



INSO
9933

1st. Revision

2017

Identical with
ISO 21150:
(2015)

جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran
سازمان ملی استاندارد ایران

Iranian National Standardization Organization



استاندارد ملی ایران
۹۹۳۳

تجدیدنظر اول

۱۳۹۵

میکروبیولوژی فرآورده‌های بهداشتی،
آرایشی - جستجو و شناسایی اشريشياکلى

**Microbiology of cosmetics - Detection of
*Escherichia coli***

ICS:07.100.40

سازمان ملی استاندارد ایران

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

صندوق پستی: ۱۴۱۵۵-۶۱۳۹ تهران - ایران

تلفن: ۸۸۸۷۹۴۶۱-۵

دورنگار: ۸۸۸۸۷۱۰۳ و ۸۸۸۸۷۰۸۰

کرج ، شهر صنعتی، میدان استاندارد

صندوق پستی: ۳۱۵۸۵-۱۶۳ کرج - ایران

تلفن: ۰۲۶ (۳۲۸۰۶۰۳۱)-۸

دورنگار: ۰۲۶ (۳۲۸۰۸۱۱۴)

رایانمۀ: standard@isiri.org.ir

وبگاه: <http://www.isiri.gov.ir>

Iranian National Standardization Organization (INSO)

No.1294 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.org.ir

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

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

سازمان ملی استاندارد ایران به موجب بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفه تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) ایران را به عهده دارد.

تدوین استاندارد در حوزه‌های مختلف در کمیسیون‌های فنی مرکب از کارشناسان سازمان، صاحب‌نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می‌شود و کوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانه صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرفکنندگان، صادرکنندگان و واردکنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان‌های دولتی و غیردولتی حاصل می‌شود. پیش‌نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی‌نفع و اعضای کمیسیون‌های مربوط ارسال می‌شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادها در کمیته ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایران چاپ و منتشر می‌شود.

پیش‌نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان‌های علاقه‌مند و ذی‌صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می‌کند در کمیته ملی طرح، بررسی و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می‌شود. بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می‌شود که بر اساس مقررات استاندارد ملی ایران شماره ۵ تدوین و در کمیته ملی استاندارد مربوط که در سازمان ملی استاندارد ایران تشکیل می‌شود به تصویب رسیده باشد.

سازمان ملی استاندارد ایران از اعضای اصلی سازمان بین‌المللی استاندارد (ISO)^۱، کمیسیون بین‌المللی الکترونیک (IEC)^۲ و سازمان بین‌المللی اندازه‌شناسی قانونی (OIML)^۳ است و به عنوان استاندارد تنها رابط^۴ کمیسیون کدکس غذایی (CAC)^۵ در کشور فعالیت می‌کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی‌های خاص کشور، از آخرین پیشرفت‌های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین‌المللی بهره‌گیری می‌شود.

سازمان ملی استاندارد ایران می‌تواند با رعایت موازین پیش‌بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرفکنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و/یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباریکند. سازمان می‌تواند به منظور حفظ بازارهای بین‌المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباریکند. همچنین برای اطمینان پخته‌شدن به استفاده کنندگان از خدمات سازمان‌ها و مؤسسات فعل در زمینه مشاوره، آموزش، بازرگانی، ممیزی و صدور گواهی سیستم‌های مدیریت کیفیت و مدیریت زیستمحیطی، آزمایشگاهها و مراکز واسنجی (کالیبراسیون) وسایل سنجش، سازمان ملی استاندارد این‌گونه سازمان‌ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می‌کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامه تأیید صلاحیت به آن‌ها اعطا و بر عملکرد آن‌ها نظارت می‌کند. ترویج دستگاه بین‌المللی یکاه، واسنجی وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبهای و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این سازمان است.

1- International Organization for Standardization

2- International Electrotechnical Commission

3- International Organization for Legal Metrology (Organisation Internationale de Métrologie Legale)

4-Contact point

5- Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تجدیدنظر استاندارد

«میکروبیولوژی فرآورده‌های بهداشتی، آرایشی - جستجو و شناسایی/ اشریشیا کلی»

(تجدیدنظر اول)

سمت و/یا محل اشتغال:

رئیس:

دبیر کمیته فراورده‌های بهداشتی، آرایشی ISO

روشن طبری، مژده

(کارشناسی ارشد قارچ شناسی پزشکی)

دبیر:

اداره کل استاندارد استان مازندران

افضلي، سمانه السادات

(کارشناسی ارشد میکروبیولوژي)

اعضا: (اسمی به ترتیب حروف الفبا)

انجمان صنایع شوینده و آرایشی ایران

ابراهیمی، لیلا

(کارشناسی ارشد میکروبیولوژي)

وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی - اداره کل آزمایشگاه- های کنترل غذا و دارو

اصغری، شهرناز

(کارشناسی میکروبیولوژي)

شرکت آریان کیمیا تک

اميني، الدوز

(کارشناسی ارشد انگل شناسی)

لابراتوار دکتر اخوی (سی گل)

باقري، مریم

(دکتری داروسازی)

شرکت گلتاش

بنائي، زهرا

(کارشناسی ارشد بیولوژي)

شرکت تحقیقاتی آرين گستر

تيموري، عزيزه

(کارشناسی ارشد شيمي تجزيه)

پژوهشگاه پلیمر و پتروشيمى ايران

دستمردي، مصطفى

(دکتری مهندسي صنایع)

رحمانی، آزاده
شرکت تحقیقاتی آرین گستر
(دکتری میکروبیولوژی)

رضایی، فرزاد
شرکت آنیل طب آذران
(کارشناسی ارشد میکروبیولوژی)

شاهینده، محمدرضا
شرکت ایران آوندفر
(دکتری شیمی)

مهرپور، رامش
پژوهشگاه استاندارد، گروه پژوهشی میکروبیولوژی
(لیسانس صنایع)

نیک بین، حمیده
سازمان ملی استاندارد ایران
(کارشناسی ارشد علوم بهداشتی در تغذیه)

ویراستار:

مهرپور، رامش
پژوهشگاه استاندارد، گروه پژوهشی میکروبیولوژی
(لیسانس صنایع)

فهرست مندرجات

صفحه	عنوان	
ز	پیش‌گفتار	
ح	مقدمه	
۱	هدف و دامنه کاربرد	۱
۱	مراجع الزامی	۲
۲	اصطلاحات و تعاریف	۳
۴	اصول آزمون	۴
۴	محلول‌های رقیق‌کننده و محیط‌های کشت	۵
۱۰	وسایل	۶
۱۰	سویه‌های میکروارگانیسم‌ها	۷
۱۰	نگهداری فرآورده‌های بهداشتی، آرایشی و نمونه‌های آزمایشگاهی	۸
۱۰	روش اجرای آزمون	۹
۱۳	بیان نتایج (جستجوی اشريشیا کلی)	۱۰
۱۳	خنثی‌سازی خواص ضدمیکروبی فرآورده	۱۱
۱۵	گزارش آزمون	۱۲
۱۶	پیوست الف (آگاهی دهنده) سایر آبگوشت‌های غنی‌کننده	
۲۱	پیوست ب (آگاهی دهنده) خنثی‌کننده‌های فعالیت ضدمیکروبی مواد نگهدارنده و مایعات آبکشی	
۲۲	کتاب‌نامه	

پیش‌گفتار

استاندارد «میکروبیولوژی فرآورده‌های بهداشتی، آرایشی - جستجو و شناسایی/شريشيا كلی» که نخستین-بار در سال ۱۳۸۶ تدوین و منتشر شد، بر اساس پیشنهادهای دریافتی و بررسی و تأیید کمیسیون‌های مربوط برای اولین بار مورد تجدیدنظر قرار گرفت و در چهارصد و پنجاه و یکمین اجلاسیه کمیته ملی استاندارد میکروبیولوژی و بیولوژی مورخ ۱۳۹۵/۱۱/۳۰ تصویب شد. اینک این استاندارد به استناد بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

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

این استاندارد جایگزین استاندارد ملی ایران شماره ۹۹۳۳ : سال ۱۳۸۶ می‌شود.

این استاندارد ملی بر مبنای پذیرش استاندارد بین‌المللی زیر به روش «معادل یکسان» تهیه و تدوین شده و شامل ترجمه تخصصی کامل متن آن به زبان فارسی می‌باشد و معادل یکسان استاندارد بین‌المللی مذبور است:

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

ISO 21150: 2015, Cosmetics-Microbiology-Detection of *Escherichia coli*

مقدمه

به منظور حصول اطمینان از ایمنی و کیفیت فرآورده برای مصرف کنندگان، آزمون‌های میکروبیولوژی فرآورده‌های بهداشتی، آرایشی مطابق با تجزیه و تحلیل ریسک میکروبیولوژیکی، انجام می‌شود.

تجزیه و تحلیل ریسک میکروبیولوژیکی به عوامل مختلفی مانند عوامل زیر بستگی دارد:

- تغییرات بالقوه فرآورده‌های بهداشتی، آرایشی؛

- بیماریزائی میکروارگانیسم‌ها؛

- محل کاربرد فرآورده‌های بهداشتی، آرایشی (مو، پوست، چشم و غشاهاي مخاطي^۱)؛

- گروه سنی مصرف کننده (بزرگسالان، کودکان کمتر از ۳ سال).

برای فرآورده‌های بهداشتی، آرایشی و سایر فرآورده‌های موضعی، جستجوی میکروارگانیسم‌های بیماریزا مانند استافیلوکوکوس/ورئوس^۲، سودوموناس آئروژینوزا^۳ و کاندیدا/آلبیکنس^۴ به دلیل ایجاد عفونت‌های پوستی یا چشمی، می‌تواند در نظر گرفته شود. جستجوی سایر انواع میکروارگانیسم‌ها (شامل میکروارگانیسم‌های نشانگر آبودگی مدفوعی مانند /شریشیاکلی^۵) که نشانگر مشکلات بهداشتی در فرآیند تولید هستند، نیز ممکن است حائز اهمیت باشد.

1- Mucous membranes

2- *Staphylococcus aureus*

3- *Pseudomonas aeruginosa*

4- *Candida albicans*

5- *Escherichia coli*

میکروبیولوژی فرآورده‌های بهداشتی، آرایشی - جستجو و شناسایی / اشریشیا کلی

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد ارائه راهنمای کلی در مورد جستجو و شناسایی میکروارگانیسم مشخص اشریشیا کلی در فرآورده‌های بهداشتی، آرایشی است. میکروارگانیسم‌های مورد بررسی مشخص شده در این استاندارد، ممکن است مطابق با رویه‌ها و مقررات ملی در هر کشور متفاوت باشند.

به منظور حصول اطمینان از کیفیت و ایمنی فرآورده برای مصرف کنندگان، توصیه می‌شود که یک تجزیه و تحلیل ریسک میکروبیولوژیکی مناسب برای تعیین نوع فرآورده‌های بهداشتی، آرایشی که این استاندارد برای آن‌ها کاربرد دارد، انجام شود. فرآورده‌هایی که ریسک میکروبیولوژیکی کمی دارند (به استاندارد ملی ایران شماره ۱۳۵۵۷ مراجعه کنید) شامل فرآورده‌هایی با فعالیت آبی پایین^۱، فرآورده‌های آبی - الكلی^۲، فرآورده‌های دارای مقدار pH بالا، و غیره هستند.

روش شرح داده شده در این استاندارد بر اساس جستجوی اشریشیا کلی در محیط مایع غیر انتخابی (محیط کشت مایع غنی‌کننده) و متعاقب آن جداسازی در محیط جامد انتخابی است. سایر روش‌ها نیز ممکن است نسبت به سطح جستجو مورد نیاز، مناسب باشد.

یادآوری - برای جستجوی اشریشیا کلی، می‌توان روی محیط کشت غیر انتخابی، کشت مجدد داده شود و بعد از آن مراحل شناسایی مناسب (مانند کاربرد کیت‌های شناسایی) را انجام داد.

به دلیل اینکه دامنه کاربرد این استاندارد انواع زیادی از فرآورده‌های بهداشتی، آرایشی را در بر می‌گیرد، تمام جزئیات آن برای برخی از فرآورده‌ها (مانند بعضی فرآورده‌های غیر محلول در آب) مناسب نمی‌باشد. در این صورت استفاده از سایر استانداردها مانند استاندارد ملی ایران شماره ۹۶۰۸ می‌تواند مناسب باشد. به عنوان جایگزین این روش، می‌توان از سایر روش‌های مناسب (مانند روش‌های خودکار) نیز استفاده نمود.

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 می‌شوند.

در صورتی که به مرجعی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد، اصلاحیه‌ها و تجدیدنظرهای 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.

1 - Low water activity

2 - Hydro-alcoholic products

استفاده از مراجع زیر برای کاربرد این استاندارد الزامی است:

- ۱-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۸۶۶۳: میکروبیولوژی مواد غذایی، خوراک دام و آب - آماده سازی، ساخت، ذخیره سازی و آزمون عملکرد محیط‌های کشت
- ۲-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۹۶۰۸: میکروبیولوژی فرآورده‌های بهداشتی، آرایشی - جستجو و شناسایی میکروارگانیسم‌های مشخص و نامشخص
- ۳-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۱۰۵۰۵: ضدعفونی کننده‌ها و گندزداهای شیمیایی - نگهداری ارگانیسم‌های آزمون مورد استفاده در تعیین فعالیت باکتری‌کشی (از جمله لژیونلا)، مایکوباکتری‌کشی، اسپورکشی، قارچ‌کشی و ویروس‌کشی (از جمله باکتریوفاژ)
- ۴-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۱۱۰۶۸: میکروبیولوژی فرآورده‌های بهداشتی، آرایشی - راهنمای کلی برای آزمون‌های میکروبیولوژی
- ۵-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۱۳۵۷۷: میکروبیولوژی فرآورده‌های بهداشتی، آرایشی - ارزیابی ریسک و شناسایی فرآورده‌های کم ریسک از نظر میکروبیولوژی - راهنمای

۳ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد اصطلاحات و تعاریف زیر به کار می‌رود:

۱-۳

فرآورده

product

قسمتی از فرآورده بهداشتی، آرایشی مشخص، که آزمایشگاه برای آزمون آن را دریافت می‌کند.

۲-۳

نمونه

sample

قسمتی از فرآورده است (حداقل ۱ g یا ۱ ml) که برای آماده‌سازی سوسپانسیون اولیه استفاده می‌شود.

۳-۳

سوسپانسیون اولیه

initial suspension

سوسپانسیون یا محلولی از نمونه در حجم معینی از آبگوشت غنی‌کننده مناسب است.

۴-۳

رقت نمونه

sample dilution

رقتی از سوسپانسیون اولیه است.

۵-۳

میکروارگانیسم مشخص

specified microorganism

باکتری مزو菲尔ی هوازی یا مخمری است که وجود آن در فرآورده‌های بهداشتی، آرایشی به دلیل اینکه می‌توانند باعث عفونت پوست شده و برای سلامتی انسان مضر باشد، نامطلوب است و یا نشانگر عدم رعایت اصول بهداشتی در فرآیند ساخت می‌باشد.

۶-۳

اشریشیاکلی

Escherichia coli

باکتری‌های میله‌ای شکل، گرم منفی، متحرک با کلنی‌های صاف^۱ هستند.

یادآوری ۱- ویژگی‌های اصلی/اشریشیاکلی برای شناسائی، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی، تخمیر لاكتوز، تولید اندول و رشد روی محیط کشت انتخابی دارای نمک‌های صفرایی^۲ با کلنی‌های اختصاصی می‌باشد.

یادآوری ۲- اشریشیاکلی را می‌توان از منابع محیطی مرطوب (هوای آب و خاک) جدا کرد و نشانگر آلودگی مدفووعی است.

۷-۳

آبگوشت غنی‌کننده

enrichment broth

1- Smooth

2- Bile salts

محیط کشت مایع غیرانتخابی که دارای مواد خنثی کننده و/یا مواد پراکنده کننده مناسب می‌باشد و برای فرآورده مورد آزمون، مناسب بودن آن اثبات شده است.

۴ اصول آزمون

اولین مرحله روش، غنی‌سازی با استفاده از آبگوشت غیرانتخابی است. به این ترتیب، تعداد میکرووارگانیسم‌ها، بدون خطر ممانعت از رشد و تکثیر بوسیلهٔ ترکیبات انتخابی موجود در محیط کشت رشد انتخابی / افتراقی^۱ افزایش می‌یابد.

دومین مرحله آزمون (جداسازی / شریشیاکلی)، کشت روی محیط انتخابی و بعد از آن انجام آزمون‌ها برای شناسائی آن می‌باشد.

برای پیشگیری از احتمال ممانعت رشد میکروبی بوسیلهٔ نمونه و امکان‌پذیر شدن جستجوی میکرووارگانیسم‌های زنده، باید خنثی‌سازی^۲ انجام شود. در تمام موارد، لازم است خنثی‌سازی خصوصیات ضد میکروبی فراورده بررسی و اثبات شود (به بند ۱۱ مراجعه کنید).

۵ محلول‌های رقیق‌کننده و محیط‌های کشت

۱-۵ کلیات

دستورالعمل‌های کلی برای تهیه محلول‌های رقیق‌کننده و محیط‌های کشت در استاندارد ملی ایران شماره ۱۱۰۶۸ تعیین شده است. آب مورد استفاده در این استاندارد باید آب مقطر و یا آب خالص مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۱۱۰۶۸ باشد.

محیط کشت آبگوشت غنی‌کننده برای پراکنده سازی نمونه و افزایش جمعیت اولیه میکروبی به کار می‌رود. در صورتی که نمونه مورد آزمون خصوصیات ضد میکروبی داشته باشد، می‌توان از محیط کشت آبگوشت غنی‌کننده حاوی مواد خنثی‌کننده استفاده کرد. کارائی روش خنثی‌سازی باید اثبات شود (به بند ۱۱ مراجعه شود). اطلاعات مربوط به خنثی‌کننده‌های مناسب در پیوست ب ارائه شده است.

برای بررسی وجود / شریشیاکلی مطابق با این استاندارد، از آبگوشت غنی‌کننده (طبق زیر بند ۳-۳-۱)، یا هر یک از محیط‌های ارائه شده در پیوست الف، در صورت اثبات مناسب بودن آن‌ها با بند ۱۱ می‌توان استفاده نمود.

از سایر محلول‌های رقیق‌کننده و محیط‌های کشت در صورت اثبات مناسب بودن آن‌ها می‌توان استفاده نمود.

1- Differential
2- Neutralization

کنترل عملکرد محیط‌های کشت باید طبق استاندارد ملی ایران شماره ۸۶۶۳ انجام شود.

۲-۵ محلول‌های رقیق‌کننده برای سوسپانسیون باکتریایی (محلول تریپتون سدیم کلراید)

۱-۲-۵ کلیات

از این محلول رقیق‌کننده برای آماده سازی سوسپانسیون باکتریایی در روش اجرای اثبات مناسب بودن^۱ (طبق بند ۱۱) استفاده می‌شود.

مواد تشکیل دهنده

نام مواد	مقدار
تریپتون، هضم شده پانکراتیک کازئین ^۲	۱/۰ g
سدیم کلراید	۸/۵ g
آب	۱۰۰۰ ml
آماده سازی	

مواد فوق را با حرارت دادن در آب حل کنید. سپس آن را در ظروف مناسب تقسیم و در اتوکلاو با دمای ۱۲۱°C برای مدت ۱۵ min سترون کنید. پس از سترون‌سازی و سرد کردن محلول، pH را برابر 7.0 ± 0.2 در دمای آزمایشگاه تنظیم کنید.

۳-۵ محیط‌های کشت

۱-۳-۵ کلیات

محیط‌های کشت را با استفاده از روش‌های شرح داده شده در زیر آماده کنید. در صورت تهیهٔ محیط‌های کشت از بازار، آماده‌سازی آن را مطابق با دستورالعمل سازنده انجام دهید.

یادآوری - از محیط‌های کشت آماده مصرف^۳ می‌توان استفاده کرد، که در این صورت مواد تشکیل دهنده و نتیجهٔ رشد آن با باید فرمول داده شده در این استاندارد قابل مقایسه باشد.

۲-۳-۵ محیط کشت آگاردار برای «آزمون مناسب بودن» (به بند ۱۱ مراجعه شود)

۲-۳-۵-۱ محیط کشت سوی بین کازئین دایجست آگار (SCDA)^۴ یا تریپتیک سوی آگار (TSA)^۵

1- Suitability

2- Pancreatic digest of casein

3- Ready-to-use

4- Soybean-casein digest agar

5- Tryptic soy agar

مواد تشکیل دهنده

نام مواد	مقدار
هضم شده پانکراتیک کازئین	۱۵,۰ g
هضم شده پاپائیک سویا ^۱	۵,۰ g
سدیم کلراید	۵,۰ g
آگار	۱۵,۰ g
آب	۱۰۰۰ ml
آماده سازی	

مواد فوق را با حرارت دادن در آب حل کنید. پس از تقسیم محیط کشت در ظروف مناسب، آن را در اتوکلاو با دمای ۱۲۱°C به مدت ۱۵ min سترون کنید.

pH نهایی محیط کشت پس از سترون سازی باید برابر $۷,۳ \pm ۰,۲$ در دمای آزمایشگاه باشد.

۳-۳-۵ آبگوشت غنی‌کننده

۱-۳-۳-۵ محیط مایع اگون LT ۱۰۰^۲

۱-۱-۳-۳-۵ کلیات

این محیط کشت دارای ترکیباتی است که باعث خنثی شدن مواد ممانعت‌کننده موجود در نمونه می‌شود: لسیتین و پلی سوربات^۳ و ماده پراکنده‌کننده اکتوکسینول^۹

مواد تشکیل دهنده

نام مواد	مقدار
هضم شده پانکراتیک کازئین	۱۵,۰ g
هضم شده پاپائیک سویا	۵,۰ g
ال-سیستین	۰,۷ g
سدیم کلراید	۴,۰ g
سدیم سولفیت	۰,۲ g
گلوکز	۵,۵ g
لسیتین تخم مرغ	۱,۰ g
پلی سوربات ۸۰	۵,۰ g

1- Papaic digest of soybean meal^۱

2- Eugon LT 100 broth

3- Octoxynol 9

۱۰ g	اکتوکسی نول ۹
۱۰۰۰ ml	آب
	آماده سازی

پلی سوربات ۸۰، اکتوکسی نول ۹ و لسیتین تخم مرغ را در آب جوش تا حل شدن کامل حل کنید. سپس در حالیکه حرارت داده می شود، سایر مواد را در آب حل کنید. محیط کشت را پس از تقسیم در ظروف مناسب در اتوکلاو با دمای 121°C به مدت ۱۵ min سترون کنید.

پس از سترون سازی و سرد شدن محلول فوق، pH باید برابر 7.0 ± 0.2 در دمای آزمایشگاه باشد.

۲-۳-۳-۵ سایر آبگوشت های غنی کننده

سایر آبگوشت های غنی کننده در صورتی که مناسب باشند ممکن است استفاده شوند (طبق پیوست الف).

۴-۳-۵ محیط کشت آگار انتخابی برای جداسازی اشربیشیا کلی

۱-۴-۳-۵ محیط کشت مک کانکی آگار^۱

مواد تشکیل دهنده

نام مواد	مقدار
هضم شده پانکراتیک ژلاتین ^۲	۱۷۰ g
هضم شده پپتیک بافت حیوانی ^۳	۱.۵ g
هضم شده پانکراتیک کازئین	۱.۵ g
لاکتوز	۱۰۰ g
مخلوط نمک های صفرایی	۱.۵ g
سدیم کلرید	۵.۰ g
آگار	۱۳.۵ g
قرمز خنثی ^۴	۳۰.۰ mg
کریستال ویوله ^۵	۱.۰ mg

-
- 1- MacConkey agar medium
 - 2- Pancreatic digest of gelatin
 - 3- Peptic digest of animal tissue
 - 4- Neutral red
 - 5- Crystal violet

۱۰۰۰ mg

آب

آماده سازی

مواد فوق را در آب حل کنید و به مدت یک دقیقه بجوشانید تا کاملا حل شود. پس از تقسیم محیط کشت در ظروف مناسب در اتوکلاو با دمای 121°C به مدت ۱۵ min استروون کنید. pH نهائی محیط کشت پس از استروون سازی و سرد شدن باید برابر $7,1 \pm 0,2$ در دمای آزمایشگاه باشد.

۵-۳-۵ محیط کشت آگار انتخابی برای تأیید اشریشیاکلی

۵-۳-۵-۱ محیط کشت لوین ائوزین - متیلن بلو آگار^۱

مواد تشکیل دهنده

نام مواد	مقدار
هضم شده پانکراتیک ژلاتین	۱۰,۰ g
دی پتاسیم هیدروژن فسفات (K_2HPO_4)	۲,۰ g
آگار	۱۵,۰ g
لакتوز	۱۰,۰ g
ائوزین Y ^۲	۴۰,۰ mg
متیلن بلو ^۳	۶۵,۰ mg
آب	۱۰۰۰ ml

آماده سازی

هضم شده پانکراتیک ژلاتین، دی پتاسیم هیدروژن فسفات و آگار را با گرم کردن در آب حل کنید. بگذارید تا سرد شود. درست پیش از استفاده، محلول آگار ژله‌ای شده را به صورت مایع درآورید. سپس به ازای هر ۱۰۰ ml محلول آگار مایع شده بقیه مواد مانند محلول‌ها را در مقادیر تعیین شده به شرح زیر به آن اضافه کرده و مخلوط کنید:

- ۵ ml از محلول لакتوز ۲۰٪،

- ۲ ml از محلول ائوزین Y ۲٪،

- ۲ ml از محلول متیلن بلو ۰,۰۳۳٪

1- Levine eosin-methylene blue agar medium

2- Eosin Y

3- Methylene blue

محیط کشت نهایی ممکن است شفاف نباشد. پس از تقسیم محیط کشت در ظروف مناسب، آن را در اتوکلاو با دمای 121°C به مدت ۱۵ min سترون کنید. pH نهائی محیط کشت پس از سترون سازی و سردشدن باید برابر 7.1 ± 0.2 در دمای آزمایشگاه باشد.

۶ وسایل

از وسایل، تجهیزات آزمایشگاهی و وسایل شیشه‌ای مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۱۱۰۶۸ استفاده کنید.

۷ سویه‌های میکرووارگانیسم‌ها

برای تصدیق^۱ مناسب بودن شرایط آزمون از سویه‌های زیر استفاده کنید:
/شیریشیا کلی^۲ ATCC 8739^۳ یا سویه معادل آن: ۵۳.۱۲۶ CIP^۴ یا NCIMB ۸۵۴۵^۵ یا NBRC ۳۹۷۲^۶ یا KCTC ۲۵۷۱^۷ یا سایر سویه‌های معادل در کلکسیون میکروارگانیسم‌های ایران (PTCC).
کشت سویه‌ها باید مطابق با دستورالعمل تعیین شده توسط تامین‌کننده سویه‌های مرجع انجام شود.
نگهداری سویه‌ها در آزمایشگاه باید مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۱۰۵۰۵ باشد.

۸ نگهداری فرآورده‌های بهداشتی، آرایشی و نمونه‌های آزمایشگاهی

در صورت لزوم نمونه‌های مورد آزمون را در دمای آزمایشگاه نگهداری کنید. پیش یا پس از انجام آزمون از قرار دادن نمونه‌ها در گرمخانه، یخچال و فریزر خودداری کنید.

نمونه برداری از فرآورده‌های بهداشتی، آرایشی را مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۱۱۰۶۸ انجام دهید.
آزمون نمونه‌ها را مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۱۱۰۶۸ و این استاندارد انجام دهید.

۹ روش اجرای آزمون

۱-۹ توصیه‌های کلی

-
- 1- Verification
 - 2 - American Type Culture Collection
 - 3 - Collection Institut Pasteur
 - 4 - National Collection of Industrial and Marine Bacteria
 - 5 - National Biological Resource Center
 - 6- Korean Collection for Type Culture
 - 7- Persian Type Culture Collection

برای آماده‌سازی نمونه، سوسپانسیون اولیه و رقت‌ها از مواد، تجهیزات سترون و روش‌های آسپتیک استفاده کنید. برای آماده‌سازی سوسپانسیون اولیه در یک ماده محلول کننده مناسب، زمان بین پایان آماده‌سازی و تماس ماده تلقیحی با آبگوشت غنی‌کننده، باید بیشتر از ۴۵ min باشد، مگر آن‌که به طور خاص در روش آزمون تعیین شده باشد.

۲-۹ آماده‌سازی سوسپانسیون اولیه در آبگوشت غنی‌کننده

۱-۲-۹ کلیات

برای غنی‌سازی حداقل ۱ ml یا ۱ g فرآورده مورد آزمون که کاملاً مخلوط شده است را به حداقل ۹ ml آبگوشت غنی‌کننده بیفزایید.

وزن یا حجم دقیق نمونه را یادداشت کنید.

این روش برای حصول اطمینان از مناسب بودن ترکیب (مواد خنثی‌کننده که احتمالاً اضافه شده است) و حجم آبگوشت بکار رفته باید بررسی شود (به زیریند ۱۱-۳ مراجعه کنید).

یادآوری - در برخی از موارد و در صورت امکان، صاف کردن فرآورده‌های بهداشتی، آرایشی با استفاده از صافی غشایی و بعد از آن غوطه‌ورسازی صافی در آبگوشت غنی‌کننده سبب تسهیل در خنثی‌سازی خصوصیات ضدمیکروبی فرآورده می‌شود (به زیریند ۱۱-۳ مراجعه کنید).

۲-۹ فرآورده‌های محلول در آب^۱

نمونه ۵ از فرآورده را به ظرف دارای مقدار مناسب آبگوشت، منتقل کنید.

۳-۲-۹ فرآورده‌های غیرمحلول در آب^۲

نمونه ۵ از فرآورده را به ظرف مناسب دارای مقدار کافی از مواد محلول‌کننده مناسب (بطور مثال پلی سوربات ۸۰) منتقل کنید.

با استفاده از مواد محلول‌کننده، نمونه را پراکنده کنید و به آن مقدار مناسب آبگوشت بیفزایید.

۴-۲-۹ فرآورده‌های قابل صاف کردن

از صافی غشائی با قطر منافذ حداقل $45 \mu\text{m}$ استفاده کنید. نمونه ۵ را روی صافی غشایی در یک تجهیز فیلتراسیون (به استاندارد ملی ایران شماره ۱۱۰۶۸ مراجعه شود) منتقل کنید. بلافصله نمونه را صاف کنید و با استفاده از حجم معین آب و یا محلول رقیق‌کننده، صافی را شستشو دهید. سپس صافی را به ارلن یا لوله آزمایش با گنجایش مناسب که دارای مقدار کافی آبگوشت می‌باشد، منتقل و در آن غوطه‌ور کنید.

1- Water-miscible

2- Water-immiscible

۳-۹ گرمخانه‌گذاری آبگوشت غنی‌کننده تلقیح شده

سوسپانسیون اولیه آماده‌شده در آبگوشت غنی‌کننده (طبق زیربند ۲-۹) را در دمای $32.5^{\circ}\text{C} \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ به مدت زمان حداقل ۲۰ h و حداقل ۷۲ h گرمخانه‌گذاری کنید.

۴-۹ جستجو و شناسائی اشریشیاکلی

۱-۴-۹ جداسازی

برای بدست آوردن کلنی‌های منفرد، با استفاده از حلقه کشت سترون، از آبگوشت گرمخانه‌گذاری شده بردارید و به صورت خطی روی محیط کشت مک‌کانکی آگار (زیربند ۳-۵) کشت دهید. سپس پلیت‌ها را به صورت وارونه در دمای $32.5^{\circ}\text{C} \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ به مدت زمان حداقل ۲۴ h و حداقل ۴۸ h گرمخانه‌گذاری کنید.

برای بررسی ویژگی‌های کلنی اشریشیاکلی به جدول ۱ مراجعه شود.

جدول ۱- ویژگی‌های ظاهری اشریشیاکلی روی محیط کشت مک‌کانکی آگار

محیط انتخابی جامد	ویژگی‌های کلنی اشریشیاکلی
محیط کشت مک‌کانکی آگار	قرمز تیره، که ممکن است با هاله‌ای ناشی از رسوب نمک‌های صفراء احاطه شده باشد

۲-۴-۹ شناسائی اشریشیاکلی

۱-۲-۴-۹ کلیات

برای کلنی‌های مشکوک جدا شده از محیط کشت مک‌کانکی آگار، آزمون‌های تأثیدی را طبق زیربندهای ۲-۲-۴-۹ و ۳-۲-۴-۹ انجام دهید. وجود اشریشیاکلی را می‌توان با آزمون‌های بیوشیمیائی و سایر کشت‌های مناسب تأیید کرد.

۲-۲-۴-۹ رنگ آمیزی گرم^۱

به منظور انجام رنگ آمیزی گرم مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۱۱۰۶۸ عمل نمایید.

وجود باکتری‌های میله‌ای شکل (باسیل) گرم منفی را بررسی کنید.

۳-۲-۴-۹ کشت روی محیط لوین اوزین- متیلن بلو آگار (محیط کشت EMB آگار)

۱- Gram staining

از کلنی‌های مجرزا و مشکوک رشد یافته روی محیط کشت مک‌کانکی آگار به گونه‌ای روی محیط کشت لوین ائوزین-متیلن بلو آگار تلقیح کنید بطوری که کلنی‌های مجرزا ایجاد شود. سپس پلیت‌ها را به صورت وارونه در دمای $32.5^{\circ}\text{C} \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ به مدت زمان حداقل ۲۴ h و حداقل ۴۸ h گرماخانه‌گذاری کنید.

برای بررسی ویژگی‌های کلنی/شریشیاکلی روی محیط کشت لوین ائوزین-متیلن بلو آگار به جدول ۲ مراجعه شود.

جدول ۲- ویژگی‌های ظاهری/شریشیاکلی روی محیط کشت لوین ائوزین - متیلن بلو آگار

محیط آگار انتخابی	ویژگی‌های کلنی/شریشیاکلی
محیط کشت لوین ائوزین-متیلن بلو آگار	جلای فلزی زیر نور بازتابی ^۱ و ظاهر آبی - سیاه زیر نور عبوری ^۲

۱۰ بیان نتایج (جستجوی/شریشیاکلی)

چنانچه شناسائی کلنی‌ها، وجود این گونه را تأیید کند، نتایج را به صورت «وجود/شریشیاکلی در نمونه ۵» بیان کنید.

چنانچه پس از غنی سازی رشدی مشاهده نشود و / یا شناسائی کلنی‌ها وجود این گونه را تأیید نکند، نتایج را به صورت «عدم وجود/شریشیاکلی در نمونه ۵» بیان کنید.

۱۱ خنثی‌سازی خواص ضدمیکروبی فرآورده

۱-۱۱ کلیات

آزمون‌های مختلف شرح داده شده در زیربندهای ۱۱-۲ و ۱۱-۳ نشان می‌دهد که این میکرووارگانیسم می‌تواند تحت شرایط خاص آزمون رشد کند.

۲-۱۱ آماده‌سازی مایه تلقیح

پیش از انجام آزمون سطح محیط کشت جامد غیرانتخابی سوی بین کارزین دایجست آگار (SCDA) یا تریپتیک سوی آگار (TSA) یا هر محیط مناسب (غیرانتخابی، غیرخنثی‌کننده) را با/شریشیاکلی تلقیح کنید.

پلیت‌ها را به مدت زمان 18 h تا 24 h در دمای $32.5^{\circ}\text{C} \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ گرماخانه‌گذاری کنید.

1- Reflected light

2-Transmitted light

با استفاده از لوب سترون باکتری‌ها را از سطح محیط کشت بردارید و با استفاده از رقیق کننده سوسپانسیون باکتری در حدود 1×10^8 cfu/ml (به طور مثال با استفاده از اسپکتروفوتومتر، مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۱۱۰۶۸) تهیه نمایید. از سوسپانسیون تنظیم شده فوق و رقت‌های آن در مدت ۲ h ساعت استفاده کنید.

۳-۱۱ مناسب بودن روش جستجو

۱-۳-۱۱ روش آزمون

۱-۱-۳-۱۱ به منظور به دست آوردن شمارش نهایی بین ۱۰۰ cfu/ml و ۵۰۰ cfu/ml، رقت‌های سوسپانسیون تنظیم شده را در لوله‌های حاوی ۹ ml رقیق کننده آماده کنید. برای شمارش میکروارگانیسم‌های زنده در غلظت نهایی سوسپانسیون تنظیم شده، ۱ ml از سوسپانسیون را به پتری دیش منتقل کنید. سپس مقدار ۱۵ ml تا ۲۰ ml از محیط کشت جامد ذوب شده (طبق زیربند ۳-۵) که در حمام آب با دمای حداقل 48°C نگهداری شده است را به آن بیفزایید. پس از جامد شدن محیط، پلیت را در دمای آب با دمای حداکثر 48°C نگهداری شده است را به آن بیفزایید. پس از جامد شدن محیط، گرمخانه‌گذاری کنید.

۲-۱-۳-۱۱ تحت شرایط انتخاب شده برای آزمون (حداقل ۱ g یا ۱ ml از فرآورده تحت شرایط آزمون در حجم معین آبگوشت غنی کننده)، سوسپانسیون اولیه (طبق زیربند ۲-۹) را به صورت دوتایی در لوله آزمایش یا ارلن تهیه کنید. چنانچه از روش صافی غشایی استفاده می‌کنید، حداقل ۱ ml از فرآورده را (به صورت دوتایی) صاف کنید و هر صافی را به یک لوله آزمایش یا ارلن حاوی آبگوشت غنی کننده در شرایط انتخاب شده برای آزمون منتقل کنید.

۳-۱-۳-۱۱ با رعایت شرایط آسپتیک مقدار ۱ ml از سوسپانسیون تنظیم شده رقیق شده (طبق زیربند ۱-۱-۳-۱۱) میکروارگانیسم‌ها را به یک لوله یا ارلن منتقل کنید «آزمون مناسب بودن». پس از مخلوط کردن، هر دو لوله یا ارلن («آزمون مناسب بودن» و شاهد تلقیح نشده) را در دمای $32.5^\circ\text{C} \pm 2.5^\circ\text{C}$ به مدت زمان ۲۰ h تا ۲۴ h گرمخانه‌گذاری کنید.

۴-۱-۳-۱۱ برای هر لوله یا ارلن («آزمون مناسب بودن» و شاهد تلقیح نشده) جداسازی را انجام دهید. تحت شرایط یکسان آزمون، با استفاده از یک لوب سترون، مقداری از مخلوط گرمخانه‌گذاری شده را به سطح پتری دیش (با قطر ۸۵ mm تا ۱۰۰ mm) حاوی حدود ۱۵ ml تا ۲۰ ml از محیط کشت مک‌کانکی آگار به صورت خطی کشت دهید. پلیت‌ها را در دمای $32.5^\circ\text{C} \pm 2.5^\circ\text{C}$ به مدت ۲۴ h تا ۴۸ h گرمخانه‌گذاری کنید.

۲-۳-۱۱ تفسیر نتایج «آزمون مناسب بودن»

از رقت نهائی سوسپانسیون تنظیم شده باکتری که دارای تعداد باکتری بین ۱۰۰ CFU/ml تا ۵۰۰ CFU/ml است، اطمینان حاصل کنید.

چنانچه در پلیت‌های «آزمون مناسب بودن»، /شريشياكلى رشد کند و در پلیت‌های شاهد رشد مشاهده نشود، مناسب بودن روش خنثی‌سازی تصدیق، روش جستجو و شناسایی قابل قبول می باشد.

چنانچه در پلیت‌های شاهد رشد مشاهده شود (فراورده آلووده)، در صورتی روش خنثی‌سازی تصدیق شده و روش جستجو و شناسایی قابل قبول می باشد که /شريشياكلى از پلیت‌های «آزمون مناسب بودن» بازیافت شود.

عدم رشد روی پلیت‌های «آزمون مناسب بودن» نشان دهنده این است که فعالیت ضد میکروبی هنوز وجود دارد و تغییر شرایط آزمون بوسیله افزایش حجم آبگوشت غنی‌کننده با مقدار ثابت فراورده، یا افزودن مقدار کافی ماده خنثی کننده در آبگوشت غنی‌کننده، یا با ترکیب مناسبی از این تغییرات به گونه‌ای که اجازه رشد به /شريشياكلى بدهد، لازم است.

چنانچه علیرغم افزودن مقدار کافی ماده خنثی‌کننده و افزایش قابل توجه در حجم آبگوشت غنی‌کننده، همچنان امکان بازیافت کشت‌های زنده به شرح فوق وجود نداشت، نشان دهنده این است که احتمالاً فراورده با /شريشياكلى آلووده نشده است.

۱۲ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید دارای آگاهی‌های زیر باشد:

- ۱-۱۲ نتایج آزمون بر اساس استاندارد ملی ایران؛
- ۲-۱۲ کلیه اطلاعات لازم برای شناسائی کامل فرآورده؛
- ۳-۱۲ روش آزمون مورد استفاده؛
- ۴-۱۲ تاریخ انجام آزمون؛
- ۵-۱۲ نتایج بدست آمده؛
- ۶-۱۲ تمام جزئیات کار برای تهیه سوسپانسیون اولیه؛
- ۷-۱۲ شرح روش خنثی‌سازی و محیط‌های کشت استفاده شده؛
- ۸-۱۲ اثبات مناسب بودن روش، حتی اگر آزمون به صورت جداگانه انجام شده است؛
- ۹-۱۲ هر نکته‌ایی که در این استاندارد مشخص نشده و یا اختیاری در نظر گرفته شده است و جزئیات هر رویدادی که ممکن است روی نتایج آزمون تاثیرگذار باشد؛
- ۱۰-۱۲ نام، نام خانوادگی و امضای آزمون کننده.

پیوست الف

(آگاهی دهنده)

سایر آبگوشت‌های غنی‌کننده

الف-۱ محیط کشت مایع لاکتوز با مواد خنثی‌کننده و پراکنده‌کننده^۱

این محیط کشت دارای ترکیباتی است که باعث خنثی‌شدن مواد ممانعت‌کننده موجود در نمونه می‌شود: لسیتین و پلی سوربات ۸۰ و عامل پراکنده کننده اکتوکسی نول ۹.

مواد تشکیل دهنده

نام مواد	مقدار
عصارة گوشت گوساله ^۲	۳/۰ g.
هضم شده پانکراتیک ژلاتین	۵/۰ g.
لاکتوز	۵/۰ g.
لسیتین تخم مرغ	۱/۰ g.
پلی سوربات ۸۰	۵/۰ g.
اکتوکسی نول ۹	۱/۰ g.
آب	۱۰۰۰ ml.
آماده سازی	

پلی سوربات ۸۰، اکتوکسی نول ۹ و لسیتین تخم مرغ را در آب جوش به طور کامل حل کنید. سپس در حالی که محلول فوق حرارت داده می‌شود، سایر مواد را در آب حل کنید. محیط کشت را پس از تقسیم در ظروف مناسب در اتوکلاو با دمای ۱۲۱°C به مدت ۱۵ min سترون کنید.

پس از سترون سازی و سردشدن محیط فوق، pH باید برابر $۶/۹ \pm ۰/۲$ در دمای آزمایشگاه باشد.

الف-۲ محیط کشت مایع لاکتوز^۳

مواد تشکیل دهنده

نام مواد	مقدار
عصارة گوشت گوساله	۳/۰ g.
هضم شده پانکراتیک ژلاتین	۵/۰ g.

1- Fluid lactose medium with neutralizing and dispersing agents
2- Beef extract
3- Fluid lactose medium

۵/۰ g.	لاکتوز
۱۰۰۰ ml.	آب
	آماده‌سازی

مواد فوق را در آب حل کنید. پس از تقسیم محیط کشت در ظروف مناسب آن را در اتوکلاو با دمای 121°C به مدت ۱۵ min سترون کنید.

پس از سترون‌سازی محیط کشت آن را تا حد ممکن، سریع سرد کنید. pH محیط کشت فوق را برابر 6.9 ± 0.2 در دمای آزمایشگاه تنظیم کنید.

الف-۳ محیط کشت سوی بین-کازئین-دایجست-لسيتین-پلی سوربات ۸۰ (آبگوشت ۸۰^۱ (SCDLP 80

مواد تشکیل دهنده

نام مواد	مقدار
پپتون کازئین	۱۷/۰ g
پپتون لوبیای سویا	۳/۰ g
سدیم کلراید	۵/۰ g
دی پتاسیم هیدروژن فسفات	۲/۵ g
گلوکز	۲/۵ g
لسيتین	۱/۰ g
پلی سوربات ۸۰	۷/۰ g
آب	۱۰۰۰ ml
آماده‌سازی	

مواد فوق را یکی پس از دیگری در آب جوش به طور کامل حل کنید. پس از تقسیم محیط کشت در ظروف مناسب آن را در اتوکلاو با دمای 121°C به مدت ۱۵ min سترون کنید.

پس از سترون‌سازی و سرد کردن محیط کشت، pH را برابر 7.2 ± 0.2 در دمای آزمایشگاه تنظیم کنید.

الف-۴ آبگوشت خنثی کننده D/E^۱

مواد تشکیل دهنده

نام مواد	مقدار
گلوکز	۱۰/۰ g
لسيتین لوبیای سویا	۷/۰ g

1- Soybean-casein-digest-lecithin-polysorbate 80 medium
2- Dey/Engley neutralizing broth

۶۰ g	سدیم تیوسولفات با ۵ مولکول آب ^۱
۵۰ g	پلی سوربات ۸۰
۵۰ g	هضم شده پانکراتیک کازئین
۲۵ g	سدیم بی‌سولفیت ^۲
۲۵ g	عصاره مخمر
۱۰ g	سدیم تیوگلیکولات ^۳
۰.۰۲ g	بروموکروزول ارغوانی ^۴
۱۰۰۰ ml	آب
	آماده‌سازی

مواد فوق را یکی پس از دیگری در آب جوش به طور کامل حل کنید. پس از تقسیم محیط کشت در ظروف مناسب آن را در اتوکلاو با دمای ۱۲۱°C به مدت ۱۵ min سترون کنید.

پس از سترون‌سازی و سرد کردن محیط کشت، pH را برابر 7.6 ± 0.2 در دمای آزمایشگاه تنظیم کنید.

الف-۵ آبگوشت لتین اصلاح شده^۵

مواد تشکیل دهنده

نام مواد	مقدار
هضم شده پیتیک گوشت	۲۰۰ g
هضم شده پانکراتیک کازئین	۵۰ g
عصاره گوشت گوساله	۵۰ g
عصاره مخمر	۲۰ g
لستیین	۰.۷ g
پلی سوربات ۸۰	۵۰ g
سدیم کلراید	۵۰ g
سدیم بی‌سولفیت	۰.۱ g
آب	۱۰۰۰ ml
آماده سازی	

به ترتیب پلی سوربات ۸۰ و لستیین را در آب جوش، به طور کامل حل کنید. سپس در حالی که محلول فوق حرارت داده می‌شود، سایر مواد را به آن اضافه کنید. مخلوط کردن محیط کشت را به آرامی انجام دهید تا

1- Sodium thiosulfate pentahydrate

2- Sodium bisulfite

3- Sodium thioglycollate

4- Bromocresol purple

5- Modified letheen broth

کف نکند. پس از تقسیم محیط کشت در ظروف مناسب آن را در اتوکلاو با دمای 121°C به مدت ۱۵ min سترون کنید.

پس از سترون سازی و سرد کردن محیط کشت، pH را برابر 7.2 ± 0.2 در دمای آزمایشگاه تنظیم کنید.

پیوست ب

(آگاهی دهنده)

جدول ب ۱- خنثی کننده های فعالیت ضد میکروبی مواد نگهدارنده^۱ و مایعات آبکشی^۲

مواد نگهدارنده	ترکیبات شیمیائی خنثی کننده مواد نگهدارنده	مثال هایی از مواد خنثی کننده و مایعات آبکشی مناسب (برای روش صافی غشائی)
ترکیبات فنلی: - پارابن ها، فنوکسی اتانول، فنیل اتانول وغیره. آنیلیدها	لیستین پلی سوربات ۸۰ g/l + لیستین ، ۳۰ g/l + لیستین ، ۷ g/l + لیستین ، ۲۰ g/l + پلی اتیلن اکساید متراکم شده حاصل از الكل چرب ، ۴ g/l . محیط کشت مایع خنثی کننده ^a D/E مایعات آبکشی : آب مقطر، تریپتون ، ۱ g/l + کلریدسدیم ، ۹ g/l . پلی سوربات ۸۰ g/l .	پلی سوربات ۸۰ g/l + ۳۰ g/l + لیستین ، ۷ g/l + لیستین ، ۲۰ g/l + پلی اتیلن اکساید متراکم شده حاصل از الكل چرب ، سرفکتانت های غیریونی
ترکیبات چهارتائی آمونیوم، سورفکتانت های کاتیونی آلدئید ها، عوامل آزاد کننده فرمالدئید	لیستین، ساپونین، پلی سوربات ۸۰ g/l . دوسدیل سولفات، اتیلن اکساید متراکم شده حاصل از الكل چرب	پلی سوربات ۸۰ g/l + ۳۰ g/l + ساپونین ، ۳۰ g/l + لیستین . محیط کشت مایع خنثی کننده ^a D/E مایعات آبکشی : آب مقطر ، تریپتون، ۱ g/l + کلریدسدیم ، ۹ g/l . پلی سوربات ۸۰ g/l .
گلیسین، هیستیدین	لیستین ، ۳ g/l + پلی سوربات ، ۸۰ g/l ، ۳۰ g/l + ال هیستیدین ، ۱ g/l . ال سیستین ، ۱ g/l . محیط کشت مایع خنثی کننده ^a D/E مایعات آبکشی : پلی سوربات ، ۸۰ g/l + ۳ g/l + ال هیستیدین ، ۰.۵ g/l .	پلی سوربات ، ۸۰ g/l ، ۳۰ g/l + ساپونین ، ۳۰ g/l + لیستین ، ۱ g/l + ال هیستیدین ، ۱ g/l . ال سیستین ، ۱ g/l .
ترکیبات اکسید کننده	سدیم تیوسولفات	مایعات آبکشی: سدیم تیوسولفات ، ۰.۳ g/l .
ایزووتیازولینون ها، ایمیدازول ها	لیستین، ساپونین، آمین ها، سولفات ها، مرکاپتان ها، سدیم بی سولفات، سدیم تیوگلیکولات	پلی سوربات ، ۸۰ g/l + ۳۰ g/l + ساپونین ، ۳۰ g/l + لیستین ، ۱ g/l . مایعات آبکشی : تریپتون ، ۱ g/l + کلریدسدیم ، ۹ g/l . پلی سوربات ، ۸۰ g/l .
گوانیدهای دوتائی	لیستین ، ساپونین، پلی سوربات ۸۰	پلی سوربات ، ۸۰ g/l + ۳۰ g/l + ساپونین ، ۳۰ g/l + لیستین ، ۱ g/l . مایعات آبکشی : تریپتون ، ۱ g/l + کلریدسدیم ، ۹ g/l . پلی سوربات ، ۸۰ g/l .
نمک های متالیک (Cu,Zn,Hg) ترکیبات آلی جیوه	سدیم بی سولفات، ال-سیستئین ترکیبات سولفیدریل، تیوگلیکولیک اسید	سدیم تیوگلیکولات ، ۰.۵ g/l . ال سیستین ، ۰.۸ g/l یا ۱ g/l . محیط کشت مایع خنثی کننده ^a D/E مایعات آبکشی: سدیم تیوگلیکولات ۰.۵ g/l .

- به پیوست الف مراجعه شود.

1- Preservation
2- Rising liquid

كتابنامه

- [۱] استاندارد ملی ایران شماره ۹۴۸۵: ضد عفونی کننده‌ها و گندزداهای شیمیایی - آزمون سوسپانسیون کمی برای ارزیابی فعالیت پایه باکتری‌کشی - روش آزمون و الزامات
- [۲] استاندارد ملی ایران شماره ۹۶۰۸: میکروبیولوژی فرآورده‌های بهداشتی، آرایشی - جستجو و شناسائی میکروارگانیسم‌های مشخص و نامشخص
- [۳] استاندارد ملی ایران شماره ۱۱۸۰۴: میکروبیولوژی فرآورده‌های بهداشتی، آرایشی - جستجو و شناسایی باکتریهای مزو菲尔 هوازی
- [۴] استاندارد ملی ایران شماره ۱۳۵۵۷: میکروبیولوژی فرآورده‌های بهداشتی، آرایشی - ارزیابی ریسک و شناسایی فرآورده‌های کم ریسک از نظر میکروبیولوژی - راهنمای
- [5] COLIPA. Guidelines on Microbial Quality Management, published by the European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association, 1997
- [6] CTFA. Microbiology Guidelines, published by the Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association ISBN 1-882621-32-8, 2007
- [7] E P.. Microbiological Examination of non-sterile products, 4th edition, published by the European Pharmacopoeia, 2002
- [8] FDA. Bacteriological Analytical Manual, 8th edition, published by the U.S. Food and Drug Administration, 1995, <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-23.html>
- [9] JP 14, General Tests — Microbial Limit test, published by the Japanese Pharmacopoeia, 2001
- [10] USP 28, Microbial Limit test (61), published by the U.S. Pharmacopoeia, 2005
- [11] Atlas R.M. Handbook of Microbiological Media. CRC Press, 1993
- [12] Singer S. The Use of Preservative Neutralizers in Diluents and Plating Media. Cosmetics and Toiletries. 1987 December, 102 p. 55