www.abpsoil.com

ابنیه پایدار سبز

ISIRI
7024-1
1st.edition

جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran
مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
Institute of Standards and Industrial Research of Iran

استاندارد ملی ایران
۷۰۲۴-۱
چاپ اول

کیفیت آب –
جستجو و شمارش باکتریو فاژ ها –
قسمت اول : شمارش باکتریوفاژهای ریبونوکلئیک اسید (RNA) اختصاصی F

Water qality–Detection and enumeration of *bacteriophages*
Part 1: Enumeration of *F – specific RNA bacteriophages*

ICS: 07.100.20

به نام خدا

آشنایی با مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب بند یک مادهٔ۳ قانون اصلاح قوانین و الزامات مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفه تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) ایران را به عهده دارد.

تدوین استاندارد در حوزه های مختلف در کمیسیون های فنی مرکب از کارشناسان مؤسسه* صاحب نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می شود وکوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانهٔ صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف‌کنندگان، صادرکنندگان و وارد کنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان های دولتی و غیر دولتی حاصل می شود .پیش نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی نفع و اعضای کمیسیون های فنی مربوط ارسال می شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادها در کمیتهٔ ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب به عنوان استاندارد ملی(رسمی) ایران چاپ و منتشر می شود.

پیش نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان های علاقه مند و ذیصلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می کنند درکمیتهٔ ملی طرح و بررسی و درصورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می شود .بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می شود که بر اساس مفاد نوشته شده در استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تدوین و در کمیتهٔ ملی استاندارد مربوط که مؤسسه استاندارد تشکیل می‌دهد به تصویب رسیده باشد.

مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران از اعضای اصلی سازمان بین المللی استاندارد (ISO)[1] کمیسیون بین المللی الکتروتکنیک (IEC)[2] و سازمان بین المللی اندازه شناسی قانونی (OIML)[3] است و به عنوان تنها رابط[4] کمیسیون کدکس غذایی (CAC)[5] در کشور فعالیت می کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی های خاص کشور، از آخرین پیشرفتهای علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین المللی بهره گیری می شود.

مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران می‌تواند با رعایت موازین پیش‌بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و / یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری نماید. مؤسسه می تواند به منظور حفظ بازارهای بین المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری نماید. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده کنندگان از خدمات سا زمانها و مؤسسات فعال در زمینهٔ مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدورگواهی سیستم‌های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست- محیطی، آزمایشگاه‌ها و مراکز کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش ، مؤسسهٔ استاندارد این گونه سازمان‌ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامهٔ تأیید صلاحیت به آن‌ها اعطا و بر عملکرد آنها نظارت می کند .ترویج دستگاه بین المللی یکاها، کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این مؤسسه است.

---

* موسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

1- International organization for Standardization
2- International Electro technical Commission
3- International Organization for Legal Metrology (Organization International de Metrology Legal)
4- Contact point
5- Codex Alimentarius Commission

کمسیون فنی تدوین استاندارد

" کیفیت آب - جستجو و شمارش باکتریوفاژ ها – قسمت اول:شمارش *باکتریوفاژهای ریبونوکلئیک اسید (RNA) اختصاصی F* "

رئیس :	**سمت و/ یا نمایندگی**
اصلانی، محمد مهدی (دکتری میکروب شناسی)	انستیتو پاستور ایران
دبیر:	
زرسازی ،گیتا (لیسانس صنایع)	موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
اعضا : (اسامی به ترتیب حروف الفبا)	
رحیمی فرد، ناهید (دکتری تخصصی میکروب شناسی)	وزارت بهداشت ، درمان و آموزش پزشکی- اداره کل آزمایشگاههای کنترل و مرکز تحقیقات غذا و دارو
زند وکیلی ، فاطمه (فوق لیسانس علوم بهداشتی در تغذیه)	موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
سرگزی ، مریم (لیسانس میکروب شناسی)	شرکت آب های شهرها و شهرک های غرب تهران
ضرغا میور ، زهره (فوق لیسانس میکروب شناسی)	شرکت آب و فاضلاب شهر تهران
سعادتی ، شهلا (لیسانس تغذیه)	وزارت بهداشت ، درمان و آموزش پزشکی- اداره کل آزمایشگاههای کنترل و مرکز تحقیقات غذا و دارو

فهرست مندرجات

عنوان	صفحه
آشنایی با مؤسسهٔ استاندارد	ج
کمیسیون فنی تدوین استاندارد	ه
پیش گفتار	ز
مقدمه	ح
۱ هدف	۱
۲ دامنه کاربرد	۱
۳ مراجع الزامی	۱
۴ اصطلاحات و تعاریف	۲
۵ اساس روش	۳
۶ نمونه برداری	۳
۷ مواد لازم	۳
۸ وسایل لازم	۱۰
۹ روش اجرای آزمون	۱۱
۱۰ بیان نتایج	۱۹
۱۱ گزارش نتایج	۱۹

پیش گفتار

استاندارد " کیفیت آب ـ جستجو و شمارش باکتریو فاژ ها - شمارش *باکتریوفاژهای ریبونوکلئیک اسید (RNA)اختصاصی F* " که پیش‌نویس آن درکمیسیون‌های مربوط توسط مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران تهیه و تدوین شده و در .یکصد و شانزدهمین اجلاس کمیتهٔ ملی میکروبیولوژی و بیولوژی مورخ ۸۶/۳/۲۹ مورد تصویب قرار گرفته است ، اینک به استناد بند ۱ مادهٔ ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱، به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت‌های ملی و جهانی در زمینهٔ صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در مواقع لزوم تجدید نظر خواهد شد و هر پیشنهادی که برای اصلاح و تکمیل این استانداردها ارائه شود، هنگام تجدید نظر در کمیسیون فنی مربوط مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین، باید همواره از آخرین تجدید نظر استانداردهای ملی استفاده کرد.

منبع و ماخذی که برای تهیهٔ این استاندارد مورد استفاده قرار گرفته به شرح زیر است :

1-ISO 10705–1:1995Water quality– Detection and enumeration of bacteriophages - Part 1: Enumeration of F – specific RNA bacteriophages

" کیفیت آب – جستجو و شمارش باکتریوفاژها – قسمت اول :
شمارش *باکتریوفاژهای ریبونوکلئیک اسید (RNA) اختصاصی F* "

۱ هدف

هدف از تدوین این استاندارد، تعیین روش جستجو و شمارش *باکتریوفاژهای ریبونوکلئیک اسید (RNA) اختصاصی F* در آب است.

۲ دامنهٔ کاربرد

این استاندارد در باره انواع مختلف آب شامل آب های تصفیه شده، آب های تصفیه نشده، آب حوضچه های پرورش آبزیان، پساب های تصفیه شده، رسوبات و لجن، کاربرد دارد.

۳ مراجع الزامی

مدارک الزامی زیر حاوی مقرراتی است که در متن این استاندارد به آنها ارجاع داده شده است. بدین ترتیب آن مقررات جزئی از این استاندارد محسوب می شود. در مورد مراجع دارای تاریخ چاپ و/ یا تجدید نظر، اصلاحیه ها و تجدیدنظرهای بعدی این مدارک مورد نظر نیست. معهذا بهتر است کاربران ذینفع این استاندارد، امکان کاربرد آخرین اصلاحیه ها و تجدید نظرهای مدارک الزامی زیر را مورد بررسی قرار دهند. در مورد مراجع الزامی بدون تاریخ چاپ و/ یا تجدید نظر، آخرین چاپ و/ یا تجدید نظر آن مدارک الزامی ارجاع داده شده مورد نظر است.

استفاده از مراجع زیر برای کاربرد این استاندارد الزامی است :

۳-۱ استاندارد ملی ایران شماره ۴۲۰۸،آیین کار نمونه‌برداری از آب جهت آزمون‌های باکتریولوژیکی؛

۳-۲ **استاندارد ملی ایران شماره ۱-۸۹۲۳ ، میکروبیولوژی موادغذایی وخوراک دام – آماده سازی آزمایه – سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری برای آزمون های میکروبیولوژی – قسمت اول : مقررات کلی برای آماده سازی سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری.**

۳-۳ استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹، میکروبیولوژی موادغذایی وخوراک دام - راهنمای الزامات کلی برای آزمون

۳-۴ استاندارد ملی ایران شماره ۱-۸۶۶۳ ، قسمت اول – راهنمای عمومی تضمین کیفیت برای آماده سازی محیط های کشت در آزمایشگاه؛

۳-۵ استاندارد ملی ایران شماره ۲-۸۶۶۳ ، میکروبیولوژی خوراک انسان و دام- راهنمای آماده سازی و تولید محیط های کشت - قسمت دوم - راهنمای عملی برای آزمون محیط های کشت؛

۴ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد اصطلاحات و/ یا واژه ها با تعاریف زیر به کار می‌رود:

۴-۱

باکتریوفاژها

ویروس‌هایی هستند که میزبان آنها باکتری‌ها می‌باشند.

۴-۲

باکتریوفاژهای *ریبونوکلئیک اسید (RNA) اختصاصی F*

ویروس‌های باکتریایی هستند که با اتصال به سویهٔ باکتری میزبان از پیلیF و یا پیلی جنسی، سویهٔ میزبان را آلوده کرده و در محل تلاقی آن با محیط‌های کشت مغذی، پلاک‌های شفاف و قابل مشاهده ایجاد می کنند.

۴-۳

پلاک[1]

ناحیهٔ شفاف و قابل مشاهده‌ای است که در نتیجهٔ لیز[2] شدن باکتری توسط باکتریوفاژ، در سطح محیط کشت جامد مغذی پس از گرمخانه‌گذاری ایجاد می شود.

۵ اساس روش

1- *Plaque*
2 - *Lyse*

این روش بر اساس شمارش پلاک‌های ایجاد شده پس از اضافه کردن سویهٔ باکتری میزبان به حجم معینی از نمونه و محیط کشت نیمه جامد و انجام کشت روی محیط‌های کشت جامد مغذی و گرمخانه‌گذاری در دما و زمان مشخص، طبق بند۱۰ این استاندارد می باشد.

۶ نمونه برداری

نمونه برداری ازآب باید طبق استاندارد ملی ایران شماره ۴۲۰۸ ، انجام شود.

۷ مواد لازم

برای بدست آوردن نتایج هماهنگ، از مواد شیمیایی با کیفیت یکسان و درجهٔ خلوص آزمایشگاهی استفاده کنید. همچنین برای تهیهٔ محیط‌های کشت و معرف‌ها ، از آب یون‌زدایی شده[1] و فاقد مواد باز دارنده از رشد میکروارگانیسم ها استفاده کنید.
چنانچه از محیط‌های کشت قابل دسترس در بازار استفاده می کنید، تهیهٔ آن را طبق دستورالعمل سازنده انجام دهید.

۷-۱ محلول های رقیق کننده

برای تهیهٔ محلول‌های رقیق کننده به استاندارد ملی ایران شماره ۴۲۰۷ ، مراجعه کنید.

۷-۱-۱ محلول پپتون نمکدار

مواد تشکیل دهنده

نام مواد	مقدار
پپتون	g ۱
سدیم کلراید	g ۸/۵
آب مقطر	ml۱۰۰

روش تهیه :

1- Deionized

مواد فوق را با جوشاندن در ۹۵۰ ml آب مقطر حل کنید. سپس حجم آن را با آب مقطر به ۱۰۰۰ ml برسانید. پس از تقسیم کردن محلول به حجم‌های مناسب ، آن را در اتوکلاو با دمای ^{oC}(۳ ± ۱۲۱) به مدت زمان ۱۵ دقیقه سترون کنید.

pH محیط را با محلول هیدرو کسیدسدیم و یا اسید هیدروکلریدریک (یک مول در لیتر) به گونه‌ای تنظیم کنید که پس از سترون سازی برابر(۰/۱ ± ۷) در دمای ^{oC} ۲۵ باشد.

محلول فوق را در تاریکی و دمای ^{oC} (۲ ± ۴) نگه داری کنید.

۷-۲ محیط های کشت ، محلول ها و کشت های مرجع

۷-۲-۱ آبگوشت تریپتون عصارهٔ مخمر گلوکز[1] (TYGB)

۷-۲-۱-۱ محیط کشت پایه[2]

مواد تشکیل دهنده

نام مواد	مقدار
پیتون حاصل از تریپتون[3]	g ۱۰
عصارهٔ مخمر	g ۱
سدیم کلراید	g ۸/۵
آب مقطر	ml۱۰۰۰

روش تهیه:

مواد فوق را با جوشاندن در آب مقطرحل کنید.پس از تقسیم محیط در حجم های ml ۲۰۰ آن را در اتو کلاو با دمای ^{oC} (۳ ± ۱۲۱) به مدت زمان ۱۵ دقیقه سترون کنید.

pH محیط را به گونه ای تنظیم کنید که پس از سترون سازی برابر (۰/۱ ± ۷/۲) در دمای ^{oC} ۲۵ باشد.

محیط فوق را در تاریکی و دمای ^{oC} (۲± ۴) حداکثر به مدت رمان ۶ ماه می توان نگهداری کرد.

۷-۲-۱-۲ محلول کلسیم - گلوکز[3]

مواد تشکیل دهنده

نام مواد	مقدار
کلسیم کلراید با دو ملکول آب	g ۳
گلوکز	g ۱۰

1- Tryptone yeast extract glucose broth
2- Basal medium
3- Tryptocase peptone
1- Calcium – glucose solution

آب مقطر	ml ۱۰۰

روش تهیه:

مواد فوق را با استفاده از حرارت ملایم در آب مقطر حل کنید. سپس آن را با استفاده از صافی غشایی با اندازهٔ روزنهٔ η ۰/۲۲ سترون کنید.

محلول فوق را در تاریکی و دمای ^{oC} (۲ ± ۴) نگه داری کنید.

۷-۲-۱-۳ محیط کشت کامل[۱]

مواد تشکیل دهنده

نام مواد	مقدار
محیط کشت پایه (طبق بند ۷ـ۲ـ۱ـ۱)	ml ۲۰۰
محلول کلسیم گلوکز(طبق بند ۷ـ۲ـ۱ـ۲)	ml ۲

روش تهیه:

محلول کلسیم - گلوکز را با رعایت شرایط اسپتیک به محیط کشت پایه اضافه و مخلوط کنید.

محیط کشت کامل را در تاریکی و دمای ^{oC} (۲± ۴) نگه داری کنید.

۷-۲-۲ تریپتون عصارهٔ مخمر گلوکز آگار[۲] (TYGA)

۷-۲-۲-۱ محیط کشت پایه

مواد تشکیل دهنده

نام مواد	**مقدار**
پیتون حاصل از تریپتون	g ۱۰
عصارهٔ مخمر	g ۱
سدیم کلراید	g ۸/۵
آگار	g ۱۵ تا ۲
	(به قدرت ژله ای شدن آگار بستگی دارد)
آب مقطر	ml۱۰۰۰

روش تهیه:

2- Complete medium

۱- Tryptone yeast extract glucose agar (TYGA)

موادفوق را با جوشاندن در آب مقطر حل کنید. پس از تقسیم محیط کشت در حجم های ml ۲۰۰ آن را در اتوکلاو با دمای ^{oC}(۳±۱۲۱) به مدت زمان ۱۵ دقیقه سترون کنید.
pH محیط را به گونه‌ای تنظیم کنید که پس از سترون سازی برابر(۰/۱ ±۷/۲) در دمای ^{oC}۲۵ باشد.
محیط کشت فوق را در تاریکی و دمای ^{oC}(۲ ±۴) نگهداری کنید.

۷-۲-۲-۲ محیط کشت کامل

مواد تشکیل دهنده

نام مواد	مقدار
محیط کشت پایه (طبق بند ۷-۲-۲-۱)	ml ۲۰۰
محلول کلسیم ـ گلوکز (طبق بند۷-۲-۱-۲)	ml ۲

روش تهیه:
محیط کشت پایه را پس از ذوب کردن، تا دمای ^{oC}(۴۵ تا ۵۰) سرد کنید. سپس محلول کلسیم گلوکز را با رعایت شرایط اسپتیک به آن اضافه و مخلوط کنید. محیط کشت را در پلیت های سترون بشرح زیر پخش کنید :
الف ـ در پلیت‌هایی به قطر ۹ cm، با حجم‌های ۲۰ml.
ب ـ در پلیت‌هایی به قطر۱۴cm، با حجم‌های ۵۰ml .

۷-۲-۳ محیط کشت نیمه جامد تریپتون -عصارهٔ مخمر -گلوکز آگار[1] (ssTYGA)

۷-۲-۳-۱ محیط کشت پایه

مواد تشکیل دهنده

نام مواد	مقدار
پیتون حاصل از تریپتون	g ۱۰
عصارهٔ مخمر	g ۱
سدیم کلراید	g ۸/۵
آگار	g ۱۰ تا ۶
	(مقدار آن، به قدرت ژله ای شدن آگار بستگی دارد.)
آب مقطر	ml ۱۰۰۰

1- Semisolid tryptone yeast extract glucose agar

روش تهیه:

مواد فوق را با جوشاندن در آب مقطر حل کنید. پس از تقسیم محیط در حجم های ۵۰ ml ، آن را در اتوکلاو با دمای ^{oC}(۳ ± ۱۲۱) به مدت زمان ۱۵ دقیقه سترون کنید.

محیط کشت فوق را در تاریکی و دمای(۲ ± ۴) نگهداری کنید.

pH محیط را به گونه‌ای تنظیم کنید که پس از سترون سازی برابر(۰/۱ ± ۷/۲) در دمای ^{oC} ۲۵ باشد.

یادآوری ــ برای بدست آوردن نتایج مطلوب، قدرت ژله ای شدن آگار باید کنترل شود.

۷-۲-۴ محیط کشت مکانکی آگار[1]

مواد تشکیل دهنده

نام مواد	مقدار
پیتون	g ۲۰
لاکتوز	g ۱۰
نمک صفرا وی	g ۵
قرمز خنثی	m g ۷۵
آگار	g (۱۲ تا ۲۰)
آب مقطر	ml ۱۰۰۰

روش تهیه:

مواد فوق را با جوشاندن در آب مقطر حل کنید. پس از تقسیم محیط به حجم های ۲۰۰ ml ، آن را در اتوکلاو با دمای ^{oC} (۳ ± ۱۲۱) به مدت زمان ۱۵ دقیقه سترون کنید. pH محیط را به گونه‌ای تنظیم کنید که پس از سترون سازی برابر(۰/۱ ± ۷/۴) در دمای ^{oC} ۲۵ باشد. پس از سرد شدن دمای محیط کشت تا دمای ^{oC}(۴۵ تا ۵۰) ، آن را در پلیت‌هایی به قطر ۹ cm پخش کنید.

۷-۲-۵ گلیسرول[2]

1-MacConkey agar
2-Glycerol

مواد تشکیل دهنده

نام مواد	مقدار
گلیسرول (۸۷۰ گرم در لیتر)	ml ۱۰۰

پس از تقسیم گلیسرول در ظروف مناسب به حجم‌های ۲۰ml آن را در اتـوکلاو بـا دمـای ^{oC}(۱۲۱±۳) بـه مدت زمان ۱۵ دقیقه سترون کنید.
گلیسرول را می توانید در دمای ^{oC}(۲۰-) حداکثر به مدت زمان یک سال نگهداری کنید. پیش از استفاده از گلیسرول، آن را با قرار دادن در دمای آزمایشگاه ، ذوب کنید

۷-۲-۶ محلول R_{Nase}[1]

مواد تشکیل دهنده

نام مواد	مقدار
R_{Nase}	m g ۱۰۰
آب مقطر	ml ۱۰۰

روش تهیه:

R_{Nase} را با جوشاندن در آب مقطر به مدت زمان ۱۰ دقیقه حل کنید. سپس آن را در ظروف پلاسـتیکی به حجم‌های ۰/۵ ml تقسیم و در دمای ^{oC}(۲۰-) نگهداری کنید. محلول فوق را در دمـای ^{oC}(۲۰-) تـا یـک سال می توان نگهداری کرد.

۷-۲-۷ محلول نالیدیکسیک اسید [2]

مواد تشکیل دهنده

نام مواد	مقدار
نالیدیکسیک اسید	m g ۲۵۰
سدیم هیدروکساید (NaOH یک مول در لیتر)	ml ۲
آب مقطر	ml ۸

روش تهیه:

1- R_{Nase} *solution*
2- *Nalidixic acid solution*

نالیدیکسیک اسید را در محلول سدیم هیدروکساید حل کنید. پس از افزودن آب مقطر، آن را با استفاده از صافی غشایی با اندازهٔ روزنهٔ µ ۰/۲۲ سترون کنید.

محلول فوق را می توانید در دمای ^{oC}(۲ ± ۴) حداکثر تا ۸ h و یا در دمای ^{oC}(۲ ±۲۰-) به مدت تا ۶ ماه نگه‌داری کنید

۷-۲-۸ کشت‌های میکروبی مرجع [i]

کشت‌های میکروبی مرجع برای باکتریوفاژهای *ریبونوکلئیک اسید(RNA)اختصاصی F* شامل:

- سویهٔ WG۴۹ سالمونلا تایفی‌موریوم، فاژ تایپ ۳ - NCTC ۱۲۴۸۴؛
- باکتریو فاژهای MS۲ - NCTC ۱۲۴۸۷ یا B۱ - ATCC ۱۵۵۹۷؛
- اشریشیا کلی K۱۲ - Hfr (NCTC ۱۲۴۸۶ یا ATCC ۲۳۶۳۱).

۸ وسایل لازم

از وسایل معمول درآزمایشگاه میکروب‌شناسی طبق استاندارد ملی ایران شماره شماره ۹۸۹۹ ، میکروبیولوژی موادغذایی وخوراک دام - راهنمای الزامات کلی برای آزمون ، و به ویژه از وسایل زیر استفاده کنید:

۸-۱ اتوکلاو و آون برای سترون‌سازی محیط‌های کشت و وسایل ؛

۸-۲ گرمخانه یا حمام آب [ii] قابل تنظیم در دمای ^{oC}(۲± ۳۷) و مجهز به تکان دهنده [iii] با سرعت(۱۰±۱۰۰) دور در دقیقه؛

۸-۳ گرمخانه یا حمام آب قابل تنظیم در دمای ^{oC}(۱± ۴۵ و۱۰۰) ؛

۸-۴ pH متر برای تنظیم pH محیط‌های کشت؛

۸-۵ دستگاه کلنی کانتر [iv] برای شمارش پلاک‌ها؛

۸-۶ فریزر قابل تنظیم در دماهای ^{oC}(۵±۲۰- و ۵±۷۰-)؛

۸-۷ اسپکترومتر [v] مجهز به صافی در محدودهٔ طول موج ۵۰۰ تا ۶۵۰ نانومتر با پهنای باند۱۰ ± نانومتر و قادر به نگهداری کووت [vi] به قطرcm ۱ باشد؛

۸-۸ پلیت به قطر ۹cm یا ۱۴cm؛

۸-۹ پیپت مدرج در اندازه‌های ml (۱ و۵ و۱۰) و پیپت پاستور؛

۸-۱۰ مزور مدرج؛

۸-۱۱ ارلن با گنجایش ml (۵۰ تا ۳۰۰)؛

۸-۱۲ لولهٔ آزمایش درپیچ‌دار؛

۸-۱۳ کووت اسپکترومتر با مسیر عبور نور ۱ cm؛

۸-۱۴ ارلن نفلرومتریک[1] با گنجایش ml (۲۵۰ تا ۳۰۰) و بازوی جانبی (طبق بند ۸-۷) وصل شود؛

۸-۱۵ صافی غشایی با اندازهٔ روزنهٔ ۰/۲۲µ؛

۸-۱۶ ویال‌های پلاستیکی[2] با گنجایش ml (۱/۲ تا ۳) ؛

۸-۱۷ سانتریفوژ ۳۰۰۰ دور در دقیقه .

۹ روش اجرای آزمون

۹-۱ آماده سازی نمونه

آماده سازی نمونه را مطابق با استاندارد ملی ایران شماره۴۲۰۷ ، انجام دهید.

۹-۲ آماده سازی مو اد

۹-۲-۱ آماده سازی کشت مرجع

محتویات آمپول لیوفیلیزه[3] کشت میکروبی مرجع (طبق بند ۷-۲-۸) را از فریزر خارج کنید و در دمای آزمایشگاه قرار دهید تا ذوب شود.

۹-۲-۱-۱ آماده‌سازی، کشت و نگهداری سویهٔ میزبان WG۴۹ و اشریشیا کلی K۱۲ - Hfr

با استفاده از پیپت پاستور، به سویه های میکربی میزبان و مرجع بند ۹-۲-۱مقداری محیط کشت TYGB (طبق بند ۷-۲-۱) بیفزایید. سوسپانسیون فوق را به ارلن حاوی ۵۰ ml محیط کشت TYGB (طبق بند ۷-۲-۱) منتقل کنید. سپس آن را به مدت زمان h ۲± ۱۸درگرمخانهٔ ^{oC} (۱ ± ۳۷) و مجهز به تکان دهنده (طبق بند ۸-۲) گرمخانه گذاری کنید. پس از افزودن ۱۰ml گلیسرول سترون(طبق بند۷-۲-۵) به سوسپانسیون فوق، آن را در حجم های ۱/۲ mlدر ویال های پلاستیکی (طبق بند ۸-۱۶) تقسیم و دردمای ^{oC}(۱۰± ۷۰-) ذخیره کنید.

1- Reference cultures
2- Water bath
3- Shaker
4- Colony counter
5- Spectrometer
6- Cuvet

1- Nephelometric
2- plastic vials
3- lyophilized

۹ـ۲ـ۲ آماده سازی کشت کاری[1]

۹-۲-۲-۱ یک ویال از کشت ذخیرهٔ (طبق بند ۹-۲-۱-۱) را در دمای آزمایشگاه قرار دهید تا ذوب شود. سپس با استفاده از پی‌پت پاستور سترون آن را به پلیت حاوی محیط کشت مکانکی آگار (طبق بند ۷ـ۲ـ۴) تلقیح نمایید ودردمای ^{oC} ۳۷ به مدت زمان h ۲±۱۸ گرمخانه‌گذاری کنید.

۹-۲-۲-۲ پس از پایان زمان گرمخانه گذاری، ۳ تا ۵ کلنی لاکتوز مثبت را انتخاب کنید. هر کلنی را به طور جداگانه به ظروف حاوی۵۰ml محیط کشت TYGB(طبق بند ۷-۲-۱) تلقیح کنید.سپس پلیت ها را در گرمخانهٔ ^{oC}(۱± ۳۷) ومجهز به تکان دهنده (طبق بند ۸-۲) به مدت زمان h (۱ ± ۵) قرار دهید.

۹-۲-۲-۳ به سوسپانسیون بند ۹-۲-۲-۲ مقدار۱۰ml گلیسرول سترون (طبق بند ۷-۲-۵) اضافه و مخلوط کنید. پس از تقسیم سوسپانسیون در ویال‌های پلاستیکی (طبق بند ۸-۱۶) به حجم‌های ۱/۲ ml ، آن را می توانید در دمای^{oC}(۱۰ ±۷۰-) تا مدت زمان دوسال‌نگهداری کنید.

یادآوری ۱ـ آزمون کنترل کیفی کشت کاری را طبق بند ۹-۴ این استاندارد انجام دهید.

یادآوری۲ـ چنانچه نتیجهٔ کنترل کیفی در حد قابل قبول نباشد، آمپول لیوفلیزهٔ دیگری از کشت میکروبی مرجع تهیه کنید و مراحل کنترل کیفی را دوباره انجام دهید. از انجام کشت‌های مکرر خودداری کنید.

یادآوری۳ـ چنانچه انجام آزمون‌های بیشتری لازم باشد، از چندین ارلن نفلرومتریک مجزا بطور همزمان می‌توانید استفاده کنید.

۹ـ ۳ اندازه‌گیری میزان کدورت

۹-۳-۱ ویال کشت کاری (طبق بند ۹-۲-۱-۱) را که از سویهٔ میزبان ۴۹ WG تهیه شده، از فریزر خارج کرده و در دمای آزمایشگاه قرار دهید تا ذوب شود.سپس آن را به ارلن نفلرومتریک (طبق بند ۸-۱۴) حاوی ۵۰ml محیط کشت TYGB (طبق بند۷-۲-۱) تلقیح کنید.

۹-۳-۲ اسپکترومتر (طبق بند ۸ - ۷) را با استفاده از کووت صفر کنید.

۹-۳-۳ مقدارml ۰/۵کشت کاری (طبق بند ۹-۲-۱-۱) ذوب شده در دمای آزمایشگاه را به محیط کشت TYGB (طبق بند ۷-۲-۱) تلقیح و آن را در گرمخانهٔ^{oC}(۱±۳۷) و مجهز به تکان دهنده به مدت دست کم h ۳ قرار دهید.

۹-۳-۴ هر ۳۰ دقیقه یکبار میزان کدورت سوسپانسیون فوق را توسط اسپکترومتر اندازه‌گیری کنید.

۹-۳-۵ ml ۱از سوسپانسیون بند ۹-۳-۳ را برای شمارش کنار بگذارید.

۹-۳-۶ اطمینان حاصل کنید که ارلن نفلرومتریک در کمترین زمان ممکن در بیرون از گرمخانه قرار گرفته است.

1- Working culture

۹-۳-۷ نمونه را تا رقت 10^{-6} رقیق کنید.

۹-۳-۸ مقدار ml ۰/۲ از رقت‌های 10^{-4} و 10^{-5} و 10^{-6} را روی دو پلیت (هر کدام ۰/۱ml) حاوی محیط کشت TYGA (طبق بند ۷-۲-۲) پخش نموده و در دمای ^{oC}(۱±۳۷) به مدت زمان h (۲±۲۴) گرمخانه گذاری کنید. پس از پایان زمان گرمخانه گذاری، پلیت‌هایی را شمارش کنید که تعداد تقریبی کلنی‌های آن بین(۳۰ تا ۳۰۰) کلنی در هر پلیت باشد.

یاد آوری- مراحل فوق را تا حدی تکرار کنید که بین میزان کدورت و شمارش کلنی ها، ارتباط مستقیم وجود داشته باشد.

۹-۴ کنترل کیفی سویهٔ میزبان WG۴۹

۹-۴-۱ مراحل آزمون را (طبق بند ۹-۳) تکرار کنید. سپس در زمان های صفر و سه ساعت، از هر رقت به طور جداگانه روی محیط کشت مکانکی آگار(طبق بند ۷-۲-۴) کشت دهید. پلیت ها را در دمای ^{oC} (۱±۳۷) به مدت زمان h(۲±۲۴)گرمخانه گذاری کنید.

۹-۴-۲ در زمان های صفر و سه ساعت ، مقدار ۰/۱ml از رقت 10^{-2} را روی پلیت حاوی محیط کشت مک‌کانکی آگار (طبق بند ۷-۲-۴) پخش کنید. سپس یک دیسک نالیدیکسیک اسید و یک دیسک کانامایسین را روی آن قرار دهید و در دمای ^{oC}(۱±۳۷) به مدت زمان h (۲ ± ۲۴) گرمخانه گذاری کنید. پس از پایان زمان گرمخانه گذاری ، هالهٔ عدم رشد میکروارگانیسم‌ها را در محدودهٔ دیسک ها بررسی کنید.

۹-۵ تأیید سویهٔ میزبان

سویهٔ میزبان باید دارای ویژگی‌های زیر باشد:

۹-۵-۱ شمارش (طبق بند ۹-۳) روی محیط کشت TYGA در زمان صفر ساعت باید بین 10^{7}× (۰/۵تا ۳) cfp در ۱ml باشد؛

۹-۵-۲ شمارش (طبق بند ۹-۳) روی محیط کشت TYGA در زمان سه ساعت باید بین 10^{7} × (۷ تا ۴۰) cfp در ۱ml باشد؛

۹-۵-۳ در اطراف دیسک نالیدیکسیک اسید، هالهٔ عدم رشد دیده نشود؛

۹-۵-۴ در اطراف دیسک کانامایسین، هالهٔ عدم رشد کمتر از ۲۰ml باشد؛

۹-۵-۵ کلنی‌های لاکتوز منفی در پلیت های حاوی TYGA بند ۹-۳-۸ کمتراز ٪ ۸ تعداد کل کلنی‌های آن باشد؛

یادآوری ــ دیسک‌های آنتی بیوتیک را می‌توانید با غلظت بیشتر و یا با اندازه‌های متفاوت استفاده کنید ولیکن هالهٔ عدم رشد را باید متناسب با آن‌ها در نظر بگیرید.

۹ـ۶ کنترل حساسیت سویهٔ میزبان به باکتریوفاژهای ریبونوکلئیک اسید (RNA) اختصاصی F

۹-۶-۱ کشت ذخیره از باکتریوفاژ MS۲ (طبق بند ۹-۲-۱-۱) را تهیه کنید.

۹-۶-۲ به ارلن حاوی ۲۵ ml محیط کشت TYGB (طبق بند ۷-۲-۱) یک سویهٔ میزبان اضافه کنید. سپس آن را در دمای ^{oC}(۱± ۳۷) طبق بند ۸-۲ به مدت زمان h (۲± ۱۸) گرمخانه گذاری کنید.

یادآوری ـ سویهٔ میزبان مانند (اشریشیا کلی Hfr - K ۱۲ و NCTC ۱۲۴۸۶)

۹-۶-۳ به ارلن نفلرومتریک حاوی ۲۵ ml محیط کشت TYGB(طبق بند ۷-۲-۱) با دمای ^{oC}(۳۵ تا ۳۷) مقدار ۰/۲۵ ml از سویهٔ میزبان را که یک شب در یخچال قرار داده‌اید، افزوده و دردمای ^{oC}(۱±۳۷) به مدت زمان دست کم ۹۰دقیقه گرمخانه‌گذاری کنید. سپس سویهٔ محلول ذخیرهٔ MS۲ با تعداد تقریبی فاژ $pfp۱۰^{۷}$ در ml را به آن اضافه کنید. پس از گرمخانه‌گذاری به مدت زمان h (۴ تا ۵)، مقدار ۲/۵ ml محلول کلروفرم را به آن اضافه نموده و کاملاً مخلوط کنید. سپس سوسپانسیون فوق را به مدت یک شب در دمای ^{oC}(۲±۴) قرار دهید.

۹-۶-۴ سوسپانسیون بند ۹-۶-۳ را در لوله‌های مخصوص ریخته و در سانتریفوژ (طبق بند ۸ -۱۷) به مدت زمان ۲۰ دقیقه قرار دهید. سپس با استفاده از پی‌پت پاستور سترون با دقت و به آرامی محلول رویی را برداشته وآن را در دمای ^{oC}(۲± ۴) نگه داری کنید.

یادآوری ۱- تعداد تقریبی پلاک ها باید بین($۱۰^{۱۰}$ تا $۱۰^{۱۳}$) pfp در ml باشد.

یادآوری ۲ـ با توجه به سرطانزا بودن کلروفرم، هنگام استفاده از آن نکات ایمنی را رعایت کنید.

یادآوری ۳ـ باید توجه داشت که تیتر محلول فاژی با گذشت زمان، به تدریج کاهش می‌یابد.

۹ـ۷ تهیهٔ سویهٔ میکروبی میزبان اشریشیا کلی Hfr ـ K ۱۲

۹-۷-۱ از محلول فاژی بند ۹-۶-۴ رقت های اعشاری طبق استاندارد های ملـی ایـران شـماره ۴۲۰۷ و ۸۹۲۳-۱ تهیه کنید.

۹-۷-۲ رقت‌های فوق را به مدت زمان یک شب در دمای ^{oC}(۲±۴) نگه داری کنید. سپس با استفاده ازمحلول پپتون نمکدار(طبق بند ۷-۱-۱) مقادیر ml (۱۰۰ تا ۱۰۰۰) از سوسپانسیون سویهٔ MS۲ را به گونه ای تهیه کنید تا تعداد تقریبی پلاک‌ها در آن pfp ۱۰۰ در ml باشد.

۹-۷-۳ به سوسپانسیون بند ۹-۷-۲ مقدار g/L ۵ گلیسرول سترون اضافه کنید. سپس آن ها را در ویال های پلاستیکی به حجم های ml ۱/۲ تقسیم و در دمای ^{oC}(۵ ±۲۰-)یا دمای ^{oC}(۵ ± ۷۰-) نگه داری کنید.

۹-۷-۴ چهار ویال حاوی سوسپانسیون بند ۹-۷-۳ را از فریز خارج کنید و در دمای آزمایشگاه قرار دهید تا ذوب شود. پس از انتقال سوسپانسیون به لولهٔ آزمایش سترون ومخلوط کردن، مقدار ml ۱ از آن را برداشته و در پلیت حاوی سویهٔ اشریشیا کلی Hfr -K ۱۲ و WG۴۹ (طبق بند ۱۰-۱) بریزید.

۹-۷-۵ پلاک ها را در هر کدام از پلیت ها بطور جداگانه شمارش وسپس محاسبه کنید.
چنانچه تعداد پلاک ها روی پلیت WG۴۹ مربوط به سویهٔ اشریشیاکلی Hfr -K۱۲ از ٪ ۸۰ کل آن بیشتر شد، آنها را برای آزمون استفاده کنید.

۱۰ اجرای آزمون

۱۰-۱ روش استاندارد

۱۰-۱-۱ یک ویال کشت کاری (طبق بند ۹-۲-۱-۱) از فریزر خارج کنید و در دمای آزمایشگاه قرار دهید.

۱۰-۱-۲ کشت کاری را به ارلن نفلرومتریک حاوی ml ۵۰ TYGB (طبق بند ۷-۲-۱) در دمای آزمایشگاه اضافه کنید. سپس بلافاصله میزان کدورت آن را (طبق بند ۹-۳) با استفاده از اسپکترومتر (طبق بند ۸-۷) اندازه گیری کنید.

۱۰-۱-۳ مقدار ml ۰/۵ کشت کاری بند ۱۰-۱-۱ را به سوسپانسیون بند۱۰-۱-۲ اضافه کنید سپس آن را در دمای ^{oC}(۱± ۳۷) در گرمخانهٔ مجهز به تکان دهنده (طبق بند ۸-۲) قرار دهید.

۱۰-۱-۴ هر ۳۰ دقیقه یکبار میزان کدورت آن را (طبق بند ۹-۳) وبا استفاده از اسپکترومتر(طبق بند ۸-۷) اندازه گیری کنید.

۱۰-۱-۵ چنانچه میزان کدورت بند ۱۰-۱-۴ به تعداد تقریبی cfu 10^{8}در ml رسید، سوسپانسیون را ازگرمخانه خارج کنید و پس از سرد کردن آن روی یخ، حد اکثر تا مدت زمان h ۲ بررسی کنید.

یادآوری ـ برای جلوگیری ازکاهش پیلیF که تأثیر منفی در محاسبات دارد، محیط کشت را بلافاصله پس از خارج کردن از گرمخانه سرد کنید.

۱۰-۱- ۶ محیط کشت ssTYGA (طبق بند ۷-۲-۳) را ذوب کرده، سپس آن را تا دمای ^{oC}(۴۴ تا ۵۰) سرد کنید.

۱۰-۱-۷ با رعایت شرایط اسپتیک به هر ۵۰ ml محیط کشت بند ۱۰-۱-۶ مقدار ml ۰/۵ محلول کلسیم گلوکز (طبق بند ۷-۲-۱-۲) اضافه کنید. پس از تقسیم به حجم های ml ۲/۵ در لوله های آزمایش در پیچ دار آن را در حمام آب (طبق بند ۸-۳) با دمای ^{oC}(۱± ۴۵) قرار دهید.

۱۰-۱-۸ به هر یک از لوله های آزمایش بند ۱۰-۱-۷ ml ۱از نمونه اضافه کنید.

۱۰-۱-۹ ml۱کشت تلقیحی را به لوله های آزمایش بند۱۰-۱-۸ اضافه و با احتیاط مخلوط کنید. سپس آن را روی محیط کشت TYGA (طبق بند ۷-۲ -۲) در پلیت هایی با اندازه cm ۹ریخته، پس از یکنواخت کردن، در سطح صاف قرار دهید. سپس پلیت ها را به صورت وارونه در دمای ^{oC}(۱±۳۷) به مدت زمان h(۲±۱۸) گرمخانه گذاری کنید.

یادآوری ۱ ـ اضافه کردن اولین قطرهٔ نمونهٔ سرد شده و سویهٔ میزبان به محیط کشت در دمای آزمایشگاه، ممکن است باعث کاهش سریع دما و جامد شدن محیط کشت شود. برای پیشگیری از کاهش سریع دمای محیط کشت بین این دو مرحله، فاصلهٔ زمانی کافی را در نظر بگیرید اما از قرار دادن لوله های آزمایش، بیشتر از ۱۰ دقیقه در گرمخانه یا حمام آب خودداری کنید.

یادآوری ۲ــ با استفاده از نور غیرمستقیم می توانید پس از h ۴ گرمخانه گذاری، پلاک ها را در پلیت ها بررسی کنید.

۱۰ــ۲ روش برای نمونه های با تعداد زیاد فلور(جمعیت) باکتریایی[1]

پیش از سترون سازی محیط کشت ssTYGA (طبق بند ۷-۲-۳) مقدار mg ۰/۲ نالیدیکسیک اسید (با غلظت نهایی ۱۰۰ میکروگرم در لیتر) را به ml۵۰ محیط کشت ssTYGA اضافه کنید.

یادآوری ــ با توجه به حساس به حرارت بودن نالیدیکسیک اسید، می توانید آن را با استفاده از صافی غشایی با اندازهٔ روزنهٔ η ۰/۲۲ (طبق بند ۸-۱۵) سترون کنید سپس آن را به محیط کشت ssTYGA پس از سترون کردن اضافه کنید.

۱۰-۳ روش برای نمونه های با تعداد کم باکتریوفاژ

۱۰-۳-۱ مراحل آزمون بند۱۰-۱ را با تغییرات زیر انجام دهید:

۱۰-۳-۲ مقدار ml۱۰ محیط کشت ssTYGA (طبق بند ۷-۲-۳) و ml ۱کشت سویهٔ میزبان و ml ۵ از نمونه را با هم مخلوط کنید. سپس آن را روی پلیت به قطر cm۱۴حاوی ml۵۰ محیط کشت TYGA (طبق بند ۷-۲-۲) بریزید.

1- Bacterial flora

یادآوری ــ با روش فوق می توانید ۵۰ تا ۱۰۰ نمونه را در ۱۰ تا ۲۰ پلیت به طور همزمان تلقیح نمایید ودر ۱ pfp / ml جستجو کنید. با توجه به مصرف بالای محیط کشت، توصیه می شود از روش های تغلیظ که برای تعداد باکتریوفاژهای کمترهم کارائی دارد استفاده کنید.

۱۰ــ ۴ آزمون تأییدی

۱۰-۴-۱ به طور موازی با روش استاندارد (طبق بند ۱۰-۱) یک سری از پلیت ها را به روش زیر تهیه کنید به لولهٔ حاوی محیط کشت ssTYGA(طبق بند ۷-۲-۳) محلول R_{Nase} (طبق بند ۷-۲-۶) (با غلظت نهایی ۴۰ میکروگرم در میلی لیتر) اضافه کنید.

مثال: ۱۰۰ میکرولیتراز محلول R_{Nase} به ۲/۵ ml محیط کشت ssTYGA اضافه شود.

۱۰-۴-۲ آزمون تأییدی در شرایط زیر باید انجام شود :

۱۰-۴-۲-۱ زمانی که شرایط نمونه برداری تغییر کرده است؛

۱۰-۴-۲-۲ زمانی که شرایط نمونه برداری ثابت است اما نسبت $\frac{NR_{Nase}}{N}$ (طبق بند ۱۱ این استاندارد) معمولاً کمتر از ٪ ۱۰ باشد؛

۱۰-۴-۲-۳ زمانی که شرایط نمونه برداری ثابت است اما نسبت $\frac{NR_{Nase}}{N}$ (طبق بند ۱۱ این استاندارد) معمولاً بیشتر از٪ ۱۰ باشد؛

یاد آوری ۱ - اگر پلاک روشن حلقوی بزرگی با اطراف صاف دیده شود، احتمال وجود باکتریوفاژ سالمونلا سوماتیک می باشد؛

یادآوری ۲ ـ در موارد کمتر، فاژهای RNA نمی توانند توسط ۴۰ میکروگرم در لیتر R_{Nase} ممانعت شوند و در صورت لزوم می توانید، غلظت R_{Nase} را تا ۴۰۰ میکروگرم در لیترافزایش دهید.

۱۰ــ۵ تضمین کیفیت [1]

۱۰-۵-۱ در هر سری از نمونه های مورد آزمون از یک شاهد منفی (مانند محلول رقیق کنندهٔ سترون) و یک شاهد مثبت(مانند MS۲) استفاده کنید.

۱۰-۵-۲ نمونه ای از آب سطحی و یا فاضلاب را که به طور طبیعی آلوده است، انتخاب کنید. سپس با استفاده از محلول پپتون نمکدار (طبق بند ۷-۱-۱) آن را به گونه ای رقیق کنید که تعداد تقریبی کلنی ها ۱۰۰ pfp/ml شود. سپس مقدار ۵ g/L گلیسرول سترون (بند ۷-۲- ۵) به آن اضافه کنید و در دمای ^{oC}(۵± ۲۰ -) ، یا دمای ^{oC}(۵±۷۰-) نگهداری کنید.

1- Quality assurance

یاد آوری ۱ – چنانچه دربرخی موارد تعداد فاژهای RNA در نمونهٔ استاندارد تهیه شده کاهش یافت، آن را دور بریزید.

یاد آوری ۲ – چنانچه دربرخی موارد حساسیت به فاژ ها کاهش یافت، نمونهٔ دیگری را (طبق بند ۱۰ــ۱) تهیه و سپس آزمون کنید.

یادآوری ۳– برای به‌دست آوردن نتایج مطلوب باید، مقایسهٔ بین آزمایشگاهی انجام شود.

۱۱ بررسی و شمارش

۱ــ۱۱ پلیت هایی را که تعداد پلاک در آنها بین(۳۰ تا ۳۰۰) می باشد، انتخاب کنید. سپس پلاک های باکتریوفاژ ریبونوکلئیک اسید (RNA) اختصاصی F را (طبق بند۱۰ این استاندارد) شمارش کنید.

تعداد باکتریوفاژهای ریبونوکلئیک اسید (RNA) اختصاصی F را طبق فرمول(۱) محاسبه کنید.

فرمول(۱)

$$C_{pfp} = \frac{N - N_{RNase}}{n} \times F$$

که در آن :

C_{pfp} تعداد تایید شده باکتریوفاژهای ریبونوکلئیک اسید (RNA) اختصاصیF در ۱ ml؛

N تعداد کل پلاک های شمارش شده روی پلیت های حاوی WG۴۹ (طبق بندهای ۱۰-۱ یا ۱۰-۲ یا ۱۰-۳)؛

N_{RNase} کل پلاک های شمارش شده روی پلیت های حاوی WG۴۹ همراه با R_{Nase} (طبق بند۱۰- ۴)؛

n تعداد پلیت ها؛

F فاکتور رقت و یا غلظت است.

۱۱-۲ بیان نتایج

نتایج را به صورت تعداد باکتریوفاژهای ریبونوکلئیک اسید (RNA) اختصاصیF در ۱ ml نمونه بیان کنید.

یادآوری ــ چنانچه آزمون های تاییدی (طبق بند ۱۰ـ۴) انجام می شود، نسبت R_{Nase} را به صورت درصد گزارش کنید.

۱۲ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید دارای آگاهی های زیر باشد:

۱۲ ـ ۱ مشخصات کامل نمونه شامل نوع و حجم نمونه؛.

۱۲ ـ ۲ تاریخ و محل نمونه برداری؛

۱۲-۳ تاریخ ارسال نمونه به آزمایشگاه؛

۱۲ـ ۴ تاریخ انجام آزمون؛.

۱۲ـ ۵ روش آزمایش مورد استفاده طبق استاندارد ملی ایران ۱- ۷۰۲۴

۱۲- ۶ بیان نتایج طبق بند ۱۱ استاندارد ملی ایران به شماره ۱- ۷۰۲۴

۱۲- ۷ سایر اطلاعات مربوط به روش آزمون؛

۱۲- ۸ نام، نام خانوادگی و امضای آزمایش‌کننده.