



مهندسی آب و فاضلاب

www.abfaeng.ir

جلوتر از دیگران حرکت کنید

اطلاعات آموزشی

اطلاعات فنی و مهندسی

اخبار روز آب و فاضلاب

اخبار استخدامی کارفرمایان



[T.me/mohandesifazelab](https://t.me/mohandesifazelab)



[Instagram.com/abfaeng](https://www.instagram.com/abfaeng)



شرکت مهندسی آب و فاضلاب کشور

معاونت نظارت بر بهره برداری

دفتر نظارت بر بهداشت آب و فاضلاب

دستورعمل روش های کنترل کیفیت آزمون های میکروبیولوژیکی آب

قسمت اول

ویراست نخست- خرداد ماه ۱۳۹۴

اعضای تدوین دستورعمل روش های کنترل کیفیت آزمون های میکروبیولوژیکی آب

رئیس:

سمت و/یا نمایندگی

فرهاد پور، ژاله

کارشناس کنترل کیفیت

شرکت مهندسی آبفای کشور

دبیر:

باغبان ، مهتاب

رئیس گروه کنترل کیفیت

و بهداشت آب استان تهران

اعضاء

مهرنوش امیر مظاهری

کارشناس نظارت بر بهداشت

و کیفیت آب استان تهران

مرتضی برغمندی

ناظر عالی آزمایشگاه های

شرکت آبفای خراسان رضوی

سمیه پارسا نیا

کارشناس میکروبیولوژی

شرکت آبفا آذربایجان غربی

نوشین سهراب نیا

کارشناس مسئول امور

آزمایشگاه مرجع

زهره ضرغامپور

رئیس قسمت کنترل کیفیت و

فرآیند تصفیه خانه های آب و فاضلاب

علی عبدالعظیمی

کارشناس مسئول کنترل کیفیت و

بهداشت آب شرکت آبفای منطقه ۳ شهر تهران

ابوذر غفاری	رییس اداره کنترل کیفی و امور آزمایشگاه های آبفای استان فارس
محبوبه کلاته	مدیر آزمایشگاه مرکزی شرکت آبفای خراسان رضوی
ناصر محبی	کارشناس بیولوژی شرکت آبفا شهرها و شهرکهای غرب
مهیار مستقیم	مدیر کنترل کیفیت و بهداشت آب و فاضلاب استان البرز
سهیل معتبر	کارشناس مسئول معاونت نظارت بر بهره برداری استان تهران
ماریا نقیب	کارشناس مسئول میکروبیولوژی شرکت آبفا اهواز

شایان ذکر است ضمن تشکر ویژه از زحمات جناب آقای مهندس عبدالعظیمی و جناب آقای مهندس برغمندی عهده دار مکاتبات این دستور عمل سرکار خانم مهندس نوشین سهراب نیا (nsohrabnia@hotmail.com) می باشند.

مقدمه :

این دستورعمل ترجمه قسمت های ۹۰۱۰ الی ۹۰۲۰C می باشد. با توجه به الزامات استاندارد ISO ۱۷۰۲۵ مبنی بر انجام آزمون ها بر اساس استانداردهای تایید شده، و الزام استقرار این استاندارد در کلیه آزمایشگاه های آب و فاضلاب کشور، مقرر گردید جهت یکپارچه سازی روش های آزمون در کلیه آزمایشگاه ها، نسبت به یکسان سازی دستورعمل آزمایشگاهی اقدام به عمل آید. بنابراین در گروه های کاری مختلف ترجمه قسمت های استاندارد متد در دستور کار قرار گرفت.

قسمت اعظم این بخش از استاندارد متد ۲۰۱۲ به کنترل کیفی آزمون ها و چگونگی انجام آن می پردازد که اهمیت ویژه ای در فرایند انجام آزمایش، کنترل تجهیزات، مواد و محیط های کشت داشته و همچنین در فراهم نمودن الزامات استاندارد ISO ۱۷۰۲۵ نقش بسزایی دارد. تمام تلاش همکاران این کار گروه در این راستا متمرکز است تا این دستورعمل مورد استفاده کلیه همکاران قرار بگیرد. تمامی بخش ها، شماره ها و قسمت بندی ها عیناً، بر اساس کتاب استاندارد متد تنظیم گردیده است تا همکاران محترم در یافتن مطالب و مطابقت دادن با متن اصلی با حداقل مشکلات مواجه شوند.

۹۰۱۰مقدمه

بخش هایی که در ادامه خواهد آمد روش هایی را برای ارزیابی آزمون های میکروبی بر روی نمونه های آب تشریح می نمایند. این روش ها ابتدا برای آزمونهای تشخیص سریع نمونه های آب به کار گرفته می شدند و بنابراین آزمایش کننده گان اغلب برای آزمون های روتین^۱ از آن بهره می بردند. به هر حال این روش ها برای هر دو نوع کاربرد پایش و مطالعات تحقیقاتی محدود در حوزه آب شرب، فاضلاب و آبهای دریایی مناسب هستند. این روش ها به وسیله آزمایشگاه های زیادی مورد استفاده قرار گرفته اند و از بهترین تکنیک های موجود برخوردار هستند. اما برای تاثیر بهتر بایستی محدودیت های آنها را دانست و از تجارب کنترل کیفیت بطور اصولی استفاده

^۱ روزمره

شود. از سویی کلیه ی تکنیک های موجود باید برای تعیین مشخصات، توسعه جزییات، روش ها و امکان بکار گیری آنها در آزمایشات مورد بررسی قرار گیرد.

به یاد داشته باشید که آزمون های باکتریایی روتین نمی تواند تصویر کاملی از خصوصیات کیفی آب ارائه نماید زیرا بررسی نتایج باکتریایی آب همواره تحت تاثیر چگونگی شرایط بهداشتی داخل و اطراف منبع نمونه برداری می باشد. ارزیابی کنترل کیفی صرفاً به نتایج آزمون بدست آمده از یک نمونه با منبع مشخص بسنده نمی کند و در صورت امکان، ارزیابی کیفی باید بر اساس نتایج آزمون به عمل آمده بر روی چندین نمونه در بازه های زمانی معین نمونه برداری، صورت گیرد.

همچنین تجربه نشان داده که در نمونه هایی که در یخ نگه داری نشده اند، امکان وقوع تغییرات قابل توجهی در شمارش باکتریها وجود خواهد داشت (حتی اگر زمان نقل و انتقال به آزمایشگاه کوتاه باشد) بنابراین نمونه ها در حین حمل به آزمایشگاه حتماً بایستی در یخ نگه داری شوند به ویژه وقتی که درجه حرارت هوا بیشتر از ۱۳ درجه سانتیگراد باشد لازم است حداقل فاصله زمانی ممکن بین نمونه برداری و انجام آزمایش مورد توجه قرار گیرد.

یکی از اصلی ترین شاخص های کیفی آب برای مصرف خانگی، صنعتی و سایر مصارف استفاده از باکتری های گروه کلیفرم^۲ است. تجربه اهمیت تراکم باکتری های کلیفرم بخصوص کلیفرم های گرمایی^۳ یا/شرشیا کلی^۴ (قبلاً کلیفرم های مدفوعی نامیده می شدند) را به عنوان معیار کیفی آب نشان داده است و ضمناً واکنش های محیط کشت و خصوصیات آنها به طور گسترده ای مورد مطالعه قرار گرفته است.

آزمون هایی برای تشخیص و شمارش ارگانیزم های شاخص و بیماریزا وجود دارند، که برای کلیفرم ها شامل دو آزمون: روش ممبران فیلتر^۵ و آزمون تخمیر چند لوله ای می باشد .

^۲ Coliform

^۳Thermotolerant Coliforms

^۴ Escherchia coli

^۵ Membrane Filter

روش ممبران فیلتر روشی است که در آن از پلیت^۶ برای تشخیص و تخمین دانسیته کلیفرم ها استفاده میشود. با انجام پاره ای اصلاحات به عمل آمده بر روی محیط کشت نتایج این روش می تواند با نتایج روش تخمیر چند لوله ای قابل مقایسه باشد. هرچند که روش ممبران فیلتر دارای محدودیت های کاربردی است ولی اگر به طور مناسب مورد استفاده قرار گیرد نتایج یکسانی در بر خواهد داشت. از طرف دیگر این روش می تواند برای ارزیابی کیفی آب و ارزیابی فرایند تصفیه آب مورد استفاده قرار گیرد. تراکم کلیفرم ها به صورت شاخص محتمل ترین تعداد یا همان عدد MPN^۷ در ۱۰۰ میلی لیتر گزارش می شود و بصورت متداول نتایج روش تخمیر چند لوله ای بصورت MPN گزارش می شود، البته گزارش آزمایش MPN نتیجه یک شمارش واقعی نیست اما معیار نسبی از تعداد باکتری های کلیفرم را می باشد. در مقابل روش ممبران فیلتر و یا سایر روشهای وابسته به پلیت، به آزمایشگر توانایی شمارش تعداد واقعی کلنی های کلیفرمی را می دهد. در بسیاری از موارد نیاز نیست تا تمام نمونه ها مورد ارزیابی کمی برای باکتری های کلیفرمی قرار گیرند از این در این موارد، آزمونهای کیفی حضور- عدم حضور^۸ کافی می باشد. ضمناً آلودگی های عوامل بیماریزا بوسیله /ستریپتوکوک^۹ و /نتروکوک مدفوعی^{۱۰} میتوانند تشخیص داده شوند. روش تشخیص و شمارش آنها عبارت از روش های چند لوله ای همراه با رقت و ممبران فیلتر است. برای تشخیص افتراقی کلیفرم ها از یکدیگر روش هایی وجود دارد. به طور کلی تشخیص افتراقی جنس های گروه کلیفرم از هم از کارامدی کمی در ارزیابی کیفیت آب آشامیدنی برخوردار است زیرا حضور هریک از انواع باکتری های کلیفرم به ویژه کلیفرم های گرمای پای یا/شرشیا کلی به تنهایی باعث نا مطلوب شدن و نا ایمنی آب می گردد. با این وجود، تشخیص افتراقی اعتبار وجود کلیفرم را تایید می کند و می تواند به نوعی نشان دهد که چگونه شبکه توزیع درگیر تکثیر میکروبی گردیده است. افتراق همچنین اطلاعات ارزشمندی درباره منشا احتمالی آلودگی آب، به خصوص نقاط دوردست ارائه می دهد. زیرا انتظار می رود کلیفرم های غیر مدفوعی طول عمر بیشتری نسبت به کلیفرم های گرمای پای در آب داشته باشند .

^۶ Plate

^۷ MPN(Most Probable Number)

^۸ Presence-Absence

^۹ Streptococci

^{۱۰} Enterococci

روش ها برای کلیفرم های گرمای و/اشرشیا کلی مشتمل بر تست چند لوله ای ۲۴ ساعته با استفاده از محیط کشت A-۱، یک روش سریع ۷ ساعته و تستهای رنگ آمیزی کلیفرم می باشند. تستهای ژنتیکی هم قابل استفاده می باشند. بر خلاف کلیفرم های دیگر اینها در دل و جگر و مدفوع حیوانات خون گرم پیدا می شوند. به طور کلی شامل میکرو ارگانیزم هایی با قابلیت ایجاد گاز و (یا) اسید از لاکتوز، در محیط کشت مناسب در دمای ۴۴,۵ ± ۰,۲ درجه سانتیگراد می باشند. روش های چند لوله ای و ممبران فیلتر در تست های تأییدی در دمای ۴۴,۵ درجه سانتیگراد اینکوبه^{۱۱} می شوند، تا آزمایش کننده بتواند تراکم ارگانیزم های گرمای را تخمین بزند.

شمارش بشقابی هترو تروف ها^{۱۲} بوسیله روش های کشت بشقابی[□]، کشت سطحی[□]، ممبران فیلتر یا روش های لایه چند دیواره آنزیمی ممبران فیلتر یا روش چاهک های واجد سوسترای آنزیمی^{۱۵} انجام می شود. این روشها تقریب و تخمینی از باکتری های که می توانند ایجاد اطلاعات مفیدی در باره کیفیت آب و تحلیل نتایج تست کلیفرم را ارائه کنند، فراهم می نمایند.

آنها همچنین می توانند برای قضاوت درباره تاثیر روش های مختلف تصفیه مورد استفاده قرار گیرند. کاربرد آنها در تست های کنترلی تصفیه خانه ها و چک کردن کیفیت آب در آزمایشگاه های آب یا شبکه های توزیع می باشد. (از طریق شناسایی کلنیزاسیون^{۱۶} میکروبی و ته نشینی میکروبی در بخش های slow-flow , dead ends)

روش هایی برای جداسازی برخی باکتری های بیماریزا و پروتوزوآها وجود دارند اما این روشها خسته کننده و پیچیده هستند و در آزمایشگاه ها فقط بوسیله پرسنل متخصص قابل انجام می باشند. از طرف دیگر روش های تجربی برای شناسایی برخی ویروس های روده ای وجود دارد اما به کار گیری روتین آنها مقدور نمی باشد. هرچند این روش ها در بررسی بیماری هایی که از آب انتقال می یابند، مفیدند لیکن خصوصیات حوزه آبریز یا تشخیص کیفیت آب های زیر زمینی مفید هستند.

^{۱۱} Incubation

^{۱۲} Heterotrophic

^{۱۳} Pour Plate

^{۱۴} Speard Plate

^{۱۵} Multi well- enzyme substrate

^{۱۶} Colonization

معمولاً آلودگی در قسمت های دارای جزر و مد و نیز سایر مکان های آب شور زیاد است. بسته به شرایط آب و هوایی، لازم است تا روش های باکتریولوژی موجود برای آزمایش چنین آب هایی، اصلاح شوند. هرچند روش های مورد استفاده برای آزمایش آب های شیرین، برای آزمایش آبهای شور هم کاربرد رضایت بخشی دارند. روش هایی برای آزمایش آب های استخر های شنا و نیز سایر محل های آبتنی وجود دارد. روش های استاندارد شمارش پلیت برای کلیفرم های گرماپای و استرپتوکوک درست همان روش های مورد استفاده در سایر آبها هستند.

روش هایی برای شناسایی باکتری های /*استافیلوکوکوس*^{۱۷} و *سودوموناس آئروژنوس*^{۱۸} که معمولاً ارگانیزم های همراه پوست و یا متصل به قسمت بالایی دستگاه تنفس هستند و همینطور روش هایی برای شناسایی قارچ های آبی و *اکتینومیست*^{۱۹} وجود دارند.

تضمین کیفیت / کنترل کیفیت

A ۹۰۲۰ مقدمه

۱- ملاحظات معمول

^{۱۷} Staphylococcus

^{۱۸} Pseudomonas aeruginosa

^{۱۹} Actinomycetes

به دلیل تاکید بر روی میکروارگانیزم ها در استاندارد های کیفی آب و اقدامات اجرایی و نقش دائمی که آنها در پژوهش دارند، کنترل فرایند و پایش نیاز به استقرار، مستند سازی و کاربرد موثر سیستم های کیفی (QS)^{۲۰} دارد. استقرار QS برای آزمایشات محیطی و کاربرد های مدیریتی، هر دو سیاست تضمین کیفی (QA)^{۲۱} و تجارب و تکنیکهای عملی کنترل کیفی (QC)^{۲۲} را در بر می گیرد. هردو مورد برای اثبات و اعتبار دهی داده های آزمون و حصول اطمینان از برآورده شدن نیازمندی های قانونی و نیازمندی های مشتریان و بکار گیری استاندارد های معتبر یا گواهینامه ها طراحی شده اند.

هر آزمایشگاه مستندات مربوطه را بر اساس سیاست های سیستم کیفی متعلق بخودش و همچنین اهداف برنامه کیفی و یا دستور عمل های کیفی، تنظیم می کند. مستندات بیانگر الزامات آزمایشگاهی در برنامه تضمین کیفیت (QS) درون آزمایشگاهی، استاندارد کردن روش های اجرایی آزمایشگاه و تجارب مدیریتی می باشد. مستندات به طور واضح مسئولیتها و وظایف را برای اطمینان از اینکه داده ها از الزامات کمی و کیفی برخوردار باشند را تعیین می کند.

برنامه بایستی کاربردی باشد و در مدت زمان معینی انجام شود در غیر اینصورت باید کنار گذاشته شود. زمانی که برنامه QA مستقر شد حدود ۱۵ درصد از زمان آزمایشگاه باید برای جنبه های مختلف برنامه مورد استفاده قرار گیرد. هرچند زمان بیشتری شاید برای داده های تحلیلی خیلی مهم مورد نیاز باشد به عنوان مثال: برای اقدامات اجرایی.

مدیریت مناسب، تعادل، کارکرد طبق تعهدات سیستم کیفی منجر به بهینه شدن داده های کیفی، شناسایی سریع مشکلات و افزایش رضایت مندی می شود و فاقد اثرگذاری منفی بر روی کارایی آزمایشگاه می باشند.

از آنجایی که آزمون های میکروبیولوژی تغییرات دائمی ارگانیزم های زنده را مورد سنجش قرار میدهند، آنها به طور ذاتی متغیر هستند. ابزار کنترل کیفیت برای کارشناسان میکرو بیولوژی با ابزار کنترل کیفیت کارشناسان

^{۲۰} Quality System

^{۲۱} Quality Assurance

^{۲۲} Quality Control

شیمی متفاوت است چون در بسیاری از اندازه گیری های میکرو بیولوژی متغیرهای گسسته دخالت دارند در صورتی که در اندازه گیری های شیمی متغیرهای پیوسته وجود دارد. متغیر های گسسته دارای ارزش مستقل هستند. در صورتی که متغیر های پیوسته به مقادیر مشخصی محدود نمی شوند و تنها به صحت ابزار اندازه گیری استفاده شده بستگی دارند. بنابر این روش های آماری متفاوت و توزیع احتمالی برای ارزیابی داده ها مورد استفاده قرار می گیرد. سیستم های مستند سازی کنترل کیفی در میان آزمایشگاه ها، براساس ساختار سازمانی، مسئولیتها، اهداف، ابعاد آزمایشگاه، توانمندی، امکانات و مهارت و تجربه کارکنان، متفاوت می باشد.

۲- راهنمای سیستم کیفیت

آزمایشگاه باید برای توسعه و مستند سازی، روش هایی را برای دستیابی به نتایج؛ آن هم در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی ابداع نماید.

a- مسئولیت های مدیریت: مدیریت لازم است ریسک های مرتبط با خطا را ارزیابی نموده و ضمن تصدیق، از نیاز های QS حمایت فعالانه نماید و کارکنان را در ایجاد پیشرفت درگیر نموده و در انجام برنامه ها، تعهدات مالی و منابع انسانی نقش رهبری را ایفا کند. مدیریت باید برای بهبود و نگهداری یک برنامه جامع، استقرار مسئولیت های ویژه مدیریت، سرپرستان و کارشناس ها و نیز برای نگهداری هوشمندانه شرایط و بازبینی سیستماتیک وظایف و عملکرد آزمایشگاه، با مسئولین و پرسنل آزمایشگاه جلسه داشته باشد. مدیر ارشد مسئولیت کلی برنامه QA/QC و فعالیت های اجرا شده بوسیله کارشناسان آزمایشگاه را در مقابل مشتری بر عهده دارد. پرسنل QA، سرپرستان، و کارشناسان آزمایشگاه می توانند مسئولیت هایشان را توسط مدیر ارشد به شخص دیگری واگذار کنند ولی مدیر ارشد مسئول نهایی برنامه QA می باشد و نمی تواند مسئولیت مدیریتی خود را به نفر زیر دستش در سازمان واگذار کند.

b- مدیر کیفیت: در آزمایشگاه های بزرگ مدیر تضمین کیفیت دارای اختیار و مسئولیت نسبی برای اجرای برنامه QA است. در حالت ایده آل، مدیر کیفیت دارای موقعیتی است که می تواند مستقیماً به مدیر ارشد گزارش دهد و بنابراین استقلال اجرایی دارد. مدیر کیفیت باید دارای پیشینه فنی باشد که شامل گذراندن دوره های

میکروبیولوژی، آشنایی با جنبه های کار آزمایشگاهی، همچنین آگاه و آشنا با برنامه های QA و عملیات QC و روش های آماری برای ارزیابی داده ها باشد. مدیر کیفیت برای آغاز برنامه QA، متقاعد کردن مدیریت و کارکنان به فواید آن، تامین و انجام حمایت های ضروری و آموزش های لازم مسئول می باشد. هنگام استقرار برنامه QA، مدیر کیفیت باید به طور متناوب (هفته ای یا ماهانه) بازبینی ها را با مدیر آزمایشگاه و کارکنان برای حصول اطمینان از دنبال شدن برنامه و تشخیص و رفع مشکلات انجام دهد.

مدیر کیفیت باید به طور متناوب به مدیر آزمایشگاه گزارش دهد. باز خورد محرمانه برای اصلاح مشکلاتی که کیفیت داده ها را تهدید می کند ضروری است. در آزمایشگاه های کوچک این مسئولیت به یک یا چند کارمند براساس شیفت کاری، و یا کارمندی که یک واحد QA را بنا نهاده، واگذار می شود.

C- کارکنان: کارکنان آزمایشگاهی و میدانی باید در برنامه ریزی برنامه QA، آماده سازی روش های اجرایی استاندارد و از همه مهمتر پیاده سازی برنامه QA و فعالیتهای QC در وظایف روزانه خود شامل: نمونه برداری، انجام آزمون ها، انجام بررسی کنترل کیفی و محاسبات و گزارش نتایج، با مدیریت سهیم باشند. کارکنان، اولین کسانی هستند که می توانند مشکلات بالقوه را تشخیص دهند و باید با کارشناسان QA و مسئولین برای اصلاح و پیشگیری از مشکلات همکاری کنند. درک کارکنان از توقعی که از آنها می رود و حمایت فعالانه آنها از برنامه QA در موفقیت برنامه QA بسیار پر اهمیت است.

۳- اهداف سیستم کیفیت :

اهداف یک سیستم کیفی عبارت است از: تولید داده با کیفیت مشخص، اطمینان از کارایی بالای آزمایشگاه، ارزیابی مستمر از عملیات آزمایشگاهی، تشخیص ضعف ها در عملیات آزمایشگاه، تشخیص نیاز های آموزشی، بهبود مستند سازی و عملیات ثبت، توسعه کافی و شفاف سیستم گزارش دهی، اطمینان از برآورده شدن قوانین و مقررات و نیازمندی های مشتری.

۴- عناصر سیستم کیفیت:

هر آزمایشگاهی که QS را پیاده نموده است و یک دستورعمل یا برنامه مدیریتی مکتوب را ایجاد کرده، خط مشی و برنامه های آزمایشگاهی را برای اثبات کیفیت کارشان به مشتریان ارائه می دهد. برنامه، بوسیله مدیر ارشد و مدیر کیفیت برای تصویب شدن امضا می شود، در آزمایشگاه های کوچکتر خود اپراتور برنامه را امضا می کند. بودن امضای مدیر ارشد و مدیر کیفیت بر روی برنامه یا دستور عمل مدیریتی مکتوب، نشانگر این است که سیاست ها و فعالیتهای آزمایشگاه تحت مسئولیت مدیر ارشد می باشد و مفهوم آن این است که در نهایت مسئولیت حمایت از پرسنل، دستگاهها، تجهیزات و مواد با مدیر ارشد می باشد.

برنامه باید در برگیرنده جنبه های عمومی زیر باشد:

a- *بیانیه خط مشی کیفیت*: این بیانیه اهداف خاص، الزامات آزمایشگاه و مدیریت آن را برای کیفیت و درستی داده ها توصیف می کند.

b- *ساختار مدیریت و سازمان*: جنبه های اساسی آزمایشگاه و مسئولیت های مدیریتی آن را با یک چارت سازمانی توصیف می کند.

c- *خط مشی پرسنلی*: شرایط و ویژگی های خاص و نیازمندی های آموزشی و مسئولیت های شغلی برای سرپرستان و کارشناسان را مشخص می کند.

d- *نیازمندی های دستگاه و تجهیزات*: تهیه فهرستی از دستگاه ها و تجهیزات موجود، یادداشت نیازمندی های آزمایشگاه و روش های کالیبراسیون دوره ای و نگهداری پیشگیرانه و اطمینان از عملکرد صحیح دستگاه ها قبل از سرویس دستگاه ارزیابی و تشریح فرایند های آزمایشگاهی، پایش و گزارش دهی به منظور بررسی اثر بخش بودن برنامه QA.

e- *مشخصات و ویژگی های تامین کنندگان*: وجود روش هایی برای اطمینان از اینکه معرف ها و مواد دارای کیفیت کافی و مناسب برای استفاده هستند.

f- خصوصیات قراردادها برای انجام آزمون و کالیبراسیون: استقرار استانداردها برای رفع خطاهای غیر عمدی آزمایشگاهی و مقبولیت محصول.

g- روش های نمونه برداری (اگر بوسیله آزمایشگاه انجام می شود)، ضوابط و معیارهای پذیرش نمونه، روش جمع آوری، شرایط حمل و نقل (مثل زمان و دما)، پذیرش و قابلیت ردیابی نمونه های ارسالی و روش هایی برای حفاظت نمونه در صورتی که به نتیجه آزمون اعتراض شود؛ باید تدوین گردد.

h- روش های آزمون: از آزمون هایی که در دامنه کاری آزمایشگاه قرار دارند فهرست تهیه گردد، صحت گذاری روش های غیر استاندارد یا روش های جدید و مشخص نمودن وضعیت اعتبار هر روش به لحاظ داشتن گواهی نامه معتبر، لازم است.

i- اقدامات کنترل کیفی تجزیه ای آزمون ها: شامل نیازمندی های آزمایشگاه برای تضمین آزمون مثل صحت گذاری روش، مستند سازی، جلوگیری از خطا و کنترل آزمون مثل تکرار آزمون ها، کنترل های مثبت و منفی، چک کردن استریلیتی^{۲۳}، تست های تائیدی و روش های آماری مورد استفاده.

j- روش های اجرایی/استاندارد: فهرست تمام فرایندهای آزمایشگاه و عملیات آزمایشگاهی روتین که بوسیله مدیریت امضا شده، آماده و در دسترس کارکنان باشد و در صورت درخواست مشتری باید در دسترس قرار گیرد.

k- کنترل مستندات و نگهداری سوابق: تعیین ساختار نگهداری سوابق مانند کپی سخت افزاری، دفترچه های یادداشت و فایل های کامپیوتری.

روش هایی برای مرور و تجدید نظر، ردیابی، پاسخگویی و تضمین حفظ اطلاعات و نیز سایر نیازمندی ها مثل کنترل، امنیت، ذخیره سازی و زمان نگهداری اسناد و داده های آزمایشگاهی تدوین گردد. در صورت عدم مغایرت با اصول حفظ اطلاعات و امنیت، یک نسخه پشتیبان از مستندات باید نگه داری شود.

^{۲۳} Sterility

۱- ارزیابی و تشریح فرایند های آزمایشگاهی، پایش و گزارش دهی به منظور بررسی اثر بخش بودن برنامه QA شامل:

۱- ممیزی داخلی: آزمایشگاه بر روی کارهای جاری حداقل سالی یکبار، بوسیله مدیر کیفیت و یا سرپرست انجام می شود. برای آزمایشگاه های کوچک یک متخصص از خارج مورد نیاز است. این ممیزی ها باید تمام جنبه های آزمایشگاه مثل آزمون ها و گزارش دهی را شامل گردد .

۲- ارزیابی خارجی: بوسیله کارشناسان از بیرون آزمایشگاه به منظور حصول اطمینان از اینکه آزمایشگاه و پرسنل آن، برنامه QA را به صورت قابل قبولی پیگیری می کنند انجام شود. این ارزیابی یک مولفه ضروری به منظور اعتبار دهی و تایید صلاحیت آزمایشگاه می باشد. برای آزمایشگاه هایی که تمایلی به رسمی شدن ندارند، این اقدامات اختیاری است .

۳- تست مهارت^{۲۴}: انجام آزمون های مهارت در واقع صلاحیت یک آزمایشگاه را در تولید نتایج قابل قبول و قابل مقایسه با آزمایشگاه مرجع و سایر آزمایشگاه ها نشان می دهد و مشکلات بالقوه را شناسایی می کند. آزمون های مهارت معمولاً یک یا دو بار در سال انجام می شود.

m- اقدامات/اصلاحی و پیشگیرانه: شناسایی روش های مفید برای تشخیص علت مشکلات و ثبت و اصلاح و پیشگیری از تکرار مجدد آنها.

n- ارائه خدمات به مشتری: الزامات آزمایشگاه در خصوص پاسخگویی به مشتری در صورت درخواست و یا شکایت مشتری و همچنین رعایت راز داری و حفظ اطلاعات شخصی مشتری را توصیف می کند. توصیه های راهنمای QC در بخش های B ۹۰۲۰ و C ۹۰۲۰ به عنوان یک منبع مفید برای تهیه خط مشی برنامه های QA و فعالیت های QC کاربرد دارد. اطلاعات بیشتر از منابع زیر قابل دسترس می باشد.

✓ انجمن امریکایی اعتبار دهی آزمایشگاه A2LA

^{۲۴} Proficiency test

✓ سازمان بین المللی استاندارد ISO

✓ کنفرانس ملی اعتبار دهی آزمایشگاه های محیط زیست NELAC

✓ انستیتو ملی اعتبار دهی آزمایشگاه های محیط زیست INELA

✓ آژانس حفاظت محیط زیست امریکا USEPA

۹۰۲۰ B راهنمای کنترل کیفیت در داخل آزمایشگاه

فعالیت های کنترل کیفیت برای اطمینان از تحت کنترل بودن فرآیندهای آزمایشگاهی طراحی شده اند. کلیه آزمایشگاه ها دارای تعدادی فعالیت های کنترل کیفیت می باشند که از یک مفهوم و قواعد مشترک کنترل آزمون برای نشان دادن کفایت و کارآمدی روش و عملکرد آزمایشگاه استنتاج شده است.

یک سیستم کیفیت آزمایشگاه (QS) جهت استقرار برنامه و یا خط مشی های تضمین کیفیت (QA) و فعالیت های کنترل کیفی (QC) لازم برای به حداقل رساندن خطاهای سیستماتیک و تصادفی ناشی از تغییرات پرسنل، دستگاه ها، تجهیزات، معرف ها، منابع، نمونه برداری و روش های آزمایشگاهی، مدیریت داده ها و گزارش دهی داده ها را تعیین می کند؛ به خصوص برای آزمایشگاه هایی که فقط تعداد محدودی از فعالیت های کنترل کیفیت آزمون های میکروبی را انجام می دهند. فهرست فعالیت های کلیدی کنترل کیفیت (QC) در جدول ۹۰۲۰ ذکر شده، و در بخش ۹۰۲۰ B.۵ مورد بحث قرار گرفته است. اطلاعات اضافی درباره روش های کنترل کیفیت (QC) آزمایشگاه در دسترس می باشند. آزمایشگاه ها باید به همه دستورعمل های کنترل کیفیت (QC) که در این باره بحث گردیده پردازند، اما عمق و جزئیات ممکن است برای آزمایشگاه متفاوت باشد.

تعدادی از مواردی که اینجا اشاره شده نیز می تواند برای آزمایشگاه های دیگر مثل آزمایشگاه های شیمی و رادیولوژی کاربرد داشته باشد. برای آزمون آزمایشگاه های میکروب شناسی که تحت قوانین عملیات بهینه تولید

(GMP)^{۲۵} / عملیات بهینه آزمایشگاهی (GLP)^{۲۶} کار می کنند برخی از تکنیک های کنترل کیفی (QC) از آنچه که اینجا لیست شده، متفاوت خواهد بود.

۱ - پرسنل :

آزمون های میکروبیولوژی باید توسط یک متخصص میکروب شناس و یا تکنسین با سطح مناسبی از آموزش؛ کارآموزی و تجربه در فعالیت های عمومی میکروب شناسی انجام شود در غیر این صورت یک متخصص در زمینه میکروب شناسی باید نظارت مستقیم برای راهنمایی و آموزش آزمایشگر در فرآیندهای پایه آزمایشگاه میکروب شناسی برای انجام وظایف محوله داشته باشد. ناظر بطور مستمر باید مهارت های تکنسین را ارزیابی و مستندسازی نماید. بایستی نظارت دقیق در فرآیندهای جمع آوری نمونه (اگر از طریق آزمایشگاه صورت می گیرد)، بررسی نمونه، محیط های کشت و آماده سازی لوازم شیشه ای، استریل نمودن، روپوش آزمایشگاهی، دسترسی به لوازم، تکنیک های گندزدایی، آزمون های معمول آزمایشگاهی، شمارش، ثبت داده ها و تکنیک های QC برای تعیین و حذف مشکلات صورت پذیرد. مدیریت باید در کسب آموزش های اضافی پرسنل برای افزایش مهارت های اختصاصی و پیشرفت شغلی ایشان کمک کند. لازم است حد نصاب آموزش و تعیین رتبه کارایی آزمایشگر از طریق انجام آزمون وی بر روی نمونه های مجهول به طور مستمر ارزیابی گردد. اثبات اولیه توانایی قبل از تولید اطلاعات و اثبات تداوم توانایی برای انجام هر روش آزمایش باید ثبت شود.

۲ - معیار و ضوابط ایمنی زیستی :

ایمنی زیستی برای همه آزمایشگاه های میکروبی جهت محافظت از پرسنل آزمایشگاه و سایر اشخاصی که در معرض فعالیت های میکروبی قرار دارند؛ حائز اهمیت می باشد. در اینجا سه عامل وجود دارد که باید مورد توجه قرار گیرند: تکنیک های آزمایشگاهی - ایمنی دستگاهی و طراحی ساختمان آزمایشگاه. ارزیابی ریسک کاری که در ارتباط با هر عامل بیولوژیک به خصوص باید انجام شود، ترکیب مناسب این عوامل ضروری را برای هر آزمایشگاه به

^{۲۵} (GMP) Good Manufacturing Practices

^{۲۶} (GLP) Good Laboratory Practices

خودی خود تعیین می کند. مرکز جلوگیری و کنترل بیماری (CDC)^{۲۷} خدمات بهداشت همگانی آمریکا، آزمایشگاه ها را بر اساس نوع عوامل زیان آور بیولوژیکی که با آن سروکار دارند به چهار سطح ایمنی زیستی (BSLs)^{۲۸} طبقه بندی می کند. این چهار سطح شامل مجموعه ای از فعالیت و روش های آزمایشگاهی، ایمنی تجهیزات و لوازم آزمایشگاهی می باشند. هر مجموعه بطور ویژه برای کارهای انجام شده، راه های مشکوک انتقال عوامل عفونی و کار و فعالیت آزمایشگاهی مناسب می باشند. در ادامه این ۴ سطح ایمنی زیستی به اختصار شرح داده می شوند. در استاندارد متد به عوامل طبیعی، خطرناک داخلی و یا خارجی که ممکن است سبب بروز بیماری کشنده بالقوه و جدی شوند، پرداخته نمی شود.

بنابراین در اینجا به اطلاعات جزئی در مورد فعالیت های خاص، آلودگی ها و تجهیزات مربوط به سطوح ۳ و ۴ ایمنی زیستی پرداخته نمی شود. برای دستیابی به اطلاعات بیشتر در مورد کلیه سطوح ایمنی به پروتکل مرکز جلوگیری و کنترل بیماری (CDC) خدمات بهداشت همگانی آمریکا مراجعه کنید.

a- سطح ۱ / ایمنی زیستی (BSL ۱): بر اساس آنچه که CDC مورد توجه قرار داده است:

سطح یک ایمنی زیستی (BSL ۱) برای عوامل کاملاً شناخته شده ای که عامل اصلی بیماری در بزرگسالان نبوده و نیز کمترین خطر را برای پرسنل آزمایشگاه و محیط دارند، مناسب می باشند. کار عمدتاً روی سطوح باز سکوی آزمایشگاهی با استفاده از دستورعمل های استاندارد میکروبی انجام می شود. عوامل فهرست شده در استاندارد متد که باید طبق سطوح یک ایمنی زیستی با آنها رفتار شود، شامل روش های مرتبط با کل کلیفرم ها ،

^{۲۷} (CDC) The Centers for Disease Control

^{۲۸} (BSLs)Biosafety levels

جدول ۹۰۲۰:۵- فعالیت های کنترل کیفیت

TABLE 9020:I. KEY QUALITY CONTROL PRACTICES

Item	Action	Frequency	Further Information in Section 9020B
Reagent water	Monitor quality	See Table 9020:II	1
Air in workplace	Monitor bacterial density	Monthly	3e
Temperature devices:			4a
Working units	Check accuracy	Annually	
Reference units	Recertify	Every 5 years	
Balances	Check zero	Each use	4b
	Check accuracy	Monthly/each use preferably	
	Service and recalibrate	Annually	
Weights:			4b
Working	Check with reference weights	Annually	
Reference	Recertify	Every 5 years	
pH meter	Standardize	Each use	4c
	Determine slope	Monthly	
Media-dispensing apparatus	Check volume dispense accuracy	Each use	4f
Hot-air sterilizing oven	Check performance	Monthly	4g
Autoclave	Check temperature with max-registering thermometer	Weekly	4h
	Check performance with bioindicator	Monthly	
Timer:			
Autoclave	Check timing with stopwatch	Quarterly	4h
Stopwatch	Check against National Time Signal	Annually	
Refrigerator	Check temperature	Daily	4i
Freezer	Check temperature	Daily	4j
	Defrost	Annually	
Membrane filtration equipment	Check for leaks and surface scratches	Each use	4k
	Check sterility	Pre- and post-test	
	100-mL volume check	Initially	
UV lamps (shortwave)	Test with UV meter or perform plate count check	Quarterly	4l
Biosafety cabinet	Inspect for airflow	Each use	4m
	Have certified	Annually	
Incubator	Check temperature	Twice daily	4n and o
Microscope	Clean optics and stage, check alignment	Each use	4p
Conductivity meter	Calibrate	Monthly	4q
Micropipettes	Check dispense accuracy and precision	Quarterly or more frequently if heavily used	4s
	Calibrate	Annually	
Glassware	Inspect for cleanliness, chips, and etching	Each use	5a
	Check pH with bromthymol blue	Each wash batch	
	Conduct inhibitory residue test	Initial use and new washing procedure (also may be annual)	
Dilution water bottles	Check for autofluorescence if used for testing	Each batch or lot	5c and 9050C.1a
Sample bottles	Check sterility, pH, and volume	Each batch or lot	5d
	Check sterility	Each batch or lot	
	Check dechlorination agent efficacy	Each batch or lot	
	Check 100 mL line	Each lot	
	Check for autofluorescence if also used for testing	Each lot	
Multi-well sealer	Check performance	Monthly	5e
Membrane filters	Check sterility and properties	Each new lot	5f
Media	Check sterility, pH and appearance	Each batch or lot	5j
	Check recovery of new vs. old media	Before first use	
	Check performance with + and - culture controls	Each batch or lot	
Plate counts	Perform duplicate analyses	Monthly	9a
	Repeat counts	Monthly	

کلیفرم های گرم پای، اشریشیا کلی، انتروکوکسی^{۲۹}، باکتری های آهن و سولفور، اکتینومایست ها و دیگر میکروارگانیسم های غیر بیمارزا می باشند. فعالیت های ایمنی زیستی متناسب با روش های مورد آزمایش به نظر مدیر آزمایشگاه بستگی دارد که چه روشی به کار گرفته شود. فعالیت های استاندارد و تجهیزات ایمنی برای این سطح به صورت زیر انجام میشود:

۱- در زمان شروع آزمایش ها یا کار با نمونه ها با صلاحدید مدیر آزمایشگاه دسترسی به آزمایشگاه از طریق الصاق یک برچسب یا نشانگر، محدود یا ممنوع شود، به عنوان مثال، از برچسب ورود ممنوع به دلیل وجود مواد زیستی خطرناک^{۳۰}، یا برچسب ورود صرفاً برای پرسنل آزمایشگاه مجاز است، استفاده کنید. از بسته بودن راه های ورودی و پنجره ها هنگام کار در شرایط استریل اطمینان حاصل نمایید.

۲- پرسنل باید دست های خود را بعد از تماس با مواد بیولوژیک و بعد از خارج کردن دستکش ها و قبل از ترک آزمایشگاه با آب و صابون بشویند.

۳- خوردن، نوشیدن، سیگار کشیدن، استفاده از لنزهای تماس چشمی، مواد آرایشی و نگهداری مواد غذایی برای استفاده شخصی در فضای کاری مجاز نمی باشد.

۴- کشیدن مایعات با دهان از داخل پیپت ممنوع است.

۵- برای سر و کار داشتن ایمن با وسایل نوک تیز باید دستورعمل تهیه شود.

۶- سطوح کاری قبل و بعد از هر بار استفاده از مواد زیستی باید از هر گونه آلودگی عاری شوند.

۷- همه محیط های کشت، مواد اولیه و مواد دفعی ایجاد شده قبل از انهدام باید از طریق اتوکلاو^{۳۱} ضدعفونی شوند و اطلاعات مربوطه به آن ثبت شود.

^{۲۹} Enterococci

^{۳۰} Biohazards

^{۳۱} Autoclaving

۸- باید یک برنامه کنترل حشرات و جوندگان اجرا شود. توصیه می شود که پوشش های آزمایشگاهی، روپوش برای جلوگیری از آلودگی یا کثیف شدن لباس ها پوشیده شود. چنانچه پوست دست آسیب دیده و یا دچار جوش و زخم باشد حتماً باید از دستکش استفاده شود. هر نوع کار مراقبتی که لازم است باید انجام شود تا از ریزش مایعات یا ایجاد ابروسل ها^{۳۲} ممانعت به عمل آید.

b- سطوح ۲ / ایمنی زیستی (BLS ۱): BLS ۲ بالاتر از فعالیت های سطوح یک ایمنی زیستی قرار دارد و کار با عوامل دارای پتانسیل متوسط خطر برای اشخاص و محیط کار را شامل می شوند.

عوامل میکروبی فهرست شده در استاندارد متد که فعالیت های سطوح ۲ ایمنی زیستی را نیاز دارند؛ مشتمل بر میکروارگانیسم های بیماری زایی هستند که در بخش های ۹۲۶۰ ، ۹۵۱۰ ، ۹۶۱۰ و ۹۷۱۱ شرح داده شده است. این سطح از سطح ۱ متمایز می شود از این بابت که پرسنل آزمایشگاه باید دارای آموزش های خاص برای تماس با عوامل بیماری زا باشند. در هنگام شروع کار آزمایشگاهی باید دسترسی به آزمایشگاه محدود شود. در تماس با وسایل تیز و برنده باید احتیاط لازم در نظر گرفته شود. فرآیندهایی که ممکن است ذرات معلق آلوده تولید کنند باید در زیر هود بیولوژیک (BSC)^{۳۳} انجام شود. ایمن سازی مناسب چنانچه امکان داشته باشد انجام شود.

فعالیت های استاندارد برای این سطح کلیه مواردی که برای سطح ۱ ایمنی زیستی نیز فهرست شده اند شامل می گردد ؛ علاوه بر روش های ویژه که در ادامه آورده شده اند:

۱- در هنگام کار با چیزهای نوک تیز شامل سرنگ ها، سوزن ها، اسلایدها^{۳۴} ، لوله های موئینه و تیغ های تیز بایستی به شدت احتیاط شود.

۲- لازم است سطوح کار در شروع کار یا پایان روز و بعد از هرگونه پخش احتمالی مواد عفونت زا؛ با استفاده از مواد گندزدای مناسب، عاری از هر گونه آلودگی شوند.

^{۳۲} Aerosols

^{۳۳} Biological Safety Cabinets

^{۳۴} Slides

۳- محیط های کشت یا مواد دورانداختنی که دارای قابلیت عفونت زایی هستند باید در یک ظرف که برچسب مشخصی (با عنوان مواد دور انداختنی و دارای خطر زیستی) بر روی آن الصاق شده است جدا شوند و با پوشش مناسبی که بتواند مانع از چکه و ترشح مواد در هنگام تهیه، جابجایی، فرآیند سازی، ذخیره، حمل و نقل هوایی و یا دریایی باشد پوشانده و در محل مناسبی کنار گذاشته شوند.

۴- لازم است از هود های بیولوژی، ترجیحاً کلاس ۲ به همراه تجهیزات مناسب حفاظت فردی در زمان انجام فرآیندهای با قابلیت تولید آئروسول و یا پاشیدگی مایعات و یا غلظت های بالا و حجم های زیاد از عوامل عفونی استفاده شوند.

۵- در انجام هرگونه کار با میکروارگانیسم ها در خارج از هود های بیولوژی بایستی از ماسک و حفاظ صورت برای جلوگیری از اسپری شدن و یا پاشیدگی مواد عفونی به ناحیه صورت استفاده شود.

۶- در آزمایشگاه باید پوشش، روپوش، یونیفرم های مخصوص آزمایشگاهی و عینک های ایمنی مخصوص آزمایشگاهی استفاده شوند و هنگام خروج از آزمایشگاه نیز از تن خارج گردند و در آزمایشگاه نگهداری شوند.

۷- در صورت تماس احتمالی دست با مواد عفونت زا، سطوح و یا ابراز و وسایل آلوده لازم است از دستکش استفاده شود.

C- سطوح ۳ و ۴ / ایمنی زیستی : سطوح ۳ و ۴ ایمنی زیستی کار با عوامل درونی، خطرناک و یا خارجی که ممکن است موجب بیماری های وخیم و کشنده شوند را در بر می گیرد مثل قرار گرفتن در معرض مواد خطرناک از طریق تنفسی و استنشاقی. چون که عوامل این گروه در استاندارد متد شرح داده نشده اند، برای این سطح از ایمنی زیستی فعالیت های خاص، محدود و ساده فقط بصورت خلاصه شرح داده می شوند:

پرسنلی که با مواد عفونت زا سر و کار دارند باید آموزش های لازم را فرا گرفته باشند. کلیه روش های ایمنی قبلی باید دنبال شود. دسترسی به آزمایشگاه باید محدود و ممنوع باشد. کار باید داخل هودهای بیولوژیک (BSC) توسط پرسنل دارای وسایل و پوشش محافظ مناسب انجام شود. هیچ کس اجازه ورود به آزمایشگاه با زخم باز را ندارد. یک مسیر عبور مخصوص که در آنجا پرسنل بتوانند روپوش خود را تعویض کنند بایستی حد فاصل سالن

های ورودی و خروجی آزمایشگاه وجود داشته باشد. باید از باز شدن هر دو درب در یک زمان جلوگیری به عمل آورد. کلیه مواد دارای قابلیت آلودگی از جمله دستکش ها، روپوش های آزمایشگاهی و غیره، قبل از انهدام یا استفاده مجدد باید مجدداً ضدعفونی شوند.

سطح ۴ ایمنی زیستی همانند آنچه در مورد سطح ۳ ایمنی زیستی گفته شد؛ عوامل بیولوژیکی اغلب خارجی و غیر معمول را شامل می شود که هم برای پرسنل و هم برای محیط بی نهایت خطرناک می باشند. تمام روش های ایمنی قبلی باید دنبال شوند. دسترسی به آزمایشگاه باید اکیداً کنترل شده و در یک فضای مشخص و به دور از فعالیت های معمول آزمایشگاهی و یا در یک ساختمان مجزا انتقال یابد. پرسنل باید پیش از ورود به آزمایشگاه لباس آزمایشگاهی بپوشند و باید قبل از ترک آزمایشگاه نیز از آلودگی پاک شوند.

۳- امکانات :

یک خط مشی کنترل محیطی، برای اطمینان از اینکه شرایط محیطی منجر به بی اعتبار شدن نتایج، تاثیر خواسته بر کیفیت اندازه گیری و یا تاثیر ناخواسته بر پرسنل نمی شود؛ تهیه کنید. عواملی که باید موردتوجه و اجرا قرار گیرند در زیر شرح داده شده است. بیشتر این اطلاعات برای هر نوع ساختمان آزمایشگاهی کاربرد دارند.

a- تهویه : آزمایشگاه ها را با تهویه مناسب طراحی کنید که از گرد و غبار و تغییرات دمایی شدید مصون باشد. برای کاهش آلودگی، سیستم های کنترل دما، رطوبت و تهویه مناسب نصب کنید؛ تا انکوباتورها با ثبات بیشتری کار کنند و مشکلات ناشی از رطوبت محیط های کشت و تجهیزات کاهش یابند. از آنجائی که جریان هوای داخل آزمایشگاه برای جلوگیری از خطر آلودگی به دلیل وجود جریان منفی هوا همیشه باید بیش از جریان هوای خارج از آزمایشگاه باشد؛ سیستم تهویه هوا را طوری تنظیم کنید تا جریان هوا بطور مستقیم روی سطح کار و سکوهایی آزمایشگاهی دیده نشود.

b- فضای کاری: برای اطمینان از صحت و درستی نمونه و آزمایش و به حداقل رساندن بار آلودگی، آزمایشگاهی با حداقل تردد و بازدید کننده طراحی و پیاده سازی کنید. مناطق قابل دسترسی و نقاط خروجی را مسدود نکنید.

باید اطمینان حاصل شود که به اندازه کافی فضای کار در آزمایشگاه وجود دارد. برای مثال، فضای جداگانه برای دریافت نمونه، آماده سازی و استریل نمودن، آلودگی زدایی محیط های کشت، ظروف شیشه ای، تجهیزات، آزمون و کشت، و انتقال و ذخیره اطلاعات. تجهیزات دمایی مانند اتوکلاو، با یک اتاق از انکوباتورها فراهم شود. توصیه می شود از هود یا کابیت های ایمن از لحاظ بیولوژیکی برای توزیع و آماده سازی محیط های کشت، انتقال کشت های میکروبی، کار با مواد آلوده استفاده شود. در آزمایشگاه های با وسعت کمتر اگرچه شرایط مطلوب نمی باشد ولی احتمال دارد که کلیه این فعالیت ها در یک اتاق انجام شود معهداً نباید کلیه ی کارها در کنار درب و پنجره آنهم بصورت باز انجام شود. فضای کافی برای ذخیره مناسب مواد در آزمایشگاه وجود داشته باشد.

C- فضای مختص سکوی آزمایشگاهی: برای هر آزمایشگر حداقل دو متر از طول سکوی آزمایشگاهی را اختصاص دهید و ضمناً فضا های بیشتری برای فعالیت های آماده سازی و پشتیبانی تدارک ببینید. ارتفاع میز معقول و مناسب برای آزمایشگران باشد. برای کارهای ایستاده ارتفاع میز ۹۰ تا ۹۷ سانتی متر و پهنای آن ۷۰ تا ۷۶ سانتی متر و برای کارهای نشسته مانند استفاده از میکروسکوپ و شمارش کلنی، ارتفاع میز ۷۵ تا ۸۰ سانتی متر باشد. سطح فوقانی میزها باید از جنس استیل ضد زنگ، پلاستیک اپوکسی، یا سایر سطوح صاف و غیر قابل نفوذ باشد که در مقابل خوردگی مقاوم بوده و حداقل شکاف و درز در آن ها دیده شود. لامپ هایی با روشنایی مناسب اما بدون تشعشع زیاد با قدرتی در حدود ۱۰۰۰ لوکس (۱۰۰۰ FT-C) بالای میزهای کار نصب نمایید. با یک نورسنج میزان نور را بررسی کنید.

d- دیوارها و کف: اطمینان یابید که کل دیوارها از یک سطح کاملاً صاف که قابلیت شستشو و ضد عفونی شدن را دارند، پوشیده شده است. مواد مورد استفاده در کف از مواد فشرده صاف و هموار، وینیل^{۳۵}، کاشی، یا هر ماده غیر قابل نفوذ با قابلیت شستشو باشد. سقف صاف، بدون بافت فیبری بوده و مکانی برای لامپ های روشنایی در نظر گرفته شود.

e- محیط کار: در تمیزی محیط آزمایشگاه از استانداردهای بالایی بهره گیری نمایید. قبل و بعد آزمایش سطوح باید ضد عفونی شوند. خط مشی نگهداری پیشگیرانه برای محیط کاری و تجهیزاتی مانند انکوباتورها و یخچال ها

^{۳۵} Vinyl

برقرار نمایید. ابزار کار و محیط های کشت آلوده را بعد از استفاده استریل نمایید. از تجمع آب در یخچال و فریزر جلوگیری نموده و همه فیلترهای مخصوص تهویه هوا را تمیز نمایید. یک برنامه پایش زیست محیطی مداوم برای بررسی کیفیت هوا که فواصل زمانی آن حداقل یک ماهه باشد فراهم نمایید و اگر حجم کار بالا است یا محیط کار در معرض خطر آلودگی با عوامل زیستی قرار دارد تواتر پایش بیشتر شود. از آزمون کشت هوا در پلیت به منظور ایجاد و فراهم آوری یک محیط فاقد آلودگی، استفاده نمایید. این روش یک نمونه برداری منفعلانه است و به نوعی متأثر از نشست و ته نشینی ذرات در مکانی است که ذرات معلق می توانند در آن مکان بر سطح آگار بنشینند. اگر شاخص های ارزیابی ریسک امکان وجود ذرات آئروسول را نشان می دهد، از نمونه بردارهای اکتیو برای نمونه برداری هوا استفاده نمایید. پلیت های تماسی RODAC^{۳۶} (شناسایی و شمارش ارگانیسم تکثیر یافته) یا روش سواب^{۳۷} به صورت هفتگی یا برحسب نیاز با تواتر بیشتر با توجه به میزان آلودگی سطوح سکو ها می توانند مورد استفاده قرار گیرند.

بعد از سپری شدن یک دوره زمانی، برای تعیین حد نرمال آلودگی یک ناحیه خاص می توانید از میانگین نتایج به دست آمده از آزمون های به عمل آمده استفاده کنید. گرچه برای همه باکتری ها، حدود دانسیته ای یکسانی مشخص نشده اند لیکن هر آزمایشگاه می تواند بر حسب نیاز، این آزمون را به صورت مبنا برای محل های کار ویژه، رویه ارزیابی، ایجاد سطح اعلام از نوع هشدار و خطر و گرفتن تصمیمات مقتضی برای خود مورد توجه قرار دهد.

تعداد کلنی های روی پلیت (در معرض هوا، نباید از $\square\square\square/cm^2/\square\square$ کلنی در مدت زمان ۱۵ دقیقه یا

$\square\square colonies/plate/\square\square min$) بیشتر باشد. بعلاوه در این سیستم مراقبتی، ممکن است آزمایشگاه تمایل

داشته باشد شناسایی عوامل آلودگی را با سیستم های خودکار انجام دهد. از بروز هر گونه صدای ناهنجار و لرزش در آزمایشگاه جلوگیری به عمل آورید. برای جلوگیری از افزایش دما ناخواسته در آزمایشگاه، برای پنجره های بزرگ، سایه بان قابل شستشو نصب نمایید.

^{۳۶} Replicate Organism Detection and Counting

^{۳۷} The Swab Method'

f- تمیز کردن آزمایشگاه: به صورت برنامه ریزی شده اتاق ها و میزها، قفسه ها، کف، پنجره ها، پوشش لامپ ها را بشوید و سطوح لوله ها قابل دید را تمیز نمایید. به صورت هفتگی کف را با یک ماده ضدعفونی کننده و توسط یک تی پارچه ای ضدعفونی کنید. از تی خشک یا جارو استفاده نکنید. حداقل به صورت روزانه و یا با تواتر بیشتر بر اساس ایمنی زیستی مورد نیاز، سطح میز کار را با یک ماده ضد عفونی کننده پاک و ضدعفونی نمایید (بخش B.□□□□ را ببینید). آزمایشگاه بهم ریخته نباشد. لوازم و کاغذها را بالای میز قرار دهید. لوله های بالا سری میز کار را که امکان تمیز شدن مکرر ندارند جمع آوری کرده و یا پوشانید. در کنار سینک^{۳۸} آزمایشگاه صابون مایع و حوله کاغذی قرار دهید. سیگار نکشید و از خوردن و آشامیدن در آزمایشگاه بپرهیزید.

g- برق: اطمینان یابید که یک منبع برقی ثابت با تعداد کافی پریز وجود دارد و در جایی که لازم باشد جهت افزایش حفاظت؛ قطع کننده جریان عمل می کند. یک سیستم برق اضطراری پشتیبان و سیستم هشدار دهنده وقتی کار حساس است ممکن است مورد نیاز باشد.

۴- لوازم و تجهیزات آزمایشگاهی

به منظور بررسی و تایید اینکه هر قطعه از تجهیزات به طور صحیح نصب شده و به صورت مداوم و رضایت بخش کار می کند، رویه ها و دستورعمل های مربوطه را در دسترس داشته باشید. از طریق نظارت مستمر، نگهداری روزانه و یک برنامه ی کالیبراسیون منظم، این مطلب را که هر قطعه از تجهیزات و یا ابزارآلات، نیازهای کاربر را در ارتباط با دقت و حداقل خطا و انحراف تامین می کند، بررسی و تایید نمایید. دستورعمل های مدون در ارتباط با استفاده، عملکرد، کالیبراسیون و نگهداری از تجهیزات و ابزارآلات مربوطه تهیه نمایید (بخش B.۶.۲۰۹۰ ملاحظه شود) و دستورعمل های تولیدکنندگان را برای بازیابی آسان، در دسترس نگاه دارید. کالیبراسیون تجهیزات را با استفاده از استانداردهای مرجع به انجام رسانده و نگهداری از تجهیزات را به طور منظم مطابق با توصیه ی ارائه شده از سوی تولیدکننده انجام دهید و یا قراردادهای نگهداری پیشگیرانه را در ارتباط با اتوکلاوها، ترازوها، میکروسکوپ ها و سایر تجهیزات مهم و حساس منعقد نمایید. تمامی بررسی های کنترل کیفی را مستقیماً در دفاتر مخصوص

^{۳۸} Sink

ثبت و ضبط نموده و مستندات مربوطه را نگهداری نمایید. برای بررسی مشکلات مربوط به تضعیف کارایی تجهیزات (کاهش توان عملکردی آنها) و اقدامات لازم برای تصحیح آن یک سیستم ایجاد نمایید.

اطمینان حاصل کنید آزمایشگاه دارای تمامی تجهیزات و لوازم مورد نیاز برای اجرای آزمایش‌های زیست-محیطی و کالیبراسیون می‌باشد. تجهیزات و لوازم کافی را در محلی که مورد نیاز است فراهم آورید، به نحوی که مجبور به جابجایی روزانه و دائمی آن‌ها از یک آزمایشگاه به آزمایشگاه دیگر نباشید. در شرایطی که تجهیزات فقط خارج از محیط آزمایشگاه موجود می‌باشند، مشخص نمایید که چگونه کیفیت آزمایشگاه مورد تایید خواهد بود. برای انجام آزمایشات مولکولی، بایستی تجهیزات و لوازم آزمایشگاهی در اتاق‌های مشخصی قرار داده شوند. تمامی مستنداتی را که نشان دهنده‌ی مقبولیت تجهیزات، ابزارآلات و لوازم، و همچنین تمامی آزمایش‌های تحلیلی هستند؛ نگهداری نمایید. موارد ثبت شده را در قالب یک ساختار ماندگار نظیر یک دفترچه‌ی الکترونیکی و یا فایل رایانه‌ای نگهداری نمایید.

از دستورعمل‌ها و رویه‌های کنترل کیفی زیر برای لوازم اصلی و همچنین آزمایشگاه تحقیقاتی استفاده نمایید (تجهیزات مورد نیاز برای آزمایش‌های ویژه یا تخصصی ممکن است در اینجا فهرست نشده باشند):

a- وسایل/اندازه‌گیری و ثبت دما: به صورت سالیانه و یا ترجیحاً هر شش ماه، صحت و دقت تمامی ابزارهای اندازه-گیری دما از قبیل دماسنج‌های مایع در شیشه، ترموکوپل‌ها و ابزارآلات ثبت دما را در دمای مورد استفاده نسبت به یک دماسنج واجد گواهینامه انستیتیوی ملی استانداردها و تکنولوژی (NIST)^{۳۹} و یا یک دماسنج قابل ردیابی به NIST و منطبق با مشخصات NIST، چک نمایید.

نتایج کالیبراسیون را به همراه تاریخ و امضای کارشناس در یک دفتر کنترل کیفیت، ثبت نمایید. ضریب تصحیح کالیبراسیون لازم برای هر وسیله‌ی سنجش دما را روی آن نشانه‌گذاری کنید به طوری که تنها مقادیر دمایی صحیح، ثبت و ضبط گردند. صحت و درستی دماسنج‌های مرجع واجد گواهینامه را مطابق با دوره زمانی که در گواهی کالیبراسیون مشخص گردیده یا حداقل هر ۵ سال یکبار مورد تصدیق قرار دهید. در برخی از سازمان-های اعتبارسنجی و یا آژانس‌های فدرال و یا ایالتی، کالیبراسیون ممکن است زودتر از موعد نیاز به انجام داشته باشد.

برای کاربردهای عمومی، از دماسنج‌های مدرج شده با زینه ۰.۵ درجه‌ی سانتیگراد و یا کمتر استفاده نمایید.

برای انکوباتورهای که در آنها هوا جریان دارد و یخچال‌ها، بخش حبابی دماسنج را در درون آب و یا گلیسرین نگهداری کنید. به عنوان مثال؛ برای یک حمام آب 44.5 ± 0.2 درجه سانتیگراد، از یک دماسنج کاملاً غوطه‌ور مثل یک دماسنج کوتاه قد و بازه کاری کم، که درجه زینه آن ۰.۱ باشد، استفاده کنید. در انکوباتورهایی که هوای داخل دارای جریان همرفتی است، از دماسنج‌های کوتاه قد و بازه‌ی کاری محدود، که درون یک بالن یا لوله‌ی آزمایشگاهی (مناسب از نظر حجم و استفاده در انکوباتور) متصل شده و بخش حبابی آنها در گلیسرین مایع (داخل ظرف مذکور) قرار دارد استفاده نمایید. دماسنج‌های کالیبره شده را قرائت کرده و در یک دفتر کنترل کیفی دما را ثبت نمایید. در صورت امکان، انکوباتورها و حمام‌های آب را به ابزارآلات ثبت پیوسته دما مجهز نمایید تا امکان رصد مداوم دما فراهم شود. در صورت امکان، از به کارگیری دماسنج‌های جیوه‌ای، جهت جلوگیری از نشت جیوه درون محیط در صورت شکست احتمالی دماسنج، خودداری نمایید.

b-ترازوها: ترازوها را در مکان‌هایی عاری از جریان هوای تند قرار دهید، و به منظور جلوگیری از ایجاد لرزش، آنها را بر روی سطوح سفت و همواره تنظیم نمایید. هر بار که ترازو را به محل جدیدی منتقل می‌نمایید، آن را مورد تنظیم مجدد قرار دهید. برای عملکرد و نگهداری معمول و روزانه‌ی ترازوهای آنالیتیکال^{۴۰} و نوع تاپ لودینگ^{۴۱}، از دستورعمل‌های شرکت سازنده آنها پیروی کنید. به صورت سالیانه اقدام به سرویس نمودن ترازوها نمایید، و تحت تغییر شرایط و بروز مشکلات، این کار را زودتر انجام دهید. پیش از هر بار استفاده، ترازو را به وسیله‌ی یک برس نرم تمیز کنید و اطمینان حاصل نمایید که نمایشگرهنگام خالی بودن صفحه توزین، صفر را نشان دهد و اگر لازم باشد دکمه تیر (tare) فشار داده تا صفر شود. پیش از افزودن مواد شیمیایی، کاغذ توزین و یا ظرف‌های توزین را بر روی کفه‌ی ترازو قرار داده و با استفاده از دکمه‌ی تیر (tare)، ترازو را صفر کنید. مواد مورد نظر را برای وزن-کردن بر روی کفه قرار داده و پس از ثابت شدن نشانگر (در صورت وجود آن)، وزن را مطابق مقدار نمایشگر قرائت نمایید. پس از استفاده، بلافاصله کفه‌های ترازو را تمیز نموده و با استفاده از یک پارچه‌ی تمیز، ذرات ریخته شده را پاک و برطرف نمایید. اگر وزنه‌ها دچار خوردگی و یا سقوط شده اند، آنها را تعویض نمایید. فقط از انبرک نوک-

^{۴۰} Analytical

^{۴۱} Top-loading

پلاستیکی برای برداشتن وزنه‌ها استفاده کنید. به صورت معمول و مرتب و ترجیحاً روزانه و پیش از شروع وزن کشی و توسط حداقل دو وزنه که غالباً محدوده کاری شما را پوشش می‌دهند، عملکرد ترازو را چک و بررسی کنید.

صحت، دقت و خطی بودن وزنه‌ها را به صورت ماهیانه، با مجموعه‌ای از وزنه‌های مرجع، با تلورانس^{۴۲} شناخته شده، (به عنوان مثال، ANSI/ASTM Class ۱ یا NIST Class S واجد گواهینامه معتبر) بررسی و چک نمایید. نتایج را به همراه تاریخ و نام کارشناس ارزیاب ثبت کنید. وزنه‌های مرجع را مطابق آنچه که در مجوز کالیبراسیون مشخص گردیده و یا حداقل هر ۵ سال یک بار، مورد تایید مجدد قرار دهید. توجه داشته باشید که در مورد آژانس-های تنظیم مقررات و یا سازمان‌های اعتبارسنجی، تایید و دریافت گواهینامه‌های اعتباری وزنه‌های مرجع در تواتر های بیشتری مورد نیاز می‌باشد.

c- pH متر: از pH متری استفاده کنید که با زینه $pH = ۰/۱$ و یا کمتر مدرج شده باشد و همچنین امکان تصحیح دمایی نیز داشته باشد، زیرا که جوابدهی الکتروود pH، وابسته به دما می‌باشد. از pH مترهای دیجیتالی، محلول‌های بافر تجاری، و الکتروودهای مناسب که در بازه‌ی گسترده‌ای از دما عمل می‌کنند، استفاده نمایید. الکتروود سر تخت، می‌تواند برای سنجش pH محیط کشت آگار جامد^{۴۳} به کار گرفته شود. pH متر را توسط حداقل دو بافر pH (از قبل تایید شده) که دربرگیرنده‌ی pH نمونه‌های مورد آزمون باشد، کالیبره نمایید. مطلوب‌ترین بازه‌ی دمایی برای تعیین pH، محدوده دمایی $۰/۵ \pm ۲۵$ سانتیگراد می‌باشد. سنجش pH محلول آزمایش را در دمایی نزدیک به دمای استفاده شده جهت کالیبره کردن pH متر، انجام دهید.

نتایج کالیبراسیون، تاریخ، و نام کارشناس را ثبت نمایید. تاریخ باز کردن محلول‌های بافر و بررسی ماهانه‌ی آن-ها نسبت به یک pH متر دیگر (در صورت امکان) را بر روی بطری‌ها و در دفتر ثبت نمایید. بلافاصله پس از استفاده، محلول‌های بافر به کار گرفته شده برای کالیبره کردن pH متر را دور بریزید. پس از یک روز، تمامی محلول‌های بافر ساخته شده از بسته‌ها را دور بریزید. ظروف حاوی بافر pH را بر مبنای تاریخ انقضا، جایگزین و تعویض نمایید. الکتروود را به صورت غوطه‌ور در محلول توصیه شده از سوی تولیدکننده نگهداری کنید. اجازه ندهید

^{۴۲} Tolerance

^{۴۳} Solid Agar Media

تا الکتروود کاملاً خشک شود. شیب pH متر^{۴۴} را پس از کالیبراسیون، حداقل یکبار در ماه، و ترجیحاً پس از هر بار استفاده، به این منظور که آیا pH متر دچار عیب و نقص شده است یا خیر، اندازه‌گیری و ثبت نمایید. چنانچه pH متر، دارای این امکان نیست که به صورت خودکار شیب را محاسبه نماید، لیکن قادر است که pH را به صورت میلی‌ولت (mV) هم ارائه نماید، از فرمول زیر برای محاسبه‌ی شیب استفاده کنید:

$$\text{شیب بر حسب درصد} = \frac{100}{177} \times (\text{میلی‌ولت در pH 4} - \text{میلی‌ولت در pH 7})$$

در صورتی که شیب PH متر، کمتر از ۹۵ درصد و یا بالاتر از ۱۰۵ درصد باشد، ممکن است الکتروود pH و یا pH متر نیازمند تعمیر باشند. به منظور دستیابی به جزییات کامل در ارتباط با استفاده از pH متر و نگهداری و مراقبت از آن، بخش $\text{H}^+ - 4500$ را ملاحظه نموده و یا طبق دستورعمل‌های شرکت سازنده عمل نمایید.

d- سیستم تخلیص آب: در حال حاضر سیستم‌های تجاری متعددی موجود و در دسترس می‌باشند که واجد مراحل چون پیش فیلترسازی، کربن فعال، رزین‌های بستر - مختلط و اسمز معکوس، همراه با فیلتراسیون نهایی به منظور تولید آب $\text{RW}^{\text{۴۵}}$ هستند. و تا زمانی که رزین‌ها و یا کربن فعال داخل سیستم دچار افت عملکردی نشود، این سیستم می‌تواند آبی با کیفیت مطلوب تولید نماید. در حال حاضر، برخی از سیستم‌های مجهز به عملکرد یون‌زدایی قادرند به طور خودکار رزین‌های تبادل یونی را احیا و برای فعالیت مجدد آماده کنند. توصیه میشود آب RW تولیدی دستگاه را تا هنگامی که از دستگاه $\text{UV}^{\text{۴۶}}$ مناسب جهت استریلیزاسیون آن استفاده نشده و استریلیتی آن نیز مورد تایید قرار نگرفته است، ذخیره سازی نکنید.

RW را دائماً و یا در روز استفاده، توسط یک هدایت‌سنج کالیبره‌شده، کنترل نمایید و حداقل به صورت سالیانه جهت بررسی از نظر وجود فلزات، مورد آزمایش قرار دهید. تعیین ماهانه‌ی میزان باکتری‌های هتروتروفیک، می‌تواند نشان‌دهنده‌ی وجود مشکلات بالقوه، پیش از آزمایش سایر پارامترها باشد. افزایش تعداد باکتری‌های در آب خروجی سیستم، می‌تواند بر آزمایش‌های باکتریایی تاثیر بگذارد و این افزایش تعداد می‌تواند اثباتگر حضور منابع غذایی کافی در آب RW جهت رشد باکتری‌ها ی داخل آن باشد.

^{۴۴} Slope

^{۴۵} Reagent-grade Water

^{۴۶} (UV) Ultraviolet

لازم است کنترل کیفیت آب RW، به صورت سالیانه و یا مواقعی که تعمیرات و یا تغییراتی در سیستم تامین آب انجام گرفته باشد، صورت گیرد. برای آب کلاس ۲، و یا نمونه‌ی با کیفیت بهتر، همانطور که در کتاب استاندارد متد (ویرایش هجدهم و نوزدهم)، بخش 10^8 C تعریف شده یا برای آب با کیفیت متوسط و یا آب با کیفیت بهتر، که در کتاب استاندارد متد (ویرایش‌های بیستم، بیست و یکم و نسخه‌ی آنلاین^{۴۷}) در بخش 10^8 C تعریف شده و یا مطابق با آنچه در سایر استانداردهای مورد قبول، تعریف شده است، آزمایش کیفیت باکتریولوژی مورد نیاز نمی‌باشد. لازم به ذکر است که اکثر سیستم‌هایی که امروزه در حال استفاده می‌باشند، این استانداردها را برآورده کرده و یا حتی فراتر از آن هستند.

در بازه‌های زمانی توصیه شده از سوی تولید کننده و بر مبنای تخمین کارکرد و کیفیت آب ورودی، کارتریج‌های^{۴۸} دستگاه را تعویض نمایید. منتظر خرابی و از کارافتادگی دستگاه باقی نمانید. در صورتی که تامین آب عاری از باکتری، مد نظر است اما دستگاه پرتودهی UV در دسترس نیست، می‌توانید پس از استحصال به کمک فیلتر اسیون و با یک فیلتر غشایی استریل (با منفذ ۰٫۲ میکرون)، آبی عاری از میکروب در یک محفظه‌ی استریل گردآوری نمایید. آب فیلتر شده را جهت کنترل آلودگی، مورد نظارت قرار داده و در صورت لزوم، فیلتر را تعویض نمایید.

e- دستگاه تقطیر آب: تقطیرکننده‌ها، آبی با کیفیت خوب تولید می‌نمایند که نوعاً در طول زمان و به آهستگی در اثر بروز خوردگی، آبشویی و رسوبگیری، کیفیت خود را از دست می‌دهند. این عوارض می‌توانند با نگهداری و پاکسازی مناسب مورد کنترل قرار گیرند. تقطیرکننده‌ها، به طرز موثری ذرات حل شده را جدا می‌نمایند، ولی قادر به جداسازی گازهای محلول و یا مواد ارگانیک فرار در آب نیستند. آب تازه تقطیر شده ممکن است حاوی کلر و آمونیاک (NH_3) ترکیب شده باشد. در محل ذخیره‌سازی، NH_3 و CO_2 از هوا جذب و وارد آب می‌شوند. به منظور کاهش دفعات پاکسازی تقطیرکننده، از آب تصفیه‌شده به عنوان آب ورودی استفاده کنید. بر اساس دستورعمل و شیوه‌ی استفاده‌ی ارائه شده از سوی تولید کننده دستگاه تقطیر و مخزن را تخلیه نموده و تمیز نمایید.

^{۴۷} Online

^{۴۸} Cartridges

f- دستگاه های مکانیکی تقسیم محیط کشت: در شروع هر تغییر دهی در حجم تقسیمی و به صورت تناوبی در زمان های استفاده ی طولانی، به کمک یک استوانه ی مدرج حجم مورد نظر را اندازه گیری و چک نموده و نتایج را ثبت کنید. پیش از آغاز هر بار عمل توزیع، حجم اندکی از محیط کشت را پمپ کرده و دور بریزید، و در فواصل کاری، با ریختن مقداری آب RW داغ به درون دستگاه و پمپ کردن، آن را شستشو دهید. هرگونه نشستی، اتصالات شل و یا کارکرد ناصحیح دستگاه را فوراً بر طرف و اصلاح نمایید. در پایان روز کاری، قطعات دستگاه را از هم جدا نموده، آنها را شسته و با آب RW آبکشی و خشک کنید. قطعات را بر اساس دستورعمل های سازنده و یا حداقل یکبار در ماه، روغن کاری نمایید.

g- آون/استریل کننده با هوای داغ: عملکرد آون را ماهانه و با استفاده از نوارهای اسپور بیولوژیک^{۴۹} موجود در بازار (که متعلق به خانواده ی میکروارگانسیم هایی که تکثیر آنها از طریق اسپور می باشد نظیر باسیلوس آتروفائوس^{۵۰} و ترجیحاً دارای حداقل دانسیته ی اسپور در حد 1×10^6 میباشد) انجام دهید. نوار ها را در داخل ظروف شیشه ای، شبیه ظروفی که باید استریل شوند، قرار دهید. برای سنجش دما از یک دماسنج، که حباب آن درون شن قرار گرفته و در بازه ی دمایی ۱۶۰ تا ۱۸۰ درجه ی سانتیگراد دارای عملکرد دقیق می باشد استفاده کنید و یا از یک دماسنج دیجیتال مجهز به پروب ترموکوپل^{۵۱}، برای اندازه گیری پیوسته دما استفاده کنید. از یک نوار اندیکاتور دما به منظور مشخص نمودن دمای لوازم و موادی که در حال استریل شدن هستند، استفاده کنید. نتایج کنترل و محتویات داخل آون را در فرم های مربوطه ثبت نمایید.

h- اوتوکلاو: نوع عوامل استریل شده و دمای استریلیزاسیون به علاوه مدت زمانی که آنها از زمان شروع به کار دستگاه در معرض حرارت قرار گرفته اند و مدت زمان واقعی دوره استریلیزاسیون، فشار تنظیمی و فشار واقعی خوانده شده و نام فرد مسئول برای هر دوره کاری را ثبت نمایید. اوتوکلاوهای جدید، می توانند بخش اعظم این اطلاعات را به صورت خودکار بر روی نوار چاپ نمایند. در مورد دستگاه های قدیمی تر، استفاده از نمودار ثبت دما، مورد توصیه اکید میباشد.

^{۴۹} Biological Spore Strips

^{۵۰} Bacillus atrophaeus

^{۵۱} Thermocouple-type Probe

در مورد اتوکلاوهای جدید، نمودار دمایی اولیه می‌تواند اختلافات دمایی در نقاط گوناگون اتوکلاو را مشخص نماید. برای استفاده معمول، با استفاده از یک دماسنج ثبت کننده‌ی حداکثری دما (MRT)^{۵۲}، به صورت هفتگی دمای اتوکلاو را جهت تصدیق این که آیا اتوکلاو به دمای ۱۲۱ درجه‌ی سانتیگراد می‌رسد، مورد بررسی و تایید قرار دهید.

کارایی استریلیزاسیون دستگاه اتوکلاو را با در نظر گرفتن زمان و دمای معمول استریلیزاسیون محیط کشت توسط ماده‌ی بیولوژیک نظیر ژئوباسیلوس استئاروترموفیلس^{۵۳} که به صورت تجاری در قالب نوارهای اسپور، سوسپانسیون و یا کپسول‌های با غلظت 1×10^6 ، در بازار موجود است مورد ارزیابی قرار دهید. این ارزیابی از طریق قرارگیری اندیکاتور^{۵۴} اسپور در درون ظروف شیشه‌ای حاوی یک مایع که به نوعی شبیه سازی برای عملکرد حقیقی استریلیزاسیون اتوکلاو بر روی محیط کشت محسوب میشود، میسر می‌شود. شاید برخی از اندیکاتورهای بیولوژیکی نیازمند تخصیص زمان بیشتری برای ارزیابی عملکرد اتوکلاو در بازه زمانی متعارف استریلیزاسیون محیط‌های کشت کربوهیدراتی باشند. در صورت مواجهه با این مشکل اتوکلاو را در حالی که حاوی نمونه آب رقیق شده و مواد آلوده است برای زمان بیشتر از ۲۰ دقیقه راه اندازی کنید و اندیکاتور بیولوژیکی را جهت ارزیابی عملکرد مورد استفاده قرار دهید.

علاوه بر آن از اندیکاتورهای شیمیایی مخصوص بخار که روشی سریع و مفید برای احراز حداقل شرایط فرآیند استریلیزاسیون است استفاده کنید. به طور فصلی به کمک یک زمان سنج کالیبره، زمان را مورد چک و کنترل قرار دهید. از نوارهای نشانگر حرارت که مخصوص تعیین دمای وسایل و مواد استریل شده هستند استفاده کنید. اتوکلاو را تمیز و عاری از آشغال نگه دارید و درزگیرها و فیلتر اشغالگیر کف را مدام چک و تمیز کنید.

i- یخچال: دمای یخچال را با استفاده از دماسنجی که حباب آن در آب مقطر و یا محلول گلیسرین قرار گرفته، در محدوده دمایی ۲ الی ۸ درجه‌ی سانتیگراد نگاه دارید. تهیه‌ی یک نمودار دمایی اولیه توصیه می‌شود. هنگامی که یخچال در حال استفاده می‌باشد، به صورت روزانه دمای کالیبره شده‌ی آن را چک و ثبت نموده و سالیانه یا در صورت لزوم زودتر، اقدام به تمیزکاری آن نمایید. مواد نگهداری شده در یخچال را نام و تاریخ‌گذاری کنید. هر زمان

^{۵۲} Maximum Registering Thermometer

^{۵۳} Geobacillus stearothermophilus

^{۵۴} Indicators

که لازم است یخچال را برفک‌گیری کرده و ماهیانه مواد تاریخ مصرف گذشته را دور بریزید. یخچال‌های بدون برفک ممکن است منجر به دی‌هیدراسیون^{۵۵} یا تبخیر آب سریعتر محیط‌های کشت ذخیره شده گردند. چنانچه یخچال‌ها و فریزرها به منظور نگهداری مواد قابل اشتعال استفاده شوند، بایستی از نوع ضد انفجار باشند.

فریزرها: بازه‌ی دمایی فریزر، بر اساس نیاز آزمایش تعیین خواهد شد، به عنوان مثال ممکن است دمای فریزر آزمایشگاهی استاندارد از ۱۰- تا 20 ± 5 درجه سانتیگراد دمای فریزر فوق سرد (۷۰- تا ۹۰- درجه سانتی گراد) متغیر باشد. دما را به صورت روزانه چک و ثبت نمایید. استفاده از یک دماسنج ثبات مجهز به سیستم هشدار دهنده بسیار مطلوب می‌باشد. مواد نگهداری شده را مشخص و تاریخ‌گذاری نمایید. حداقل بصورت سالیانه (و در صورت نیاز هر شش ماه یک بار) اقدام به رفع انجماد (برفک‌گیری) و پاکسازی و دور ریختن مواد تاریخ مصرف گذشته نمایید.

k-ممبران فیلتر^{۵۶}: پیش از استفاده‌ی اولیه، اجزای دستگاه را سرهم کرده و چک کنید که نشتی وجود نداشته باشد. اگر سطوح داخلی فیلترها خراشیدگی وجود داشت، آن‌ها را دور بیندازید. پس از استفاده، قطعات دستگاه را کاملاً شستشو داده و تمیز کرده، آن‌ها را در درون کاغذ غیرسمی و یا فویل پیچیده و استریل نمایید. هنگامی که از نشانه‌های درجه‌بندی موجود بر روی ابزارآلات حجم‌سنجی به منظور سنجش حجم‌های نمونه استفاده می‌شود، در ابتدا دقت نشانه‌های درجه‌بندی را با استفاده از یک استوانه‌ی مدرج کلاس A^{57} و یا پیپت حجمی چک نموده و نتایج را ثبت کنید. در مورد قیف‌های یکبار مصرف از پیش استریل‌شده، برای بررسی دقت نشانه‌گذاری درجه‌بندی حجمی، یک نمونه از هر سری (lot)^{۵۸} خریداری شده و یا مثلاً ۱ الی ۴ درصد از آنرا چک کنید.

لامپ‌های ماورابنفش: در صورت استفاده، لامپ‌ها را به صورت ماهیانه جدا کرده و حباب‌های آن‌ها را با استفاده از یک پارچه‌ی نرم آغشته به اتانول و یا مخلوط ۷۰ درصد متانول + ۳۰ درصد آب RW و یا محلول

^{۵۵} Dehydration

^{۵۶} دستگاه تصفیه غشایی

^{۵۷} ظروف کلاس A، از بالاترین استاندارد حجمی برخوردار هستند.

^{۵۸} هر سری تولید از تجهیزات و محیط کشت دارای شماره اختصاصی می باشد که فقط مربوط به همان سری می باشند. با تغییر این شماره عملیات کنترل کیفی برای سری جدید مجدداً انجام خواهد شد.

اسپکتروسکوپیک گرید ۲- پروپانول^{۵۹} که توسط آن مواد چسبیده نیز قابل جمع‌آوری خواهند بود، تمیز نمایید. لامپ‌ها را هر سه ماه یکبار با استفاده از یک نورسنج UV (موج کوتاه) مناسب مورد آزمایش قرار دهید و اگر نور خروجی کمتر از ۷۰ درصد حالت اولیه‌اش باشد، حباب UV را تعویض نمایید. به عنوان یک راهکار دیگر، در محیط کشت پلیت کانت آگار^{۶۰} که حاوی ۲۰۰ تا ۳۰۰ کلنی باکتریایی رشد یافته است را به مدت دو دقیقه در معرض تابش اشعه UV قرار دهید. سپس پلیت‌ها را در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتیگراد و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور قرار داده و کلنی‌ها را شمارش نمایید. چنانچه تعداد کلنی‌ها تا حد ۹۹ درصد کاهش پیدا نکرده بود، لامپ را تعویض نمایید.

هشدار: اگرچه نور UV موج کوتاه (۲۵۴ نانومتری)، خطرناکتر از نور UV موج بلند (۳۶۵ نانومتری، مورد استفاده جهت تشخیص فلورسنس) شناخته می‌شود، ولی با این حال، هر دو گونه از این پرتوهای UV، می‌توانند به چشم و پوست صدمه زده و سرطانزا باشند. از چشم‌ها و پوست خود در مقابل قرارگیری در معرض نور UV محافظت نمایید. از یک مکانیسم قفل کننده، به نحوی که سیستم روشنایی آزمایشگاه بدون خاموش نمودن نورهای UV بالای سر (در صورت استفاده) قادر به روشن شدن نباشند (بخش B۱۰۹۰۱ ملاحظه شود) استفاده کنید.

m-هود میکروبیولوژی (BSC): هنگامی که هودهای کلاس (۱) و (۲) به همراه روش‌های صحیح میکروبیولوژیکی مورد استفاده قرار گیرند، ایمنی موثری را جهت کار با میکرواورگانیزم‌های واجد خطر متوسط و زیاد فراهم می‌آورند (عوامل سطح دوم و سوم ایمنی زیستی). هر دو گونه از هودهای کلاس (۱) و (۲)، دارای مکنده‌ی با سرعت سطحی ۷۵ تا ۱۰۰ فوت بر دقیقه بوده که قابلیت فراهم‌آوری سطوح ایمنی قابل ملاحظه‌ای، جهت حفاظت کارکنان آزمایشگاه و محیط اطراف از ذرات آلوده‌کننده‌ی تولید شده در درون محفظه را دارند. هودهای کلاس (۲) با راندمان بالا به کمک فیلتراسیون ذرات بسیار ریز (فیلتراسیون هپا^{۶۱}) جریان هوای رو به پایین موجود بر سطح

^{۵۹} Spectroscopic grade - ۲-propanol

^{۶۰} Plate count agar

^{۶۱} HEPA filtration

کار(جریان خطی عمودی) را فیلتر و قادر به حفاظت از مواد داخل هود می باشند. رویه‌های عملکردی استاندارد به قرار ذیل می‌باشند:

(۱) قبل و بعد از استفاده، هوای داخل هود را به مدت ۱۰ الی ۱۵ دقیقه تهویه و پالایش کنید و هود را با مواد گندزدا تمیز نمایید. با استفاده از یک تکه پارچه نازک از برقراری جریان هوا در درون هود اطمینان حاصل کنید.

(۲) دستان خود را مستقیماً وارد محفظه‌ی هود کرده و کار خود را به صورت آرام و اصولی انجام دهید. مواد را به خوبی درون محفظه قرار دهید. در قسمت شبکه هوایی که جلوی هود واقع است، چیزی نگذارید و موجب مختل شدن یا مسدود شدن جریان هوای داخلی هود نشوید. ظرف حاوی مواد دور ریختنی را درون محفظه قرار دهید.

(۳) قسمت داخلی هود را پس از انجام کار و پیش از برداشت ظروف، گندزدایی کنید. اجازه دهید تا کابینت هود به مدت ۱۰ الی ۱۵ دقیقه همچنان در حال کار باشد و سپس آنرا خاموش کنید.

آزمایش و بررسی تایید عملکرد هودهای کلاس (۱) و (۲) را در محل اصلی خود در زمان نصب یا در هر زمان که هود جابجا می‌شود، و پس از آن حداقل به صورت سالیانه، انجام دهید. محفظه‌ها را مطابق با دستورعمل‌های ارائه شده از سوی تولید کننده، نگهداری و مراقبت نمایید.

n - انکوباتور حمام آب گرم^{۶۲}: بررسی و تایید نمایید که انکوباتورهای حمام آبی در دمای تنظیمی‌ای نظیر 35 ± 0.5 یا 44.5 ± 0.2 درجه سانتیگراد نگاه داشته شوند. از یک دماسنج کاملاً غوطه‌ور که دارای درجه‌بندی مورد نیاز برای دماهای انکوباسیون باشد، استفاده کنید. به هنگام استفاده از بن ماری، دمای کالیبره شده را دو مرتبه در روز کنترل و ثبت نمایید.

دستگاه را تنها با آب معرف (RW) پر نمایید. سطح آب را به گونه‌ای نگاه دارید که بالاتر از فوقانی‌ترین سطح محیط کشت در لوله‌ها و یا فلاسک‌ها باشد. به منظور دستیابی به عملکرد بهینه، حمام آب را به یک درپوش شیب‌دار جهت جلوگیری از تبخیر و همچنین یک پمپ مخصوص جهت حفظ توزیع دمایی متوازن، مجهز نمایید. در داخل بن ماری تنها از استیل ضد زنگ، پلاستیکی و یا مقاوم در برابر خوردگی استفاده کنید. به منظور جلوگیری از واژگونی ظروف و شناور شدن آنها و نگهداری مناسب محتویات داخل آنها، از نگهدارنده یا وزنه جهت

^{۶۲} بن ماری

رفع مشکل استفاده نمایید. حمام را به منظور جلوگیری از تشکیل رسوبات و رشد میکروبی به طور متناوب خالی و تمیز نموده، و پیش از آبیگری مجدد، ضدعفونی نمایید.

0-/انکوباتور: لازم است فضای داخل انکوباتور دارای دمای مناسب و یکنواختی باشد. اجازه دهید به منظور برقراری مناسب جریان هوا؛ فضای کافی میان لوازم داخل وجود داشته باشد. در داخل انکوباتور پلیت ها را بیش از تعداد ۴ عدد روی هم نچینید. قبل از انکوباسیون لازم است توجه لازم در دما و زمان مورد نیاز گرماگذاری برای محیط های کشت واجد نمونه آزمایش به عمل آید. انکوباتورهایی که هوای ساکن و پایا دارند، زمان بیشتری را برای رسیدن به دمای کشت تنظیمی صرف خواهند کرد. تمامی نمونه های سرد را پیش از قرار دادن در انکوباتور به دمای اتاق برسانید و به منظور اجتناب از پرشدن انکوباتورها با نمونه های سرد، از انکوباتورهایی استفاده کنید که دارای اندازه ی کافی باشند. در طول دوره های زمانی استفاده، دمای صحیح و کالیبره انکوباتور را دو بار در روز (صبح و بعد از ظهر، به فاصله ی حداقل ۴ ساعت)، بر روی طبقات مورد استفاده، و یا حداقل بر روی یک طبقه از بالا و یک طبقه از پایین، چک و بررسی نمایید تا از یکنواختی دما در سراسر دستگاه اطمینان حاصل کرده و آنرا ثبت نمایید. اگر از یک دماسنج شیشه ای استفاده می کنید، حباب و بدنه ی آن را تا نشانه ی غوطه وری به درون آب و یا گلیسرین فرو ببرید. به منظور دستیابی به بهترین نتایج، از یک دماسنج ثبت کننده ی دما و یک سیستم هشدار استفاده کنید. انکوباتور را در مکانی قرار دهید که دمای اتاق در آن مکان میان ۱۶ تا ۲۷ درجه ی سانتیگراد (۶۰ تا ۸۰ درجه ی فارنهایت) تنظیم شده باشد. راهکار دیگر این است که از انکوباتورهای سایزبزرگ که واجد عایق بندی عالی و گردش هوای قوی هستند، استفاده نمایید. انکوباتورها را بطور مداوم مطابق اصول بهداشتی تمیز و پاکیزه نگهدارید.

p- میکروسکوپ ها: هر بار که میکروسکوپ مورد استفاده قرار می گیرد، نوردهی کوهرل^{۶۳} را چک نمایید. عدسی های چشمی و محل قرار گیری نمونه را پس از هر بار استفاده، توسط کاغذ مخصوص تمیز نموده و هنگامی که از میکروسکوپ استفاده نمی کنید، با استفاده از یک روکش آن را بپوشانید. اطلاعات بیشتر در این زمینه در بخش ۹۰۳۰B.۲۰ و سایر بخش ها قابل دسترس می باشد.

^{۶۳} Kohler

تنها به تکنسین های آموزش دیده اجازه ی استفاده از میکروسکوپ های فلوروسنس^{۶۴} و نوری را بدهید. لامپ فلوروسنس را تحت کنترل و نظارت قرار داده و زمانی که افت قابل ملاحظه ای در فلوروسنس مشاهده نمودید، یا زمانی که تولید کننده تعویض آن را توصیه نموده، و یا حداکثر زمان استفاده ای را که دستورعمل آزمایشگاهی مشخص نموده، هر کدام از این موارد که زودتر پیش آمد، اقدام به تعویض و جایگزینی لامپ نمایید. مدت زمان کارکرد لامپ، کارایی و تنظیم آن را ثبت کنید. همواره لامپ را پس از تعویض شدن آن، مجدداً تنظیم نمایید. از اسلایدهای فلوروسنس مثبت^{۶۵} شناخته شده، به عنوان کنترل گر استفاده کنید.

q- هدایت سنج: اندازه گیری هدایت الکتریکی، به دما وابسته بوده و تاثیر دما بسته به محلول های مختلف، متفاوت می باشد. بنابراین، هدایت سنج را به صورت ماهیانه با استفاده از ماده استاندارد گواهی نامه دار با کمترین غلظت^{۶۶}، در دمای ۲۵ درجه ی سانتیگراد کالیبره کنید و یا مقدار ثابت سل^{۶۷} را با استفاده از استاندارد گواهی نامه دار با کمترین غلظت، در ۲۵ درجه ی سانتیگراد تعیین نمایید. هنگامی که مجبور به سنجش هدایت محلول در دمایی متفاوت هستید، از هدایت سنجی استفاده کنید که دارای قابلیت تصحیح خودکار دمایی باشد، یا آن که می توانید دمای محلول را اندازه گیری و ثبت نموده، و سپس میزان هدایت الکتریکی را با استفاده از فرمول مندرج در بخش B.۵b * ۲۵۱، نسبت به ۲۵ درجه ی سانتیگراد تصحیح نمایید (معمولاً به میزان ۲ درصد به ازای هر درجه ی سانتیگراد).

r- مایکروویو^{۶۸}: مایکروویوها دستگاه هایی هستند که از نظر توان و ظرفیت داخلی متنوع می باشند، با این وجود، مایکروویوها به طور گسترده جهت ذوب نمودن محیط های کشت آگار دار استریل، مورد استفاده قرار گرفته اند. جهت ذوب ضروری است از حداقل زمان و توان دستگاه استفاده شود. دستگاه را از نظر عملکرد کیفی چک نموده، و عملکرد آن را با رویه های ذوب استاندارد مقایسه کنید.

^{۶۴} Fluorescence

^{۶۵} Positive fluorescence slides

^{۶۶} Certified low-level standard

^{۶۷} Cell constant

^{۶۸} Microwave

S- میکروپیپتورها^{۶۹}: میکروپیپتورها، لوازم آزمایشگاهی بسیار دقیقی برای توزیع حجم‌های بسیار کوچک می‌باشند. آن‌ها را همراه با سرسمپلرهای دقیق که توسط تولید کننده ارائه شده، مورد استفاده قرار داده و کاملاً انتهای مخروطی سمپلر را به سرسمپلر محکم کنید تا از آب‌بندی و عدم نشت از این قسمت اطمینان حاصل نمایید. همسانی و یکنواختی در عمل پیپتینگ^{۷۰} را با اعمالی نظیر مرطوبت کردن اولیه‌ی آن، روان سازی پیستون، و ورود ۱ تا ۳ میلیمتری نوک پیپت داخل محلول، حفظ نمایید. میکروپیپتور را صرفاً در حالت عمودی جهت مکش نمونه مورد استفاده قرار دهید و اینکه میکروپیپتور و نمونه هر دو دمای یکسان و برابری داشته باشند. به منظور جلوگیری از بروز صدمات مکانیکی، بیش از عدد توصیه شده کارخانه سازنده (تعداد دفعات مکش) از آن استفاده نکنید. جهت مراقبت‌های معمول دستگاه از دستورعمل‌های تولیدکننده مانند تمیزکاری، تعویض واشر درزگیر، و روغنکاری مجدد به طور روتین پیروی نمایید، و صحت و دقت حجم توزیع شده‌ی هر پیپتور را در بازه‌های زمانی مرتبط با کاربری آن، مثلاً هر سه ماه یکبار چک کنید و چنانچه علایم آشکاری مبنی بر بی‌دقتی و خطای میکروپیپتور بروز کرد و یا نوع و مارک سرسمپلر عوض شد، زودتر چک و بررسی نمایید. حداقل به صورت سالیانه اقدام به کالیبره کردن میکروپیپتورها در محل آزمایشگاه نموده و یا آن را برای شرکت تولیدکننده ارسال نمایید. توجه داشته باشید که پیپتور با استفاده از آب کالیبره شده است، و تغییرات در ویسکوزیته‌ی مایع می‌تواند منجر به بروز تغییر در حجم مایع توزیع شده گردد. مستندات مربوطه را نگهداری نمایید.

۵. لوازم آزمایشگاهی

در صورت امکان برای تمامی لوازم آزمایشگاه؛ سوابق و گواهی‌نامه‌های آزمون کیفیت شرکت های تولیدکننده و خلوص و یا مقدار خطای مجاز (میزان تلورانس) آنها را تهیه و نگهداری نمایید.

^{۶۹} Micropipettors: ۲۳

^{۷۰} pipeting

A-ظروف شیشه‌ای: واژه‌ی "ظروف شیشه‌ای"، هم به ظروف شیشه‌ای بوروسیلیکاتی و هم به مواد پلاستیکی مقاوم در مقابل حرارت اشاره دارد. ظروف شیشه‌ای سنجش حجم، پیپت‌ها، استوانه‌های مدرج، و بشرهای درجه‌بندی شده، می‌بایست تا تلورانس حجمی تعیین‌شده، دقیق باشند. استانداردهای وضع‌شده برای کالیبراسیون لوازم حجم سنجی آزمایشگاهی را ملاحظه نمایید. ظروف شیشه‌ای حجم سنجی، عموماً متعلق به کلاس A یا کلاس B (بدون کاربری خاص) می‌باشند.

کلاس A، شامل ظروف شیشه‌ای حجم سنجی با دقت بالاتر می‌باشد. میزان خطای لوازم را برای یک وسیله به ازای هر مجموعه از آن و یا برای درصدی از آنها، مثلاً برای ۱ تا ۴ درصد از آنها، تعیین نمایید.

پیش از هر بار استفاده، ظروف شیشه‌ای را مورد بررسی قرار داده و ظروفی که لبه‌های آنها پریده و یا سطوح داخلی آنها خراش دارد، دور بیندازید. به ویژه، بطری‌های درب پیچ‌دار و بالن‌ها را در خصوص لبه‌های پریده‌ی آنها مورد توجه قرار دهید زیرا این مشکل می‌تواند موجب بروز نشتی و آلودگی نمونه و کارشناس و محیط شود. ظروف شیشه‌ای را پس از شستشو برای یافتن اثرات بجا مانده از قطرات آب، لک‌شدگی و کدرشدگی بررسی نموده و در صورت لزوم، مجدداً شستشو دهید. ظروف شیشه‌ای را در صورتی که یادداشت‌های زیادی بر روی آن نوشته شده که قابل پاک‌کردن نمی‌باشد تعویض نمایید. به منظور جلوگیری از نشست گرد و غبار به درون ظروف شیشه‌ای، یا روی آنها را بپوشانید و یا به صورت سر و ته، نگهداری نمایید.

آزمایشات زیر را برای ظروف شیشه‌ای تمیز انجام دهید:

(۱) بررسی pH: از آنجایی که زدودن کامل محلول‌های پاک‌کننده از ظروف دشوار می‌باشد، به صورت تصادفی تعدادی از ظروف شیشه‌ای تمیز را برای بررسی واکنش pH مورد بررسی قرار دهید. به ویژه اگر ظروف در معرض مواد اسیدی و یاقلیایی قرار گرفته باشند. به منظور آزمایش ظروف تمیز برای بررسی باقیمانده‌های اسیدی یاقلیایی، چند قطره برم تیمول بلو^{۷۱} چهار صدم درصد و یا اندیکاتور pH دیگری را اضافه نموده و واکنش رنگی ایجاد شده را مشاهده کنید. برم تیمول بلو در بازه‌ی قابل قبول خنثی، باید به رنگ سبز-آبی باشد.

^{۷۱} (BTB) bromthymol blue

به منظور تهیه‌ی محلول شاخص برم تیمول آبی ۰/۰۴ درصد به صورت زیر عمل کنید: ۱۶ میلی‌لیتر سود ۰/۰۱ نرمال (NaOH / ۰,۰۱N) را به ۰/۱ گرم برم تیمول بلو اضافه کرده، و حجم را توسط آب RW، به ۲۵۰ میلی‌لیتر برسانید.

۲) برای یافتن باقیمانده‌های بازدارنده بر روی ظروف شیشه‌ای و پلاستیکی، آن‌ها را مورد بررسی و آزمایش قرار دهید. برخی عوامل مرطوب‌سازی یا مواد شوینده‌ی استفاده شده در شستشوی این گونه ظروف، ممکن است حاوی مواد ضد باکتری، بازدارنده، و یا محرکی باشند که مستلزم ۶ تا ۱۲ بار آب‌کشی، جهت برطرف شدن تمامی بقایا و کسب اطمینان از عدم تاثیر مواد ضد باکتری باقیمانده، می‌باشد. به‌شرطی که آزمایش برم تیمول بلو بر روی هر دسته از ظروف شیشه‌ای انجام شده باشد، مجدداً این آزمایش را پیش از استفاده‌ی اولیه از یک ترکیب شستشودهنده و هر زمان که یک روش شستشوی جدید مورد استفاده قرار گرفت، انجام دهید. اگر آزمایش برم تیمول بلو به شیوه‌ای سیستماتیک و پایدار انجام نشده است، آزمایش سمیت را نیز به صورت سالیانه انجام دهید و نتایج را ثبت کنید. اگرچه رویه‌ی زیر توصیفگر روش بررسی ظروف کشت برای یافتن باقیمانده‌های بازدارنده بوده، ولی برای سایر ظروف شیشه‌ای یا پلاستیکی نیز قابل استفاده می‌باشد.

a) دستورعمل - شش عدد پلیت را مطابق رویه‌ی معمول آزمایشگاهی شسته و آب‌کشی نمایید، و به عنوان گروه A در نظر بگیرید. متعاقباً شش پلیت دیگر را مطابق روش فوق شسته و ۱۲ بار متوالی با آب RW آب‌کشی نموده و به عنوان گروه B بنامید. شش پلیت را با آب شستشوی مواد شوینده (در غلظت مورد استفاده) آب‌کشی کرده، بدون آب‌کشی بیشتر بگذارید در هوای محیط خشک شده، و به عنوان گروه C برگزینید.

ظروف گروه‌های A، B و C را از طریق رویه‌ی معمول، استریلیزه نمایید. شش پلیت پلاستیکی را به نمایندگی از ظروف پلاستیکی از پیش استریل شده، انتخاب کرده و به عنوان گروه D برگزینید. ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت پلیت کانت آگار تهیه و استریلیزه نمایید و در یک حمام آب ۴۴ تا ۴۶ درجه‌ی سانتیگرادی نگه‌دارید.

یک محیط کشت از باکتری انتروباکتر آئروژینوزا^{۷۲}، که می‌دانیم حاوی ۵۰ تا ۱۵۰ کلنی به ازای هر میلی‌لیتر (cfu/ml)^{۷۲} می‌باشد، را آماده کنید. ممکن است جهت دستیابی به این تعداد کلنی، یک آزمون اولیه ضرورت

^{۷۲} Enterobacter aerogenes

^{۷۲} واحد شمارش کلنی باکتری (cfu(colony-forming units) در هر میلی‌لیتر

داشته باشد. سه ظرف از هر گروه را با ۰,۱ میلی لیتر، و سه ظرف دیگر از هر گروه را با ۱ میلی لیتر محیط کشت تلقیح نمایید.

برای تمامی پلیت های تلقیح شده از شیوهی شمارش باکتری های هتروتروفیک (بخش ۹۲۱۵B) پیروی کرده و آن ها را در انکوباتور با دمای ۳۵ درجهی سانتیگراد و به مدت ۴۸ ساعت قرار دهید. پلیت های دارای ۳۰ الی ۳۰۰ کلنی را شمرده و نتایج را برحسب CFU/mL ثبت نمایید.

(b) تفسیر نتایج – در صورتی که هیچگونه عوامل سمی و یا بازدارنده ای وجود نداشته باشد، تفاوت در میانگین شمارش کلنی های موجود بر روی پلیت ها در گروه A تا D، می بایست کمتر از ۱۵ درصد باشد.

اختلافات در میانگین شمارش های کمتر از ۱۵ درصد، بین گروه A و B، و بیشتر از ۱۵ درصد میان گروه های A و C، نشانگر آن بوده که مادهی شوینده دارای ویژگی های بازدارنده ای می باشد که در طول شستشوی معمول حذف و برطرف می گردند. تفاوت های بیشتر از ۱۵ درصد میان گروه های B و D، نشانگر وجود یک باقیماندهی بازدارنده، و همچنین لزوم عدم استفاده از ظروف پلاستیکی برای آزمایشها و تحلیل های میکروبیولوژیکی می باشد. ممکن است یک رویه ی شستشوی نوین، تجهیزاتی جدید یا تهیهی مواد شویندهی دیگری مورد نیاز باشد.

b-وسایل و ظروف مورد استفاده برای تهیهی محیط کشت: از وسایل و ظروفی از جنس شیشهی بوروسیلیکات، فولاد ضد زنگ (استیل)، آلومینیوم و یا سایر مواد مقاوم در برابر خوردگی استفاده نمایید (بخش ۹۰۳۰B.۸ را مشاهده کنید). از ظروف مسی استفاده نکنید.

C-بطری های آب رقیق سازی: از بطری های درجه بندی شده تا سطح ۹۹ میلی لیتر و ساخته شده از شیشهی بوروسیلیکات واکنش ناپذیر و یا پلاستیک در پیچ دار با لایه ی درونی خنثی استفاده نمایید. پیش از استفاده، آن ها را تمیز کنید. بطری های آماده ی آب رقیق سازی موجود در بازار، نیز قابل قبول می باشند. پیش از استفاده از هر دسته و یا مجموعه، آزمایش استریل بودن را انجام دهید، یک نمونه از مجموعه و یا درصدی از آن، مثلاً ۱ تا ۴ درصد را در ارتباط با مقدار pH و حجم (99 ± 2 میلی لیتر) چک نمایید، و بطری های آب رقیق سازی را در ارتباط با رسوبگیری مورد بررسی و ارزیابی قرار داده، و در صورت وجود رسوب، آن ها را دور بیندازید. بطری ها را در صورت نیاز، دوباره با استفاده از اسید تمیز نموده و مجدداً آب رقیق سازی را تهیه نمایید. در صورتی که رسوبگیری تکرار گردید منبع

دیگری برای تهیه‌ی بطری‌ها فراهم کنید. حجم آب را، تحت شرایط نگهداری آن و در فواصل منظم، به منظور تعیین نرخ کاهش حجم چک نمایید. در صورت رسیدن به تاریخ انقضا آن‌ها را دور بیندازید.

d-بطری‌های نمونه‌برداری: از بطری‌های شیشه‌ای بوروسیلیکاتی واکنش‌ناپذیر دهانه گشاد و یا پلاستیکی دربیچ‌دار (که بایستی دارای لایه‌ی درونی باشد) و یا کیسه‌های پلاستیکی استریلیزه‌ای که به صورت آماده در بازار موجود بوده، با اندازه‌ی کافی و مناسب به منظور جمع‌آوری نمونه‌ی مورد نیاز که در عین حال دارای فضای خالی کافی جهت تکان دادن نمونه در درون ظرف نیز باشند، استفاده نمایید. بطری‌ها را قبل از استفاده و بسته به نوع استفاده، تمیز و استریلیزه نمایید، و عامل کلرزدا‌ی کافی جهت خنثی‌سازی کلر باقیمانده اضافه نمایید (بخش ۹۰۶۰A.۲ را مشاهده کنید). جهت بررسی استریل بودن، حداقل یک بطری نمونه‌برداری را به ازای هر دسته از بطری‌های استریل‌شده در آزمایشگاه و یا یک بطری نمونه‌گیری را به ازای هر مجموعه‌ی خریداری شده به عنوان استریل، و یا یک درصدی از آن، نظیر ۱ الی ۴ درصد را مورد آزمایش قرار دهید. نتایج را مستندسازی نمایید. چنانچه درون بطری رشدی به وجود آمد، تمامی دسته و یا مجموعه را دوباره استریل کنید. اثر عامل کلرزدا را برای یک بطری به ازای هر دسته یا مجموعه، بررسی و ثبت نمایید. همچنین برای یک بطری به ازای هر مجموعه، دقت درجه‌بندی ۱۰۰ میلی‌لیتر را (در صورت وجود) و ویژگی‌های اوتو-فلوئورسنسی^{۷۴} را (چنانچه برای آزمون فلوئورسنس استفاده می‌شود)، چک نموده و نتایج را ثبت کنید.

e-سینی‌های چندچاهکه^{۷۵} و درزبندها (یا مهر و موم کننده‌ها): استریل بودن سینی‌های چندچاهکه را هنگامی که برای تحقیقات مرتبط با رشد مورد استفاده قرار می‌گیرند، برای یک عدد به ازای هر مجموعه، از طریق افزودن ۱۰۰ میلی لیتر تریپیک سوی براث^{۷۶} و یا یک محیط کشت گندزدایی‌شده‌ی دیگر، مهر و موم نمودن آن، و قرار دادن در دستگاه انکوباتور در دمای 35 ± 0.5 درجه سانتیگراد برای حداکثر ۴۸ ساعت، کنترل و بررسی نمایید. عدم وجود هرگونه رشد، نشانگر استریل بودن آن خواهد بود. توجه داشته باشید که اگر چاهک‌ها خیلی تیره و کدر شوند (نشانگر شرایط غیر استریل)، این عامل می‌تواند باعث تولید گاز و ترکیدگی همزمان در میان سوراخ‌ها گردد.

^{۷۴} Auto-fluorescence

^{۷۵} Multi-well trays

^{۷۶} Tryptic Soy Broth

عملکرد مهر و موم سازی درزگیر حرارتی را به صورت ماهیانه، با افزودن یک یا دو قطره از یک رنگ خوراکی به ۱۰۰ میلی لیتر نمونه آب یون زدایی شده، مورد ارزیابی قرار داده و هر سوراخ را به صورت بصری برای یافتن نشتی چک کنید. تمیزکاری و نگهداری پیشگیرانه را در مورد درزگیر به صورت سالیانه و یا در صورت نیاز، زودتر از آن انجام دهید.

صفحات میکروتیتر^{۷۷}، در انواع مختلف روش‌های تحلیلی مورد استفاده قرار می‌گیرند، به عنوان مثال در تحقیقات هیبریدیزاسیون^{۷۸} (پیوندزدن) DNA و ایمنواسی^{۷۹}، و ممکن است دارای بیش از ۹۶ سوراخ باشد. آزمایشگاه می-بایست سوراخ‌های سینی را برای بررسی یکنواختی و همسانی آنها مورد ارزیابی قرار داده و کنترل‌های مناسب و مقتضی را اجرا نماید. چنانچه استفاده از این صفحات مستلزم سم‌زدایی بوده، آزمایشگاه ممکن است نیازمند انجام ایمن‌کن‌ن‌نی‌ار نی‌ز باش‌د.

^{۷۷} Microtiter plates

^{۷۸} Hybridization

^{۷۹} Immunoassay

f- آب معرف (RW): از آب RW برای تهیه و آماده‌سازی محلول‌ها و محیط کشت، و همچنین برای آب‌کشی نهایی ظروف شیشه‌ای استفاده نمایید. این آب می‌بایست حتماً عاری از هر گونه مواد بازدارنده و ضد باکتری باشد. کیفیت آب به‌دست‌آمده از یک سیستم تصفیه‌ی آب، بسته به سیستم استفاده شده و نحوه‌ی نگهداری آن، متفاوت می‌باشد. بخش‌های ۹۰۲۰B.۴d,e را مشاهده کنید. حدود مجاز توصیه شده در ارتباط با کیفیت آب RW برای آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی، در قالب جدول ۹۰۲۰:II ارائه گردیده‌است. اگر این حدود، برآورده نشدند، اقدام به زمینه‌یابی و تصحیح آن و یا تغییر منبع آبی خود نمایید. اگرچه اندازه‌گیری pH آب دیونیزه، از طریق میزان انحراف آن مشخص می‌شود، ولی با این حال، مقادیر خوانده‌شده که دارای انحراف زیاد از pH=۷ بوده، نشان‌دهنده‌ی آلودگی شیمیایی می‌باشد.

جدول ۹۰۲۰:II کیفیت آب مقطر مورد استفاده در آزمایش میکروبیولوژی

TABLE 9020:II. QUALITY OF REAGENT WATER USED IN MICROBIOLOGY TESTING

Test	Monitoring Frequency	Maximum Acceptable Limit
Chemical tests:		
Conductivity	Monthly*	<2 $\mu\text{mhos/cm}$ ($\mu\text{siemens/cm}$) at 25°C
Total organic carbon	Monthly	<1.0 mg/L
Heavy metals, single (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, and Zn)	Annually†	<0.05 mg/L
Heavy metals, total	Annually†	<0.10 mg/L
Total chlorine residual	Monthly or with each use	<0.1 mg/L
Bacteriological tests:		
Heterotrophic plate count (See Section 9215)	Monthly	< 500 CFU/mL
Use test: [(see 9020B.5/2)]	For a new source	Student's $t \leq 2.78$
Water quality test [see 9020B.5/1.]‡	Annually	0.8–3.0 ratio

* Monthly, if meter is in-line or has a resistivity indicator light; otherwise with each new batch of reagent water.

† Or more frequently if there is a problem.

‡ This bacteriological quality test is not needed for Type II water or better, as defined in *Standard Methods* (18th and 19th Editions), Section 1080C, or medium-quality water or better, as defined in *Standard Methods* (20th, 21st, and Online Editions), Section 1080C.



شرکت مهندسی آب و فاضلاب کشور

معاونت نظارت بر بهره برداری

دفتر نظارت بر بهداشت آب و فاضلاب

دستورعمل روش های کنترل کیفیت آزمون های میکروبیولوژیکی آب

قسمت دوم

ویراست نخست- خرداد ماه ۱۳۹۴

اعضای تدوین دستورعمل روش های کنترل کیفیت آزمون های میکروبیولوژیکی آب

رئیس:

سمت و/یا نمایندگی

فرهاد پور، ژاله

کارشناس کنترل کیفیت

شرکت مهندسی آبفای کشور

دبیر:

باغبان ، مهتاب

رئیس گروه کنترل کیفیت

و بهداشت آب استان تهران

اعضاء

مهرنوش امیر مظاهری

کارشناس نظاربهداشت

و کیفیت آب استان تهران

مرتضی برغمندی

ناظر عالی آزمایشگاه های

شرکت آبفای خراسان رضوی

سمیه پارسا نیا

کارشناس میکروبیولوژی

شرکت آبفا آذربایجان غربی

نوشین سهراب نیا

کارشناس مسئول امور آزمایشگاه مرجع

زهره ضرغامپور
رئیس قسمت کنترل
کیفیت و فرآیند تصفیه خانه های آب و فاضلاب

علی عبدالعظیمی
کارشناس مسئول کنترل
کیفیت و بهداشت آب شرکت آبفای منطقه ۳ شهر تهران

ابوذر غفاری
رئیس اداره کنترل کیفی
و امور آزمایشگاه های آبفای استان فارس

محبوبه کلاته
مدیر آزمایشگاه مرکزی

شرکت آبفای خراسان رضوی

ناصر محبی
کارشناس بیولوژی

شرکت آبفا شهرها و شهرکهای غرب

مهیار مستقیم
مدیر کنترل

کیفیت و بهداشت آب و فاضلاب استان البرز

سهیل معتبر
کارشناس مسئول معاونت

نظارت بر بهره برداری استان تهران

ماریا نقیب
کارشناس مسئول میکروبیولوژی

شرکت آبفا اهواز

شایان ذکر است ضمن تشکر ویژه از زحمات جناب آقای مهندس عبدالعظیمی و جناب آقای مهندس برغمندی عهده دار مکاتبات این دستور عمل سرکار خانم مهندس نوشین سهراب نیا (nsohrabnia@hotmail.com) می باشند.

مقدمه :

این دستورعمل ترجمه قسمت های ۹۰۱۰ الی C ۹۰۲۰ می باشد. با توجه به الزامات استاندارد ISO ۱۷۰۲۵ مبنی بر انجام آزمون ها بر اساس استانداردهای تایید شده، و الزام استقرار این استاندارد در کلیه آزمایشگاه های آب و فاضلاب کشور، مقرر گردید جهت یکپارچه سازی روش های آزمون در کلیه آزمایشگاه، نسبت به یکسان سازی دستورعمل آزمایشگاهی اقدام به عمل آید. بنابراین در گروه های کاری مختلف ترجمه قسمت های استاندارد متد در دستور کار قرار گرفت.

قسمت اعظم این بخش از استاندارد متد ۲۰۱۲ به کنترل کیفی آزمون ها و چگونگی انجام آن می پردازد که اهمیت ویژه ای در فرایند انجام آزمایش، کنترل تجهیزات، مواد و محیط های کشت داشته و همچنین در فراهم نمودن الزامات استاندارد ISO ۱۷۰۲۵ نقش بسزایی دارد. تمام تلاش همکاران این کار گروه در این راستا متمرکز است تا این دستورعمل مورد استفاده کلیه همکاران قرار بگیرد. تمامی بخش ها، شماره ها و قسمت بندی ها عیناً بر اساس کتاب استاندارد متد تنظیم گردیده است تا همکاران محترم در یافتن مطالب و مطابقت دادن با متن اصلی با حداقل مشکلات مواجه شوند.

۱) آزمایش بررسی کیفیت باکتریولوژیکی- این آزمایش، که تحت عنوان آزمایش مناسب بودن آب نیز شناخته می‌شود، بر مبنای رشد/تتروباکتر/آئروزینوزا در محیط کشت شیمیایی، می‌باشد. وجود یک عامل سمی و یا یک ماده‌ی افزایش‌دهنده‌ی رشد، در مدت ۲۴ ساعت، جمعیت را دچار افزایش و یا کاهش ۲۰ درصدی و یا بیشتر، در مقایسه با یک نمونه‌ی کنترلگر، خواهد نمود. این آزمایش را حداقل به صورت سالیانه، هنگامی که منبع آب دیونیزه تغییر داده می‌شود و در زمانی که یک مسئله‌ی تحلیلی بروز می‌کند، انجام دهید. این آزمایش بررسی کیفیت باکتریولوژیکی، برای آب نوع دوم و یا انواع بهتر از آن، همان‌گونه که در/استاندارد روش (ویرایش هجدهم و نوزدهم)، بخش ۱۰۸۰C تعریف شده، و یا آب با کیفیت متوسط و یا بهتر از آن، همان‌طور که در/استاندارد روش (ویرایش بیستم و بیست و یکم، و نسخه‌ی آنلاین)، بخش ۱۰۸۰C بیان شده، مورد نیاز نمی‌باشد.

به منظور حصول اطمینان از این که کیفیت مستمر این آب، شرایط این استانداردهای جایگزین را برآورده می‌کند، آن را بررسی و آزمایش نمایید.

این آزمایش پیچیده، و مستلزم مهارت و تجربه بوده، و به سهولت بر اساس یک مبنای غیر مداوم یا نامنظم، قابل انجام نمی‌باشد. این آزمایش نیازمند کاری بیش از چهار روز، آبی فوق خالص از یک منبع مستقل به عنوان یک کنترلگر، معرف‌هایی با خلوص بالا، و پاکیزگی حداکثری بالن‌های کشت، پلیت‌ها، لوله‌های آزمایشگاهی، پیپت‌ها و سایر تجهیزات می‌باشد.

a) ابزارآلات و مواد - از ظروف شیشه‌ای بوروسیلیکاتی برای تمامی مراحل استفاده کنید، اگرچه، پلیت‌های پلاستیکی از پیش استریل شده نیز می‌توانند در مراحل کشت پلیت مورد استفاده قرار گیرند. آن‌ها را با استفاده از آب مقطر که به تازگی توسط یک تقطیرکننده‌ی شیشه‌ای، برای بار دوم تقطیر شده، آب‌کشی نموده، و سپس ظروف شیشه‌ای را توسط حرارت خشک استریلیزه نمایید؛ استریلیزاسیون توسط بخار، موجب آلودگی مجدد این ظروف، که به شکلی خاص تمیز شده‌اند، می‌گردد. میزان حساسیت و قابلیت تکثیر میکروارگانیسم‌ها در ظروف نمونه‌برداری، بالن‌ها، لوله‌ها و پیپت‌ها را که تا حدی وابسته به تمیزی و

پاکیزگی آنها می‌باشد، مورد آزمایش قرار دهید. غالباً، بهتر آن است که ظروف شیشه‌ای جدید را برای استفاده در این آزمایش خاص، اختصاص دهید. از هر گونه کلیفرم با تایپ + - - IMViC (*E. aerogenes*) + می‌توان استفاده نمود، این کلی فرم می‌تواند از یک نمونه‌ی آب محیطی، یا نمونه‌ی پساب به دست آمده باشد و یا از سوش مرجع استفاده گردد.

(b) معرف‌ها - تنها از معرف‌ها و مواد شیمیایی متعلق به گرید^۱ ACS استفاده کنید. میزان حساسیت آزمایش، تا حدی تحت کنترل خلوص معرف قرار دارد. معرف‌ها را در آبی که توسط یک تقطیرکننده‌ی شیشه‌ای، دو بار تقطیر شده اند از قرار زیر تهیه نمایید:

- محلول سیترات سدیم: ۰/۲۹ گرم سیترات سدیم ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) را در ۵۰۰ میلی لیتر آب حل نمایید.

- محلول سولفات آمونیوم: ۰/۲۶ گرم $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ را در ۵۰۰ میلی لیتر آب حل نمایید.

- محلول نمک ترکیبی: ۰/۲۶ گرم سولفات منیزیم ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)، ۰/۱۷ گرم کلرید کلسیم ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)، ۰/۲۳ گرم سولفات آهن ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)، و ۲/۵۰ گرم کلرید سدیم (NaCl) را در ۵۰۰ میلی لیتر آب حل نمایید.

محلول بافر فسفات/آب رقیق‌سازی: محلول بافر فسفات موجود (بخش ۹۰۵۰C.۱a) را به نسبت ۱:۲۵ در آب، رقیق‌سازی نمایید.

تمامی محلول‌های معرف را به منظور کشتن سلول‌های قابل رشد موجود در آن، به مدت ۱ الی ۲ دقیقه بجوشانید. محلول‌ها را در بطری‌های شیشه‌ای درپوش‌دار استریل شده، در تاریکی و در دمای ۵ درجه‌ی سانتیگراد به مدت حداکثر چند ماه ذخیره‌سازی نمایید، مشروط بر اینکه پیش از هر بار استفاده، جهت بررسی استریل بودن، مورد آزمایش قرار گیرند. از آن جایی که محلول نمک ترکیبی، در عرض ۳ تا ۵ روز، به دلیل تبدیل نمک آهن به حالت یون آهن ۳ ظرفیتی (فریک)، کمی تیره و کدر خواهد شد، محلول نمک

^۱ Grade

ترکیبی را برای ذخیره‌سازی بلندمدت، بدون استفاده از FeSO_4 تهیه نموده و برای استفاده از این ترکیب، مقدار مناسبی نمک آهن که به تازگی تهیه و جوشانده شده، به آن بیفزایید. محلول‌های با کدورت بالا را دور ریخته و محلول جدیدی تهیه نمایید. اگر محلول دچار تیرگی و کدورت شد، آنرا دور بریزید.

(C) - نمونه‌ها - به منظور آماده‌سازی نمونه‌های آزمایش، اقدام به جمع‌آوری ۱۵۰ تا ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر آزمایشگاهی و آب کنترل (دو بار تقطیرشده) در بالن‌های شیشه‌ای بوروسیلیکاتی استریل نموده و آنها را به مدت ۱ الی ۲ دقیقه بجوشانید. به منظور جلوگیری از ایجاد تغییرات شیمیایی، از جوشاندن طولانی‌تر خودداری کنید.

(d) - دستورعمل - پنج بالن یا لوله‌ی آزمایش را با برچسب‌های A, B, C, D و E مشخص کنید. در هر بالن مطابق جدول III: ۹۰۲۰ محیط کشت را آماده کنید. یک سوسپانسیون از *E.aerogenes* (IMViC type - - + +) که به صورت تشریح‌شده در زیر تهیه و آماده می‌گردد، با دانسیته‌ای که هر بالن حاوی ۳۰ تا ۸۰ سلول در هر میلی‌لیتر باشد، اضافه نمایید. دانسیته‌های سلولی پایین‌تر از این بازه، منجر به نسبت-های ناسازگاری خواهند شد، در حالی که دانسیته‌های بالاتر از ۱۰۰ سلول در هر میلی‌لیتر، منجر به کاهش میزان حساسیت نسبت به مواد مغذی در آب تحت آزمایش خواهند گردید.

(e) تهیه‌ی سوسپانسیون باکتریایی - در روز قبل از انجام آزمایش مناسب‌بودن آب مقطر، یک گونه از *انتروباکتر آئروژینوزا* را درون یک نوترینت‌آگار شیب‌دار، با شیب حدود ۶/۳ سانتیمتر، که داخل یک لوله‌ی آزمایش درپیچ‌دار ۱۶×۱۲۵ میلیمتری قرار گرفته، کشت دهید. تمامی سطح آگار را به منظور ایجاد یک لایه‌ی نازک از رشدی پیوسته، کشت خطی داده و به مدت ۱۸ الی ۲۴ ساعت درون انکوباتور با دمای ۳۵ درجه‌ی سانتیگراد قرار دهید.

(f) برداشت سلول‌های زنده - بوسیله‌ی pipette، یک تا دو میلی‌لیتر آب رقیق‌سازی استریل را، از یک آب شاهد ۹۹ میلی‌لیتری، به روی محیط کشت ۱۸ تا ۲۴ ساعته، بریزید. کلنی‌های رشدیافته بر روی سطح شیب‌دار را

از طریق تکان دادن لوله‌ی آزمایش، به حالت امولسیون درآورده، سپس این سوسپانسیون را توسط پیپت به درون آب شاهد ۹۹ میلی‌لیتری اولیه دوباره بازگردانید.

g) رقیق‌سازی سوسپانسیون باکتریایی – یک رقیق‌سازی ۱:۱۰۰ از بطری اولیه درون آب شاهد دوم و یک رقیق‌سازی ۱:۱۰۰ دیگر از بطری دوم درون آب شاهد سوم، و یک رقیق‌سازی ۱:۱۰ از بطری سوم درون آب شاهد چهارم انجام دهید، پس از هر انتقال آنرا به شدت تکان داده و به هم بزنید. توسط پیپت ۱ میلی‌لیتر از رقیق‌سازی چهارم (10^{-5}) را درون بالن‌های A، B، C، D و E بریزید. این روش می‌بایست منجر به تولید یک رقیق‌شدگی نهایی از ارگانیسم‌ها تا یک بازه‌ی ۳۰ تا ۸۰ سلول زنده در هر میلی‌متر از محلول آزمایش، شود.

h) بررسی و تایید دانسیته‌ی باکتریایی – تنوع‌های موجود میان گونه‌های یک ارگانیسم یکسان، ارگانیسم‌های متفاوت، محیط کشت و مساحت سطح شیب‌های آگار، احتمالاً تنظیم رویه‌ی رقیق‌سازی را جهت رسیدن به یک بازه‌ی دانسیته‌ی مشخص، بین ۳۰ تا ۸۰ سلول زنده، الزامی خواهند نمود. به منظور تایید و تثبیت عددی بازه‌ی رشد برای یک ارگانیسم و محیط کشت مشخص، مجموعه‌ای از شمارش سلول‌های موجود در پلیت‌ها را، جهت تعیین نمودن دانسیته‌ی باکتریایی، از رقیق‌سازی سوم، انجام دهید. حجم مناسبی از این رقیق‌سازی سوم را انتخاب نمایید که در صورت رقیق شدن به واسطه‌ی ۳۰ میلی‌لیتر در بالن‌های A، B، C، D و E، حاوی ۳۰ تا ۸۰ سلول زنده در هر میلی‌لیتر باشد. اگر دستورعمل‌های مربوط به مساحت سطح شیب‌دار و روش آزمایشگاهی استاندارد شوند، تکرار نتایج درباره‌ی آزمایشات مکرر با یک گونه‌ی یکسان از میکروارگانیسم، امکان پذیر می‌باشد.

جدول ۹۰۲۰:III افزودن معرف برای آزمایش کیفیت آب

TABLE 9020:III. REAGENT ADDITIONS FOR WATER QUALITY TEST

Media Reagents	Control Test mL		Optional Tests mL		
	Control A	Test Water B	Carbon/Nitrogen Available C	Nitrogen Source D	Carbon Source E
Sodium citrate solution	2.5	2.5	—	2.5	—
Ammonium sulfate solution	2.5	2.5	—	—	2.5
Salt-mixture solution	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Phosphate buffer (7.3 ± 0.1)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Unknown water	—	21.0	21.0	21.0	21.0
Redistilled water	21.0	—	5.0	2.5	2.5
Total volume	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0

- ا) مسائل موجود در روش های اجرایی - مشکلات موجود در روش های اجرایی شامل موارد زیر می باشد:
- ذخیره سازی آب نمونه، در ظروفی از جنس شیشه نرم یا ظروف شیشه ای با درپوش های فاقد لاینر (نوار لاستیکی).
 - استفاده از مواد شیمیایی بدون در نظر گرفتن گرید (درجه) معرف و یا شرکت سازنده ی قبلی.
 - آلودگی آب معرف از طریق آب مقطر آلوده به باکتری (برای جلوگیری از این نوع آلودگی و به منظور بررسی آلودگی محلول ذخیره شده لازم است قبل از آغاز آزمایش، یک شمارش پلیت باکتری هتروتروف بر روی محیط های کشت و معرف های شیمیایی صورت گیرد).
 - عدم موفقیت در محاسبه تراکم باکتری ها و یا عدم انتخاب صحیح رقت مورد استفاده در شمارش پلیت ۲۴ ساعته.
 - تاخیر در کشت پلیت (آزمایش پور پلیت) و طولانی تر شدن زمان انکوباسیون بیشتر از ۲۶ ساعت که می تواند به واکنش رشد حساسیتی منجر شود.
- ز) محاسبات - مواد بازدارنده رشد از این فرمول محاسبه می شود:

$$\text{نسبت} = \frac{\text{شمارش کلنی B، ml بالن}}{\text{شمارش کلنی A، ml بالن}}$$

اگر عدد بدست آمده بین ۰,۸ تا ۱,۲ باشد هیچ ماده سمّی قابل مشاهده نیست و عدد کم تر از ۰,۸ نشان دهنده ی وجود مواد بازدارنده ی رشد در نمونه آب می باشد.

در منابع حاوی نیتروژن و کربن :

$$\text{نسبت} = \frac{\text{شمارش کلنی C، ml بالن}}{\text{شمارش کلنی A، ml بالن}}$$

منابع حاوی نیتروژن که در افزایش رشد نقش دارند:

$$\text{نسبت} = \frac{\text{شمارش کلنی D، ml بالن}}{\text{شمارش کلنی A، ml بالن}}$$

منابع حاوی کربن به عنوان افزاینده ی رشد باکتریایی:

$$\text{نسبت} = \frac{\text{شمارش کلنی E، ml بالن}}{\text{شمارش کلنی A، ml بالن}}$$

در شرایطی که در اولین تناسب، واکنش سمی مشاهده نشود دیگر نیازی به محاسبه ی سه تناسب بعدی نیست. هرگاه تناسب ها بالای ضریب ۱,۲ را نشان دهد یعنی یک منبع قابل دسترس برای رشد باکتری ها وجود دارد.

k) تفسیر نتایج- بین تعداد کلنی های بالن A بعد از گذشت ۲۰ تا ۲۴ ساعت در شرایط دمایی ۳۵ درجه سانتیگراد و تعداد ارگانیسیمهای اولیه بالن A و نژاد به کار رفته /نتروباکتر/ آئروژینوز/ وابستگی وجود دارد. بنابراین بالن A در هر سری تست، طرح و برنامه ریزی کنترل را در دست دارد. به هر حال در نژاد معینی از /نتروباکتر/ آئروژینوز/ و تحت شرایط محیطی یکسان با مورد قبل چنانچه تعداد ارگانیسیم های استقرار یافته اولیه با مورد یاد شده قبلی یکسان باشد منطقی به نظر می رسد که تعداد کلنی در شمارش نهایی ثابت باقی بماند. تعداد ارگانیسیم هایی که در مرحله ی اولیه معادل ۳۰ تا ۸۰ بوده است حدوداً سه برابر بیشتر از ۸۰ ارگانیسیمی می شود که در مرحله ی اولیه به بالن A وارد شده بود که این میزان نمایانگر ثابت بودن درصد رشد است. بنابراین یکسان بودن نسبی شمارش اولیه کلنی در بالن A و B ضرورت دارد.

مقدار تناسب بیش تر از ۱,۲ می تواند حاکی از وجود مواد محرک رشد باشد. این رویه ی اجرایی از حساسیت زیادی برخوردار است و میزان تناسب بیش تر از ۳,۰ در فعالیت های آزمایشگاهی حقیقی از اهمیت ناچیزی برخوردار است. بنابراین اگر میزان تناسب بین ۱,۲ و ۳,۰ باشد انجام آزمایشات D, C و E تنها در شرایطی خاص ضرورت پیدا می کند. معمولاً مقدار تناسب در بالن C در سطحی بسیار پایین قرار دارد. این میزان در بالن های D و E به ۱,۲ می رسد و نسبت تناسب بالن های B به A حدفاصل ۰,۸ و ۱,۲ خواهد بود. نیتروژن و کربن آلی عوامل محدود کننده ی رشد در بالن A هستند. مقادیر زیاد نیتروژن آمونیاک فاقد کربن آلی می تواند موجب افزایش تناسب بالن D به میزان بیش تر از ۱,۲ شود و عدم وجود نیتروژن حاوی کربن غلیظ می تواند موجب افزایش میزان تناسب به بیش از ۱,۲ در بالن E و تناسب B:A حد فاصل ۰,۸ و ۱,۲ شود.

تناسب کم تراز ۰,۸ نمایانگر وجود موادمسمی درآب است و این نسبت دربرگیرنده ی تمام غلظت های مجاز می باشد. همان طوری که در پارگراف قبل به آن اشاره شد میزان نسبت می تواند از ۱,۲ به ۳,۰ برسد بدون این که نتایج نامطلوبی درپی داشته باشد.

به کارگیری کمیت های اصلاحی ویژه در تجهیزات تقطیر معیوب شده پیشنهاد نمی شود. به هر حال بازرسی دقیق لوازم تقطیر و نظارت برنحوه ی تولید وجابه جایی آب مقطر می تواند به تعیین محل عیب و رفع مشکل به وجود آمده کمک کند.

آب مغذی معمولاً از یک ستون جداساز یون و فیلترکربن عبور داده می شود. چنانچه این ستون ها درست عمل کنند بیش تر آلاینده های غیرآلی و آلی جداسازی می شوند چنانچه دستگاه از لحاظ عملکرد در شرایط مناسب قرار نداشته باشد کیفیت آب ورودی به کیفیتی پایین تر از آب خام شهری می رسد. بهترین سیستم تقطیر از کوارتز و یا شیشه بوروسیلیکاتی با سیلیکات چگالی بالا و تحمل حرارتی ویژه ساخته می شود استفاده از دستگاه تقطیر با روکش قلع توصیه نمی شود. برای اتصالات آب از استیل ضدزنگ، شیشه های از جنس بوروسیلیکات و یا لوله های پلاستیکی مخصوص از جنس پلی وینیل (پی وی سی)^۲ استفاده کنید. مخازن ذخیره را در محلی به دور از گرد و غبار نگه داری کنید.

(۱) حساسیت تست- چنانچه مس را به عنوان مقیاس نسبی اندازه گیری مواد سمی درآب مقطر در نظر بگیریم حداکثر حساسیت تست در نمونه آب مقطر معادل ۰,۰۵mgCu/L می باشد.

(۲) از آزمایش برای ارزیابی آب معرف، محیط کشت و ممبران استفاده کنید- هنگامی که از آب معرف جدید و یا از سری جدی محیط کشت و یا سری جدید ممبران فیلتراستفاده شود برای آزمایش برابری محصول، می توان مقایسه سری جدید (به عنوان مرجع) را با سری در حال استفاده و با کشت سوش باکتریایی مرجع مورد بررسی قرار داد. این آزمایش در برای منابع جدید آب معرف همیشه امکان پذیر نیست، چون سیستم قبلی ممکن است در دسترس نباشد.

^۲ Polyvinyl chloride

a) روش اجرایی - یک مجموعه کنترل آب (خالص کردن آب مقطر دو بار تقطیر و یک بار تقطیر در فرآیند دیونیزاسیون)، ظرف شیشه ای، فیلترهای غشایی و یا دیگر مواد مورد نیاز برای بررسی تمام متغیرهای موجود به غیر از یکی از فاکتورهای مورد بررسی استفاده نمایید. روش کشت بشقابی و یا کشت سطحی و یا کشت پلیت ممبران فیلتر را در رابطه با سری مرجع و سری در حال استفاده مطابق با روش های ارائه شده در بخش های ۹۲۱۵ و ۹۲۲۲ عیناً همانندسازی کنید. حداقل هر یک از موارد آزمایش را بر روی پنج نمونه آب مثبت مختلف با ارزیابی وجود ارگانیسم های هدف و یا سوش کنترلی با تراکم مشخص مثبت انجام دهید. آزمایش را تکرار کنید و به منظور افزایش آشکارسازی تفاوت های موجود میان مجموعه های مرجع و سری های آزمایش، آزمایشاتی بر روی نمونه های اضافی انجام دهید.

بعد از اجرای تست کاربردی بر روی آب معرف، آزمایشاتی به موازات آزمایشات قبلی و بر اساس کمیت باکتریایی و با استفاده از آب با کیفیت بالا تحت عنوان کنترل آب صورت دهید. آب رقیق سازی/شست و شو و محیط کشت را با منبع جدید آب معرف و آب کنترل تهیه نمایید. آب را در تمام موارد (رقیق سازی، شست و شو، آماده سازی محیط کشت و...) آزمایش نمایید.

b) شمارش و محاسبات - بعد از انکوباسیون، کلنی های باکتریایی دو مجموعه را از لحاظ اندازه و ظاهر مورد مقایسه قرار دهید. چنانچه کلنی های موجود در پلیت های مجموعه مرجع غیرعادی باشد و یا این که تا حد قابل توجهی کوچکتر از کلنی های پلیت های مجموعه مرجع باشد بدون در نظر گرفتن تفاوت های موجود در شمارش، مشاهدات مربوط به بازدارندگی رشد یا دیگر مسائل به وجود آمده را به ثبت رسانید. مقادیر موجود در پلیت ها را شمارش کنید و شمارش را در هر ۱ ml یا ۱۰۰ ml به طور جداگانه انجام دهید. مقادیر را به لگاریتم تبدیل و نتایج لگاریتم دو مجموعه را در ستون های موازی وارد نمایید. اختلاف نتایج دو تبدیل را در هر نمونه با علامت های + یا - ، مقدار میانگین، $\bar{d}$ و انحراف استاندارد Sd این اختلاف ها را محاسبه نمایید (بخش B ۱۰۱۰) . $t_{student}$ را با استفاده تعداد نمونه ها n محاسبه نمایید :

$$t = \bar{d} / sd / \sqrt{n}$$

این محاسبات با کمک نرم افزارهای مختلف آماری در کامپیوتر شخصی امکان پذیر است.

(C)تفسیر- از مقادیر بحرانی t ارائه شده در جدول t_{student} برای مقایسه مقدار محاسبه شده استفاده کنید. در سطح اطمینان ۰,۰۵ برای پنج نمونه اضافی (چهاردرجه آزادی) این مقدار معادل ۲,۷۸ است. چنانچه میزان t به دست آمده از ۲,۷۸ بیش تر نشود اختلاف نتایج به دست آمده از مجموعه ها معنادار نخواهد بود و بنابراین سری تست قابل قبول فرض می شود. چنانچه میزان t به دست آمده از ۲,۷۸ بیش تر شود اختلاف معنادار در نتایج مشاهده خواهد شد و در نتیجه سری تست غیرقابل قبول فرض می شود. نرم افزاری این محاسبات قابل نصب بر روی کامپیوترهای شخصی می باشد.

چنانچه کلنی ها وضعیتی نابهنجار داشته باشند یا این که اندازه آن در سری آزمون در حد قابل توجهی کوچکتر از حد طبیعی باشد و یا این که t_{student} از ۲,۷۸ بیش تر باشد لازم است شرایط آزمایش مورد بازبینی مجدد قرار گیرد و یا اینکه سری آزمایش مردود اعلام شود و به مورد دیگری پرداخته شود. **g- معرف ها-** از آن جایی که معرفها بخش اصلی آزمایش میکروبیولوژی به شمار می روند تضمین کیفیت آن ها ضرورت دارد. لازم است از مواد شیمیایی ACS و یا درجه (گريد)های معادل آن استفاده شود، وجود ناخالصی در آن می تواند مانع از رشد باکتریایی و نیز موجب ارائه مواد مغذی و یا مانع از واکنش دلخواه شود. لازم است اطلاعات مربوط به معرف های کاربردی در برگه های اطلاعات ایمنی مواد (MSDS)^۳ در اختیار کارکنان قرار داده شود.

زمان دریافت مواد شیمیایی و معرف ها و نیز زمان اولین مصرف را تعیین نمایید. اطلاعات مربوط به دریافت، تاریخ انقضا و تدارکات بعدی را ثبت کنید. در زمان آماده سازی لازم است معرفهای شیمیایی با دمای اتاق هم دما شوند، مواد را در بالن های حجمی به حجم برسانید و از ظروف پلاستیکی مرغوب و مقاوم

^۳ Material Safety Data Sheets

در برابر مواد شیمیایی و یا بطری های شیشه ای بوریسیلیکاتی مجهز به استاپر^۴ یا درپوش هایی از جنس بوریسیلیکات، پلی اتیلن و یا دیگر مواد پلاستیکی جهت انتقال مواد و نگه داری استفاده نمایید. معرف های آماده شده را به همراه نام، میزان غلظت، تاریخ آماده سازی، نام مسئول تهیه و تاریخ انقضاء در صورت مشخص بودن آن برچسب گذاری کنید. معرف های آماده شده را در شرایط مناسب نگه داری و بعد از انقضای تاریخ، از مصرف آن خودداری کنید. کنترل مثبت و منفی را برای هر سری کشت و آزمون های بیوشیمیایی اضافه کنید.

h-رنگ ها و رنگ آمیزی – در آزمایش میکروبیولوژی از مواد شیمیایی آلی (نظیر برلیانت گرین^۵) به عنوان عوامل انتخابی، شناسگرها (نظیر فنل رد^۶)، و رنگ آمیزی گرم^۷ استفاده می شود. رنگ های ارائه شده از سوی شرکت های سازنده از لحاظ درصد مواد رنگی، پیچیدگی رنگ ها، مواد غیرقابل حل و مواد مقاوم در برابر مواد شیمیایی در سری های مختلف تولید متفاوت هستند. برای این که رنگ های مورد استفاده در میکروبیولوژی برای شرکت از توان و ثبات کافی برخوردار باشند فقط از رنگ های دارای گواهینامه کمیسیون رنگ آمیزی بیولوژی^۸ استفاده نمایید. لازم است قبل از رنگ آمیزی باکتریولوژی حداقل یک کشت با سوش مثبت و منفی انجام شود و نتایج مربوطه به ثبت رسد. در رنگ آمیزی فلورسانس لازم است تست واکنش مثبت و منفی در روز مصرف صورت گیرد.

^۴ Stoppers

^۵ Brilliant green

^۶ Phenol red

^۷ Gram stain

^۸ Biological Stain Commission

فیلترهای غشایی و پدها^۹ - به دلیل تفاوت های موجود در روش، مواد اولیه، کنترل کیفیت، شرایط ذخیره سازی و مواد کاربردی، کیفیت و عملکرد ممبران فیلتر از لحاظ شرکت سازنده، نوع، نشان تجاری سری ساخت متفاوت خواهد بود.

(۱) مشخصات - ممبران فیلترها و پدهای جذبی ارائه شده از سوی شرکت های سازنده که در آزمایش آب مورد استفاده قرار می گیرند باید مطابق با استانداردهای حفظ و نگه داری، قابلیت بازیافت، مواد قابل جداسازی و ویژگی های مربوط به میزان عبور جریان ارائه دهند. بعضی از شرکت های سازنده اطلاعاتی فراتر از اطلاعات مرتبط با ویژگی های یاد شده و گواهینامه ارائه می نمایند و عملکرد غشاهای تولیدی خود را در فرآیند آزمایش آب رضایت بخش عنوان می کنند. این سازندگان گزارشاتی در رابطه با میزان بازدارندگی رشد، اندازه ی منافذ، درصد جریان، استریلیزه، pH، درصد بازیافت و محدودیت برای استخراج مواد شیمیایی آلی و غیرآلی ارائه می نمایند. به هر حال ارزیابی ممبران فیلتر به صورت استاندارد کارخانه ای در اختیار آزمایشگاه ها قرار می گیرد و آزمایشگاه ها در صورت تمایل می توانند از آن استفاده کنند.

(۲) آزمایش عملی - لازم است وضعیت هر سری ممبران فیلتر جدید، در آزمایش عملی رضایت بخش اعلام شود و از لحاظ عدم وجود نارسایی در بازیافت، تفکیک پذیری و بدشکلی کلنی که حاصل وجود مواد سمی، ساختار شیمیایی و یا نقایص ساختاری است، تضمین گردد.

(۳) آزمایشات استاندارد سازی - در کنترل کیفیت لازم است هر سری فیلتر قبل از به کارگیری و در زمان آزمایش از لحاظ مدور بودن و انعطاف پذیری مورد بازبینی قرار بگیرد. در صورتی که بیش از یک یا چند سال از زمان نگه داری آن گذشته باشد بررسی میزان شکنندگی آن از اهمیت زیادی برخوردار است. موارد شکننده را دور بریزید. شماره سریال و تاریخ دریافت در اطلاعات مربوط به زمان نگه داری را در آزمایشگاه ثبت کنید. با عدم رشد در یک ممبران فیلتر قرار گرفته بر روی پد آغشته به عصاره گلوکز تریپتون^{۱۰} (یا

^۹ Pads

^{۱۰} Tryptone glucose

آبگوشت غیر انتخابی معادل آن یا آگار) و انکوباسیون آن در 35 ± 0.5 درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت و اجرای فرآیند کنترل استریل در هر مرحله آزمایش، فرآیند استریل را تایید کنید.

بعد از انکوباسیون نمونه های آزمایشگاهی، کلنی ها با رنگ و شکل مناسب مشخص شده در روش نمایان می شوند. در فیلترهای غشایی نبایستی مسیر رشد و توسعه کلنی ها در طول خطوط مشبک جوهری، دچار محدودیت گردد. کلنی ها باید به طور یکنواخت در سطح غشاء توزیع شوند. مجموعه سری ممبران را برگردانید و شرکت سازنده را در جریان موضوع قرار دهید.

J- محیط کشت: از آن جایی که روش های کشت به آماده سازی مناسب محیط کشت وابسته است لازم است در مراحل آماده سازی محیط کشت، ذخیره سازی و روش های کاربردی از مرغوب ترین مواد اولیه و تکنیک های هماهنگ استفاده شود و محیط کشت مناسبی برای عملیات هدف در نظر گرفته شود. برای کنترل کیفی لازم است از محیط های کشت آماده تجاری در صورت موجود بودن استفاده شود اما قابل ذکر است که کیفیت چنین محیطی در بین سازندگان و حتی در یک کارخانه ی تولیدی در سری های مختلف تولید آن متفاوت است. به همین دلیل توصیه می شود جهت بررسی یکسان بودن کیفیت، بسته های جدید کشت با نمونه های قبل مقایسه شوند. همچنین آزمایشگاه وظیفه دارد با کنترل کشت مثبت و منفی و محاسبه ی تراکم مجموعه کشت قبلی و جدید، رعایت ضوابط و شرایط مورد نیاز برای افزایش رشد در محیط کشت میکروبیولوژی را تضمین نماید. نگه داری برگه داده های ایمنی مواد MSDS ضروری است.

مقدار سفارش محیط های کشت باید به گونه ای باشد که مدت زمان استفاده از آن از یک سال و ترجیحاً از ۶ ماه بعد از اولین مصرف بسته بیش تر نشود. محیط های کشت آماده ی صنعتی را مقداری سفارش دهید که مطابق با تاریخ انقضای تعیین شده به مصرف برسد. محیط کشت را بر اساس تقدم و تاخر تاریخ استفاده نمایید. در هنگام آزمایشات عملی به جای بطری های کشت مقادیر کوچک تر آن نظیر 1b یا ۰,۲۵ گرم یا ۱۲۵ یا 1b یا ۰,۵ یا ۵۰۰ گرم، را سفارش دهید و تا حد امکان فرآورده را در حالت مهر و موم نگه داری کنید. اطلاعات مربوط به نوع، مقدار و شکل ظاهری محیط کشت دریافت شده، شماره سریال،

تاریخ انقضا و تاریخ دریافت و اولین مصرف را به کتابچه اطلاعات^{۱۱} و یا فایل رایانه وارد کرده و تاریخ انقضاء و اولین مصرف را روی برچسب ظرف یادداشت نمایید. برای سفارش دهی مجدد وضعیت موجودی را هر سه ماه یک بار مورد بررسی قرار دهید.

محیط های کشت را تحت شرایط کنترل شده تا انقضای تاریخ آن نگه داری کنید. محیط های کشت دی هیدراته^{۱۲} را در ظرفی کاملاً در بسته در شرایط دمایی کنترل شده خنک (۲۵ تا ۱۵ درجه سانتیگراد) و اتاق خشک یا دسیکاتور^{۱۳} به دور از تابش مستقیم نور خورشید نگه داری کنید. در صورت خمیری شدن و یا تغییر رنگ محیط کشت و یا بروز دیگر علائم فساد از مصرف آن خودداری کنید. محیط های کشت تاریخ گذشته را دور بریزید. مدت زمان نگه داری بطری های باز نشده در دمای معمولی اتاق ۲ سال است. استفاده از محیط های کشت تاریخ گذشته توصیه نمی شود.

از آن جایی که احتمال وجود تفاوت در هر سری محیط های جدید کشت وجود دارد لازم است مقایسه بازیافت رشد سری های محیط های کشت تازه خریداری با سری های قبلی آزمایش شده ترجیحاً از طریق سوش های مرجع یا استفاده از کشت خالص و یا نمونه های طبیعی صورت بگیرد.

بطری های باز شده باید در مدت زمان ۶ ماه به مصرف برسند. محیط های کشت دی هیدراته، هیگروسکوپیک^{۱۴} (جاذب رطوبت) هستند. لازم است از جذب رطوبت اضافی جلوگیری شود. بطری ها باید بعد از مصرف بلافاصله محکم بسته شوند. در صورت خمیری شدن و یا تغییر رنگ محیط کشت از مصرف آن خودداری کنید. بطری های باز شده در دسیکاتور نگه داری شوند.

^{۱۱} کتابچه اطلاعات یا log book که اطلاعات مربوط به فرایند آزمایش و ساخت و تهیه مواد و سایر اطلاعات در آن ثبت می گردد.

^{۱۲} Dehydrated

^{۱۳} Desiccator

^{۱۴} Hygroscopic

(۱) آماده سازی محیط کشت- لازم است آماده سازی محیط کشت در ظروف تمیزی انجام شود که حجم آن حداقل دو برابر حجم محیط کشت باشد. محیط کشت را با آب معرف RW آماده کنید. حجم آب و محیط کشت با استفاده از ابزارهای اندازه گیری و یا پیپت های مورد تایید استانداردهای NIST و APHA اندازه گیری شود. از پیپت های ترک برداشته استفاده نشود. از پیپت های TD (برای انتقال) استفاده نمایید. محیط های کشت به ویژه آگار را در زمان گرم کردن به هم بزنید. با استفاده از روش حمام آب برای بسته محیط های کشت کوچک و با مراقبت دائمی برای حجم های بزرگتر از سطوح گرمایشی هات پلیت^{۱۵} و یا شعله گازسوز، می توان از داغی بیش از حد و یا تبخیر جلوگیری نمود. ترجیحاً از هیتر هم زن های مغناطیسی^{۱۶} استفاده شود. اطلاعات مربوط به محیط کشت آماده شده را به همراه تاریخ بر روی برچسب وارد نمایید.

بعد از استریلیزاسیون، مقدار PH یک بخش از محیط کشت را بررسی نمایید و آن را به ثبت برسانید. این میزان، PH واقعی مورد نیاز برای رشد مناسب می باشد. در صورت استفاده از محیط های کشت آماده صنعتی، تنظیم PH به ندرت ضرورت پیدا می کند. در صورت لزوم مطابق با فرمولاسیون NaOH یک نرمال و یا محلول های HCl یک نرمال که با فیلتر استریلیزه شده اند، می توان تغییراتی جزئی در PH ایجاد نمود. چنانچه اختلاف PH بیشتر از ۰.۵ واحد باشد از مصرف بسته صرف نظر نمایید و برای رفع مشکل دستورعمل های مربوط به آماده سازی و PH آب معرف را مورد بررسی قرار دهید. چنانچه محیط کشت به تنظیم PH نیاز داشته باشد این کار باید قبل از استریلیزاسیون و ثبت PH نهایی صورت بگیرد. مقادیر نادرست PH به کیفیت آب معرف، فساد محیط کشت و یا وجود خطا در مراحل آماده سازی نسبت داده می شود. دستورعمل های مربوط به مرحله ی آماده سازی و PH آب را بررسی نمایید. در صورت مطلوب نبودن شرایط PH آب، محیط کشت را از سری جدید محیط و از منبع آب دیگر آماده کنید (جدول ۹۰۲۰B.۴d,e را ببیند). در صورت مطلوب بودن شرایط آب لازم است بار دیگر محیط کشت بازسازی و

^{۱۵} Hot plate

^{۱۶} Hot plate-magnetic stirrer

PH اندازه گیری شود. در این حالت اگر PH بار دیگر نادرست نشان داده شد با استفاده از مجموعه محیط کشت متفاوت و یا برگرفته از منشا دیگر آماده سازی نمایید. در محیط های کشت ایزوله شده ویژه ای که با اسیدهای آلی و یا اسیدهای چرب آماده سازی می شوند تغییرات قابل توجهی در میزان PH بعد از فرآیند استریلیزاسیون قابل مشاهده است.

فعالیت های مربوط به آماده سازی نظیر نام گذاری محیط کشت، حجم تولید شده، قالب یا فرمت، PH نهایی، زمان تکمیل و نام مسئول آماده سازی را ثبت نمایید. مسائل مربوط به PH را در کتابچه اطلاعات (log book) محیط کشت ثبت کنید و در صورتی که محیط کشت به عنوان منبع خطا شناسایی شده باشد لازم است شرکت سازنده در جریان امر قرار داده شود. هرگونه تغییر رنگ غیرعادی، تیرگی و یا ته نشینی در محیط کشت آماده شده باید بررسی و نتایج ثبت شود. نوسانات زمان استریلیزاسیون و دما به عنوان عوامل احتمالی مشکل باید در نظر گرفته شوند. در صورت مشاهده هریک از موارد ذکر شده لازم است از مصرف محیط کشت خودداری شود.

۲) استریلیزاسیون – محیط کشت در حداکثر دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد و حداقل زمان تعیین شده استریلیزه می گردد. برای استریلیزاسیون محیط کشت مطابق با دستورعمل شرکت سازنده عمل نمایید. زمان مورد نیاز با توجه به مواد، نوع محیط کشت، وجود کربوهیدرات و حجم متفاوت است. جدول VI: ۹۰۲۰ راهنمایی برای این مورد است. محیط های کشت حاوی کربوهیدرات را بیشتر از ۴۵ دقیقه در معرض حرارت قرار ندهید. مدت زمان در معرض قرار گرفتن به دوره زمانی شروع حرارت تا خارج شدن از اتوکلاو اطلاق می گردد. حرارت دهی بیش از حد محیط کشت می تواند به از بین رفتن مواد مغذی منجر شود. اطلاعات به ثبت رسیده را به صورت چاپی نگه داری نمایید.

جدول VI: ۹۰۲۰ زمان و دمای استریلیزاسیون اتوکلاو

TABLE 9020:IV. TIME AND TEMPERATURE FOR AUTOCLAVE STERILIZATION*

Material	Time at 121°C min
Membrane filters and pads	10
Carbohydrate-containing media (lauryl tryptose, BGB broth, etc.)	12-15†
Contaminated materials and discarded cultures	30
Membrane filter assemblies (wrapped), sample collection bottles (empty)	15
Buffered dilution water, 99 mL in screw-cap bottle	15
Rinse water, volume >100 mL	Adjust for volume

* Except for media, times are guidelines.

† Certain media may require different sterilization conditions.

محیط کشت استریلیزه شده را به محض رسیدن فشار محفظه دستگاه اتوکلاو به صفر و در صورت استفاده از مدل کاملاً اتوماتیک به محض باز شدن درب، از دستگاه اتوکلاو خارج کنید. به دلیل داغ شدن بیش از حد مایعات، مراقب میزان تبخیر باشید. از قرار دادن مجدد محیط کشت در دستگاه اتوکلاو خودداری کنید.

محلول ها یا محیط های کشت حساس در برابر گرما را طبق روش فیلتراسیون و با استفاده از فیلتری با قطر منفذ ۰,۲ میکرومتر در دستگاه فیلتراسیون و تجهیزات جانبی استریل، استریلیزه نمایید. در صورت امکان محیط کشت را زیر هود لامینار یا کابینت ایمنی مجهز به سیستم جریان یکنواخت فیلتر یا توزیع نمایید. ظروف شیشه ای (پیپت، پتری دیش، بطری های نمونه) را در دستگاه اتوکلاو و یا آون های استریلیزه کننده (170 ± 10 درجه سانگیراد به مدت حداقل ۲ ساعت) استریل نمایید. تجهیزات، فرآورده

ها و دیگر مواد جامد و خشکی را که حساس در برابر گرما هستند با قرار دادن در برابر اکسید اتیلن^{۱۷} موجود در تجهیزات استریل کننده گازی استریل نمایید. اسپورها یا سوسپانسیون های آماده صنعتی برای بررسی استریلیزاسیون خشک و استریلیزاسیون اکسید اتیلن مناسب هستند.

۳) استفاده از آگار و آبگوشت (براث) - آگار را در دمای ۵۰ < درجه سانیتگراد و ترجیحاً بین ۴۴ تا ۴۶ درجه سانیتگراد حرارت دهید، زمان مصرف آگارهای حل شده به روش حمام آب (روش بن ماری) نباید از ۳ ساعت بیش تر شود. برای کنترل دما، یک بطری آب و یا محیط کشتی در همان شرایط گرما و سرمادهی قرار دهید. برای کنترل شرایط دمایی کشت های بشقابی، دماسنجی در بطری های پایش قرار دهید. محلول های حساس در برابر گرما، آنتی بیوتیک را به آگار حرارت دیده اضافه نمایید. آماده سازی محیط کشت را حداقل دو روز قبل از انجام آزمایشات انجام دهید تا زمان کافی برای استریل کردن و آزمایش کشت کنترل مثبت و منفی و مشاهده ی نتایج وجود داشته باشد. چنانچه انتشار بر روی محیط کشت آگار صورت نگیرد و تا استفاده ی بعدی حالت سفت به خود بگیرد بار دیگر محیط کشت آگار را در آب جوش، جریان بخار و یا ولتاژ کم امواج مایکروویو حل نمایید و بعد از مصرف مقدار باقی مانده را دور بیندازید. ذوب مجدد آگار تنها برای یک بار امکان پذیر است. توزیع حجم به نسبت اندازه ی ظرف پتری دیش و کاربرد مورد نظر متفاوت خواهد بود. به محض سفت شدن محیط کشت انتشار یافته، بشقاب را وارونه نمایید.

لوله های حاوی محیط کشت تخمیر استریل شده را به دقت جابه جا کنید تا هیچ گونه گاز یا حبابی در لوله های دورهام ایجاد نشود و از ایجاد واکنش منفی خطا جلوگیری شود. هرچه زودتر لوله های آماده شده را مورد بررسی قرار دهید تا از عدم حضور حباب های هوا در لوله های دورهام اطمینان حاصل کنید.

جدول V: ۹۰۲۰: زمان نگهداری محیط کشت

^{۱۷} Ethylene Oxide

TABLE 9020:V. HOLDING TIMES FOR PREPARED MEDIA

Medium	Holding Time
Broth in screw-cap flasks*	96 h
Poured agar in plates with tight-fitting covers*	2 weeks
Agar or broth in loose-cap tubes*	2 weeks
Agar or broth in tightly closed screw-cap tubes†	3 months
Poured agar plates with loose-fitting covers in sealed plastic bags*	2 weeks
Large volume of agar in tightly closed screw-cap flask or bottle*	3 months

* Hold under refrigerated conditions 2–8°C.

† Hold at <30°C.

۳) ذخیره سازی محیط کشت – محیط کشت را به مقداری آماده سازی کنید که در مدت زمان نگه داری تعیین شده در جدول V: ۹۰۲۰ مورد استفاده قرار گیرد. برای تفکیک مناسب میکروارگانیسم های مورد نظر خصوصاً باکتری های تحت فشار یا صدمه دیده در فرآیند گندزدایی، به محیط تازه آماده شده نیاز است. برای آماده سازی محیط کشت آماده برای مصرف در زمانی طولانی تر از موعدی که از سوی سازنده تعیین شده است لازم است شرایط کیفی محیط کشت بعد از موعد مقرر تحت نظارت و کنترل قراردادشته باشد. با آزمایش بازیافت از تراکم های معینی از کشت های کنترلی مطابق با نیازهای کنترل کیفی، به صورت هفتگی کارایی محیط کشت را تایید نمایید.

از آن جایی که افزایش مدت زمان ذخیره سازی، تغییراتی در بازیافت و تفکیک پذیری ایجاد می کند، کنترل میزان رطوبت حائز اهمیت است. در صورت به کارگیری محیط های کشت در اهداف تحقیقاتی لازم است زمانی برای انقضای مصرف محیط کشت در نظر گرفته و نتایج آزمایش به ثبت رسانده شود. از تابش نور بر محیط های کشت تهیه شده در آزمایشگاه و محیط های کشت خریداری شده حاوی مواد رنگی جلوگیری به عمل آورده شود و در صورت تغییر رنگ از مصرف آن خودداری شود. چنانچه آگار توزیع شده، در روز آماده سازی محیط کشت به مصرف نرسد لازم است پلیت های حاوی آگار توزیع شده را در یخچال نگه داری نمایید. برای جلوگیری از دی هیدراته شدن لازم است پلیت های حاوی آگاری را که به بیش از دو روز

نگه داری نیاز دارند آن ها را در کیسه های پلاستیکی و یا محفظه های دیگر به حالت مهر و موم قرار دهید. برای جلوگیری از ریزش قطرات بر محیط کشت ، پلیت ها را به صورت وارونه قرار دهید و در صورت ایجاد قطره، پلیت ها را در انکوباتور در دمای بین ۳۵ تا ۳۷ درجه سانتیگراد قرار دهید. برای ذخیره سازی محیط های کشت در لوله های آزمایش لازم است درب لوله ها محکم بسته شوند. پلیت ها را وزن کنید و یا سطح مایع در لوله (۱۰٪ هربسته) بعد از استریلیزاسیون علامت گذاری کنید و کاهش میزان مایعات براساس وزن یا حجم ذخایر بعد از گذشت دو هفته مورد بررسی قرارگیرد. چنانچه کاهش میزان مایعات معادل ۱۰٪ یا بیشتر باشد از مصرف بسته خودداری شود. از به کارگیری پتری دیش ها و محیط های کشت جامد درون آن که بیش از دوهفته از نگه داری آن گذشته است، صرف نظر نمایید. در صورتی که محیط کشت زودتر از مدت زمان دو هفته خشک یا چروکیده یا ترک خورده و یا سوراخ شده باشد لازم است هرچه سریع تر دور انداخته شود.

اگر محیط کشت را در یخچال گذاشته شده اند قبل از استفاده در دمای معمولی اتاق قرار دهید و در صورت مشاهده رشد یا واکنش مثبت خطا از مصرف آن صرف نظر کنید. در شرایطی که آزمایش به صورت متناوب اجرا شود و نیروی کافی برای عملیات آماده سازی موجود نباشد و میزان هزینه با دیگر فاکتورهای عملیاتی آزمایشگاه برابری کند، تامین براث های (آبگوشت) و آگارهای استریل و آماده از منابع تجاری مقرون به صرفه خواهد بود. عملکرد این محیط های کشت را مطابق با مطالب ارائه شده در بخش (۷- (۵ S ۹)) بررسی نمایید.

(۵)آزمایش عملی- از هر دو محیط کشت، تهیه شده در آزمایشگاه و خریداری شده در آزمایشات عملی استفاده شود. برای کسب اطلاعات مربوط به روش کار به بخش (۲ f ۹)) مراجعه شود.

(۶)کنترل کیفیت محیط کشت تهیه شده درآزمایشگاه - اطلاعات کامل هر مجموعه کشت تهیه شده در محیط آزمایشگاه را به همراه تاریخ و مشخصات مسئول تهیه، نام و شماره سریال محیط کشت، وزن محیط کشت، حجم محیط کشت آماده شده، زمان و دمای استریلیزاسیون، تنظیم PH در صورت لزوم، PH نهایی و

تدارکات مربوط به عناصر ناپایدار را در پرونده به ثبت رسانید. لازم است روند ارتقاء کمی سری های جدید با نمونه های قابل قبول قبلی (۵) ۱۱ در رابطه با ریزارگانسیم های هدف مورد مقایسه قرارگیرد. لازم است بررسی های مربوط به استریل سازی محیط کشت و کنترل ارگانسیم های منفی و مثبت و مشاهدات مربوط به تاثیرگذاری آن در تمام محیط های کشت که در مطالب بعدی به آن اشاره خواهدشد، در برنامه در نظرگرفته شود. کشت کنترلی برای مشاهده روند افزایش رشد و انتخاب محیط کشت و نظارت بر روش های پایش آزمایش استفاده شود.

در عملیات موفق آزمایشگاهی، چالش های دوره ای در رابطه با محیط کشت آماده شده و تعداد کم میکروارگانسیم های رشد یافته، ایجاد می شود. روند رشد تحت تاثیر کیفیت محیط کشت، آماده سازی محیط کشت، استریلیزاسیون، زمان و شرایط ذخیره سازی قرار دارد.

(۷) کنترل کیفیت محیط های کشت خریداری شده- حمل و نقل محیط های کشت آماده مصرف نباید به گونه ای انجام شود که مدت زمان نگه داری محیط کشت و یا شرایط ذکر شده در مطالب قبل تحت تاثیر قرار گیرد. چنانچه شرایط حمل و نقل به غیر از شرایط ذکر شده باشد شرکت سازنده ملزم به ارائه ی اطلاعات اعتباربخشی خواهد بود. لازم است اطلاعات مربوط به تاریخ دریافت، انقضاء و شماره سریال و پس از آن داده های مربوط به اندازه گیری محیط کشت به ثبت رسد. ذخیره سازی محیط کشت باید مطابق با دستورعمل شرکت سازنده صورت بگیرد و از مصرف موارد تاریخ گذشته خودداری شود. مقایسه افزایش روند کمی مطابق با ۵ ۱۱ پیشنهاد می گردد. لازم است هر مجموعه جدید از لحاظ استریل بودن و بررسی کشت کنترل مثبت و منفی مورد آزمایش قرار بگیرد. این آزمایشات در رابطه با محیط های کشت خریداری شده ای که مدت بیشتری در مقایسه با نمونه های تهیه شده در آزمایشگاه مانده اند، باید در دفعات بیش تری این آزمایش انجام شود.

۶- روش های اجرایی استاندارد (SOPs)^{۱۸}

SOPs عمومی و اختصاصی، شالوده های عملیاتی یک آزمایشگاه آزمون هستند که با هدف پیشگیری از انحرافات ناشی از تفسیر نادرست یک فرآیند یا روش، طراحی شده اند. هر یک از موارد SOPs اختصاصی، مرحله به مرحله جزئیات کار و یا روش های اجرایی روتین آزمایشگاه را تشریح و آن را به تناسب تجهیزات، ابزارآلات و انواع نمونه های آزمایشگاهی ارائه می کند. این عملیات آزمایشگاهی در برگیرنده ی فرآیند آماده سازی معرف ها، آب معرف، استانداردها، محیط کشت، استفاده مناسب ترازوها، عملیات استریلیزاسیون، روش های شستشوی ظروف و دفع مواد آلاینده و نیز روش های نمونه گیری، آزمایش نمونه، زنجیره ی حفاظت، نگه داری سوابق و روش های کنترل کیفیت می باشد. SOPs ارائه ی نقل قولی ساده از یک روش تحلیلی انتشار یافته نیست هرچند که چنین اطلاعاتی با SOPs آزمایشگاه قابل ادغام است.

SOPs هر آزمایشگاهی منحصر به همان آزمایشگاه است و توسط شخصی نوشته می شود که مسئول اجرای آن است و سپس با تاریخ به امضای سرپرست می رسد. لازم است SOPs مطابق با شرایط مکتوب پیگیری شود و بازنگری های مداوم انجام شده و قابل دسترس برای تمام کارکنان مربوطه در جریان کار قرار داده شود. در صورت نیاز به تغییر لازم است موارد مستند شوند و مورد تایید مجدد قرار گیرد. نسخه های قبلی SOPs به عنوان مرجع نگه داری شود. به کارگیری مداوم SOPs، هماهنگی عملیات را تضمین می کند. SOPs ابزار آموزشی معتبر و روشی برای تعیین صلاحیت و اجرای ارزیابی ها می باشد.

۷- نمونه برداری

معمولاً دغدغه اصلی آزمایشگاه جمع آوری نمونه های آزمایشگاهی نیست ولی کارکنان نیاز دارند اطلاعاتی فرآیند نمونه برداری آزمایشگاهی داشته باشند.

^{۱۸} Standard Operating Procedures

a- برنامه ریزی: کارشناسان رشته میکروبیولوژی باید در برنامه ریزی های مرتبط با برنامه های نظارتی شامل آزمایش های میکروبی مشارکت داشته باشند. کارشناسان می توانند راهنمایی های ارزشمندی جهت انتخاب جایگاه های نمونه برداری، عمق نمونه برداری، تعداد نمونه ها و آزمایش های مورد نیاز، میزان کار و نحوه ی آماده سازی ارائه دهند. برای منابع آب طبیعی اطلاعاتی نظیر اطلاعات مربوط به تراکم احتمالی میکروب ها و تاثیر فصل، آب و هوا، الگوهای جذر و مد و باد، منابع شناخته شده آلودگی و متغیرهای دیگر از مواردی هستند که برای تنظیم موثرترین برنامه های نمونه گیری ضرورت دارند. همچنین کارشناسان رشته میکروبیولوژی می توانند تکرار نمونه برداری را تعیین نمایند، مانند آزمایش منابع جدید آب و یا نمونه برداری از مناطق مختلف یک جایگاه نمونه گیری را مشخص نمایند. به منظور هماهنگی پایش، طرح نمونه برداری باید مورد تایید دولت قرار گیرد.

b- روش ها: برنامه های نمونه برداری باید به تناسب هر محل بوده و بر اساس طرح های آماری مناسب برای نمونه برداری ارائه گردد. راهنمایی های قبل از نمونه برداری از ماهیتی کلی برخوردارند این راهنمایی ها به عواملی اشاره دارند که لازم است در هر جایگاه در نظر گرفته شوند. SOPs نمونه برداری به شرح مواردی نظیر تجهیزات نمونه برداری، روش، تواتر، زمان و شرایط نگه داری، مقررات ایمنی و موارد دیگری می پردازد که می تواند در شرایط مختلف برای محل های مختلف انجام شود تا از یکنواختی و نمایندگی اطمینان حاصل شود. برنامه های نمونه برداری بر اساس اطلاعات SOPs تنظیم خواهند شد.

c- تایید نمونه /آزمایشگاهی: آزمایشگاه موظف است هماهنگی نمونه ها، شرایط و زمان نگه داری و تهیه اسناد و مدارک ضمیمه را به منظور استفاده از داده های به دست آمده مورد تایید قرار دهد.

۸- روش های آزمایش

a- انتخاب روش : محیط کشت، دما، زمان دمای انکوباسیون و ایجاد تغییرات جزئی در روش ها از عواملی هستند که به طور مداوم برای تعیین مقادیر مناسب بازیافت و تعیین رشد کمی و کیفی ضرورت دارد. برای

جلوگیری از بروز تغییرات معنادار در نتایج لازم است استاندارد سازی روش های میکروبیولوژی و به دنبال آن هماهنگ سازی داده های آزمایشگاه های مختلف انجام پذیرد. انتخاب روش های تحلیلی متناسب با نوع نمونه آزمایشگاهی و بر اساس روش های استاندارد و منابع دیگر استاندارد سازی صورت می گیرد و به دنبال آن اعتباربخشی مناسب روش های مذکور در مطالعات چند آزمایشگاه بر نمونه های هدف تضمین می گردد. آزمایشگاه موظف است روش های جدید و غیراستاندارد و هرگونه روش به کار رفته در ماتریس را که مطابق با روش های ارائه شده تعریف نشده نیستند اعتباربخشی نماید.

b-هدف/داده ها: لازم است روش های موجود مورد بازبینی قرار گیرند و مناسب ترین موارد لازم برای ارائه داده های مورد نیاز برنامه، از لحاظ دقت، بایاس^{۱۹} یا سوگیری، تخصیص، گزینش، حد آشکارسازی و کارایی ترمیم در شرایط حقیقی آزمایشگاهی مشخص گردند. روش های سریع، ارزان قیمت و کاربری کمتر، زمانی روش های مطلوب تری به شمار می آیند که مراحل تایید آن وقت گیر نباشد و داده های به دست آمده تامین کننده ی نیازهای برنامه یا مشتریان باشد.

c-کنترل کیفیت داخلی: روش های استنادی آزمایش دربرگیرنده ی بررسی های کنترل کیفی مورد نیاز برای تضمین کنترل داده نظیر کشت کنترل مثبت و منفی، نمونه های شاهد یا بلانک، روش استریلیزه، تکرار آزمایش (دقت) و کشت های باکتریایی با سطح تراکم مشخص شده برای روش های کمی می باشد.

d-SOPS روش: در این بخش از مجموعه SOPS، نسخه روش تحلیلی به صورت مرحله به مرحله اجرا می گردد و در رابطه با هریک از انواع نمونه ها، تجهیزات و ابزارهای کاربردی آزمایشگاه در اختیار مسئول آزمایش قرار داده می شود.

۹. رویه های کنترل کیفیت تحلیلی در روش های تعیین شده

رویه های کلی کنترل کیفیت

^{۱۹} Bias

a- اختلاف در شمارش کلنی توسط آزمایش کننده: در ارزیابی روتین آزمایشگاهی، عملیات شمارش حداقل به صورت ماهانه بر روی یک یا چند نمونه مثبت تکرار می شود و نتایج مربوطه به ثبت می رسد و مقادیر شمارش با مقادیر به دست آمده با دیگر آزمایش کنندگان از نمونه های آزمایشگاهی یکسان مورد مقایسه قرار می گیرد. تکرار شمارش برای یک آزمایش کننده از ۵٪ نمونه (در محدوده تکرارپذیری شمارش آزمایش کننده) و تکرار شمارش بین چند آزمایش کنند تا ۱۰٪ نمونه (در محدوده تجدید پذیری تمام آزمایش کنندگان) انجام شود. در صورت عدم انجام، بررسی و اقدامات اصلاحی مورد نیاز از سرگرفته شود. برای محاسبات آماری میزان دقت داده ها به بخش B ۱۳.b ۹۰۲۰ مراجعه شود.

b- کشت با ارگانسیم های کنترل مثبت و منفی: از محیط های کشت مرجع مورد تایید استفاده کنید. آزمایشگاه برای محیط های جدید با استفاده از کشت های مثبت و منفی ارگانسیم ها محیط های جدید را تایید می نماید به این صورت که از هر سری (lot) محیط کشت دریافتی یک دسته (batch) و برای هر سری کشت آماده خریداری شده، این آزمایش انجام می شود. نتایج آزمایش را ثبت نمایید. کشت های (سوش) مرجع را از منابع شناخته شده- ی ملی یا بین المللی تهیه نموده و یا کشت (سوش) اشباع شده مرجع بر روی دیسک^{۲۰} یا استریپ^{۲۱}، را از مراکز معتبر تجاری تهیه نمایید. از کشت های (سوش) مرجع، یک یا چند استوک^{۲۲} کاری اولیه تهیه می شود. تعداد انتقال به محیط های جدید را به حداقل برسانید جهت تقویت رشد کشت (سوش) را به محیط جدید انتقال داده، از حفظ فنوتیپ^{۲۳} و ژنوتیپ^{۲۴} کشت (سوش) و از کاهش آلودگی، اطمینان حاصل نمایید. آزمایشات را با هدف تضمین رشد و عملکرد به صورت دوره ای انجام دهید. برای هر سری محیط کشت آزمایش محیط های کشت با استفاده از ارگانسیم

^{۲۰} Disc

^{۲۱} Strip

^{۲۲} Stock

^{۲۳} Phenotypic

^{۲۴} Genotypic

های کنترل مثبت و منفی انجام دهید. برای مراجعه به نمونه کشت (سوش) آزمایش به جدول VI : ۹۰۲۰ مراجعه نمایید. برای آزمایشگاه تصفیه خانه فاضلاب که فاقد امکانات حفظ و نگه داری کشت خالص است، از کشت (سوش) بر روی استریپ^{۲۵} استفاده کرده و یا این که به آزمایشگاه برای آزمایش ارسال می گردد.

C-آزمایش دوتایی: میزان دقت نتایج کمی آزمایش شمارش کلنی های موجود بر پلیت بر اساس روند تکرار آزمایش مورد ارزیابی قرار می گیرد. لازم است فرآیند تکرار آزمایش حداقل به صورت ماهانه در صورت نیاز در دفعات بیش تر انجام شود مثلاً به ازای ٪ ۱۰ نمونه های آزمایشگاه، براساس ضوابط و مقررات آزمایش، یک نمونه در یک مرحله آزمایش و یا یک نمونه در هر هفته برای آزمایشگاهی که در طول هفته کمتر از ۱۰ تست انجام می دهد، در نظر گرفته شود. یک مرحله آزمایش به مجموعه ای پیوسته از فرآیندهای آزمایش اطلاق می شود. لازم است تناسب حجم نمونه آزمایشگاهی رعایت شود. نتایج آزمایش باید مورد ارزیابی قرار گیرد و نتایج به ثبت رسانده شود. دفعات آزمایش های تکرار را با زمان، فعالیت های عملی و هزینه های وارده هم تراز نمایید. زمانی که آزمایشگاه یا فرد آزمایش کننده در ابتدای آغاز به کار خود با روش یا ماتریسی مواجه شود که تغییرات معناداری از آن در نتایج پیش بینی شود، اجرای فرآیند تکرار آزمایش، مستلزم به کارگیری فعالیت های بیش تری خواهد بود.

جدول IV: ۹۰۲۰ کنترل پیشنهادی، کشت های کنترلی آزمایشات میکروبی

TABLE 9020: VI. SUGGESTED CONTROL CULTURES FOR MICROBIOLOGICAL TESTS*

Group	Control Culture	
	Positive	Negative
Total coliforms	<i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> † <i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATTC 4352)	<i>Staphylococcus aureus</i> † <i>Proteus vulgaris</i> § <i>Pseudomonas aeruginosa</i> †
Fecal coliforms	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> (thermotolerant) <i>Escherichia coli</i> (MUG-positive strain)	<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> (thermotolerant)
<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i> ** <i>Escherichia coli</i> ††
Enterococci#	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i>	

* Use appropriate ATCC strains.

† *S. aureus*, *P. aeruginosa*—not lactose fermenter.‡ *E. aerogenes*—ferments lactose, but is not typically thermotolerant.§ *P. vulgaris*—not lactose fermenter, uses hydrolyzed lactose, indicating "overcooked" medium.|| *K. pneumoniae*—ferments lactose, but does not hydrolyze MUG.# Do not use closely related strains from genus *Streptococcus* as a positive control.** *S. aureus*—sensitive to sodium nalidixic acid medium.†† *E. coli*—sensitive to sodium azide in medium.

تکرار آزمایش نمونه های زیست محیطی به تفاوت های گسترده ای در نتایج شمارش منجر می شود و تنها به صورت تخمینی قابل محاسبه است.

d- بررسی/استریلیزاسیون: لازم است وضعیت استریلیزه محیط کشت قبل از اولین مصرف مورد بررسی قرار گیرد. حداقل یک مورد در هر سری کشت یا درصدی از نمونه مثلاً ۱ تا ۴٪ از سری محیط کشت تهیه شده در آزمایشگاه و محیط کشت آماده ی مصرف، براث یا آگار را در دمای مناسب و در مدت زمان لازم برای آزمایش انکوبه کنید، به عنوان مثال ۴۸ ساعت برای کلیفرم اجرا گردد و نتایج افزایش رشد مورد بررسی قرار گیرد. در آزمایشات مربوط به آنزیمی می توان وضعیت استریلیزه محیط کشت را با افزودن هر بسته محیط کشت به ۱۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه استریل و انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت مورد بررسی قرار داد. محیط کشت حاوی مواد آنزیمی آماده شده گرانول دار، ممکن است استریل نبوده ولی عاری از کلیفرم باشند. از براث غیر انتخابی استفاده کنید که می تواند به افزایش رشد و تیرگی محیط منجر شود اما تاثیری در ایجاد واکنش مثبت ندارد.

هر بسته تازه تولید شده (یا هرسری آماده صنعتی) از آب بافر باید قبل از اولین مصرف از لحاظ استریل بودن مورد بررسی قرار گیرد. این کار از طریق افزوده شدن ۵۰ میلی لیتر آب به ۵۰ میلی لیتر محیط کشت

براث دو برابر غلظت (نظیر تریپتیک سوی^{۲۶}، تریپتیکاز سوی^{۲۷} و تریپتوز براث^{۲۸}) صورت می گیرد. به جای این کار می توان ۱۰۰ میلی لیتر آب و یا حتی آبی با غلظت کمتر را به صورت ضد عفونی شده از فیلتر غشایی عبور و فیلتر را روی محیط کشت غیرانتخاب شده قرار دهید. از روش انکوباسیون در دمای 35 ± 0.5 درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت استفاده کنید و نتایج افزایش رشد را مشاهده نمایید.

لازم است نتایج آزمایش به ثبت رسیده شود. در صورت مشاهده هرگونه آلودگی لازم است از مصرف محیط کشت صرف نظر و هرگونه داده های به دست آمده از آن بسته را مردود اعلام و منشا آلودگی را بررسی نمایید. درخواست فوری تکرار نمونه برداری ضرورت دارد.

برای آزمایش فیلتر غشایی لازم است مجموعه ی فرآیند از لحاظ استریلیزه بودن مورد بررسی قرار گیرد. این کار با به کارگیری آب معرف استریل شده یا آب رقیق شده به عنوان نمونه های ابتدایی و انتهایی مجموعه فیلتراسیون و بررسی میزان رشد صورت می گیرد. در صورتی که در پردازش بیش از ۳۰ دقیقه وقفه ایجاد شود لازم است با به کارگیری قیف های استریل شده و نو، آزمایش استریل سازی را تکرار نمایید. نتایج را به ثبت برسانید. در صورت مشاهده آلودگی، داده های به دست آمده از آن بسته را مردود اعلام و منشا آلودگی را بررسی نمایید. درخواست فوری تکرار فرآیند نمونه برداری و آزمایش ضرورت دارد.

در روش های چند لوله ای و حضور عدم حضور، وضعیت استریل محیط کشت آماده و آب رقیق شده را مطابق با مطالب یاد شده بررسی نمایید. در صورت مشاهده آلودگی علت یابی نمایید و داده های حاصل از نمونه های آزمایش شده با این مواد را مردود اعلام نمایید. درخواست فوری تکرار نمونه گیری و آزمایش ضروری است.

^{۲۶} Tryptic soy

^{۲۷} Trypticase soy

^{۲۸} Tryptose broth

در روش کشت بشقابی با استفاده از کشت حداقل یک پلیت در هر بسته یا سری محیط کشت می توان وضعیت استریل را مورد بررسی قرار داد و نتایج را به ثبت رساند. در صورت مشاهده ی هرگونه آلودگی لازم است علت یابی صورت گیرد. اطلاعات مرتبط با مشکل به وجود آمده و اقدامات اصلاحی را به ثبت برسانید و درخواستی در رابطه با تکرار نمونه گیری ارائه نمایید.

آزمایشگاه برای شناسایی آلودگی می تواند از هر دو سیستم استاندارد آزمایش فنوتیپ و یا روش های ژنوتیپی استفاده نماید.

e- میزان دقت روش های کمی: دقت تکرار آزمایش را در انواع نمونه آب نظیر آب شرب، آب های سطحی و یا فاضلاب مطابق با روش ها محاسبه نموده و نتایج را به ثبت برسانید. تکرار آزمایش را بر روی ۱۵ نمونه مثبت اول هر نوع آب را به گونه ای انجام دهید که هر تکرار، توسط یک آزمایش کننده انجام شود. در صورتی که تعداد آزمایش کنندگان از یک نفر بیشتر باشد تمام آزمایش کنندگان باید طبق روالی منظم به گونه ای آزمایشات را انجام دهند که تعداد آزمایشات آزمایش کنندگان تقریباً یکسان باشد. نتایج آزمایش تکراری با D_1 و D_2 به ثبت رسیده شود. لگاریتم نتایج به دست آمده را محاسبه نمایید. چنانچه تعداد هر مجموعه از نتایج تکرار $1 <$ باشد قبل از محاسبه لگاریتم، یک به هر کدام اضافه نمایید. دامنه ی (R) را به ازای هر جفت آزمایش تبدیل شده به صورت میانگین (R) دامنه ها محاسبه نمایید. محاسبات مربوط به نمونه آزمایشگاهی در جدول IIV: ۹۰۲۰ ارائه شده است.

بنابراین فرآیند تکرار آزمایش بر روی ۱۰٪ از نمونه های روتین و یا هر مرحله آزمایش صورت می گیرد. محاسبات تکراری را تبدیل نمایید و دامنه آن ها را طبق مراحل گفته شده به دست آورید. چنانچه میزان دامنه از $3/27\bar{R}$ بیشتر باشد به احتمال بیشتر از ۹۹٪، مقدار تغییرپذیری آزمایشگاه بیشتر از حد نرمال خواهد بود. در چنین

جدول IIV: ۹۰۲۰ محاسبه مقادیر دقت

TABLE 9020: VII. CALCULATION OF PRECISION CRITERION

Sample No.	Duplicate Analyses		Logarithms of Counts		Range of Logarithms ($R_{\log}$) ($L_1 - L_2$)
	D_1	D_2	L_1	L_2	
1	89	71	1.9494	1.8513	0.0981
2	38	34	1.5798	1.5315	0.0483
3	58	67	1.7634	1.8261	0.0627
.	.	.	.	.	.
.	.	.	.	.	.
.	.	.	.	.	.
14	7	6	0.8451	0.7782	0.0669
15	110	121	2.0414	2.0828	0.0414

Calculations:

$$\Sigma \text{ of } R_{\log} = 0.0981 + 0.0483 + 0.0627 + \dots + 0.0669 + 0.0414 = 0.71889$$

$$\bar{R} = \frac{\Sigma R_{\log}}{n} = \frac{0.71889}{15} = 0.0479$$

$$\text{Precision criterion} = 3.27 \bar{R} = 3.27 (0.0479) = 0.1566$$

مواردی با بررسی آخرین دقت به دست آمده (جدول VIII: ۹۰۲۰) از نتایج آزمایش صرف نظر کنید. قبل از شروع آزمایشهای بعدی مشکلات به وجود آمده در آزمایش را شناسایی و نسبت به رفع آن اقدام نمایید. با استفاده از تازه ترین نتایج به دست آمده از ۱۵ تکرار آزمایش، روش های تکرار آزمایش را به روز رسانی نمایید.

جدول VIII: ۹۰۲۰ کنترل روزانه دقت از طریق شمارش دوتایی

TABLE 9020: VIII. DAILY CHECKS ON PRECISION OF DUPLICATE COUNTS*

Analyses	Duplicate Analyses		Logarithms of Counts		Range of Logarithms	Acceptance of Range†
	D_1	D_2	L_1	L_2 †		
8/29	71	65	1.8513	1.8129	0.0384	A
8/30	110	121	2.0414	2.0828	0.0414	A
8/31	73	50	1.8633	1.6990	0.1643	U

* Precision criterion = $(3.27 \bar{R}) = 0.1566$

† A = acceptable; U = unacceptable.

۱۰ - تایید

تایید، فرایند عمومی بکار گرفته شده ای است که مشخص می کند آیا روش آزمایش میکروبیولوژی به همان میزان مورد انتظار برای ایجاد داده های قابل اعتماد در حال اجرا است یا خیر. اگر آزمایشگاهی درصد پایینی از ارزیابی با ماتریکس یا میزان آب معینی پیدا کند، باید روش آزمایشی دیگری انتخاب شود. در بیشترین بخش، به علت نیازهای قانونی خاص، روش های تایید/تصدیق برای آب آشامیدنی از دیگر آب ها، متفاوت است.

در زیر چکیده ای از موضوع آورده شده است. اطلاعات بیشتر ممکن است در بحث های متناسب با میکروارگانیسم خاص یا گروه میکروبی پیدا شود.

a-روش های تخمیر چند لوله ای (MTF)^{۲۹}

۱ - روش کلیفرم کل (بخش B ۹۲۲۱)

a) آب آشامیدنی _ آزمایش ها را فقط از فاز تایید شده انتقال دهید. نیاز به آزمایش کامل نیست .

برای اهداف QC، اگر به طور نرمال در یک چهارم نتایج مثبتی وجود نداشته باشد، حداقل یک نمونه منبع آب مثبت را تجزیه و تحلیل کنید تا تایید کند که روش های آزمایشگاه و محیط کشت و تجهیزات، پاسخ های مناسبی ایجاد می کنند. برای نمونه های با سابقه رشد زیاد بدون گاز در لوله های احتمالی، لوله ها را از فاز تایید شده به منظور چک کردن پاسخ های منفی نادرست برای باکتری کلیفرم انتقال دهید. هر پاسخ مثبتی برای /شرشیا کلی یا کلیفرم مدفوعی مقاوم به گرما را تایید کنید.

^{۲۹} Multiple-tube fermentation

b) انواع دیگر آب- با اجرای مرحله کامل در یک تواتر مشخص، مانند آزمایش ۱۰٪ نمونه های مثبت یا یک نمونه از هر سری آزمایش یا درصد معینی از حجم کاری آزمایشگاه، تایید انجام می شود. آزمایشگاه های بزرگ، تعداد چشمگیری از نمونه ها را به صورت روزانه تحلیل می کنند، ۱۰٪ از نمونه های مثبت ممکن است هزینه های غیر ضروری را سبب شود و ممکن است کمتر استفاده شود.

۲) روش استرپتوکوک مدفوعی^{۳۰} - تایید می تواند بعنوان طرح کلی در بخش (۵. ۹۲۳۰C) در زمان مشخصی که توسط آزمایشگاه ایجاد شده ، اجرا شود. رشد با کاتالاز^{۳۱} - منفی، کوکسی گرم مثبت^{۳۲} به صورت کلنی های سیاه مایل به قهوه ای با هاله های قهوه ای در آگار اسکولین بایل^{۳۳}، در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد ظاهر می شوند و در محیط کشت برین- هارت اینفیوژن برات^{۳۴} brain-heart infusion - fvdک (broth) در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد استرپتوکوک مدفوعی را تایید می کند. همچنین، رشد در دمای ۱۰ درجه سانتیگراد در ۶,۵٪ محیط کشت کلرید سدیم برین- هارت ایفیوژن برات^{۳۵} NaCl brain- (heart infusion broth) نشان می دهد که استرپتوکوک ها جزء گروه انتروکوکوس^{۳۶} هستند

b - روشهای ممبران فیلتر:

(۱) روش های کلیفرم کل

^{۳۰} Fecal streptococci

^{۳۱} Catalase

^{۳۲} Gram-positive cocci

^{۳۳} Bile esculin agar

^{۳۴} (BHI)Brain-heart infusion broth

^{۳۵} NaCl brain-heart infusion broth

^{۳۶} Enterococcus

a) آب آشامیدنی - کل ممبران را سواب کامل کنید یا ۵ کلنی معمولی و ۵ کلنی غیرمعمولی (بدون درخشندگی) از کلنی های نمونه های مثبت روی محیط کشت لس- اندو^{۳۷} یا ام- اندو^{۳۸} آگار را انتخاب کنید و مانند بخش B.۴f. ۹۲۲۲ تایید کنید. همچنین، هر نمونه مثبتی برای کلیفرم های مقاوم به گرما را تایید کنید. اگر هیچ نمونه مثبتی وجود نداشت، حداقل یک نمونه منبع آب مثبت شناخته شده را هر سه ماه یک بار آزمایش کنید.

b) انواع دیگر آب - همانند بخش B.۴f. ۹۲۲۲ حداقل ۱۰ کلنی معمولی و غیرمعمولی از نمونه آبهای مثبت را برداشت کنید، نمونه های مثبت را به صورت ماهانه تایید کنید. تعداد را بر پایه درصد تایید تنظیم کنید.

c) جهت تعیین نمونه های منفی نادرست، کلنی های غیر معمولی معرف را از انواع شکل های (مرفولوژی^{۳۹}) متفاوت انتخاب کنید و مانند بخش B.۴f. ۹۲۲۲ تایید کنید.

۲) روش کلیفرم (مدفوعی) گرماپای^{۴۰} - نمونه های مثبت را به طور ماهانه با انتخاب حداقل ۱۰ کلنی آبی رنگ از یک نمونه مثبت که از آبگوشت لوریل تریپتوز^{۴۱} و EC براث^{۴۲} استفاده کرده است، مانند بخش E.۱b. ۹۲۲۱ تایید کنید. تعداد را بر پایه درصد تایید تنظیم کنید.

جهت تعیین نمونه های منفی نادرست، کلنی های غیر معمولی معرف را از انواع شکل های مختلف انتخاب کنید و مانند فاز احتمالی، بخش ۲. B.۹۲۲۱ تایید کنید.

^{۳۷} LES-ENDO

^{۳۸} M-ENDO

^{۳۹} Morphological

^{۴۰} Thermotolerant (fecal) coliform

^{۴۱} Lauryl tryptose broth

^{۴۲} EC broth

a- آب آشامیدنی - نیازی به تایید نیست.

b- انواع دیگر آب- یک نمونه مثبت را به طور ماهانه با انتخاب کلنی های جدا شده مناسب تایید کنید، در صورتی که نمونه های محیط کشت را انتخاب می کنید دقت کافی نکنید می توانند پاسخ مثبت نادرستی را ارائه دهند. تست های سیترات^{۴۳} و ایندول^{۴۴} را همان طور که در بخش ۷ و D. ۹۲۲۵ و دیگر سیستم ها یا روش های شناسایی مشابه شرح داده شده است، اجرا کنید. تست ایندول را در دمای ۴۴,۵ درجه سانتیگراد انجام دهید/شرشیا کلی ها ایندول مثبت هستند و در سیترات رشدی ندارند. تعداد را بر اساس درصد تایید تنظیم کنید.

C) جهت تعیین نمونه های منفی نادرست، کلنی های غیر معمولی معرف را از انواع شکل های (مرفولوژی) مختلف انتخاب کنید و مانند (قسمت b در بالا) تایید کنید.

۴) روش استرپتوکوکی مدفوعی - جهت تایید ماهانه، حداقل ۱۰ کلنی قرمز جداسازی شده از محیط کشت ام-انترکوکوس^{۴۵} آگار به محیط کشت (BHI)^{۴۶} انتخاب کنید و ادامه دهید، همان طور که در بخش ۹۲۳۰C شرح داده شده است. تعداد را بر اساس درصد تایید تنظیم کنید .

۵) روش های انتروکوکسی - جهت تایید ماهانه، حداقل ۱۰ کلنی جدا شده مناسب، از صورتی تا قرمز با رسوب سیاه یا قهوه ای مایل به قرمز از محیط کشت EIA آگار انتخاب کنید. و بر اساس آنچه در بخش

^{۴۳} Citrate test

^{۴۴} Indole test

^{۴۵} m-Enterococcus

^{۴۶} (BHI)Brain-heart infusion broth

C ۹۲۳۰ شرح داده شده است به محیط کشت BHI منتقل کنید . تعداد را بر اساس درصد تایید تنظیم کنید.

C- تست هایی با پایه آنزیمی مشخص شده:

(۱) تست کلیفرم کل بخش ۹۲۲۳

a- آب آشامیدنی - تایید نیاز نیست .

b- انواع دیگر آب - تایید و تصدیق نیاز ندارد. آزمایش های سوبسترای آنزیمی مورد استفاده از یک سوبسترای مشخص مانع رشد باکتریهای غیر کلیفرمی می شود. برای کسانی که تمایل دارند تستهای تاییدی را مدیریت کنند در زیر شرح مختصری آمده است .

برای تجزیه و تحلیل کلیفرم های کل، مواد را به طور ضدعفونی شده با یک درصد معین (مثلا ۰.۵٪) از لوله های ONPG یا CPRG مثبت و از لوله های ONPG یا CPRG منفی به محیط کشت ام-اندو یا EMB با جلای براق (درخشان) یا محیط کشت مناسب دیگری انتقال دهید. جداسازی به سرعت انجام شود. تخمیر لاکتوز را آزمایش کنید (تعدادی از کلیفرم ها می توانند هر دو را انجام دهند یا لاکتوز را به آهستگی تخمیر کنند یا به طور کامل لاکتوز را تخمیر نکنند)، یا برای بتا-دی گالاکتوپیرانوزیداز^{۴۷} بوسیله تست نیترو فنیل بتا-دی گالاکتوزیداز (ONPG)^{۴۸} و تست ایندوفنل سیتوکروم اکسیداز (CO)^{۴۹}، یا شناسایی ارگانیزم ها را انجام دهید. برای تشریح آزمایش به بخش D ۹۲۲۵ مراجعه کنید یا از سیستم ها یا روش های شناسایی مشابه دیگر استفاده کنید.

^{۴۷} β -D galactopyranosidase

^{۴۸} o-nitrophenyl- β -D galactopyranoside

^{۴۹} indophenol cytochrome oxidase (CO)

۲) اشرشیا کلی - برای اثبات تجزیه و تحلیل اشرشیا کلی در صورت تمایل بوسیله انتقال ماده به طور ضدعفونی شده با درصد معینی مثلاً ۵٪ ازلوله های حاوی MUG مثبت و MUG منفی مناسب به محیط کشت مک کانگی^{۵۰} یا EMB با جلای درخشان یا محیط کشتهای مناسب دیگر می تواند انجام شود. جداسازی به سرعت انجام شود. صحت آن را بوسیله واکنش MUG که از محیط کشت (EC+MUG) یا (NA+MUG) استفاده می کند یا با بررسی بیوشیمیایی E.coli، همان طور که در بخش D ۹۲۲۵ شرح داده شده است و یا سایر سیستم ها یا روشهای شناسایی مشابه، تایید کنید.

۳) انتروکوکسی - ماهیانه یک بار کلنی ها را با انتخاب ۱۰ کلنی معمولی (مثبت) و ۱۰ کلنی غیرمعمولی (منفی)، تایید کنید. یا، یک کلنی معمولی و یک کلنی غیرمعمولی از ۱۰٪ از نمونه های مثبت، هر کدام که بزرگتر است اثبات کنید.

۱۱- صحه گذاری^{۵۱} روشهای جدید و غیراستاندارد

تمام روش های غیراستاندارد، روشهای گسترش یافته آزمایشگاهی و روشهای استاندارد بکارگرفته شده تحت شرایط آزمایشی متفاوت مانند ماتریکس، باید توسط آزمایشگاه صحه گذاری شود قبل از این که داده ها با این روشها جمع آوری شوند. صحه گذاری، معیار اجرای یک روش یا فرایند است و داده های قابل اعتماد و صحیح را برای کاربرد هدفمند فراهم می کند. عبارت صحه گذاری، در گذشته برای رشته شیمی استفاده می شد اما امروزه این عبارت برای میکروبیولوژی هم استفاده می شود که همان عبارت به کار رفته در علم شیمی است. تفاوت اصلی آن این است که کجا متغیرهای مجزا استفاده شده است، یعنی در مورد تعداد پلیت ها، آمارهای متفاوتی بکار گرفته شده است و توزیع های احتمالی متفاوتی استفاده شده است.

^{۵۰} MacConkey

^{۵۱} Validation

در محیط کشت پایه میکروبیولوژی، صحنه گذاری بر مناسب بودن روش یا فرایند تست، جهت بررسی و/یا کمیت میکروارگانیسمی مشخص یا گروهی از میکروارگانیسم هایی که خصوصیات ثابتی دارند، تمرکز می کند. در روشهای محیط کشت مستقل، مانند ایمونواسی و تکنیک های ژنتیک مولکولی، نیاز مشابهی برای نمایش کنترل فرایند و اطمینان در قابل اعتماد بودن اطلاعات وجود دارد و این برای اثبات مفهوم ضروری است.

برای روش های قابل قبول استاندارد، صحت داده ها را از کارخانه های سازنده یا نمایندگی های قانونی بدست آورید. قبل از این که روش بوسیله آزمایشگاه تصویب شود، برای تعیین قابلیت مقایسه ای با معیار اجرای شرایط استاندارد و مناسب بودنش برای استفاده، تست های موازی با روش مرجع یا استاندارد را اجرا کنید. حداقل ۳۰ داده مثبت با کیفیت در طول یک سال بدست آورید تا اجازه تعیین آماری یکسانی با روش ایجاد شده یا استاندارد قبل از جایگزینی با روش جدید برای کاربرد روتین پیدا کنید. این می تواند صحنه گذاری ثانویه یا متقاطع نامیده شود. برای روش های در حال توسعه، مانند روش های تحقیقاتی، با هدایت کامل مطالعات اعتبار بخشی درون آزمایشگاهی در تعداد نمونه های آماری زیاد در روش یا فرایند آزمایش اطمینان ایجاد کنید تا قبل از تعیین نهایی قابلیت استفاده، از قابل اعتماد بودن آن مطمئن شوید. جهت صحنه گذاری روش، برای کاربرد وسیع تر، مطالعات درون آزمایشگاهی را مدیریت کنید (مطالعات مشترک نیز نامیده می شود). در ادامه بحث مختصری از صحنه گذاری روش میکروبیولوژی آمده است و ضوابط اجرای کیفی مطلوب، تعیین شده است. برای اطلاعات بیشتر و برای برنامه های عجین شده با صحنه گذاری روش میکروبیولوژی، مراجع ذکر شده را بازنگری کنید.

جهت تعیین تاثیر ماتریکس بر بازیافت، مقدار غلظت مشخصی را در سطح محدود قابل پیش بینی، در نمونه زمینه جمع آوری شده از محل مشابه بعنوان محل اصلی اضافه کنید. برای میکروارگانیسم های هدف از سوسپانسیون های آماده شده ی آزمایشگاهی یا تجاری استفاده کنید.

a-روشهای آزمایش کیفی: تایید روشهای حضور یا عدم حضور (رشد در مقابل عدم رشد) نیاز به اجرای روش های جایگزینی در ماتریکس انتخابی دارد، مانند :

(۱) صحت^{۵۲} و درستی^{۵۳} (تکرارپذیری^{۵۴} و تجدیدپذیری^{۵۵}) - برای آزمون های کیفی، تعداد تکرارها به منظور دستیابی به ارزیابی آماری قابل قیاس، باید زیاد باشد. در غیر این صورت، این شاخص های کیفیت داده ها به طور عمومی، قاطع نیستند.

(۲) اختصاصی بودن^{۵۶} / انتخابی بودن^{۵۷} - توانایی روش آزمایش یا فرایند، جهت انتخاب یا تفاوت قائل شدن ارگانیسم های هدف از گونه های غیرهدف در ماتریکس انتخابی تحت شرایط آزمایشگاه است، یعنی روش برای استفاده نمودن تناسب کافی دارد. در روشهای کیفی، رشد ارگانیسم های هدف، شاخص است. این شاخص، با تایید همه پاسخ ها مانند آزمایش های بررسی میکروبی، تعیین شده است .

(۳) حدود تشخیص^{۵۸} - کمترین دانسیته (غلظت) میکروبی که می تواند تحت شرایط توضیح داده شده، تعیین شود. با رقیق سازی سوش های مرجع و اندازه گیری میزان بازیافت در میان تکثیردر هر رقت، حدود تشخیص راتعیین کنید.

(۴) استواری^{۵۹} - اندازه گیری این که، یک روش آزمایشی تحت شرایط در حال تغییر تا چه اندازه می تواند خوب اجرا شود. این تست بوسیله ایجاد کننده اولیه روش انجام می شود و بوسیله تغییرات متغیرهایی مانند زمان و شرایط نگهداری نمونه، درجه حرارت انکوباسیون، pH محیط کشت و زمان انکوباسیون مشخص می شود.

^{۵۲} Accuracy

^{۵۳} precision

^{۵۴} Repeatabilty

^{۵۵} Reproducibility

^{۵۶} Specificity

^{۵۷} Selectivity

^{۵۸} Detection limit

^{۵۹} Robustness

۵) قابلیت تکرارپذیری^{۶۰} - به میزان هماهنگی بین آزمایش های تکرارپذیری یا اندازه گیری های تحت شرایط یکسان از نظر آزمایشگاه، تکنسین ها و تجهیزات اطلاق می شوند. از میکروارگانیزم های هدف یا از غلظتی از گروه میکروبی استفاده کنید، که حداقل ۷۵٪ نتیجه مثبت خواهند بود. بنابراین، تعداد مناسبی پاسخ، هم برای آزمون های کمی و کیفی می تواند تشخیص داده شود . این اطلاعات می تواند بعنوان مقیاس عدم قطعیت بکار رود.

b- روش های کمی: همانطور که در بالا ذکر شد، صحه گذاری روش یا فرایند، با تشخیص های شمارشی مانند تعداد در واحد حجم مورد توجه قرار می گیرد، و شامل دریافت اطلاعات دقیق در مورد خصوصیات اجرایی روش است، بعلاوه در ادامه :

۱) صحت: به میزان سازگاری بین مشاهدات و مقدار واقعی یا فقدان عدم قطعیت اطلاق می گردد. این مقدار با استفاده از سوش مرجع در غلظت مشخص و مقایسه کردن نتایج روش آزمایش با آن مرجع یا روش استاندارد، تخمین زده می شود. و معمولاً بعنوان درصد بازیافت بیان می شود.

۲) دقت /تکرارپذیری: به میزان سازگاری بین آزمون های تکرارپذیر یا اندازه گیری هایی که تحت شرایط یکسان برای مثال آزمایشگاه، تکنسین ها و تجهیزات انجام شوند، اطلاق می گردد. از میکروارگانیزم های هدف یا غلظتی از گروه های میکروبی استفاده کنید، که حداقل ۷۵٪ نتیجه مثبت خواهند داشت بنابراین، تعداد مناسب پاسخ ، برای تست های کمی و کیفی ایجاد می گردد که می تواند بعنوان مقیاس عدم قطعیت بکار رود.

۳) دقت/ تجدید پذیری - به میزان تغییر پذیری در روش های مشابه یا فرایندها که تحت شرایط تغییر یافته انجام می شوند اطلاق می گردد، بعنوان مثال، بیش از یک آزمایشگر روش مذکور را در محل یا اتاق

^{۶۰} Repeatability

دیگری انجام می دهد / یا تجهیزات مختلفی را به کار می گیرد و این پارامتر نیز بعنوان مقیاس دیگر عدم قطعیت به کار می رود.

۴) بازیافت / حساسیت – به قابلیت روش آزمون در شناسایی یا تعیین میکروارگانیسم هدف درماتریکس انتخابی اطلاق می گردد. بازیافت یا حساسیت را با آزمایش تعداد مناسب نمونه که با افزودن حداقل دو سویانسیون یکسان از میکروارگانیسم هدف تهیه شده است، یا با آزمایش میزان رقت تعیین کنید. سپس این روند با محاسبات آماری دنبال شود.

۵) حدود تشخیص – کمترین غلظت میکروبی که می تواند تعیین شود. با رقیق سازی سوش مرجع و اندازه گیری میزان بازیافت تکرارپذیری در هر رقت، حدود تشخیص را تعیین کنید.

۶) بالاترین حد شمارش – بعنوان مثال، میزانی که در آن، اندازه گیری کمی، بعلت افزایش رشد بیش از حد روی آگار موجود در پلیت، غیر قابل اطمینان باشد. شناسایی مانند بالا انجام می شود.

۷) محدوده – فاصله ی بین بالاترین و پایین ترین حد تشخیص شناسایی، مانند بالا تعیین شده است .

۱۲- مستندسازی و نگهداری سوابق

a- برنامه QA : برنامه QA آزمایشگاه، یا نظام نامه تعهد مدیریت کیفیت، به سیاست QA است و الزامات مورد نیاز جهت حمایت از اهداف برنامه را نشان می دهد. برنامه مذکور، کل سیاست ها، سازمان، اهداف و مسئولیت های عملیاتی را برای دستیابی به اهداف کیفی تشریح می کند و تعیین می کند که فعالیت های QC، به داده های قابل بازیابی، قابل مقایسه و قابل تطابق نیاز دارد. علاوه بر آن، برنامه QA، شامل برنامه اجرایی آزمایشگاهی است تا بیشترین هماهنگی و یکپارچگی فعالیت های QC را در کل برنامه تضمین کند.

(نمونه برداری، تجزیه و تحلیل و مدیریت داده ها) و تبعیت از قوانین ایالتی، فدرال و قانون های محلی و الزامات را نمایش دهد.

b- سوابق نمونه برداری- SOP برای مدیریت سوابق نمونه برداری ، روش های آزمایشگاهی را برای جمع آوری نمونه، انتقال و پذیرش ، ذخیره، تجزیه و تحلیل و دفع آن نوشته شود. سوابق نمونه برداری در فایل کامپیوتر به راحت ترین شکل نگهداری می شود یا به صورت یک سری فرم های چاپ شده است که به کاربر اجازه دسترسی سریع به همه ی اطلاعات مورد نیاز را می دهد. به ویژه برای زمانی که دعوای قضایی پیش بیاید، ضروری است که سوابق خیلی دقیق و کامل باشند. چنین سیستم های سوابق (زنجیره نگهداری و حفاظت) نامیده می شوند و ممکن است به منظور تضمین نمودن یکپارچگی و بی نقص بودن نمونه ها، توسط برنامه مشخص فدرالی و ایالتی لازم باشد. چرا که آزمایشگاه ها آگاه نیستند که آیا نتایج تجزیه و تحلیل ها در دعوای قضایی در آینده مورد استفاده قرار خواهند گرفت یا خیر، بنابراین، تعدادی از زنجیره های اصلی سوابق در همه نمونه ها نگهداری می شوند. جزییات در مورد زنجیره نگهداری و حفاظت در بخش ۲. ۱۰۶۰B و در جایی دیگر در دسترس است. سیستم آزمایشگاهی که به صورت منحصر به فرد نمونه ها را داخل آزمایشگاه شناسایی می کند و بر اساس تعداد نمونه تضمین می کند که نمونه ها نمی توانند اشتباه باشند.

c- نگهداری سوابق: سیستم نگهداری سوابق قابل قبول، اطلاعات مورد نیاز برای جمع آوری و نگهداری نمونه ها، روشهای تجزیه و تحلیل، داده های خام، محاسبه از طریق نتایج گزارش شده و ثبت اشخاص مسئول برای نمونه برداری، پذیرش نمونه و تجزیه و تحلیل را فراهم می کند. فرمتی قابل قبول هم برای آزمایشگاه و هم مشتری (کسانیکه از داده ها استفاده می کنند) انتخاب کنید. از فرم های آماده، اگر در دسترس هستند استفاده کنید. اطمینان حاصل کنید که همه برگه های داده ها توسط آزمایشگر و سرپرست امضاء و تاریخ گذاری شده اند. فرم سوابق متمایز، دفترچه شماره دار، با قلم ثبت شده و هر تغییری با خط

های منفرد کشیده شده که تصحیح آن، و همچنین، نخستین ثبت کننده تصحیح مشخص شده است و یا در یک فایل کامپیوتری مانند دفترچه الکتریکی ثبت شده باشند.

سوابق آزمایش های میکروبیولوژیکی را برای حداقل زمان ۵ سال در مکانی امن نگهداری کنید. ذخیره سازی دور از محل، بعنوان پشتیبان برای همه رکوردها پیشنهاد می شود. انتظار می رود که داده ها بعنوان بخشی از کار قانونی، برای مدت زمان طولانی تری نگهداری شوند. گزارش های دقیق آزمایشگاه ممکن است نگهداری شوند یا داده ها به صورت مختصر به جدولی انتقال داده شوند، در صورتی که آزمایشگاه باید اطلاعاتی همچون: تاریخ، مکان و زمان نمونه برداری، مشخصات نمونه، بررسی نمونه، تاریخ و زمان دریافت نمونه، شرایط و دمای نمونه دریافت شده، تاریخ های شروع و اتمام آزمایش نمونه ها، شخص یا اشخاص مسئول برای اجرای آزمایشها، روش آزمون استفاده شده، داده های خام و نتایج محاسبه شده آزمایش ها را شامل شود. که هر نتیجه ای به طور صحیح از برگه پیش نویس وارد و به وسیله آزمایشگر امضاء شده است را تایید کنید.

زمانی که سیستم مدیریت اطلاعات آزمایشگاهی استفاده می شود، ورودی و خروجی نرم افزار و نتیجه محاسبات را ارزیابی کنید. به منظور دستیابی مشتری و آزمایشگاه به گزارشگر، تمام داده های آزمایشگاهی را روی دیسک یا هارد کپی^{۶۱}، نسخه پشتیبان تهیه کنید. روی نسخه های چاپی، داده ها را بازبینی کنید. همیشه داده های الکترونیکی را توسط نوار محافظت شده یا دیسک یا نسخه چاپی کپی کنید. اگر سیستم مذکور (نرم افزار یا سخت افزار) تغییر کرد، داده های قدیمی را به سیستم جدید منتقل کنید که در این صورت در طول زمان مشخصی قابل بازگرداندن است. انتظار می رود که داده ها بعنوان بخشی از گزارش قانونی برای مدت زمان طولانی تر نگهداری شوند. با مشاور قانونی آزمایشگاه چک کنید. راهنمایی بیشتر در دسترس است.

^{۶۱} Hardcopy

۱۳- مدیریت داده ها

a-توزیع جمعیت باکتریایی: در اکثر آزمون های شیمیایی، توزیع نتایج آزمایش، منحنی نرمال^{۶۲} را دنبال می کند، که توزیع متقارنی درباره میانگین دارد (مراجعه به بخش B ۱۰۱۰). توزیع میکروبی لزوماً به صورت متقارن نیست و به ندرت منحنی، توزیع نرمالی را تقریب می زند. شمارش باکتریایی بعلت ارزش بسیار پایین، اغلب با داشتن توزیع مورب مشخص می شود و چنین ویژگی هایی منجر به میانگین حسابی می شود که به طور قابل ملاحظه ای بالاتر از حد میانگین است. تناوب منحنی این توزیع، دارای دنباله بلند مستقیمی است مانند آنچه که در شکل ۱:۹۰۲۰، نمایش داده شده است و خطوط مورب مثبت را نشان می دهد. تغییرات تصادفی طبیعی در توزیع میکروارگانیسم ها در یک نمونه، ممکن است نسبت به نمونه مورد نظر و ماتریکس منحصر به فرد باشد، و تابعی از عملکرد اجرایی آزمایشگاه نباشد. علاوه بر آن، شمارش میکروبی بدست آمده، نشان دهنده ی واحدهای تشکیل دهنده ی کلنی (CFU) می باشد که ممکن است در یک سلول یا چندین سلول وابسته به آن اتفاق بیفتد، که منجر به تغییر در شمارش تعداد کلنی ها در پلیت های مشابه یا آب رقیق سازی های متعدد شود.

^{۶۲} Gaussian



Figure 9020:1. Frequency curve (positively skewed distribution).

کاربرد روش های آماری، نیازمند فرض تقارن، مانند توزیع نرمال است. از اینرو، لازم است که داده های مورب تبدیل شوند که در این صورت، توزیع متقارن با نتایج توزیع نرمال مشابهت خواهند داشت. با تبدیل تعداد به لگاریتم، ممکن است توزیع نسبتاً "نرمالی، از داده های مورب مثبت بدست آید، همانطور که در جدول (۹۲۲۰:X) نشان داده شده است. مقایسه جداول تکرار فراوانی برای داده های اصلی (جدول X: ۹۲۲۰) و لگاریتمشان (جدول X: ۹۲۲۰) نشان می دهد که لگاریتم ها تقریباً توزیع متقارنی دارند.

TABLE 9020:X. COMPARISON OF FREQUENCY OF MPN DATA

Class Interval	Frequency (MPN)
0-400	11
400-800	2
800-1200	1
1200-1600	0
1600-2000	0
2000-2400	0
2400-2800	0
2800-3200	0

TABLE 9020:XI. COMPARISON OF FREQUENCY OF LOG MPN DATA

Class Interval	Frequency (log MPN)
1.000-1.300	1
1.300-1.600	2
1.600-1.900	1
1.900-2.200	5
2.200-2.500	1
2.500-2.800	2
2.800-3.100	2
3.100-3.400	0
3.400-3.700	1

b- معیار گرایش مرکزی توزیع نامتقارن: بهترین تخمین گرایش مرکزی داده نرمال لگاریتمی، میانگین هندسی است. عبارت (میانگین) در میانگین هندسی، همراه کننده است. چیزی که شناخته شده است تخمین احتمالی ماکزیمم است که بر پایه سبک یا تکرار فراوانی ماکزیمم منحنی توزیع می باشد. احتمال نتایج مشاهده ای بوسیله چندین رقیق سازی و توسط چندین توزیع احتمالی برای متغیرهای تصادفی ناپیوسته، بیان می شود. منحنی تولید شده، خطوط نامتقارن را به سمت راست نشان می دهد، ویژگی هایشان مشابه منحنی توزیع لگاریتمی نرمال است. علت این که کلنی، تحت پوشش منحنی نرمال لگاریتمی شمارش می شود، این است که منحنی های توزیع احتمالی برای متغیرهای تصادفی ناپیوسته ی ارگانسیم های فراوان دیگر، کیفیت مناسبی ندارند و باعث می شوند که منحنی توزیع بیشتر به سمت نامتقارنی پیش رود. زمانی که رویکرد احتمالی ماکزیمم استفاده می شود، تعداد زیادی از این موجودات زنده زیر منحنی پخش می شوند، چرا که ارگانسیم های مختلف به طور متفاوتی به مواد غذایی و محیط کشت پاسخ می دهند. این فرایند تحت تاثیر دما، pH و زمان رشد و توسعه (گرماگذاری) باکتری است. فرایند تجزیه و تحلیل این داده، برای تکرار فراوانی های ماکزیمم، تضمین می کند که موجود زنده مناسب و دقیقی برای تعداد کلنی انتخاب شده است. هنگامی که منحنی MPN برای ۱ و ۲ و ۳ و ۴ لوله از کل ۵ لوله که برای رشد و توسعه (گرماگذاری) باکتری بررسی می شود، مثبت است، احتمالاً، نمودار نرمال لگاریتمی نزدیک به خطی است (بنابراین تقریباً" حالت نرمال را نشان می دهد)، اما به سمت بالا می رود و درجه اوج ممکن را نشان

میدهد. یک شیب تند، با اندازه گیری احتمال انباشتگی در پایین و بالای قسمت انتهایی منحنی توزیع اتفاق افتاده است. خطا به میزان زیاد در دنباله نمودار توزیع وجود دارد، به دلیل اینکه اندازه گیری آن میزان خطا در منحنی توزیع نرمال لگاریتمی سخت است.

زمانی که لگاریتم مقادیر در مقابل تعداد کلنی ها (بیشترین تعداد احتمالی)، در میزان قابل احتمال لگاریتم نرمال متراکم در کاغذ شطرنجی، رسم میشود، فرض احتمالی لگاریتم نرمال، تایید می شود .

کاربرد میانگین هندسی، بعنوان تعداد بیشمار محصول در کل مقادیر داده ها، محاسبه می شود و بر پایه احتمال توزیع احتمالی است. این تخمین احتمالی هم بر اساس تکرار تعداد مشاهدات و هم تعداد نمونه های تصادفی در تعداد مشاهدات است.

هنگامی که نسبت احتمالی، قبل و بعد از تبدیل لگاریتم متغیر، X ، مشاهده شد، می توان ثابت کرد که این نسبتها مشابه هستند. با میانگین نسبت احتمالی لگاریتم، خاصیت های ضرب تبدیل به خاصیت های جمع می شود، که در اینصورت درک و مدیریتشان آسان است.

شبهات احتمالی از میانگین محاسباتی معمولی و هم در تکرار فراوانی و هم در تعداد کلنی قابل تغییر در نظر گرفته می شود نسبت به در نظر گرفتن صرف میانگین هندسی تعداد کلنی ها متفاوت است.

میانگین هندسی، لگاریتم معکوس میانگین لگاریتم احتمالی پارامتر اندازه گیری شده است. میانگین هندسی از میانگین MPN کاملاً متفاوت است و عموماً "تعداد احتمال کمتری نسبت به میانگین هندسی خواهد داد. میانگین هندسی نسبت به میانگین محاسباتی، تخمین های احتمالی زیاد، برای میکروارگانیسم های زنده دارد.

در استخراج بیشترین احتمال برای توزیع احتمالی متغیرهای تصادفی ناپیوسته، لگاریتم محصولات MPN، می تواند بعنوان عملکرد لگاریتمی تکرار فراوانی (تناوب) نشان داده شود. بنابراین، میانگین های هندسی، بعنوان روش دستیابی به تخمین بیشترین احتمال برای تعیین چندین MPN، منطقی و قابل قبول هستند.

C) "کمتر از" ($>$) مقادیر: همیشه استفاده از مقادیر "کمتر از" در محاسبه و ارزیابی داده های میکروبیولوژیکی راه مناسب و مطمئنی نیست، زیرا چنین مقادیری نمی توانند بطور آماری، بدون اصلاح، بکار گرفته شوند. اصلاحات پیشنهاد شده شامل تغییر چنین شماره هایی به صفر، انتخاب مقادیر کم بین صفر و مقدار "کمتر از" یا اختصاص خود مقادیر یعنی تغییرات > 1 به $1, 1/2$ یا 0 است.

اینها دلایل معتبری هستند که شامل مقادیر (کمتر از) نمی شوند خواه اصلاح شوند، خواه خیر. اگر پایگاه داده ها نسبتاً بزرگ باشد، با چنین مقادیر کمی، تاثیر این مقادیر نامطمئن، کم و بی فایده خواهد شد. اگر این پایگاه داده ها کوچک باشد، یا تعداد نسبتاً زیادی مقادیر (کمتر از) داشته باشد، گنجایش فرم های اصلاح شده چنین مقادیری، تاثیر زیادی روی نتیجه نهایی می گذارد و تاثیرات مثبت یا منفی ساختگی را سبب می شود. در نظر گرفتن مقادیر "کمتر از" به طور خاص نامناسب است اگر مقادیر کوچکتر از $1000, 100$ یا بالاتر باشند، چرا که مقادیر درست ناشناخته می توانند هر جایی از 0 تا 0.99 تا 999 و غیره باشند. هنگامی که چنین مقادیری در ابتدا ذکر می شوند، حجم های تست را افزایش یا تطبیق دهید. تنها استثنا نسبت به این اخطار می تواند تستهای منظم با محدودیت های مورد قبول تعریف شده باشد، مانند مقادیر $> 1/100 \text{ mL}$ گزارش شود برای سیستم های آب آشامیدنی که حجم 100 mL مورد نیاز است.

بخش C ۹۰۲۰ کنترل کیفی درون آزمایشگاهی

۱- شرایط موجود

برنامه های درون آزمایشگاهی QC، ابزار تاسیس سیستم ضوابط اجرایی بر پایه توافق هستند که سطح قابل قبولی از کیفیت داده ها و قابلیت رقابت آنها در بین آزمایشگاهها را با نیازها یا/و مزایای مشابه تضمین می کنند. تعدادی از سازمان ها و انتشارات مختلف نسبت به برنامه های درون آزمایشگاهی علاقمند هستند. برنامه گواهی، بعنوان قدرت مستقل گواهی یا ضمانت نوشته شده ای صادر می کند که مدیریت آزمایشگاه با آن استانداردها موافق است. برنامه اعتباربخشی، برنامه ای است که گروه متخصص اعتبارنامه استانداردها را تنظیم می کنند و سپس گروه گواهینامه تعیین می کنند که آیا این آزمایشگاه شایستگی تبعیت از این استانداردها را نمایش می دهد یا خیر. سپس این آزمایشگاه، گواهی رسمی را دریافت می کند. اغلب عبارت (اعتبارنامه) به جای (گواهینامه) استفاده می شود.

معمولاً "برنامه های آزمایشگاهی QA شامل ۳ بخش است: معیارهای یکسان برای عملیات آزمایشگاه، بازنگری برنامه خارجی و تست های مهارت خارجی. این برنامه ها، آزمایشگاه ها را در شناخت تلاش های توسعه ای ادامه دار یاری می کند.

۲- معیارهای یکسان

برنامه های کنترل کیفیت درون آزمایشگاهی، بعنوان ابزار اختیاری یا اجباری برای ایجاد استانداردهای آزمایشگاهی یکسان و برای هدفی خاص به وجود آمدند. شرکت کننده ها ممکن است از یک سازمان یا گروهی از سازمان هایی که دارای علایق مشترکی یا متعلق به قوانین مشترکی هستند، باشند. اغلب گروه یا شخصی ممکن است موافق پیش نویس کردن ضوابط باشند. اگر قانونی باشد، ممکن است قانون گذار ضوابط را برای تجزیه و تحلیل های پایش مطلوب تنظیم کند.

نمونه برداری یکسان و روشهای آزمایش و ضوابط کنترل کیفیت، در صورت نیاز برای پرسنل، امکانات، تجهیزات، ابزارها، موجودی ها و مدیریت داده ها و گزارش ها درخواست، بحث، بازنگری و اصلاح شده است

و بوسیله گروه برای استفاده مشترک تصویب شده است. شناسایی ضوابط بعنوان ملزومات برای کیفیت داده های قابل قبول باید اجباری شود. سند رسمی برای همه شرکت کننده ها آماده و تهیه شده است. مسئولیت های مدیریت، سرپرست ها و کارمندان QA/QC در ۹۰۲۰A شرح داده شده است. در آزمایشگاههای بزرگ، کارمند QA بعنوان پست کارمندی شناخته می شود اما ممکن است در آزمایشگاههای کوچکتر عنوان سرپرست یا مقام ارشد را داشته باشد.

بعد از ترکیب عملیات و تایید آزمایشگاهی که برنامه QA تصویب شده است و به صورت روزانه استفاده می شود، سرپرست آزمایشگاه و کارمند QA بازنگری برنامه داخلی همه عملیات و سوابق را برای قابل قبول شدن مدیریت می کنند تا مشکلات احتمالی را بررسی کنند و در تحلیل آنها کمک کنند. در صورتی که این کار به درستی انجام شود، احتمال کمی وجود دارد که در بازنگری های ثانویه مشکل مهمی پیش آید.

۳- بازنگری برنامه خارجی :

به محض اینکه آزمایشگاه برنامه QA را در جایی مستقر کند، مدیریت به سازمان اعتبارنامه یا گواهینامه (تصدیق) اطلاع می دهد و ارزیابی کیفیت برنامه خارجی درخواست می شود. نوع ارزیابی و سازمانی که ارزیابی را اجرا می کند به تعدادی متغیر مانند درخواست برای اعتبارنامه (گواهینامه) وابسته خواهند بود و اینکه آیا این نمونه های آزمایش شده برای اهداف، مطلوب و مورد نظر هستند یا خیر. سپس گروه یا شخص با تجربه و حرفه ای برنامه خارجی QA به منظور پی بردن به قابل قبول بودن برنامه QA و برای کار با آزمایشگاه برای حل همه مشکلات، ترتیب ملاقات در محل را می دهند. آزمایشگاه هایی که برای بازنگری برنامه اقدام می کنند اسناد آزمایشگاه و روشهای بازنگری شده ی خودشان را خواهند داشت. نسبت قابل قبول، تایید می کند که برنامه QA آزمایشگاه، بطور مناسب در حال انجام است و نشان می دهد

که آزمایشگاه قابلیت تولید داده های معتبر قابل دفاع را دارد. چنین ارزیابی هایی در محل تکرار می شوند و ممکن است اعلام شوند یا نشوند.

۴- تست های مهارت خارجی

آزمایشگاه هایی که برای گواهینامه یا اعتبارنامه اقدام می کنند برای آن روش های ماتریکس خاص یا فنی یا آزمایشی نیاز به شرکت در آزمون های مهارت روتین دارند که آزمایشگاه تمایل به استفاده از آنها دارد. نمونه های چالشی بعنوان نمونه های شناخته شده در جدولی برای آزمایش و گزارش نتایج آماده و فرستاده می شوند. نمونه های آزمون مهارت مانند نمونه های روتین بوسیله آزمایشگری که به صورت روتین روش را راه اندازی می کند مورد آزمون قرار می گیرد. داده های گزارش شده به صورت محرمانه کدگذاری می شوند و طبق طرح توافق شده ارزیابی می شوند. نتایج حاصله برای تمام آزمایشگاه ها خلاصه می شوند و گزارش آزمایشگاه های اختصاصی به شرکت کننده ها فرستاده می شود. نتایج چنین مطالعاتی نشان می دهد که کیفیت آزمون های روتین در هر آزمایشگاهی با عملکرد (کار) گروه مقایسه می شود. همچنین نتایج بدست آمده گروه، بعنوان توصیف کننده کامل عملکرد که می تواند برای روش های تحلیلی مورد انتظار باشد، آزمایش شود. ارزیابی از شکست تا موفقیت نمونه آزمون مهارت می تواند سبب عدم تشخیص شود. برای آن آزمایشگاه هایی که برای گواهینامه یا اعتبارنامه اقدام نمی کنند، نمونه های کنترل یا نمونه های تست مهارت می تواند خریداری شود.

۵- نگهداری :

آزمایشگاه نیاز به انجام ارزیابی خارجی دارد و باید به طور موفقیت آمیزی تعدادی از نمونه های آزمون مهارت را به اتمام رساند. با تکمیل موفقیت آمیز هر دو مورد، آزمایشگاه ابلاغیه رسمی را دریافت خواهد کرد. جهت رسیدن به این خواسته، آزمایشگاه باید بطور موفقیت آمیزی نمونه تست مهارت را به صورت

سالانه و شش ماهه به میزان مشخص شده توسط شخص باصلاحیت تکمیل کند و ارزیابی در محل، هر ۳ سال یک بار انجام شود.

۶- برنامه نمونه

در برنامه فدرال، گواهینامه آزمایشگاه آب آشامیدنی، آزمایشگاههای عمومی آب، باید بر اساس معیارهای حداقل و روش ها و تضمین کیفیت شرح داده شده در نظام نامه EPA درباره گواهینامه تصدیق شوند. ضوابط، برای عملیات آزمایشگاهی و روش شناسی ایجاد شده اند. بازرسی در محل بوسیله مرکز گواهی دهنده ایالت یا نماینده اش برای تایید استاندارد، لازم است. به طور سالانه، آزمایشگاه ملزم به انجام آزمایش نمونه های ناشناخته بطور رسمی هستند، و شخص دارای مسئولیت، مشکلات شناخته شده درون محل را بازرسی یا اجرای ارزیابی را پیگیری می کند و نیاز به تصحیح در طول یک دوره زمانی مشخص دارد. برنامه های ایالتی ممکن است ضوابط فدرال را افزایش دهد.

حفظ مجوز رسمی توسط کنفرانس ملی اعتبار بخشی آزمایشگاه، عملکرد قابل قبول و همچنین موفق در ۲ تا از ۳ تا تست های مهارت نهایی بر پایه آزمون های روتین، برای ارزیابی در محل، لازم هستند. بازرسی درون محل آزمایشگاه ها در برنامه گواهی حاضر، نشان می دهد که علت های اولیه و اصلی اختلافات در آزمایشگاه های آب آشامیدنی، ناکافی بودن تجهیزات، محیط کشت های آماده شده نامناسب، روش های آزمایش نادرست و ناکافی بودن پرسنل آموزش دیده است.



مهندسی آب و فاضلاب

www.abfaeng.ir

جلوتر از دیگران حرکت کنید

اطلاعات آموزشی

اطلاعات فنی و مهندسی

اخبار روز آب و فاضلاب

اخبار استخدامی کارفرمایان



[T.me/mohandesifazelab](https://t.me/mohandesifazelab)



[Instagram.com/abfaeng](https://www.instagram.com/abfaeng)