۰ 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 $\frac{1}{V_2\times d_2} \times V_S$ میکروارگانیسم 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 میکروارگانیسم‌ها در نمونه، برحسب میلی‌لیتر، ml است.

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

در رقت اولیهٔ باقی‌مانده ($d_1 = ۱۰^{-۲}$): بیشتر از ۳۰۰ کلنی در دیش، با کلنی‌های هدف یا تاییدشدهٔ موجود؛

در دومین رقت باقی‌مانده ($d_2 = ۱۰^{-۳}$): ۳۳ کلنی، بدون هیچ کلنی هدف یا تاییدشدهٔ موجود.

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

نتیجه عبارت است از:

کمتر از $\frac{1}{1\times10^{-3}} \times 1$

کمتر از ۱۰۰۰ در هر میلی‌لیتر نمونه را می‌دهد.

مثال ۲: شمارش پلیت‌های آنالیزشده با استفاده از روش فیلتر غشائی با حجم مرجع ml ۱۰۰ = V_s نتایج زیر را حاصل می‌کند.

آنالیزشده در حجم اولیهٔ آزمون (۱۰ ml): بیشتر از ۸۰ کلنی در دیش، بدون هیچ‌گونه کلنی هدف یا تاییدشدهٔ موجود.

آنالیزشده در حجم دوم آزمون (۱ ml): ۲۱ کلنی بدون هیچ‌گونه کلنی هدف یا تاییدشدهٔ موجود.

از 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 $\frac{1}{1\times1} \times 100$

کمتر از ۱۰۰ میکروارگانیسم در هر ml ۱۰۰ نمونه را می‌دهد.

یادآوری- در مواردی‌که تعداد زیادی کلنی غیرهدف وجود دارد، کلنی‌های هدف می‌توانند با رشد بی‌رویه پوشیده شوند و ثبت یا گزارش آن و درخواست یک نمونهٔ تکراری سودمند است.

۹-۱-۸-۶ روش‌های محاسبه: شمارهای غیرمعمول، تخمینی و غیرقابل‌قبول

۹-۱-۸-۶-۱ کلیات

بعضی از مثال‌ها با قواعد مندرج در زیربند ۹-۱- ۸-۱ مطابقت ندارند. اگر تکرار آنالیز امکان‌پذیر نباشد، می‌توان نتایج را مطابق با زیربند ۹-۱-۸-۱، محاسبه و بیان کرد که در این‌صورت دقت کاهش می‌یابد و این مسئله باید در گزارش آزمون نشان داده شود.

۹-۱-۸-۶-۲ نسبت‌های غیرمنتظره هنگام استفاده از رقت‌ها

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

اگر تعداد کلنی‌ها برای دیش دارای رقت d_1 در فاصلهٔ ۳۰۰ تا ۳۳۴ (قسمت بالای فاصلهٔ اطمینان برای تعداد ۳۰۰ کلنی) و تعداد کلنی با رقت d_2 کمتر از ۸ (حد پایینی فاصلهٔ 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 باقی‌مانده، 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 می‌کند.

در اولین رقت باقی‌مانده ($۱۰^{-۲}$): ۳۱۰ کلنی؛

در دومین رقت باقی‌مانده ($۱۰^{-۳}$): ۸ کلنی.

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

اگر تعداد کلنی‌ها برای دیش دارای رقت d_1 بیشتر از ۳۳۴ (حد بالایی فاصلهٔ اطمینان برای شمارش کلنی ۳۰۰) و تعداد کلنی با رقت d_2 کمتر از ۸ (حد پایینی فاصلهٔ 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 می‌کند.

در اولین رقت باقی‌مانده ($۱۰^{-۲}$): بیشتر از ۳۳۴ کلنی در دیش؛

در دومین رقت باقی‌مانده ($۱۰^{-۳}$): ۹ کلنی.

شمارش تخمینی از کلنی‌های شمارش‌شده در دیش برای رقت $۱۰^{-۳}$(مطابق با زیربند ۹-۱-۸-۴-۱) گزارش کنید: $N_E = ۹ \times ۱۰^{-۳}$.

اگر تعداد کلنی‌ها برای دیش دارای رقت d_1 بیشتر از ۳۳۴ (حد بالایی فاصلهٔ اطمینان برای شمارش کلنی ۳۰۰) و تعداد کلنی با رقت d_2 کمتر از ۸ (حد پایینی فاصلهٔ اطمینان ۱۵ کلنی) است، آن‌گاه اختلاف بین دو رقت غیرقابل‌قبول است.

مثال ۳: شمارش کلنی نتایج زیر را حاصل می‌کند.

در اولین رقت باقی‌مانده ($۱۰^{-۲}$): بیشتر از ۳۳۴ کلنی در دیش؛

در دومین رقت باقی‌مانده ($۱۰^{-۳}$): ۷ کلنی.

نتیجه این شمارش غیرقابل‌قبول است.

ارقام مربوط به فواصل اطمینان باید با بیشینه تعداد مشخص‌شده برای شمارش کلنی‌ها تطبیق یابد.

۹-۱-۸-۶-۳ تمام دیش‌ها بالاتر از محدودهٔ شمارش بالایی

در مواردی‌که شمارش کلنی‌ها (کل کلنی‌ها، هدف یا فرضی) برای تمام دیش‌ها در همهٔ حجم‌های نمونه آزمون یا رقت‌های مادهٔ تلقیحی تعداد بیشتر از محدودهٔ 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 میکروارگانیسم‌ها در حجم مرجع انتخاب‌شده

که در آن:

C_{max} حد بالایی شمارش در یک دیش؛

d آخرین رقت مادهٔ تلقیحی رقیق‌سازی‌شده ($d = 10^0 = 1$ وقتی‌که 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 میکروارگانیسم‌ها در نمونه؛

b تعداد کلنی‌ها مطابق با معیارهای تأیید؛

A تعداد کلنی‌های فرضی تلقیحی برای تایید است.

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

در مواردی‌که 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' میکروارگانیسم‌های موجود را با استفاده از فرمول (۸) محاسبه کنید:

$$N' = \frac{C}{V \times d} \times V_S \qquad (۸)$$

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 صورتی‌که نمونهٔ آزمون تلقیح‌شده به‌طور مستقیم باقی مانده باشد)؛

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

نتایج را طبق زیربند ۹-۱-۸ گرد کنید.

نتیجه را به‌صورت تعداد N' میکروارگانیسم‌ها در حجم مرجع انتخاب‌شده گزارش کنید.

مثال ۱: شمارش پلیت‌های آنالیزشده با استفاده از روش کشت آمیخته با حجم مرجع V_s = ۱ ml و حجم‌های مادهٔ تلقیحی (V =۱ ml) نتایج زیر را حاصل می‌کند.

در آخرین رقت ($d = ۱۰^{-۴}$): ۱۲۰ کلنی در دیش.

بنابراین:

$$N' = \frac{120}{1\times10^{-4}} \times 1 = 1\,200\,000$$

گردکردن نتایج طبق زیربند ۹-۱-۸-۱، می‌دهد:

N' = ۱۲۰۰۰۰۰ یا N' = ۱٫۲ × $۱۰^{۶}$ واحد تشکیل‌دهندهٔ کلنی (cfu) در هر میلی‌لیتر نمونه.

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

در حجم فیلترشدهٔ (V) ۰٫۱ ml: ۲۱ کلنی در دیش.

بنابراین:

$$N' = \frac{21}{0.1\times1} \times 100 = 21\,000$$

گردکردن نتایج طبق زیربند ۹-۱-۸-۱، می‌دهد:

N' = 21000 یا N' = ۲٫۱ × $۱۰^{۴}$ واحد تشکیل‌دهندهٔ کلنی (cfu) در هر ۱۰۰ ml نمونه.

۹-۱-۸-۷ عدم قطعیت نتایج آزمون

برای کسب اطلاعات بیشتر درخصوص تخمین و بیان عدم قطعیت نتایج آزمون از روش‌های کمی، به پیوست الف-۲ و استاندارد ISO 29201 [20] 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 این‌که 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 آزمونه نسبت داده شود، یعنی نتیجه یا مثبت است یا منفی. برای به‌دست آوردن تخمینی از مقدار میکروارگانیسم‌های موجود، لازم است چندین آزمونه را بررسی کرده و از روش‌های آماری برای تعیین MPN استفاده شود. این بخش‌ها ممکن است در لوله‌ها، بطری‌ها، یا پلیت‌های چندچاهکی[1] یا میکروول[2] (به استاندارد ISO 7899-1 [11]، ISO 9308-2 [12] و ISO 9308-3 [13] مراجعه شود) مطابق با روش مورد استفاده، وجود داشته باشد.

در صورت به‌کارگیری یک محیط کشت انتخابی، بهتر است اضافه‌کردن آزمونه، 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 محیط‌کشت مایع در دامنه شرح داده شده است، اما ناسازگاری می‌تواند به دلیل ترکیب بیولوژیکی ماتریس مانند نمونه‌های محیطی بسیار آلوده باشد. برای چنین ماتریس‌های مشکل‌سازی، اسپایک‌کردن[3] 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 آزمونه‌های کمتر از ml ۱ یا برابر با آن به ۵ تا ۱۰ برابر حجم یک محیط کشت با غلظت معمولی[4] اضافه می‌شود. آزمونه‌های بیشتر از ml ۱ و بیشینه تا ml ۱۰۰، به‌طور معمول به حجم برابر از محیط کشت با غلظت دو برابر[5] افزوده می‌شود.

برای حجم‌های بیشتر از ml ۱۰۰، می‌توان از محیط کشت غلیظ‌تر استفاده نمود. همان‌گونه که در زیربند ۹-۱-۴-۶ توضیح داده شده است، حجم‌های آزمونهٔ 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. آزمونه‌ها با توجه به اندازه، به لوله یا بطری‌های حاوی مقدار لازم محیط کشت مایع تلقیح می‌شوند. برای آزمونه‌های کوچک نیز از پلیت‌های چندچاهکی استفاده می‌شود.

برای مقاصد خاص، می‌توان محیط کشت آب‌گیری شدهٔ سترون را در نمونهٔ 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 اولیهٔ 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

۹-۲-۳ انتخاب سیستم تلقیح

۹-۲-۳-۱ کلیات

ماهیت روش MPN، رقیق‌سازی یک نمونه به اندازه‌ای است که مادهٔ تلقیحی گاهی اوقات، اما نه همیشه حاوی میکروارگانیسم‌های زنده باشد. نتیجه، یعنی تعداد مادهٔ تلقیحی که در هر رقت رشد ایجاد می‌کند، تخمینی از غلظت اولیهٔ 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 نمونهٔ 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 نمونهٔ 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 آزمونه‌های 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. زمانی‌که سیستم فقط از تعداد کم لولهٔ تکرار تشکیل شود، عدم قطعیت نسبی بالا خواهد بود.

۹-۲-۳-۲ سیستم رقت منفرد[1]

هنگامی‌که غلظت مورد انتظار میکروارگانیسم‌ها کم است یا انتظار می‌رود که به‌آرامی تغییر کند، مناسب‌ترین روش تلقیح سری منفرد آزمونه‌های یکسان است. در صورتی‌که نسبت مورد انتظار بین بیشینه و کمینهٔ تعداد میکروارگانیسم‌ها کمتر از ۲۵ باشد، ۱۰ آزمونهٔ موازی، کمترین تعداد مورد انتظار برای ارائهٔ اطلاعات مفید است (کمترین تعدادی است که باید آزمون شود). زمانی‌که این نسبت تا ۲۰۰ باشد ۵۰ لولهٔ 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

هنگامی‌که غلظت میکروارگانیسم‌ها در نمونه ناشناخته است یا اگر تغییرات زیادی پیش‌بینی شده باشد، در این‌صورت 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 محاسبهٔ به‌کار 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 لولهٔ 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 چندچاهکی به‌طور معمول برای انواع خاصی از آب (مانند آب سطحی و فاضلاب) استفاده کرد، به استاندارد ISO 7899-1 [11] و ISO 9308-3 [13] 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 میکروارگانیسم‌ها در یک محدودهٔ 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 ISO 9308-2 [12] مراجعه شود). بهتر است داده‌های این سیستم‌ها با استفاده از یک برنامهٔ نرم‌افزار رایانه‌ای مناسب ارزیابی شود (به زیربند ۹-۲-۷-۴ مراجعه شود).

۹-۲-۴ گرمخانه‌گذاری

لوله‌ها، بالن‌ها یا بطری‌ها تلقیح‌شده را در گرم‌خانه یا حمام آب قرار دهید. پلیت‌های چندچاهکی و میکروول را در گرم‌خانه قرار دهید تا اطمینان حاصل شود که آن‌ها به‌اندازهٔ 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 مرحلهٔ تایید 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].

۹-۲-۵ 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 آزمونه‌های مشتق‌شده از یک نمونه را شمارش و ثبت کنید.

۹-۲-۶ عدم قطعیت نتایج آزمون

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

۹-۲-۷ تعیین مقادیر MPN

۹-۲-۷-۱ کلیات

سه گزینهٔ مختلف برای تعیین مقادیر MPN وجود دارد: محاسبه با استفاده از فرمول‌های ریاضی، استفاده از جداول MPN منتشرشده، یا استفاده از برنامه‌های رایانه‌ای خاص. به‌شرط آن‌که این برنامه‌ها بر اساس ملاحظات آماری مشابه باشند، به همان اندازه معتبر هستند. جداول MPN منتشرشده، به‌طورمعمول دارای ٪ ۹۵ حدود اطمینان هستند. این موارد همچنین از طریق دو گزینهٔ 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.

۹-۲-۷-۲ فرمول‌های ریاضی

۹-۲-۷-۲-۱ فرمول یک‌سری از لوله‌ها

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

$$\mathrm{MPN} = -\frac{1}{\mathrm{m}}\ln\left[\frac{S}{N}\right] \qquad (۹)$$

که در آن:

m حجم، برحسب میلی‌لیتر نمونه در هر لوله از سری؛

S تعداد لوله‌ها با واکنش منفی؛

N تعداد لوله‌ها در سری، است.

۹-۲-۷-۲-۲ تخمین‌های دقیق برای سنجش‌های رقت منفرد

حدود اطمینان ٪ ۹۵ برای تخمین MPN را می‌توان از MPN مشتق‌شده و انحراف معیار log(MPN) با استفاده از روش هالدین[1] منبع شمارهٔ [26] به‌طورتقریبی محاسبه کرد، همان‌گونه که در BAM[2] منبع شمارهٔ [34] کتاب‌نامه توصیف شده است. همچنین به بلاجت[3] منبع شمارهٔ [22] کتاب‌نامه مراجعه شود.

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

$$\mathrm{SD}(\log_{10}\mathrm{M}) = \frac{(1 - e^{-Mm})}{2.303 \times \mathrm{Mm}\sqrt{G \times e^{-Mm}}} \qquad (۱۰)$$

که در آن:

M MPN؛

m حجم یا جرم مادهٔ تلقیحی در هر لوله؛

G تعداد لوله‌های نشان‌دهندهٔ رشد؛

e پایهٔ لگاریتم طبیعی (e = ۲٫۸۱۷ ۳) است.

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

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

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

و بنابراین:

$$\mathrm{SD}(\log_{10}\mathrm{M}) = \frac{(1- e^{-Mm})}{2.303\times\mathrm{Mm}\sqrt{G\times e^{-Mm}}} = \frac{(1- e^{-0.223})}{2.303\times 0.223\sqrt{4\times e^{-0.223}}} = \frac{(1- 0.80)}{0.513\,6+\times\sqrt{3.2}} = \frac{0.20}{0.918\,7} = 0.22$$

حالا، $\log_{10}\mathrm{M}$ =۰٫۳۵

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

1- Haldane
2- Bacteriological Analytical Manual
3 - Blodgett

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

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

بنابراین حد پایینی:

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

و حد بالایی:

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

با این وجود، لازم نیست این محاسبات را به‌صورت دستی انجام دهید، زیرا می‌توان با استفاده از محاسبه‌گر MPN آن‌ها را تعیین نمود (مطابق با زیربند ۹-۲-۷-۴).

۹-۲-۷-۲-۳ تخمین‌های دقیق برای سنجش‌های چندرقتی متقارن

عدم قطعیت استاندارد $\log_{10}$ یک سیستم MPN چندرقتی منظم را می‌توان از تقریب کوکران[1] [23]، فرمول (۱۱) به‌دست آورد:

$$\mathrm{SD} = 0.58\sqrt{\frac{\log_{10} f}{\mathrm{N}}} \qquad (۱۱)$$

که در آن:

SD انحراف معیار MPN $\log_{10}$؛

f فاکتور رقت بین رقت‌های متوالی (به‌طورمعمول ۱۰)؛

N تعداد لوله‌ها در هر رقت است.

حدود اطمینان ٪ ۹۵ بالایی و پایینی را به‌ترتیب، با ضرب و تقسیم تخمین MPN در آنتی‌لگاریتم SD × ۲ می‌توان تقریب زد. این روش گرایش به بزرگ‌نمایی حد اطمینان بالایی دارد. تخمین دقیق‌تر را می‌توان با استفاده از محاسبه‌گر MPN (مطابق با زیربند ۹-۲-۷-۴) به‌دست آورد.

۹-۲-۷-۳ جداول MPN

۹-۲-۷-۳-۱ جداول سیستم‌های با رقت منفرد

جداول منتشرشده (برای مثال به منابع شمارهٔ [22]، [27] و [30] کتاب‌نامه مراجعه شود) مقادیر MPN و حدود اطمینان ٪ ۹۵ هر آزمونه با شماره‌های مختلف مانند ۱۰، ۲۰، ۱۵ و ۲۵ لوله‌های موازی را نشان می‌دهد (فرض بر این است که هر لوله با حجم یکسان رقت منفرد تلقیح شده است).

1- Cochran

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 به‌طورمعمول ml ۱ و ml ۱۰۰ است. حجم آزمونه مطابق با مقدار نمونه‌ای (برحسب میلی‌لیتر) است که در حجم مورد استفاده برای تلقیح به لوله‌ها وجود دارد، برای مثال ml ۰٫۱ در صورتی‌که ml ۱ از رقت 10^{-1} استفاده شده است.

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

مقدار ml ۵ از نمونهٔ با رقت ده برابری (ml/ml ۰٫۱) به بیست لولهٔ 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 لولهٔ معین‌شده است، که در حدود اطمینان ٪ ۹۵ پایینی و بالایی ۰٫۹۳ و ۲٫۷۷ قرار دارد.

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

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

با حدود اطمینان ٪ ۹۵

$$\text{حد ٪ ۲٫۵ پایینی} = \frac{0.93}{0.5} = 1.9 \ \ l^{-1}$$
$$\text{حد ٪ ۹۷٫۵ بالایی} = \frac{2.77}{0.5} = 5.5 \ \ l^{-1}$$

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

با سیستم‌های متقارن، به‌طورمعمول 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 MPN، SD log MPN، حدود اطمینان پایینی و بالایی فواصل اطمینان ٪ ۹۵ اطمینان همراه با مقدار کمیابی و طبقه‌بندی کمیابی فراهم شده است. مقدار کمیابی (به منابع شمارهٔ [21] [22] و [25] کتاب‌نامه مراجعه شود) رویکرد ساده‌تری را برای ارزیابی احتمال این‌که نتیجهٔ 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 مشاهده‌شده x_1، x_2، ...، x_k آزمون رقت سری؛

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

جزئیات کامل روش محاسبهٔ توابع احتمال در منبع شمارهٔ [28] کتاب‌نامه ارائه شده است.

شاخص کمیابی عددی بین ۰ و ۱ است. اگر نتیجهٔ آزمون رقت سری محتمل‌ترین غلظت برابر با MPN تخمینی باشد، این مقدار ۱ است. چنان‌چه در حدود صفر باشد، نتیجهٔ آزمون رقت سری برای غلظت برابر MPN تخمینی، بسیار غیرمحتمل است. با توجه به رویکرد در منابع شمارهٔ [23] و [24] کتاب‌نامه، سه طبقه‌بندی کمیابی زیر استفاده می‌شود:

- طبقه‌بندی ۱: مقدار MPN به‌طور احتمالی در صورتی رخ می‌دهد که مقدار کمیابی آن در محدودهٔ ۰٫۰۵ تا ۱٫۰۰ ($۰٫۰۵ \leq r \leq ۱٫۰۰$) باشد، یعنی ممکن است چنین نتیجه‌ای در ٪ ۹۵ موارد رخ دهد؛
- طبقه‌بندی ۲: انتظار می‌رود مقدار MPN به ندرت اتفاق افتد، اگر مقدار کمیابی آن در محدودهٔ ۰٫۰۱ تا ۰٫۰۵ ($۰٫۰۱ \leq r \leq ۰٫۰۵$) باشد؛ چنین نتیجه‌ای به‌طور احتمالی با فراوانی کمتر از ٪ ۵ رخ می‌دهد؛
- طبقه‌بندی ۳: انتظار می‌رود مقدار MPN به ندرت اتفاق افتد اگر مقدار کمیابی آن در محدودهٔ ۰ تا ۰٫۰۱ ($۰ < r < ۰٫۰۱$) باشد؛ یعنی انتظار می‌رود چنین نتیجه‌ای با احتمال کمتر از یک بار در ۱۰۰ آزمون رخ دهد.

بیشتر جداول فقط ترکیبی از نتایج را نشان می‌دهند که در طبقه‌بندی‌های ۱ و ۲ قرار دارند.

در کلیهٔ شرایط، درصورتی‌که بیش از سه رقت ساخته می‌شود، تمام مقادیر داده‌های اندازه‌گیری‌شده باید مورد استفاده قرارگیرد. در فرضیهٔ انتخاب هیچ ترکیبی از مقادیری که این مقادیر از سایر ترکیبات صحیح‌تر باشد، از لحاظ علمی درست نیست. بهتر است نتایج حاصل از همهٔ ترکیبات احتمالی لوله‌های مثبت ثبت شود و از محاسبه‌گر MPN (مطابق با زیربند ۹-۲-۷-۴) برای استخراج مقادیر MPN استفاده شود.

۹-۲-۷-۴ تعیین مقادیر MPN با استفاده از محاسبه‌گر MPN

بهتر است از محاسبه‌گر MPN برای تعیین مقادیر MPN حاصل از ترکیب لوله‌های مثبت و منفی، بالن‌ها یا چاهک‌های میکروپلیت در هر رقت استفاده شود. چنین محاسبه‌گرهایی امکان ورود نتایج حاصل از تمام آزمونه‌ها را به‌جای محدودکردن استفاده از تعداد معینی از رقت‌ها و تکرارها، همانند جداول MPN، فراهم می‌کند. بهتر است خروجی این محاسبه‌گر شامل تخمین فواصل اطمینان ٪ ۹۵ برای MPN همراه با شاخص احتمال وقوع ترکیب نتایج حاصل از MPN باشد (این ممکن است به‌صورت یک شاخص کمیابی و/یا طبقه‌بندی کمیابی باشد؛ به زیربند ۹-۲-۷-۳-۲ مراجعه شود). برای کسب اطلاعات بیشتر در خصوص محاسبه‌گری که این الزامات را برآورده کند به وب‌گاه http://standards.iso.org/iso/8199 مراجعه شود.

این صفحه گسترده[1] می‌تواند تا ۱۰ سطح رقت سری را اداره کند. جزئیات این محاسبه‌ها در منبع شمارهٔ [28] کتاب‌نامه تشریح شده است.

برخی از استانداردهای خاص (برای مثال ISO 9308-2 [12]) 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 همهٔ 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 غیرمحتمل 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 نمونهٔ تکراری درخواست شود.

۱۰ روش‌های (کیفی) تشخیص

۱۰-۱ کلیات

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

۱۰-۲ روش اجرایی

مقدار p ml نمونهٔ تحت بررسی را با P ml ×۹ 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 جایی‌که 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.

1- Spreadsheet

استفاده از دو براث غنی‌سازی متفاوت و همچنین دو یا چند محیط کشت انتخابی آگـار، حساسـیت روش را افزایش می‌دهد.

براث‌های 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 بـه‌دسـت آوردن کلنی‌های جداشده برداشته شود.

سپس با استفاده از روش‌های تأیید مناسب (به‌طور کلی پنج عدد در هر دیش آگار، مگر در استاندارد خـاص خلاف آن گفته شود) تعداد کلنی به دست آمده پس از گرمخانه‌گذاری مشـخص شـود. بهتـر اسـت انتخـاب 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 دسـت بروند (منفی کاذب یا کاهش حساسیت آزمون) یا میکروارگانیسم‌های غیرهـدف بـه اشـتباه شناسـایی شـود (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 شمارهٔ ۱۵۶۶۲ [۴] تعریف شده است.

تعیین ویژگی فرایند اکتشافی با هـدف تعیـین محـدودهٔ احتمـالی ویژگـی‌هـای عملکـرد یـک روش جدیـد، اصلاح‌شده یا در غیراین‌صورت یک روش توصیفی نامناسب است. در مرحلهٔ اول از طریق یک آزمایشگاه واحد به‌منظور تعیین عملکرد احتمالی یک روش آزمون کمی انجام می‌شود.

بهتر اسـت ویژگـی‌هـای عملکـرد تعیـین‌شـده در روش‌هـای آزمـون اسـتاندارد بـین‌المللـی ذکـر شـوند تـا آزمایشگاه‌های کاربر بتوانند ویژگی‌های منتشرشده را با نتایج خود برای بررسی عملکرد آزمـون آزمایشـگاهی 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: محدودهٔ کاری، خطی‌بودن، پایداری، کارآیی 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 ساده‌شدهٔ 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 شمارهٔ 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

۱۲-۱ کلیات

استفاده از روش‌های معتبر در حدود قابل اطمینان مشخص‌شدهٔ آن‌ها به‌طور خودکار نتایج معتبر را تضمین نمی‌کند. کنترل کیفیت تجزیه‌ای (AQC)[1] 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 توصیهٔ استاندارد [16] ISO/IEC 17025، باشد. AQC بخش مهمی از یک برنامهٔ 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 این‌که یک آزمایشگاه قادر به جداسازی، شناسایی دقیق و شمارش میکروارگانیسم‌های هدف در یک نمونه است، استفاده شود. اجزای کلیدی برنامهٔ AQC کنترل کیفیت داخلی در زمان آنالیز نمونه و تضمین کیفیت خارجی از طریق مشارکت در یک طرح‌وارهٔ 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)[1] 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 به‌کار گرفته می‌شوند و این بند برخی از گزینه‌های موجود را شرح می‌دهد. بهتر است تمام نمونه‌های کنترل کیفیت حاوی میکروارگانیسم‌های هدف مشابه با دستهٔ مورد جستجو با روش‌های خاص و درصورت لزوم، میکروارگانیسم‌های 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 اولیهٔ IQC با استفاده از کنترل‌های روزانهٔ فرایند در کنار آزمون‌های معمول انجام می‌شود. این موارد عبارتند از:

الف- کنترل مثبت: سویه‌ای از میکروارگانیسم یکسان یا مشابه موارد مورد جستجو، که بر روی آگار (یا واکنش‌های مثبت در براث) و در صورت مناسب‌بودن، در آزمون‌های تایید کلنی‌های هدف را تولید می‌کند؛

ب- کنترل منفی (غیرهدف): سویه‌ای از میکروارگانیسم که قادر به رشد در محیط کشت آزمون است، اما کلنی‌های غیرهدف (یا واکنش‌ها در براث) و در صورت مناسب‌بودن، در آزمون‌های تایید تولید می‌کند؛

پ- کنترل منفی (مهار): سویه‌ای از میکروارگانیسم‌ها که رشد آن به‌وسیلهٔ محیط آزمون مورد استفاده، مهار می‌شود.

ت- شاهد: یک جزء نمونهٔ سترون که هیچ کلنی روی آگار یا واکنشی در براث تولید نمی‌کند.

۱۲-۲-۲-۲ آزمون تکرار

تکرار آزمون نمونه‌های معمول شاخص تکرارپذیری معمول یا عملکرد متخصص فنی را زمانی‌که نمونهٔ 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 به‌عنوان یک منبع تکمیلی داده، ترکیب شود.

1- Internal quality control

۱۲-۲-۲-۳ نمونه‌های اسپایک‌شده

در مواردی‌که میکروارگانیسم‌های هدف طی آزمون نمونه‌های معمول، به ندرت از هم جدا می‌شوند، بهتر است از نمونه‌های اسپایک‌شده استفاده شود. این نمونه‌ها با استفاده از ارگانیسم‌های هدف و/یا غیرهدف یا سویه‌ها، مطابق با زیربند ۱۲-۲-۲ آماده و توسط تمام کارکنان آزمایشگاه به‌صورت نامعلوم[1] آزمون می‌شوند. یک برنامهٔ منظم از نمونهٔ اسپایک‌شده هنگام آموزش یا به‌روزرسانی متخصصین فنی در روش‌های معمول، به‌عنوان مکمل آزمون‌های ارزیابی کیفیت خارجی، که می‌تواند به‌ندرت و هزینه‌بر باشد، مفید است.

۱۲-۲-۲-۴ میکروارگانیسم‌ها برای کنترل کیفیت داخلی

جزئیات میکروارگانیسم‌های مورد نیاز برای آزمون عملکرد همهٔ 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.

میکروارگانیسم‌های کنترل کیفیت که در آزمایشگاه نگهداری می‌شوند، باید تا جای ممکن، برگرفته از مواد خشک‌شده به روش انجماد[2] یا سایر مواد مرجع تولیدشده از سویه‌های مرجع نسل اول حاصل از منابع شناخته‌شده (مجموعه‌های کشت یا تامین‌کنندگان 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، میکروارگانیسم‌هایی که به روش‌های دیگر باقی می‌مانند، می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد، در صورتی‌که نشان داده شود شرایط ذکرشده 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 زمانی‌که چنین جدایه‌هایی در یک منبع آب یا نوعی از نمونهٔ خاص ارسال‌شده به آزمایشگاه، رایج باشند.

۱۲-۲-۲-۵ 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 به‌صورت 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[3] [32] و [33] تشریح شد، ترسیم کرد. حدود هشدار و اقدام از طریق روش‌های مشخص‌شده برای هشدار به آزمایشگاه نسبت به مشکلات بالقوه با دقت روش‌شناسی (به استاندارد

1- Blind
2- Freeze- dried
3- Shewhart

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

۱۲-۳ ارزیابی کیفیت خارجی

طرح‌های ارزیابی کیفی خارجی بین آزمایشگاهی (EQAs)[1] یا آزمون مهارت (PT)[2] معتبر قابل‌دسترس برای آزمایشگاه‌هایی که آزمون میکروبیولوژی آب را انجام می‌دهند، وجود دارد. این طرح‌ها شامل بررسی نمونه‌های با ترکیب نامعلوم است که به‌وسیلهٔ 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 ISO/TS 22117 [19] مراجعه شود.

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

1- External quality assessments
2- Proficiency testing

پیوست الف

(آگاهی‌دهنده)

معیارهای انتخاب روش

الف-۱ کلیات

بیشتر میکروارگانیسم‌های قابل‌کشت 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 ± عدد یا فاصلهٔ 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 شمارهٔ [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 نتیجهٔ آزمون و مقدار مرجع پذیرفته شده است. مطابق نظر لایت‌فوت و مایر[1] منبع شمارهٔ [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 نتیجهٔ منفرد شامل دو جزء سیستماتیک (مانند اریبی) و تصادفی (مانند عدم دقت) باشد:

عدم دقت + اریبی = عدم قطعیت

این ساده‌سازی وضعیت است. در میکروبیولوژی به‌طور معمول سهم‌هایی در عدم قطعیت وجود دارد که در این طبقه‌بندی قرار نمی‌گیرد مانند نوسان غیرقابل‌انتظار که از نظر ریاضی قابل الگوبرداری نیست. در مقابل صحت روش، اریبی قرار دارد. این ویژگیِ 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 به‌وسیلهٔ تفاوت‌های بین آزمایشگاه‌ها یا در یک آزمایشگاه مجزا ایجاد می‌شود. دقت در مقابل خطای تصادفی، قرار می‌گیرد. از این رو، رابطهٔ مشابه در بالا بیشتر به‌صورت زیر بیان می‌شود:

دقت + صحت = 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 مجموعهٔ 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 این‌که روش‌های میکروبیولوژیکی از نظر ماهیت مخرب هستند (یعنی نمونه طی آنالیز از بین می‌رود)، بنابراین لازم است از مواد آزمون به‌طورکامل مخلوط‌شده، که در آن باکتری‌ها به‌طور تصادفی توزیع شده است و/یا گروه بزرگی از چندین آزمایشگاه استفاده شود (به منبع شمارهٔ [29] کتاب‌نامه مراجعه شود).

1- Lightfoot and Maier

خطاهـا ممکـن اسـت کمـی یـا کیفـی باشـد. خطاهـای کمـی هنگـامی اتفـاق مـی‌افتـد کـه بـرای مثـال میکروارگانیسم‌های شمارش‌شده متعلق به گروه مورد جـستجو باشـند، ولـی نتـایج شمارش نهایی کمتـر از مقدار واقعی تخمین زده شود (برخی از منفی‌های کاذب یا حساسیت کاهش‌یافته). خطاهای کیفی هنگـامی اتفاق می‌افتد که برای مثال، تعدادی از میکروارگانیسم‌هایی کـه متعلـق بـه گـروه مـورد جسـتجو نیسـتند، شمارش شوند به گونه‌ای که مقدار نهایی بزرگ‌تـر از مقـدار واقعـی باشـد (برخـی از مثبـت‌هـای کـاذب یـا اختصاصیت کاهش‌یافته). هر دو نوع خطا می‌توانند به‌طور هم‌زمان رخ دهند.

الف-۲-۳-۲-۲ خطاهای کمی

برخی از خطاها مستقل از روش اجرایی شمارش هستند. در صورت وجود ذرات معلـق، میکروارگانیـسم‌هـا ممکـن اسـت جذب سطحی شوند و علی‌رغم اختلاط شدید قابل جداسازی نباشند؛ این مسئله فرض تشکیل یک کلنی یا کـدورت در محـیط کـشت مـایع تلقـیح‌شـده بـا حجـم کمـی از نمونـه که مـی‌توانـد از یـک میکروارگانیسم منفرد به‌دسـت آیـد را بی‌اعتبار می‌سازد.

عملکرد یک محیط کشت انتخابی ممکن اسـت اثـر بازدارنـدگی زیـادی داشـته باشـد و در نتیجـه نه‌تنها در رشـد میکروارگانیسم‌های زمینه بلکه هم‌چنین میکروارگانیسم‌هایی که باید شمارش شوند تداخل ایجاد کند.

سایر خطاها مربوط به ماهیت نمونهٔ آب است. اجزای فیزیکو شیمیایی مانند مواد سمی یا غلظـت‌هـای زیـاد نمک با تاثیر بر محیط‌های کشت، از رشد میکروارگانیسم‌ها ممانعت مـی‌کنـد. ایـن اثـر بـه ویـژه در صـورت زیـادبودن حجم آزمونهٔ استفاده‌شده در مقایسه با حجم محیط کشت استفاده‌شده (برای مثـال در روش‌هـای MPN که در آن محیط کشت با غلظت دو یا چند برابر یا محـیط کشـت آب‌گیـری‌شـدهٔ محلـول در نمونـه، آزمون مـی‌شـود)، دارای اهمیت است. ضمن استفاده از فیلتراسیون غشائی برای جداسازی میکروارگانیسم‌ها از نمونه می‌تواند در غلبه بر این مشکل کمک کند مگر این‌که مواد بازدارنده روی فیلتر غشائی حفظ شود.

اجزای بیولوژیکی ماننـد میکروارگانیسـم‌هـای زمینـه ممکـن اسـت از طریـق رقابـت بیولـوژیکی بـا رشـد میکروارگانیـسم‌های مورد جستجو تداخل داشته باشد. این اثر به‌ویژه در محـیط‌هـای کشـت مـایع اتفـاق مـی‌افتـد. در سـایر روش‌های آزمون که میکروارگانیسم‌ها کلنی‌های جداگانه ایجاد مـی‌کننـد، ایـن رقابـت بیولـوژیکی محدود می‌شود بـه‌شرطی‌که هیچ گسترش یا رشد زیاد کلنی‌ها روی پلیت وجود نداشته باشد.

الف- ۲-۳-۲-۳ خطاهای کیفی

خطاهای کیفـی هنگـامی اتفـاق مـی‌افتـد کـه بـین تعریـف میکروارگانیـسم‌هـای مـورد جـستجو و شناسایی میکروارگانیسم‌های جداشده تفاوت‌هایی وجود داشته باشد. وقتـی‌کـه تعریـف دقیـق اسـت، ماننـد اعـضای جداگانهٔ یک جنس یا گونه، به‌طوراستثنا یک مشـاهدهٔ منفـرد بـرای فـراهم‌کـردن اطلاعـات کـافی به‌منظور ارائهٔ نتایج نهایی درست کفایت می‌کند و اغلب انجام تمام آزمـون‌های بعـدی لازم بـرای شناسـایی 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 ISO 3534-1[5] ، استانداردهای ملی ایران به شماره‌های ۱-۷۴۴۲ [۱] و۱۵۶۶۲ [۴] دقت، نزدیکی توافق بین نتایج آزمون مستقل به‌دست آمده تحت شرایط مشخص است. استاندارد ISO 3534-1[5] 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 ۱-۷۴۴۲ [۱] و۱۵۶۶۲ [۴] و استاندارد ISO 16140-1 [15] شرح داده شده است. دو معیار دقت در این استاندارد شرح داده شده است: تکرارپذیری (r) و تجدیدپذیری (R). تعاریف در زیربندهای ۳-۱۱ و ۳-۱۳ آورده شده است.

یادآوری- معیار سوم دقت برای ارزیابی نتایج کمی در یک آزمایشگاه مجزا می‌تواند مفید باشد: دقت متوسط، که برای بیان تجدیدپذیری بین‌آزمایشگاهی استفاده می‌شود. این دقت برای ارزیابی نتایج حاصل از متخصصین فنی در یک آزمایشگاه مجزا به‌منظور ارائهٔ بهتر مولفهٔ دقت در عدم قطعیت نتایج آزمون در آن آزمایشگاه مناسب است. در میکروبیولوژی، امکان تهیهٔ مواد آزمون به راستی 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 تلقیح‌شدهٔ چندتایی در هر سری حجم آزمونه 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 محدودهٔ 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 شمارهٔ ۱۵۶۶۲ [۴] حد تشخیص به‌صورت تعداد ذرات x (در حجم مورد آزمون) تعیین می‌شود که در آن احتمال تشخیص وجود آنالیت برابر ٪ ۹۵ [p(+) =۰٫۹۵] است.

الف-۲-۴-۲ حد تشخیص در روش شمارش کلنی

احتمال نتیجهٔ مثبت p(+) وقتی توزیع پواسون غالب می‌شود را می‌توان با استفاده از فرمول (الف-۱) محاسبه کرد:

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

که با حل این فرمول x می‌شود:

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

که در آن:

e پایهٔ لگاریتم طبیعی (e = ۲٫۷۱۸۳)؛

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

مثال: با توجه به فرمول بالا، $x = -\ln (۱ - ۰٫۹۵) = -\ln (۰٫۰۵) = ۳٫۰$ است. بنابراین، در تعداد میانگین ۳ (ذرات در هر آزمونه)، شانس تشخیص وجود آنالیت برابر با ۰٫۹۵ (به شرطی‌که از توزیع پواسون تبعیت کند) است.

سطح تشخیص یک ویژگی سوسپانسیون‌ها است و یک روش را از روش‌های دیگر متمایز نمی‌کند و برای همهٔ روش‌های شمارش کلنی یکسان است.

الف-۲-۴-۳ سطح تشخیص با روش‌های MPN

سطح تشخیص روش‌های MPN را می‌توان به روش یکسان با آن‌چه برای روش‌های شمارش کلنی گفته شد، استدلال کرد. صرف‌نظر از پیکربندی هندسی، متوسط تعداد ذرات مشابه در سیستم برای اطمینان از تشخیص آنالیت با احتمال انتخاب‌شده مورد نیاز است.

الف-۲-۵ اثرات نوع و دسته‌های فیلتر غشایی

نشان داده شده است که انواع و دسته‌های فیلترهای غشائی مورد استفاده برای روش‌هایی که نمونه‌های آزمون قبل از گرمخانه‌گذاری روی محیط‌های خاص فیلتر شده‌اند، نتایج آزمون این روش‌ها را تحت تاثیر قرار داده است. برای کسب اطلاعات بیشتر در مورد انواع فیلترهای غشائی که برای روش خاص استفاده می‌شوند، به استانداردهای خاص مراجعه کنید. برای کسب اطلاعات در زمینهٔ روش‌های 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 به‌وسیلهٔ نمونهٔ در حال مخلوط‌شدن با محیط کشت آگار ذوب‌شده در دمای ۴۴ °C تا ۴۷ °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 درجهٔ 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 به‌وسیلهٔ ارگانیسم‌های زنده مانند میکروپلانکتون یا حتی باکتری‌هایی که در روزنه‌های 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 مواردی‌که 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 مشخصهٔ میکروارگانیسم‌های مورد جستجو بدون تداخل در رشد آن‌ها داشته باشد. یک مثال، تغییر pH در محیط کشت پس از تخمیر قند قابل‌تخمیر تازه ایجادشده است که در محیط‌کشت 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، فاصلهٔ اطمینان تعیین‌کنندهٔ توزیع آماری میکروبی را تخمین بزنیم.

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

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

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

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 مادهٔ 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 ($۱۰^{-۲}$): ۲۱۵ کلنی؛

- در دومین رقت باقی‌مانده ($۱۰^{-۳}$): ۱۴ کلنی.

تعداد میکروارگانیسم‌ها N به‌صورت زیر محاسبه می‌شود:

$$N = \frac{\sum c}{V \times [n_1 + (0.1 \times n_2)] \times d} = \frac{215 + 14}{1 \times [1 + (0.1 \times ۱)] \times 10^{-۲}} = \frac{229}{0.011} = 20818$$

نتیجه را مطابق با زیربند ۹-۱-۸-۱ گرد کنید، تعداد میکروارگانیسم‌ها ۲۱ ۰۰۰ یا $۲/۱ \times ۱۰^{۴}$ در هر میلی‌لیتر نمونه است.

با $N = ۲/۱ \times ۱۰^{۴}$ در هر میلی‌لیتر، برای ۲۲۹ کلنی شمارش‌شده، فاصلهٔ 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 فاصلهٔ اطمینان عبارتند از:

$$\delta_{۱} = 1.8 \times 10^{4} \quad , \quad \delta_{۲} = 2.4 \times 10^{4}$$

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

- در اولین رقت باقی‌مانده ($۱۰^{-۲}$): ۱۶۸ کلنی و ۲۱۵ کلنی؛

- در دومین رقت باقی‌مانده ($۱۰^{-۳}$): 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 میکروارگانیسم‌ها ۱۹ ۰۰۰ یا $۱/۹ \times ۱۰^{۴}$ در هر میلی‌لیتر نمونه است.

با $N = ۱/۹ \times ۱۰^{۴}$ در هر میلی‌لیتر یا در گرم، برای ۴۲۲ کلنی شمارش‌شده، فاصلهٔ 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 فاصلهٔ اطمینان عبارتند از:

$$\delta_{۱} = 1.7 \times 10^{4} \quad , \quad \delta_{۲} = 2.1 \times 10^{4}$$

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

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

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 **(فاصلهٔ اطمینان δ برای میانگین وزنی ۳۰۰ کلنی: ۲۷۰ تا ۳۳۴)** **حد پایین: ٪ ۵ از ۳۰۰ = ۱۵ کلنی** **(فاصلهٔ اطمینان δ برای میانگین وزنی ۱۵ کلنی: ۸ تا ۲۵)**		
d_1 بیش از ۳۳۴ کلنی	d_2 کمتر از ۱۵ کلنی: دو احتمال: به۲ ردیف زیر مراجعه شود.	
بیش از ۳۳۴ کلنی	مطابق با حد پایینی: کمینه ۸ کلنی	روش محاسبهٔ 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 قابل‌قبول)

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 **(فاصلهٔ اطمینان δ برای میانگین وزنی ۱۵۰ کلنی: ۱۲۹۰ تا ۱۷۵)** **حد پایینی: ٪ ۵ از ۱۵۰ = ۷ کلنی** **(فاصلهٔ اطمینان δ برای میانگین وزنی ۷ کلنی: ۳ تا ۱۴)**		
d_1 بیش از ۱۷۵ کلنی	d_2 کمتر از ۷ کلنی: دو احتمال: به۲ ردیف زیر مراجعه شود.	
بیش از ۱۷۵ کلنی	مطابق با حد پایینی: کمینه ۳ کلنی	روش محاسبهٔ تعداد تخمینی (مطابق با زیربند ۹-۱-۸-۶-۲) (با بیان خاص نتیجه اگر تعداد ۳ است)
بیش از ۱۷۵ کلنی	با حد پایینی مطابقت ندارد: کمتر از ۳ کلنی	روش محاسبه: N/A (تفاوت بین دو رقت غیر قابل‌قبول)

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

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

[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 دورهٔ 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 ارائه‌شده در زیربند ۹-۱-۸ باید دیش بدون کلنی را در صورتی‌که این دیش باقی‌مانده باشد، در نظر گرفت.

هنگام شمارش کلنی‌های هدف یا فرضی، بیشینه تعداد همهٔ 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 مواردی‌که 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) تلقیح‌شده 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.

هنگامی‌که 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 محاسبهٔ 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 قابل‌توجه 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 میکروب‌شناس واجد شرایط بررسی، تفسیر یا رد شود.

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

برای یک نتیجهٔ 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 نمونهٔ آزمون را به‌صورت میانگین وزنی دو رقت ده برابری متوالی، با استفاده از فرمول (پ-۱) محاسبه کنید:

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

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 مادهٔ 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 مواردی‌که نمونهٔ مایع رقیق‌نشده 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 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 موارد تشریح‌شده در بالا گرد کنید، تعداد میکروارگانیسم‌ها ۱۹ ۰۰۰ یا $1{,}9 \times 10^4$ 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 باقی‌مانده برای شمارش کلنی‌ها تلقیح می‌شود. پس از تایید، برای هر یک از دیش، تعداد، a، کلنی‌های مطابق با معیارهای تأیید را با استفاده از فرمول (پ-۲) محاسبه کنید:

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

که در آن:

A تعداد کلنی‌های فرضی تلقیح‌شده؛

b تعداد کلنی‌های مطابق با معیارهای شناسایی یا تایید؛

c کل تعداد کلنی‌های فرضی شمارش‌شده روی دیش است.

نتایج محاسبه‌شده 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 میکروارگانیسم‌های شناسایی‌شده یا تاییدشده موجود در نمونه آزمون را، از طریق جایگزین‌کردن $\sum a$ با $\sum c$، با استفاده از فرمول ارائه‌شده 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 باقی‌مانده (10^{-3}): ۶۶ و ۸۰ کلنی؛

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

آزمون کلنی‌های انتخاب‌شده 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 ۴ = a؛

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

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

نتیجه را مطابق موارد تشریح‌شده در بالا گرد کنید، تعداد میکروارگانیسم‌ها ۴۴ ۰۰۰ یا $۴/۴ \times ۱۰^{۴}$ در هر میلی‌لیتر نمونه است.

پ-۴ روش محاسبه: شمارش‌های تخمینی

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

اگر دو دیش از نمونهٔ 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:

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

که در آن:

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

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

n تعداد دیش باقی‌مانده (در این مورد ۲ = n)؛

d فاکتور رقت مربوط به سوسپانسیون اولیه یا رقت اول، تلقیح‌شده یا باقی‌مانده (1 = d در مواردی‌که فرآوردهٔ 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 ($۱۰^{-۲}$): ۸ و ۹ کلنی شمارش شدند.

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

با گردکردن نتیجه، همان‌طور که در پ-۳ توصیه شده است، تعداد تخمینی N_E میکروارگانیسم‌ها ۸۵۰ یا $۸/۵ \times ۱۰^{۲}$ در هر میلی‌لیتر نمونه است.

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

اگر دو دیش از نمونه آزمون، سوسپانسیون اولیه یا رقت اول، تلقیح‌شده یا باقی‌مانده بدون کلنی باشد نتیجه را به‌صورت زیر بیان کنید:

«کمتر از $1/d$ میکروارگانیسم‌ها در هر میلی‌لیتر»

که در آن d رقت مربوط به سوسپانسیون اولیه یا رقت اول، تلقیح‌شده یا باقی‌مانده ($d = 1$ در مواردی که فرآوردهٔ مایع رقیق‌نشده (نمونه آزمون) استفاده می‌شود $d = ۰٫۱$ وقتی‌که رقت $۱۰^{-۱}$ استفاده می‌شود).

پ-۵ موارد ویژه (شمارش کلنی‌های هدف یا فرضی)

پ-۵-۱ درصورتی‌که تعداد کلنی‌های هدف و غیرهدف برای دو دیش حاوی رقت اول d_1 بیشتر از ۳۰۰ (یا هر عدد دیگر بیان‌شده در استاندارد خاص) باشد، بدون کلنی‌های هدف قابل‌مشاهده یا تاییدشده 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 تاییدشده را نمی‌توان شمارش کرد که نتیجهٔ آن به‌صورت زیر بیان می‌شود:

«کمتر از $1/d_2$ و بیشتر از $1/d_1$ میکروارگانیسم‌ها در هر میلی‌لیتر»

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

مثال: شمارش کلنی نتایج زیر را حاصل می‌کند:

- در اولین رقت باقی‌مانده ($۱۰^{-۲}$): بیشتر از ۳۰۰ کلنی در هر یک از دو دیش، با کلنی‌های هدف یا تاییدشدهٔ موجود؛
- در دومین رقت باقی‌مانده ($۱۰^{-۳}$): ۳۳ و ۳۵ کلنی بدون کلنی‌های هدف یا تاییدشدهٔ موجود.

نتیجه بیان‌شده در میکروارگانیسم‌ها کمتر از ۱ ۰۰۰ و بیشتر از ۱۰۰ در هر میلی‌لیتر نمونه است.

پ-۵-۲ درصورتی‌که تعداد کلنی‌های هدف و غیرهدف برای دو دیش حاوی رقت اول d_1 بیشتر از ۳۰۰ (یا هر عدد دیگر بیان‌شده در استاندارد خاص) باشد، بدون کلنی‌های هدف قابل‌مشاهده یا تاییدشده 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 تاییدشده را نمی‌توان شمارش کرد که نتیجه به‌صورت زیر بیان می‌شود:

«کمتر از $1/d_2$ میکروارگانیسم‌ها در هر میلی‌لیتر»

که در d_2 فاکتور رقت مربوط به رقت d_2 است.

مثال: شمارش کلنی نتایج زیر را حاصل می‌کند:

- در اولین رقت باقی‌مانده ($۱۰^{-۲}$): بیشتر از ۳۰۰ کلنی در هر یک از دو دیش، بدون کلنی‌های هدف یا تاییدشدهٔ موجود؛
- در دومین رقت باقی‌مانده ($۱۰^{-۳}$): ۳۳ و ۳۵ کلنی، بدون کلنی‌های هدف یا تاییدشدهٔ موجود؛

نتیجهٔ بیان‌شده در میکروارگانیسم‌ها کمتر از ۱ ۰۰۰در هر میلی‌لیتر نمونه است.

پ-۶ روش محاسبه: موارد ویژه

پ-۶-۱ درصورتی‌که تعداد کلنی‌های شمارش‌شده (کل کلنی‌ها، هدف یا کلنی‌های فرضی) برای دو دیش حاوی رقت اول d_1 بیشتر از ۳۰۰ (یا هر عدد دیگر بیان‌شده 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 فاصلهٔ بین ۳۲۴ تا ۳۰۰ قرار داشته باشد (بخش بالای فاصلهٔ 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 نتیجهٔ شمارش رقت d_2 را درنظر بگیرید و سپس با شمارش تخمینی ادامه دهید (مطابق با زیربند ۹-۱-۸-۴)؛ به‌جز مواردی‌که به بیشینه تعداد در ۳۰۰ برای شمارش کلنی‌ها اشاره شود، اگر نتیجهٔ دوم کمتر از ۷ باشد (حد پایینی فاصلهٔ اطمینان برای میانگین وزنی برابر ۱۰)، بنابراین تفاوت بین دو رقت در آن‌صورت غیرقابل‌قبول است.

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

مثال ۱: شمارش کلنی نتایج زیر را حاصل می‌کند:

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

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

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

مثال ۲: شمارش کلنی نتایج زیر را حاصل می‌کند:

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

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

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

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

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

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

نتیجهٔ این شمارش غیر قابل‌قبول 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 نتیجهٔ شمارش رقت d_2 را درنظر بگیرید و سپس با شمارش تخمینی ادامه دهید (مطابق با زیربند ۹-۱-۸-۴)؛ به‌جز مواردی‌که به بیشینه تعداد در ۱۵۰ برای شمارش کلنی‌ها اشاره

شود، اگر نتیجهٔ دوم کمتر از ۴ باشد (حد پایینی فاصلهٔ اطمینان برای میانگین وزنی برابر ۸)، بنابراین تفاوت بین دو رقت در آن‌صورت غیرقابل‌قبول است.

مثال ۴: شمارش کلنی (هنگامی‌که 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 درصورتی‌که شمارش کلنی‌ها (کل کلنی‌ها، کلنی‌های هدف یا فرضی) در هر یک از دیش‌ها برای همهٔ رقت‌های تلقیح‌شده تعداد بیشتر از ۳۰۰ (یا هر عدد دیگر بیان‌شده در استاندارد خاص) باشد، نتایج را به‌صورت زیر بیان کنید:

«بیشتر از $300/d$ (مورد کلنی‌های کل یا هدف) یا بیشتر از $300 \times b/A \times 1/d$ (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 درمواردی‌که 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 به‌صورت میانگین حسابی کلنی‌های شمارش‌شده بر روی دو دیش، با استفاده از فرمول (پ-۴) محاسبه کنید:

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

که در آن:

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

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

n تعداد دیش باقی‌مانده (در این مورد $n = ۲$)؛

d فاکتور رقت مربوط به رقت باقی‌مانده، است.

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

نتیجه را به‌صورت 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 گردکردن نتیجه، همان‌طور که در پ-۳ توصیه شده است، تعداد N میکروارگانیسم‌ها ۱ ۳۰۰ ۰۰۰ یا $1{,}3 \times 10^{6}$ در هر میلی‌لیتر نمونه است.

پیوست ت

(الزامی)

مواد تشکیل‌دهنده، آماده‌سازی و آزمون عملکرد رقیق‌کننده‌ها

ت-۱ کلیات

ویژگی‌های کلی استاندارد ISO 11133 برای آماده‌سازی و آزمون عملکرد رقیق‌کننده‌های توصیف‌شده در این پیوست، به‌کار برده می‌شود. اگر رقیق‌کننده‌ها از محیط‌های کشت/واکنشگرهای کامل آب‌گیری‌شده، آماده شده باشند یا اگر از رقیق‌کننده‌ها/محیط‌های کشت/واکنشگرهای آماده استفاده می‌شود، دستورالعمل‌های سازنده را در خصوص آماده‌سازی، شرایط ذخیره‌سازی، تاریخ مصرف و انقضا رعایت کنید. رقیق‌کننده‌های فهرست‌شده در این پیوست به‌طور معمول در میکروبیولوژی آب استفاده می‌شود. بهتر است مناسب‌ترین رقیق‌کننده برای روش‌های خاص انتخاب شود تا اطمینان حاصل شود که هیچ تاثیری بر عملکرد روش ندارد. ممکن است همچنین در بعضی از روش‌ها نیاز به رقیق‌کننده‌هایی باشد که در این پیوست گنجانده نشده است. برای کسب راهنمایی بیشتر به استانداردهای خاص مراجعه کنید.

آزمون عملکرد به‌منظور تضمین کیفیت رقیق‌کننده‌ها در ت-۴ شرح داده شده است.

ت-۲ مواد تشکیل‌دهنده و آماده‌سازی

ت-۲-۱ محلول نمکی

ت-۲-۱-۱ مواد تشکیل‌دهنده

سدیم کلراید (NaCl) (CAS No.7647-14-5)	۸٫۵ g
آب (به زیربند ۶-۲ مراجعه شود)	۱ ۰۰۰ ml

ت-۲-۱-۲ آماده‌سازی

ترکیبات فوق را در آب حل کرده و در صورت لزوم از حرارت استفاده کنید. با افزودن محلول سدیم هیدروکسید [c(NaOH)= 1 mol/l] یا هیدروکلریک اسید [c(HCl)= 1 mol/l] pH را به‌گونه‌ای تنظیم کنید که پس از سترون‌سازی، برابر ۰٫۲ ± ۷ در دمای ۲۵ °C شود.

یادآوری- محلول نمکی آماده حاوی ۹ g گرم سدیم کلراید در ۱ ۰۰۰ ml آب (٪ ۰٫۹) نیز به‌صورت تجاری در دسترس است. در صورتی‌که توسط آزمایشگاه تایید شود که این محلول قابل‌قبول است، می‌توان آن را مورد استفاده قرار داد.

ت-۲-۲ رقیق‌کنندهٔ پپتون

ت-۲-۲-۱ مواد تشکیل‌دهنده

کازئین هضم‌شدهٔ آنزیمی	۱٫۰ g
آب (به زیربند ۶-۲ مراجعه شود)	۱ ۰۰۰ ml

ت-۲-۲-۲ آماده‌سازی

ترکیبات فوق را در آب حل کرده و در صورت لزوم از حرارت استفاده کنید. با افزودن محلول سدیم هیدروکسید [c(NaOH)= 1 mol/l] یا هیدروکلریک اسید [c(HCl)= 1 mol/l] pH را به‌گونه‌ای تنظیم کنید که پس از سترون‌سازی، برابر ۷ ± ۰٫۲ در دمای ۲۵ °C شود.

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

ت-۲-۳-۱ مواد تشکیل‌دهنده

کازئین هضم‌شدهٔ آنزیمی	۱٫۰ g
سدیم کلراید (NaCl) (CAS No.7647-14-5)	۸٫۵ g
آب (به زیربند ۶-۲ مراجعه شود)	۱ ۰۰۰ ml

ت-۲-۳-۲ آماده‌سازی

ترکیبات فوق را در آب حل کرده و در صورت لزوم از حرارت استفاده کنید با افزودن محلول سدیم هیدروکسید [c(NaOH)= 1 mol/l] یا هیدروکلریک اسید [c(HCl)= 1 mol/l] pH را به‌گونه‌ای تنظیم کنید که پس از سترون‌سازی، برابر ۷ ± ۰٫۲ در دمای ۲۵ °C شود.

ت-۲-۴ محلول رینگر یک چهارم

ت-۲-۴-۱ مواد تشکیل‌دهنده

سدیم کلراید (NaCl) (CAS No.7647-14-5)	۲٫۲۵ g
پتاسیم کلراید (KCl) (CAS No.7447-40-7)	۰٫۱۰۵ g
کلسیم کلراید (بدون آب) ($CaCl_2$) (CAS No.10043-52-4)	۰٫۰۶ g
سدیم هیدروژن کربنات ($NaHCO_3$) (CAS No.144-55-8)	۰٫۰۵ g
آب (به زیربند ۶-۲ مراجعه شود)	۱ ۰۰۰ ml

به‌طور جایگزین، جرم معادل (۰٫۱۲ g) کلسیم کلراید شش آبه ($CaCl_2 \cdot 6H_2O$) را می‌توان مورد استفاده قرار داد.

ت-۲-۴-۲ آماده‌سازی

ترکیبات فوق را در آب حل کرده و در صورت لزوم از حرارت استفاده کنید. با افزودن محلول سدیم هیدروکسید [c(NaOH)= 1 mol/l] یا هیدروکلریک اسید [c(HCl)= 1 mol/l] pH را به‌گونه‌ای تنظیم کنید که پس از سترون‌سازی، برابر ۰٫۲ ± ۷ در دمای ۲۵ °C شود.

ت-۲-۵ محلول بافرفسفات

ت-۲-۵-۱ محلول فسفات

ت-۲-۵-۱-۱ مواد تشکیل‌دهنده

پتاسیم دی‌هیدروژن‌ارتوفسفات (بدون آب) (KH_2PO_4) (CAS No.7778-77-0)	۳۴ g
آب (به زیربند ۶-۲ مراجعه شود)	۱ ۰۰۰ ml

ت-۲-۵-۱-۲ آماده‌سازی

پتاسیم دی‌هیدروژن‌ارتوفسفات را در ۵۰۰ ml آب مقطر حل کنید. با افزودن محلول سدیم هیدروکسید [c(NaOH)= 1 mol/l] یا هیدروکلریک اسید [c(HCl)= 1 mol/l] pH را به‌گونه‌ای تنظیم کنید که برابر ۰٫۲ ± ۷٫۲ شود. تا مقدار ۱ ۰۰۰ ml آب مقطر اضافه کنید. در صورتی‌که محلول فوق قبل از استفاده ذخیره می‌شود، محلول را سترون کنید.

ت-۲-۵-۲ محلول منیزیم‌کلراید

ت-۲-۵-۲-۱ مواد تشکیل‌دهنده

منیزیم کلراید (بدون آب) ($MgCl_2$) (CAS No.7786-30-3)	۳۸ g
آب (به زیربند ۶-۲ مراجعه شود)	۱ ۰۰۰ ml

به‌طور جایگزین، جرم معادل (۸۱٫۱ g) منیزیم کلراید شش آبه ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) را می‌توان مورد استفاده قرار داد.

ت-۲-۵-۲-۲ آماده‌سازی

منیزیم کلراید را در آب حل کنید. در صورتی‌که محلول فوق قبل از استفاده ذخیره می‌شود، محلول را سترون کنید.

ت-۲-۵-۳ محلول نهایی

ت-۲-۵-۳-۱ مواد تشکیل‌دهنده

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

ت-۲-۵-۳-۲ 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 ۰٫۲ ± ۷ در دمای ۲۵ °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 ۱۲۱ ± ۳) °C به‌مدت ۱۵ min]. برای بیشینه شش ماه در دمای اتاق یا در یخچال (۳ ± ۵) °C قرار دهید. به‌طور جایگزین، رقیق‌کننده را می‌توان پس از سترون‌سازی و ذخیره‌سازی در یخچال به‌مدت حداکثر یک ماه، تحت شرایط اسپتیک[1] 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

رقیق‌کننده	عملکرد	گرمخانه‌گذاری	سویه‌های کنترل	شماره‌های WDCM[a]	محیط کشت مرجع	روش کنترل	معیار[d]
محلول نمکی	رقیق-کننده	۱ h / ۴۵ min تا ۲۵ °C تا ۲۰ °C	اشریشیا کلی[c]	۰۰۰۱۲ یا ۰۰۰۱۳	TSA	کمی	± ۳۰٪ / کلنی‌ها T^0
رقیق‌کنندهٔ پپتون			استافیلوکوکوس اورئوس	[b]۰۰۰۳۴			
محلول پپتون نمکی							
محلول رینگر یک چهارم							
محلول فسفات بافری							

[a] برای کسب اطلاعات در مورد شماره سویه‌های جمع‌آوری محیط کشت و جزئیات تماس، به کاتالوگ سویهٔ مرجع در وبسایت http://www.wfcc.info مراجعه کنید.
WDCM: مرکز داده‌های جهانی میکروارگانیسم‌ها.

[b] سویه به عنوان کمینه استفاده می‌شود.

[c] سویهٔ اختیاری؛ یکی از سویه‌ها باید به عنوان کمینه استفاده شود.

[d] بهتر است شمارش پس از گرمخانه‌گذاری حدود ۳۰٪ شمارش حاصل از رقیق‌کننده قبل از گرمخانه‌گذاری 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 ml ۱۰۰ نمونه با حد اطمینان ٪ ۹۵ برای سری ۵ لوله‌ای

(۵ لولهٔ ml ۲۰)

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

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

(۱۰ لولهٔ ml ۱۰)

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

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

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

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

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

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

پیوست ج
(آگاهی‌دهنده)

تغییرات اعمال‌شده 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 شمارهٔ ۱-۷۴۴۲: سال ۱۳۸۳، درستی (صحت و دقت) روش‌ها و نتایج اندازه‌گیری قسمت اول: تعاریف و اصول کلی.

[۲] استاندارد ملی ایران به شمارهٔ ۹۸۹۹: سال ۱۳۸۶، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- الزامات کلی و راهنما برای آزمون‌های میکروبیولوژی.

[۳] استاندارد ملی ایران به شمارهٔ ۹۸۹۹: سال ۱۳۹۴، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- الزامات کلی و راهنما برای آزمون‌های میکروبیولوژی (اصلاحیهٔ اول).

[۴] استاندارد ملی ایران به شمارهٔ ۱۵۶۶۲: سال ۱۳۹۷، کیفیت آب– الزامات استقرار ویژگی‌های عملکردی روش‌های کمّی میکروبیولوژی.

[5] ISO 3534-1, Statistics — Vocabulary and symbols — Part 1: General statistical terms and terms used in probability

یادآوری- استاندارد ملی ایران به شمارهٔ ۱-۹۴۰: 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 شمارهٔ ۲-۷۴۴۲: 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 شمارهٔ ۱-۸۹۲۳: سال ۱۳۹۷، میکروبیولوژی زنجیره غذایی- آماده‌سازی آزمایه، سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری برای آزمون‌های میکروبیولوژی- قسمت ۱: مقررات کلی برای آماده‌سازی سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری، با استفاده از استاندارد ISO 6887-1:1999 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 شمارهٔ ۱-۱۹۸۴۹: سال ۱۳۹۳، کیفیت آب- جستجو و شمارش انتروکوکوس های روده‌ای -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 شمارهٔ ۳۷۵۹: سال ۱۳۵۷، جستجو و شمارش کلی‌فرم‌ها 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 شمارهٔ ۳- ۷۷۲۵: سال ۱۳۸۷، کیفیت آب- جستجو، شناسایی و شمارش اشریشیا کلی و باکتری‌های کلی‌فرم- قسمت سوم- شمارش اشریشیا 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 شمارهٔ ۲-۱۴۱۳۰: 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 شمارهٔ 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 شمارهٔ 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 شمارهٔ ۱۰۱۵۳: سال ۱۳۹۶، کیفیت آب- مقایسه احیاء نسبی میکروارگانیسم‌ها با استفاده از دو روش کمّی- 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 شمارهٔ ۴۸۰۶: سال ۱۳۸۶، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- روش‌های جامع نمونه‌برداری از سطوح با استفاده از پلیت‌های تماسی و سوآب، 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