INSO
21769
1st.Edition
2017
Identical with
ISO 14730:2014

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

استاندارد ملی ایران
۲۱۷۶۹
چاپ اول
۱۳۹۵

اپتیک بینایی - محصولات مراقبتی عدسی تماسی - آزمون اثربخشی نگه‌دارنده ضدمیکروبی و راهنمای تعیین تاریخ امحاء

Ophthalmic optics – Contact lens care products – Antimicrobial preservative efficacy testing and guidance on determining discard date

ICS: 11.040.70

سازمان ملی استاندارد ایران

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

صندوق‌پستی: ۶۱۳۹-۱۴۱۵۵ تهران- ایران

تلفن: ۵-۸۸۸۷۹۴۶۱

دورنگار: ۸۸۸۸۷۰۸۰ و ۸۸۸۸۷۱۰۳

کرج ، شهر صنعتی، میدان استاندارد

صندوق پستی: ۱۶۳-۳۱۵۸۵ کرج - ایران

تلفن: ۸- ۳۲۸۰۶۰۳۱ (۰۲۶)

دورنگار: ۳۲۸۰۸۱۱۴ (۰۲۶)

رایانامه: standard@isiri.org.ir

وبگاه: http://www.isiri.gov.ir

Iranian National Standardization Organization (INSO)

No.1294 Valiasr Ave., South western corner of Vanak Sq., Tehran, Iran

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

Tel: + 98 (21) 88879461-5

Fax: + 98 (21) 88887080, 88887103

Standard Square, Karaj, Iran

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

Tel: + 98 (26) 32806031-8

Fax: + 98 (26) 32808114

Email: standard@isiri.org.ir

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

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

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

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

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

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

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

1- International Organization for Standardization
2- International Electrotechnical Commission
3- International Organization for Legal Metrology (Organisation Internationale de Metrologie Legals)
4- Contact point
5- Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

«اپتیک بینایی - محصولات مراقبتی عدسی تماسی - آزمون اثربخشی نگه‌دارنده ضدمیکروبی و راهنمای تعیین تاریخ امحاء»

رئیس:	**سمت و/یا محل اشتغال:**
کهن‌نیا، ناصر (کارشناسی ارشد میکروبیولوژی)	کارشناس استاندارد - آزمایشگاه همکار مهرام
دبیر:	
مسافر قشلاق، مهدی (کارشناسی ارشد فیزیک)	کارشناس امور استاندارد - اداره کل استاندارد استان قزوین
اعضا: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)	
آقاجانی، امیر (کارشناسی ارشد فوتونیک)	کارشناس سازمان فضایی ایران
حاجی نورمحمدی، لیلا (کارشناسی ارشد مهندسی شیمی)	کارشناس استاندارد - آزمایشگاه همکار دانش محور البرز
حلیمی، حمیدرضا (کارشناسی میکروبیولوژی)	کارشناس امور استاندارد - اداره کل استاندارد استان قزوین
دینکانی، طاهره (کارشناسی مهندسی پزشکی)	کارشناس مسئول تجهیزات پزشکی - دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی قزوین
رحمانی، کوروش (کارشناسی ارشد علوم و مهندسی صنایع غذایی)	رئیس اداره امور آزمایشگاه‌ها - اداره کل استاندارد استان قزوین
رحمنی، سعید (کارشناسی ارشد اپتومتری)	عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
عسلی‌پیشه، آی‌سان (کارشناسی ارشد میکروبیولوژی)	عضو انجمن متخصصین علوم بیولوژی، میکروبیولوژی و صنایع غذایی استان قزوین
فرح‌بخش، احسان (کارشناسی ارشد میکروبیولوژی)	کارشناس استاندارد - آزمایشگاه همکار الکل و مواد غذایی بیدستان

اعضا: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)

سمت و/یا محل اشتغال:

قاسمی کیانی، نازیلا
(کارشناسی مهندسی پزشکی)

کارشناس مسئول تجهیزات پزشکی - دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی قزوین

منافیان، فاطمه سادات
(کارشناسی ارشد مهندسی پزشکی - بیومواد)

مدیر آزمایشگاه همکار مخازن گاز طبیعی آسیاناما

ویراستار:

فرجی، رحیم
(کارشناسی ارشد شیمی)

کارشناس مسئول - گروه پژوهشی مهندسی پزشکی- پژوهشگاه استاندارد

فهرست مندرجات

عنوان **صفحه**

پیش‌گفتار ز
مقدمه ح
۱ هدف و دامنه کاربرد ۱۰
۲ مراجع الزامی ۱۰
۳ اصطلاحات و تعاریف ۱۱
۴ اصول کلی ۱۱
۵ روش‌های آزمون ۱۱
۵-۱ مواد و واکنشگرها ۱۱
۵-۲ نمونه‌برداری برای آزمون و نگه‌داری محیط کشت ۱۳
۵-۳ آماده‌سازی آزمون میکروبی (ماده تلقیحی) ۱۳
۵-۴ روش اجرایی آزمون ماده تلقیحی ۱۴
۵-۵ کنترل‌ها ۱۶
۵-۶ معیارهای عملکرد ۱۷
۵-۷ گزارش آزمون ۱۷
پیوست الف (آگاهی دهنده) مثالی از روش اجرایی فیلتراسیون غشایی (۲) ۱۹
پیوست ب (آگاهی دهنده) روش اجرایی تاریخ امحاء (۱) ۲۲
پیوست پ (آگاهی دهنده) روش اجرایی تاریخ امحاء ۲۷
پیوست ت (آگاهی دهنده) روش اجرایی تاریخ امحاء (۳) ۳۲
پیوست ث (آگاهی دهنده) روش اجرایی تاریخ امحاء (۴) ۳۷
پیوست ج (آگاهی دهنده) ارگانیسم‌های مورد آزمون از سایر مجموعه‌های کشت ۴۲
کتاب‌نامه ۴۳

پیش‌گفتار

استاندارد «اپتیک بینایی - محصولات مراقبتی عدسی تماسی - آزمون اثربخشی نگه‌دارنده ضدمیکروبی و راهنمای تعیین تاریخ امحاء» که پیش‌نویس آن در کمیسیون‌های مربوط بر مبنای پذیرش استانداردهای بین‌المللی/منطقه‌ای به‌عنوان استاندارد ملی ایران به روش اشاره شده در مورد الف، بند ۷، استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تهیه و تدوین شده، در ششصد و چهل و سومین اجلاسیه کمیتهٔ ملی استاندارد مهندسی پزشکی مورخ ۱۳۹۵/۱۲/۱۰ تصویب شد. اینک این استاندارد به استناد بند یک مادهٔ ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱، به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

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

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

ISO 14730 : 2014 , Ophthalmic optics – Contact lens care products – Antimicrobial preservative efficacy testing and guidance on determining discard date

مقدمه

محصولات مراقبتی عدسی تماسی (CLCP)[1] با عدسی‌های تماسی استفاده می‌شوند. این محصولات، عدسیهای تماسی را شست‌وشو، تمیز، ضدعفونی، نگه‌داری و مرطوب کرده و به استفاده و شرایط نگه‌داری آن‌ها کمک می‌کنند. برخی از این محصولات تک‌عملکردی هستند درحالی‌که برخی دیگر چند عملکردی می‌باشند.

معمولاً، محصولات ساخته شده جهت استفاده برای عدسی‌های هیدروژلی ممکن است با عدسی‌های سخت نفوذپذیر نسبت به گاز (RGP)[2] یا عدسی‌های پلی متیل متاکریلات (PMMA)[3] مورد استفاده قرار گیرند، امّا محصولاتی که به‌طور خاص برای عدسی‌های تماسی RGP یا PMMA استفاده می‌شوند، معمولاً برای عدسی‌های هیدروژلی مناسب نیستند.

اکثر CLCPها به‌صورت محلول ساخته می‌شوند و عموما در ظروف چنددوزی[4]، بسته‌بندی شده و به فروش می‌رسند. محصولات خشک به‌صورت قرص یا گرانول[5] فروخته می‌شوند و باید قبل از استفاده، بلافاصله در یک حلال مناسب حل شوند.

اگر محلولِ محصول مراقبتی عدسی تماسی هیچ‌گونه فعالیت ضدمیکروبی از خود نداشته باشد، می‌توان برای جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌هایی که ممکن است از توزیع مکرر در مدت استفاده و ذخیره‌سازی پس از آن ایجاد شوند، یک نگه‌دارنده ضدمیکروبی به محصول اضافه نمود. تمام عوامل ضدمیکروبی قابلیت سمی بودن برای مصرف‌کننده را دارند. توصیه می‌شود برای حداکثر محافظت از مصرف‌کننده، غلظت نگه‌دارنده به گونه‌ای باشد که فعالیت نگه‌دارندگی کافی را با کم‌ترین میزان سمی بودن فراهم کند.

بین آماده‌سازی‌های بینایی[6] و محصولات مراقبتی عدسی تماسی تفاوت‌هایی وجود دارد و برخی از این تفاوت‌ها در رابطه با آزمون اثربخشی نگه‌دارنده، قابل‌ملاحظه هستند. به‌طورمعمول، آماده‌سازی‌های بینایی در ظروفی با حجم کم بسته‌بندی می‌شوند و برای دوره‌های کوتاه بر روی چشم‌های به خطر افتاده، استفاده می‌شوند. محصولات مراقبتی عدسی تماسی در ظروفی با حجم بیشتر توزیع می‌شوند و همراه با عدسی‌های تماسی به‌صورت بلندمدت بر روی چشم‌های سالم استفاده می‌شوند. خطرات بالقوه برای محصولات مراقبتی عدسی تماسی شامل برهم‌کنش عدسی-محلول که موجب التهاب چشم می‌شوند و خطرات آلودگی محلول به‌واسطه استفاده مکرر (روزانه) از محصول می‌باشند.

1- Contact lens care products
2- Rigid gas-permeable
3- Poly methyl methacrylate
4- Multidose
5- Granules
6- Ophthalmic preparations

بنابراین، زمانی‌که محصولات مراقبتی عدسی تماسی فرموله می‌شوند، باید خطر واکنش نامطلوب بیمار ناشی از برهم‌کنش محلول و/یا عدسی نسبت به مزایای ایمنی حاصل شده از نگه‌داری فعالیت ضد میکروبی محلول، سنجیده شود.

این استاندارد، روش اجرایی آزمون و معیارهای عملکردی برای اثربخشی نگه‌دارنده را ارائه می‌کند و از دارونامه‌هایی اقتباس شده است که یک محدودیت زمانی ۲۸ روزه را در روش اجرایی آزمون‌شان ارائه می‌دهند. پیوست‌های آگاهی دهنده، چهار مثال از روش اجرایی آزمون اثربخشی نگه‌دارنده را که توسط سازندگان محصول مراقبتی عدسی تماسی نگارش یافته‌اند، ارائه می‌کنند تا اثربخشی نگه‌دارنده برای محصولاتی که تاریخ امحاء آن‌ها بیشتر از ۲۸ روز است را نشان دهد.

اپتیک بینایی - محصولات مراقبتی عدسی تماسی - آزمون اثربخشی نگه‌دارنده ضدمیکروبی و راهنمای تعیین تاریخ امحاء

۱ هدف و دامنهٔ کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، تعیین روش سنجش فعالیت نگه‌دارنده ضدمیکروبی در تمام محصولات مراقبتی عدسی تماسی چنددوزی نگه‌داری‌شده می‌باشد و در مورد روش‌های تعیین تاریخ امحاء مانند پیوست‌های آگاهی‌دهنده راهنمایی را ارائه کرده است.

این استاندارد در مورد محصولات با تاریخ امحاء تا ۲۸ روز کاربرد دارد.

این استاندارد برای محصولات استریل بسته‌بندی‌شده در ظروف یک‌بار مصرف تک‌دوزی یا ظروف چنددوزی که با موانع فیزیکی برای آلودگی میکروبی طراحی شده‌اند (به‌عنوان مثال ظروف آئروسل[1]) کاربرد ندارد.

یادآوری ۱- اصول کلی آزمون می‌تواند برای تمدید تاریخ امحاء بیشتر از ۲۸ روز نیز مورد استفاده قرار گیرد. به پیوست‌های **ب، پ، ت و ث** مراجعه شود.

یادآوری ۲- استفاده از روش‌های آزمون میکروبی متعدد یا ترکیبی و/یا به‌کارگیری عدسی‌های تماسی یا سایر مواد آلی می‌تواند فعالیت ضدمیکروبی آشکار یک محصول خاص را تحت تاثیر قرار دهد. سنجش این متغیرها به همراه انجام آزمون، در مقابل مجموعه بزرگتری از میکروارگانیسم‌ها و همچنین آزمون روی نمونه‌هایی از ظروف نیمه استفاده شده، می‌تواند در توسعه محصول مراقبتی عدسی تماسی ارزشمند باشد، اما در دامنه کاربرد این استاندارد قرار ندارد.

۲ مراجع الزامی

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

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

استفاده از مراجع زیر برای کاربرد این استاندارد الزامی است:

1- Aerosol

2-1 ISO 14534 , Ophthalmic optics – Contact lenses and contact lens care products – Fundamental requirements

2-2 ISO 18369-1, Ophthalmic optics – Contact lenses - Part 1: Vocabulary, classification system and recommendations for labeling specifications

۳ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد، اصطلاحات و تعاریف ارائه شده در استاندارد ISO 18369-1 به‌کار می‌رود.

۴ اصول کلی

۴-۱ آزمون، شامل آماده‌سازی با یک ماده تلقیحی مشخص از میکروارگانیسم‌های مناسب در آغاز آزمون و سپس آزمون مجدد آن در روز چهاردهم است. آماده‌سازی‌های تلقیح شده در یک دمای مشخص نگه‌داری می‌شوند. نمونه‌ها از آماده‌سازی‌های تلقیح شده در فواصل زمانی مشخص استخراج شده و برای تعیین ارگانیسم‌های زنده، کشت می‌شوند. قابلیت جلوگیری از رشد مجدد در محصول، با شمارش ارگانیسم‌های زنده در دوره‌های زمانی طولانی‌تری تأیید می‌شود.

۴-۲ میزان نمونه میکروبی انتخاب شده در این آزمون، در عمل به‌عنوان نماینده کل نمونه‌های احتمالی در نظر گرفته نمی‌شود، اما تعداد قابل شمارشی که برآورد سرعت و اندازه قابلیت زیستی ازدست‌رفته باشد را می‌تواند تعیین کند.

۴-۳ خواص ماده نگه‌دارنده ضدمیکروبی محصول در صورتی کافی است که در شرایط آزمون، کاهش قابل توجهی از باکتری‌ها و عدم افزایش در مخمرها و کپک‌ها در آماده‌سازی تلقیح شده بعد از زمان‌ها و دماهای مشخص، وجود داشته باشد. معیارهای عملکرد در زیربند ۵-۶ ارائه شده‌اند.

۴-۴ برای غیرفعال‌سازی یا حذف عوامل ضدمیکروبی باقی‌مانده در طول مدت کشت و شمارش بقیه میکروارگانیسم‌ها، باید اقدامات مناسب انجام شوند. اثربخشی این اقدامات باید صحه‌گذاری شود.

۵ روش‌های آزمون

۵-۱ مواد و واکنشگرها

۵-۱-۱ ارگانیسم‌های مورد آزمون

سویه‌های[1] فهرست شده در جدول ۱ باید استفاده شوند.

1- Strains

یادآوری- ارگانیسم‌های مورد آزمون از سایر مجموعه‌های محیط کشت که می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند در پیوست **ج** فهرست شده‌اند.

جدول ۱- ارگانیسم‌های مورد آزمون

سودوموناس آئروژینوزا	ATCC 9027
استافیلوکوکوس اورئوس	ATCC 6538
اشریشیا کلی	ATCC 8739
کاندیدا آلبیکنس	ATCC 10231
آسپرژیلوس برازیلینس	ATCC 16404

۵-۱-۲ محیط‌های کشت و واکنشگرها

۵-۱-۲-۱ تریپتون سویا آگار (TSA)[1]

۵-۱-۲-۲ سابرود دکستروز آگار (SDA)[2]

۵-۱-۲-۳ بافر نمکی فسفاتی دلبکو (DPBS)[3]، بدون کلسیم کلرید و منیزیم کلرید.

ترکیب ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از KCl، ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از KH_2PO_4، ۸۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از NaCl، و ۲۱۶۰ میلی‌گرم بر لیتر از $Na_2HPO_4.7H_2$ یا رقیق‌کننده مناسب می‌باشد.

۵-۱-۲-۴ بافر نمکی فسفاتی دلبکو، به‌علاوه ۰٫۰۵ درصد جرمی حجمی پلی‌سوربات ۸۰ (DPBST) یا رقیق‌کننده مناسب.

۵-۱-۲-۵ محیط‌های کشت/یا عوامل خنثی‌سازی صحه‌گذاری شده مورد نیاز، به عنوان مثال محیط کشت آبگوشتی خنثی (DEB)[4] و محیط کشت آبگوشتی لتن[5].

۵-۱-۳ تجهیزات آزمایشگاهی

تجهیزات معمولی آزمایشگاهی زیر، مورد نیاز است: پیپت‌های استریل، سواب[6]، لوله‌های آزمایش، پتری دیش (۹۰ میلی‌متر تا ۱۰۰ میلی‌متر در ۲۰ میلی‌متر) و غیره. همچنین دستگاه‌های مناسب برای تعیین طیف‌سنجی نوری چگالی سلولی، برای شمارش پرگنه[7] و برای سانتریفیوژ مورد نیاز است.

1- Tryptone Soya Agar
2- Sabouraud Dextrose Agar
3- Dulbecco’s Phosphate-Buffered Saline
4- Dey-Engley Neutralizing Broth
5- Letheen broth
6- Swab
7- Colony

۵-۲ نمونه‌برداری برای آزمون و نگه‌داری محیط کشت

محصولی که آزمون می‌شود باید معرف محصولی باشد که می‌خواهد وارد بازار شود و توصیه می‌شود بلافاصله به‌صورت مستقیم از ظرف محصول نهایی قبل از آزمون، گرفته شوند.

سه عدد از محصول باید آزمون شود. هر کدام باید با یک آماده‌سازی تلقیحی مجزا برای هر ارگانیسم مورد آزمون، آزمون شود.

محیط‌های کشت آزمودنی از مجموعه محیط‌های کشت مناسب را بر اساس توصیه متصدی مربوطه نگه‌داری کنید.

توصیه می‌شود از محیط‌های کشت اولیه بیشتر از پنج بار پاساژ داده نشوند. (ATCC، NCIB، NCTC، NCPF یا سایر محیط‌های کشت شناخته شده؛ به پیوست ج مراجعه شود). هر پاساژ، یک زیرکشت[1] از کشت قبلی است.

۵-۳ آماده‌سازی آزمون میکروبی (ماده تلقیحی)

هر ارگانیسم مورد آزمون را تحت شرایطی که در جدول ۲ ارائه شده است، بر روی آگار کشت دهید.

جدول ۲- شرایط محیط کشت و گرم‌خانه‌گذاری برای رشد ارگانیسم‌های مورد آزمون

ارگانیسم	محیط کشت	دما (بر حسب درجه سلسیوس)	زمان گرم‌خانه‌گذاری
سودوموناس آئروژینوزا	TSA	۳۰ تا ۳۵	۱۸ تا ۲۴ ساعت
استافیلوکوکوس اورئوس	TSA	۳۰ تا ۳۵	۱۸ تا ۲۴ ساعت
اشریشیا کلی	TSA	۳۰ تا ۳۵	۱۸ تا ۲۴ ساعت
کاندیدا آلبیکنس	SDA	۲۰ تا ۲۵	۴۲ تا ۴۸ ساعت
		۳۰ تا ۳۵	۱۸ تا ۲۴ ساعت
آسپرژیلوس برازیلینس	SDA	۲۰ تا ۲۵	۷ تا ۱۰ روز

از DPBST سترون یا رقیق‌کننده مناسب برای برداشت هر محیط کشت استفاده کنید؛ سطح رشد را بشویید، آن‌را به یک ظرف انتقال داده و حرکت گردابی دهید. سوسپانسیون‌های حاوی هاگ را از طریق پشم شیشه استریل، پارچه درشت بافت یا تور ضدعفونی شده فیلتر کنید تا بخش‌های نخینه قارچی[2] حذف شوند.

پس از برداشت، ارگانیسم‌های کشت شده می‌توانند با استفاده از سانتریفیوژ شسته شوند. سوسپانسیون‌های باکتریایی می‌توانند فیلتر شوند (برای مثال با روزنه‌هایی به اندازه ۳ میکرومتر تا ۵ میکرومتر) تا یک پراکندگی تک سلول را تولید کنند. سپس تمام سوسپانسیون‌های سلولی مورد آزمون را با DPBST یا رقیق

1- Subculture
2- Hyphal fragments

کننده مناسب دیگری با غلظتی بین $1.0\times10^{7}\ cfu/ml$ و $1.0\times10^{8}\ cfu/ml$ تنظیم نمایید. غلظت تقریبی سلولی هر سوسپانسیون را با اندازه‌گیری تیرگی سوسپانسیون یا رقیق بودن آن با استفاده از دستگاه طیف‌سنج نوری، تخمین بزنید. غلظت واقعی واحدهای تشکیل پرگنه[1] در هر میلی‌لیتر باید برای هر سوسپانسیون، به‌عنوان مثال با استفاده از روش پور-پلیت[2]، در زمان آزمون تعیین شود.

اگر از سانتریفیوژ استفاده شود، هر مرحله بهتر است در دمای (۲۰ تا ۲۵) درجه سلسیوس به مدت زمان کمتر از ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰ گرم یا کم‌تر انجام شود.

از سوسپانسیون‌های سلولی مخمری و باکتریایی تازه تهیه شده، استفاده کنید.

یادآوری ۱- ممکن است زمان‌های سانتریفیوژ طولانی‌تر در سرعت‌های پایین‌تر، مورد نیاز باشد.

یادآوری ۲- سوسپانسیون‌های حاوی هاگ می‌توانند تا هفت روز بعد از آماده‌سازی با ذخیره‌سازی در دمای یخچال (۲ درجه سلسیوس تا ۸ درجه سلسیوس) استفاده شوند.

۵-۴ روش اجرایی آزمون ماده تلقیحی

۵-۴-۱ یک یا تعداد بیشتری لوله (برای هر بخش آزمون شده) حاوی حداقل ۱۰ میلی‌لیتر از محلول آزمون را برای هر ارگانیسم مورد آزمون آماده کنید.

یادآوری- لوله‌های نمونه به جای جعبه‌های عدسی استفاده می‌شوند تا اجرای فنی مؤثر آزمون را فراهم آورند. برای جلوگیری از ناسازگاری بین عناصر سازنده محلول و مواد لوله، بهتر است لوله‌ها از مواد سازگار با عناصر سازنده محلول ساخته شوند.

سوسپانسیون ارگانیسم‌های آزمون را به لوله نمونه محصولی که باید مورد آزمون قرار گیرد، به اندازه کافی تلقیح کنید تا شمارش نهایی بین $1.0\times10^{5}\ cfu/ml$ و $1.0\times10^{6}\ cfu/ml$ فراهم شود. مطمئن شوید که حجم تلقیح بیشتر از یک درصد حجم نمونه نشود. از پراکندگی کامل ماده تلقیحی به‌وسیله مخلوط‌کردن کافی مطمئن شوید.

۵-۴-۲ محصول تلقیح شده را در دمای (۲۰ تا ۲۵) درجه سلسیوس نگه‌داری کنید. دما باید با استفاده از یک دستگاه کالیبره شده، نظارت شده و ثبت شود.

درصورتی‌که محصول به نور حساس است، توصیه می‌شود در مدت آزمون از آن محافظت شود.

۵-۴-۳ مقدار ۱٫۰ میلی‌لیتر از محصول تلقیح شده را برای شمارش تعداد سلول‌های زنده، در روز هفتم و روز چهاردهم بردارید.

1- Colony-Forming Units (CFU)
2- Plate-count method

۵-۴-۴ پس از برداشتن نمونه روز چهاردهم، هر نمونه به‌صورتی که در زیربند ۵-۴-۱ شرح داده شد، با استفاده از سطح تلقیح $1.0\times10^{4}\ cfu/ml$ تا $1.0\times10^{5}\ cfu/ml$ مجددا مورد آزمون قرار می‌گیرد.

۵-۴-۵ مقدار ۱٫۰ میلی‌لیتر از محصول تلقیح‌شده برای شمارش تعداد سلول‌های زنده در روز بیست‌و یکم و روز بیست‌وهشتم را بردارید.

۵-۴-۶ هر یک از مقادیر ۱٫۰ میلی‌لیتری از نمونه‌ها که در فواصل زمانی مشخص برداشته شده‌اند را با رقت‌های اعشاری مناسب به محیط‌های خنثی‌سازی صحه‌گذاری شده انتقال دهید. سوسپانسیون را با ایجاد حرکت گردابی شدید، به خوبی مخلوط کنید و سپس اجازه دهید تا خنثی‌سازی تکمیل گردد. شرایط خنثی‌سازی باید بر اساس آزمون کنترل محیط رشد باشد (به زیربند ۵-۵-۲ مراجعه شود).

اگر یک عامل ضدمیکروبی در فرمولاسیون نمی‌تواند به اندازه کافی غیرفعال یا خنثی شود، آن را با استفاده از یک روش اجرایی فیلتراسیون غشایی صحه‌گذاری شده، حذف کنید. (به پیوست الف مراجعه شود).

۵-۴-۷ تعداد سلول‌های زنده ارگانیسم‌ها در رقت‌های مناسب را با آماده‌سازی پلیت‌های سه‌گانه[1] (مگر آن‌که طور دیگری تعریف شده باشد) از یک محیط رشد مناسب (به‌عنوان مثال TSA برای باکتری‌ها و SDA برای کپک و مخمر)، تعیین کنید.

اگر روش فیلتراسیون غشایی برای حذف یا خنثی‌سازی عوامل ضدمیکروبی استفاده شده است، غشاها را روی این محیط‌های کشت، به‌صورت مناسب کشت دهید.

اگر روش پور-پلیت مورد استفاده قرار می‌گیرد، قبل از ریختن آگار در پلیت‌ها، آن‌را در دمای زیر ۵۰ درجه سلسیوس نگه دارید.

یادآوری- در صورت نیاز محیط‌های کشت حاوی آگار استفاده شده برای شمارش تعداد سلول‌های زنده می‌توانند دارای غیرفعال‌سازها یا خنثی‌سازهای ضدمیکروبی نیز باشد.

۵-۴-۸ پلیت‌های باکتری کشت داده شده را در دمای (۳۰ تا ۳۵) درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری کنید. پلیت‌های مخمر کشت داده شده را در دمای (۲۰ تا ۲۵) درجه سلسیوس یا (۳۰ تا ۳۵) درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری کنید. پلیت‌های کپک کشت داده شده را در دمای (۲۰ تا ۲۵) درجه سلسیوس گرم خانه‌گذاری کنید. زمان‌های گرم‌خانه‌گذاری برای رشد بهینه باکتری، مخمر و کپک باید تعیین شود. حداقل زمان لازم برای گرم‌خانه‌گذاری باید بر اساس آزمون کنترل محیط رشد باشد. (به زیربند ۵-۵-۲ مراجعه شود). تعداد cfu مشاهده شده در پلیت‌های قابل شمارش را ثبت نمایید.

توصیه می‌شود پلیت‌ها طی گرم‌خانه‌گذاری به‌طور متناوب مشاهده شوند تا از وقوع پلیت‌های غیرقابل شمارش به دلیل رشد بیش از اندازه جلوگیری شود.

1- Triplicate plates

۵-۴-۹ تعداد میانگین واحدهای تشکیل پرگنه در پلیت‌های قابل شمارش را تعیین کنید. کاهش میکروبی در نقاط زمانی مشخص را محاسبه نمایید.

یادآوری- پلیت‌های قابل شمارش، به جز زمانی که پرگنه‌ها تنها برای پلیت‌هایی با رقت‌های 10^{0} یا 10^{-1} مشاهده می‌شوند، به $30cfu$ تا $300cfu$ در هر پلیت برای باکتری و مخمر، و $8cfu$ تا $80cfu$ در هر پلیت برای کپک‌ها، اشاره دارد.

۵-۴-۱۰ فقدان میکروارگانیسم‌ها باید ثبت شود، به‌عنوان مثال با ثبت کردن «O» یا «NR» (عدم رشد)، زمانی که پلیت‌های مربوط به تمام رقت‌ها در یک زمان خاص هیچ پرگنه‌ای نداشته باشد.

۵-۴-۱۱ غلظت باقیمانده میکروارگانیسم‌ها در هر نقطه زمانی محاسبه می‌شود. غلظت ارگانیسم‌های زنده پس از ۱۴روز آزمون مجدد، برابر با مجموع غلظت ماده تلقیحی مورد آزمون و غلظت باقی‌مانده میکروارگانیسم‌ها پس از ۱۴روز است.

۵-۵ کنترل‌ها

۵-۵-۱ کنترل‌های ماده تلقیحی

غلظت‌های ابتدایی و آزمون مجدد ماده تلقیحی با پراکندگی مقدار یکسانی از ماده تلقیحی در یک رقیق کننده مناسب با همان حجم استفاده شده در زیربند ۵-۴-۱ محاسبه می‌شوند تا غلظت نهایی برای ماده تلقیحی ابتدایی کم‌تر از $1.0\times10^{5}\ cfu/ml$ تا $1.0\times10^{6}\ cfu/ml$ و یا برای ماده تلقیحی آزمون مجدد کم‌تر از $1.0\times10^{4}\ cfu/ml$ تا $1.0\times10^{5}\ cfu/ml$ ، نباشد. حجم تلقیح بیشتر از یک درصد حجم نمونه نشود. از پراکندگی کامل ماده تلقیحی به‌وسیله مخلوط‌کردن کافی مطمئن شوید. این نمونه کنترل را برای cfu/ml در شروع آزمون بسنجید تا مناسب بودن محیط کشت به‌کار رفته برای رشد ارگانیسم آزمون را نشان داده و تخمینی از غلظت ابتدایی ماده تلقیحی را فراهم کنید. مقدار مناسبی از هر لوله را بر روی پلیت‌های سه‌گانه آگار کشت دهید (مگر آن‌که طور دیگری تعریف شده باشد).

۵-۵-۲ کنترل محیط رشد

رقت یک‌دهم از محصولِ نگهداری‌شده در محیط کشت آبگوشتی خنثی‌سازی صحه‌گذاری شده را حرکت گردابی دهید (۱ میلی‌لیتر در ۹ میلی‌لیتر). اجازه دهید تا خنثی‌سازی تکمیل شود. یک لوله کنترل ثانویه با ۱۰ میلی‌لیتر از یک رقیق‌کننده مناسب را آماده کنید (مانند DPBST). لوله‌ها را با ماده تلقیحی مناسب تلقیح کنید تا $10cfu$ تا $100cfu$ ارگانیسم آزمون در هر پلیت ایجاد شود. برای یک دوره زمانی مناسب در دمای محیط گرم‌خانه گذاری کنید. مقدار مناسبی از هر لوله را بر روی پلیت‌های سه‌گانه آگار کشت دهید. (مگر آن‌که طور دیگری تعریف شده باشد).

پلیت‌های باکتری کشت داده شده را در دمای (۳۰ تا ۳۵) درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری کنید. پلیت‌های مخمر کشت داده شده را در دمای (۲۰ تا ۲۵) درجه سلسیوس یا (۳۰ تا ۳۵) درجه سلسیوس گرم‌خانه-

گذاری کنید. پلیت‌های کپک کشت داده شده را در دمای (۲۰ تا ۲۵) درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری کنید. حداقل زمان‌های گرم‌خانه‌گذاری را برای رشد بهینهٔ باکتری، کپک، مخمر تعیین کنید.

بررسی کنید که رشد در محیط کشت آبگوشتی خنثی‌کننده حداقل ۵۰ درصد از رشد در لوله کنترل ثانویه باشد. این کنترل را برای هر ارگانیسم مورد آزمون انجام دهید.

توصیه می‌شود درصورتی‌که رقتی بیشتر از یک‌دهم برای خنثی‌سازی مورد نیاز است، از روش فیلتراسیون غشایی استفاده شود.

خنثی‌سازی محصول با هر ارگانیسم مورد آزمون را در ابتدا و آن‌طور که مناسب است، صحه‌گذاری کنید.

۵-۶ معیارهای عملکرد

۵-۶-۱ کلیات

محصولات باید قادر به حفظ این معیارها در مدت عمر نگه‌داری[1] برچسب‌گذاری شده و در تاریخ امحاء آنها باشند.

معیارهای زیربندهای ۵-۶-۲ و ۵-۶-۳ باید در دوره ۲۸ روزه استفاده پس از باز شدن حفظ شود (تاریخ امحاء).

یادآوری- درصورتی‌که تاریخ امحاء بیشتر از ۲۸ روز، موردنظر باشد به پیوست‌های **ب، پ، ت و ث** برای روش‌های توصیه شده مراجعه شود.

۵-۶-۲ باکتری

تعداد هر ارگانیسم مورد آزمون رشد داده شده در هر میلی‌لیتر باید تا یک مقدار میانگینی که کم‌تر از ۳٫۰logs در ۱۴روز نیست، کاهش یابد. پس از آزمون مجدد در روز چهاردهم، غلظت هر ارگانیسم مورد آزمون باید دوباره حداقل تا مقدار میانگین ۳٫۰logs در ۲۸ روز کاهش یابد.

۵-۶-۳ کپک‌ها و مخمرها

تعداد هر ارگانیسم مورد آزمون رشد داده شده در هر میلی‌لیتر باید در غلظت‌های اولیه یا کم‌تر از آن در ۱۴ روز، باقی بماند (با خطای محاسباتی ۰٫۵logs±). در روز بیست‌وهشتم، غلظت هر ارگانیسم مورد آزمون باید برابر با غلظت ارگانیسم اولیه یا کمتر از آن (با خطای محاسباتی ۰٫۵logs±) باقی بماند.

۵-۷ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید شامل موارد زیر باشد:

1- Shelf life

الف- عنوان این استاندارد

ب- شناسنامه محصول، شامل نام محصول، شماره سری ساخت[1]، تاریخ انقضا، تولیدکننده، شرایط ذخیره سازی و سوسپانسیون(های) فعال، و غلظت(های) آن(ها) (در صورتی‌که در دسترس باشند) ؛

پ- اسامی کاربرها ؛

ت- انحراف‌ها از پروتکل ؛

ث- تاریخ و زمان گرم‌خانه‌گذاری ؛

ج- زمان ذخیره‌سازی برای محصول تلقیح‌شده ؛

چ- نتایج بدست آمده، شامل تعداد ارگانیسم‌های رشد داده شده در هر نقطه زمانی.

1- Batch number

پیوست الف

(آگاهی دهنده)

مثالی از روش اجرایی فیلتراسیون غشایی (۲)

الف-۱ مواد و واکنشگرها

الف-۱-۱ محیط‌های کشت و واکنشگرها

الف-۱-۱-۱ مایع رقیق‌سازی، با یا بدون خنثی‌سازها.

الف-۱-۱-۲ تریپتون سویا آگار (TSA).

الف-۱-۱-۳ بافر نمکی فسفاتی دلبکو (DPBS)، بدون کلسیم کلرید و منیزیم کلرید: ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از KCl، ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از KH_2PO_4، ۸۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از NaCl، و ۲۱۶۰ میلی‌گرم بر لیتر از $Na_2HPO_4.7H_2$ یا رقیق‌کننده مناسب.

الف-۱-۱-۴ بافر نمکی فسفاتی دلبکو، به‌علاوه ۰٫۰۵ درصد جرمی حجمی پلی‌سوربات ۸۰ (DPBST) یا رقیق‌کننده مناسب.

الف-۱-۱-۵ محیط‌های کشت/یا عوامل خنثی‌سازی صحه‌گذاری شده مورد نیاز، به عنوان مثال محیط کشت آبگوشتی خنثی (DEB) و محیط کشت آبگوشتی لتن.

الف-۱-۲ تجهیزات آزمون

تجهیزات معمولی آزمایشگاهی (مانند پیپت‌های استریل، پتری دیش، ظروف) همراه با مواردی که در ادامه اشاره می‌شود.

الف-۱-۲-۱ فیلتر غشایی استریل.

الف-۱-۲-۲ دستگاه‌های استریل مناسب برای نگه‌داری فیلتر غشایی استریل و مایع تصفیه شده.

الف-۱-۲-۳ تجهیزات مناسب برای ایجاد خلا یا فشار، برای این‌که موجب شود فاز مایعِ محلول آزمون تلقیح شده از طریق فیلتر غشایی به صورت استریل پاساژ کند.

اندازه منافذ جزئی فیلتر غشایی بهتر است بیشتر از ۰٫۴۵ میکرومتر و حداقل قطر ۴۷ میلی‌متر نباشد و نیز بهتر است عاری از هرگونه مواد شیمیایی که برای سلول‌های میکروبی سمی هستند، باشد.

الف-۲ روش آزمون و نتایج

الف-۲-۱ فیلتر غشایی استریل (به زیربند الف-۱-۲-۲ مراجعه شود) را در یک مجموعه فیلتر استریل (به زیربند الف-۱-۲-۳ مراجعه شود) همراه با DPBST استریل (به زیربند الف-۱-۱-۴ مراجعه شود) یا رقیق‌کننده مناسب، مرطوب کنید.

الف-۲-۲ حجم اندازه‌گیری شده‌ای از محلول آزمون تلقیح شده را تحت شرایط استریل به DPBST استریل (به زیربند الف-۱-۱-۴ مراجعه شود) یا مایع رقیق‌کننده، منتقل کنید.

الف-۲-۳ محلول رقیق شده را به غشا اضافه کنید و بلافاصله آن‌را با کمک خلا یا فشار، فیلتر کنید. نمونه اعمال‌شده به فیلتر را با (۵۰ تا ۱۰۰) میلی‌لیتر از مایع رقیق‌کننده، رقیق کنید و کاملا مخلوط کنید تا از توزیع یکنواخت نمونه در سراسر محیط فیلتر مطمئن شوید.

یادآوری- این موضوع، احتمال تشکیل واحدهای پرگنه متعدد بر روی فیلتر را کاهش خواهد داد.

الف-۲-۴ فیلتر غشایی را با حجم‌های مختلفی از مایع رقیق‌کننده که ممکن است در صورت نیاز دارای عوامل خنثی‌سازی اضافی باشد، بشویید. توصیه می‌شود حجم واقعی به‌صورت تجربی برای هر فرمولاسیون برای هر ارگانیسم مورد آزمون تعیین شود.

یادآوری- معمولا سه حجم از مایع رقیق‌کننده (۱۰۰ میلی‌لیتر از هر کدام) برای حذف و/یا رقیق کردن عامل ضدمیکروبی کافی هستند.

الف-۲-۵ فیلتر غشایی را با محیط‌های کشت مناسب گرم‌خانه‌گذاری کنید تا اجازه رشد بر روی سطح غشا به واحدهای تشکیل پرگنه داده شود.

این مرحله می‌تواند با حذف آسپتیک[1] فیلتر غشایی از واحد مونتاژ فیلتر و جایگزینی غشا بر روی سطح پلیت آگار استریل که مایع مشخصی بر روی سطح خود ندارد، کامل گردد؛ یا غشا می‌تواند در مابین آگار محصور شود. در غیر این‌صورت، یک واحد فیلتر غشایی استریل که به افزودن محیط‌های کشت استریل به فیلتر درزبندی‌شده[2] و گرم‌خانه‌گذاری غشا به‌صورت درجا[3] نیاز دارد، می‌تواند استفاده شود. توصیه می‌شود محیط-های کشتی استفاده شوند که برای نوع ارگانیسم مورد آزمون مناسب هستند و به‌طور خاص برای آزمون فرموله شده‌اند. زمان گرم‌خانه‌گذاری بهتر است تثبیت شده باشد.

1- Aseptic
2- Sealed filter
3- In situ

الف-۲-۶ تعداد میانگین واحدهای تشکیل پرگنه را بر روی فیلترهای غشایی قابل‌شمارش تعیین کنید (۳ cfu تا ۱۰۰ cfu بر ۴۷ میلی‌متر فیلتر برای باکتری و مخمر و ۳ cfu تا ۱۰ cfu بر ۴۷ میلی‌متر فیلتر برای کپک‌ها). تعداد واحدهای تشکیل پرگنه در هر میلی‌لیتر از محلول تلقیح‌شده را محاسبه و ثبت کنید.

الف-۳ کنترل‌ها

با انتقال مقداری از محلول آزمون تلقیح نشده به (۵۰ تا ۱۰۰) میلی‌لیتر از مایع رقیق‌کننده استریل با استفاده از نسبت یکسان حجم محلول آزمون به حجم مایع رقیق‌کننده، اثربخشی خنثی‌ساز را تایید کنید. با استفاده از خلا یا فشار، تمام حجم را به غشا یا فیلتر اعمال کنید. فیلتر را با حجم‌های مختلف از مایع رقیق‌کننده با استفاده از حجمی که در روش اجرایی آزمون استفاده شده است، بشویید. ۵ cfu تا ۱۰۰ cfu از ارگانیسم‌های مورد آزمون (یک گونه برای هر فیلتر) را به داخل ۱۰۰ میلی‌لیتر از مایع رقیق‌کننده انتقال داده و آن‌را بر روی غشا بزنید. فیلتر غشایی را در تماس با محیط کشت که در روش اجرایی آزمون شرح داده شده‌اند، گرم خانه‌گذاری کنید. (به زیربند الف-۲-۵ مراجعه شود).

با استفاده از مایع رقیق‌کننده که در معرض محلول آزمون قرار نگرفته، این روش اجرایی را تکرار کنید. تعداد شمارش شده را با آن‌هایی که با روش یکسان ولی با استفاده از یک رقیق‌کننده مناسب (به‌عنوان مثال DPBST)، به‌جای محلول آزمون انجام شده‌اند، مقایسه کنید. تلقیح بر روی محیط کشت مناسب سه‌گانه را تایید کنید. (مگر آن‌که طور دیگری تعریف شده باشد). مطئمن شوید که رشد در محیط کشت آبگوشتی خنثی‌ساز حداقل ۵۰ درصد تلقیح است.

پیوست ب

(آگاهی دهنده)

روش اجرایی تاریخ امحاء (۱)

ب-۱ اصول کلی

ب-۱-۱ آزمون، شامل تلقیح نمونه‌های آزمون با سطح بالای ارگانیسم (تقریبا $10^6\ cfu/ml$) در روز صفرم می‌شود. نمونه‌های آزمون با سطح تلقیح ارگانیسم کم‌تر (تقریبا $10^3\ cfu/ml$) در فرمولاسیون آزمون، مورد آزمون مجدد قرار می‌گیرند.

ب-۱-۲ زمان‌های تلقیح در ابتدا، ۲ هفته، ۲۵ درصد، ۵۰ درصد، ۷۵ درصد و ۱۰۰ درصد از تاریخ امحاء پیشنهادی، هستند.

ب-۱-۳ زمان‌های نمونه‌برداری بهتر است شامل ۱ هفته، ۲ هفته، ۳ هفته، ۴ هفته، و ۲۵ درصد، ۵۰درصد، ۷۵ درصد و ۱۰۰ درصد از تاریخ امحاء پیشنهادی و ۱۴روز پس از تاریخ امحاء پیشنهادی باشند.

ب-۱-۴ نمونه‌های آزمون بهتر است معیارهای آزمون ایزو برای اثربخشی نگه‌دارنده محصولات مراقبتی عدسی تماسی نگهداری شده چنددوزی را در ۲۸ روز داشته باشند.

ب-۱-۵ توصیه می‌شود هر گونه وقفه پس از آزمون‌های مجدد، نشان داده شود.

ب-۲ روش‌های آزمون

ب-۲-۱ مواد و واکنشگرها

ب-۲-۱-۱ ارگانیسم‌های آزمون

توصیه می‌شود ارگانیسم‌های آزمون به‌صورتی که در زیربند ۵-۱-۱ مشخص شده است، باشند.

ب-۲-۱-۲ محیط کشت آزمون

توصیه می‌شود محیط کشت آزمون به‌صورتی که در زیربند ۵-۱-۲ مشخص شده است، باشد.

ب-۲-۱-۳ تجهیزات آزمایشگاهی

توصیه می‌شود تجهیزات آزمایشگاهی به‌صورتی که در زیربند ۵-۱-۳ مشخص شده است، باشند.

ب-۲-۱-۴ نمونه‌های آزمون

آزمون‌ها برای تایید تاریخ امحاء پس از تاریخ باز شدن[1] با استفاده از سه قسمت از محلول‌های مراقبتی عدسی تماسی که معرف محصول قابل عرضه به بازار هستند، انجام گرفته‌اند.

توصیه می‌شود نگه‌داری محیط کشت به‌صورتی که در زیربند ۵-۲ مشخص شده است، باشد.

ب-۲-۲ آماده‌سازی آزمون میکروبی (ماده تلقیحی)

توصیه می‌شود ارگانیسم‌ها کشت داده شوند و به‌صورتی که در زیربند ۵-۳ مشخص شده است، برداشت شوند.

ب-۲-۳ روش اجرایی آزمون ماده تلقیحی

ب-۲-۳-۱ یک نمونه ترکیبی با بیشتر از ۲۵۰ میلی‌لیتر از تک‌تک نمونه‌های آزمون اولیه را آماده کنید.

ب-۲-۳-۲ مقدار ۵۰ میلی‌لیتر دیگر از فرمولاسیون آزمون را برای هر ارگانیسم آزمون، آماده کنید. نمونه را در یک فلاسک ۲۵۰ میلی‌لیتری یا ظرف آزمونه قرار دهید.

ب-۲-۳-۳ ظروف ۵۰ میلی‌لیتری از یک رقیق‌کننده مناسب برای کنترل‌های باکتری، مخمر و کپک را آماده کنید.

ب-۲-۳-۴ نمونه‌های فرموله شده و کنترل‌ها را با مقدار ۰٫۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون ارگانیسم $10^{8}\ cfu/ml$ تلقیح کنید تا غلظت نهایی تقریبا $10^{6}\ cfu/ml$ حاصل شود. از پراکندگی کامل ماده تلقیحی به وسیله مخلوط کردن کافی، مطمئن شوید.

ب-۲-۳-۵ محصول تلقیح شده را در دمای (۲۰ تا ۲۵) درجه سلسیوس نگه‌داری کنید. دما باید با استفاده از یک دستگاهِ کالیبره شده، نظارت شده و ثبت شود.

درصورتی‌که محصول مراقبتی عدسی تماسی به نور حساس است، توصیه می‌شود در مدت آزمون از آن محافظت شود.

1- Discard after opening date

ب-۲-۳-۶ در ۱ هفته، ۲ هفته، ۳ هفته، ۴ هفته و در ۲۵ درصد، ۵۰ درصد، ۷۵ درصد و ۱۰۰ درصد از تاریخ امحاء پیشنهادی، و ۱۴ روز پس از تاریخ امحاء پیشنهادی، مقدار یک میلی‌لیتر از محصول تلقیح شده را برای شمارش تعداد سلول‌های زنده، بردارید.

ب-۲-۳-۷ نمونه‌های فرموله شده را در ۲ هفته، ۲۵ درصد، ۵۰ درصد، ۷۵ درصد و ۱۰۰ درصد از تاریخ امحاء پیشنهادی را با استفاده از نسبت $0.05/50$ میلی‌لیتر از سوسپانسیون ارگانیسم $10^6\ cfu/ml$ مجدد آزمون کنید تا غلظت نهایی تقریبا $10^3\ cfu/ml$ مهیا شود. شمارش تعداد سلول‌های زنده را در هر نقطه زمانی قبل از آزمون مجدد، تکرار کنید.

ب-۲-۳-۸ هر یک از مقادیر ۱/۰ میلی‌لیتری از نمونه‌ها که در فواصل زمانی مشخصی برداشته شده‌اند را با رقت‌های اعشاری مناسب به محیط‌های خنثی‌سازی صحه‌گذاری شده انتقال دهید. با حرکت گردابی شدید، سوسپانسیون را به‌خوبی مخلوط کنید و اجازه دهید تا خنثی‌سازی کامل شود.

اگر یک عامل ضدمیکروبی در فرمولاسیون نتواند به‌صورت کافی غیرفعال یا خنثی شود، با استفاده از روش اجرایی فیلتراسیون غشایی صحه‌گذاری شده، آن را حذف کنید. (به پیوست الف مراجعه شود).

ب-۲-۳-۹ تعداد سلول‌های زنده ارگانیسم‌ها در رقت‌های مناسب را با آماده‌سازی پلیت‌های سه‌گانه (مگر آن‌که طور دیگری تعریف شده باشد) از یک محیط رشد مناسب (به‌عنوان مثال TSA برای باکتری و SDA برای کپک و مخمر)، تعیین کنید.

اگر روش فیلتراسیون غشایی برای حذف یا خنثی‌سازی عوامل ضدمیکروبی استفاده شده است، غشاها را روی این محیط‌های کشت، به‌صورت مناسب کشت دهید.

اگر روش پور-پلیت مورد استفاده قرار می‌گیرد، قبل از ریختن آگار در پلیت‌ها، آن‌را در دمای زیر ۵۰ درجه سلسیوس نگه‌دارید.

یادآوری- در صورت نیاز محیط‌های کشت حاوی آگار استفاده شده برای شمارش تعداد سلول‌های زنده می‌توانند دارای غیرفعال‌سازها یا خنثی‌سازهای ضدمیکروبی نیز باشد.

ب-۲-۳-۱۰ پلیت‌های باکتری کشت داده شده را در دمای (۳۰ تا ۳۵) درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری کنید. پلیت های مخمر کشت داده شده را در دمای (۲۰ تا ۲۵) درجه سلسیوس یا (۳۰ تا ۳۵) درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری کنید. پلیت‌های کپک کشت داده شده را در دمای (۲۰ تا ۲۵) درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری کنید. توصیه می‌شود زمان‌های گرم‌خانه‌گذاری برای رشد بهینه باکتری، کپک و مخمرها تعیین شوند. حداقل زمان‌های لازم برای گرم‌خانه‌گذاری بهتر است بر اساس آزمون کنترل محیط رشد باشند. (به زیربند ب-۲-۴-۲ مراجعه شود).

ب-۲-۳-۱۱ تعداد میانگین واحدهای تشکیل پرگنه در پلیت‌های قابل شمارش را تعیین کنید. کاهش میکروبی در نقاط زمان مشخص را محاسبه کنید.

یادآوری- پلیت‌های قابل شمارش، به جز زمانی که پرگنه‌ها تنها برای پلیت‌هایی با رقت‌های 10^{0} یا 10^{-1} مشاهده می‌شوند، به $30\ cfu$ تا $300\ cfu$ بر پلیت برای باکتری و مخمر، و $8\ cfu$ تا $80\ cfu$ بر پلیت برای کپک‌ها، اشاره دارد.

ب-۲-۳-۱۲ توصیه می‌شود زمانی‌که پلیت‌های حاوی تمام رقت‌های یک نمونه در یک زمان مشخص هیچ‌گونه رشدی از میکروارگانیسم را ندارند، ثبت شوند.

ب-۲-۳-۱۳ در هر نقطه زمانی غلظت باقی مانده‌ها محاسبه می‌شود.

ب-۲-۴ کنترل‌ها

ب-۲-۴-۱ کنترل‌های ماده تلقیحی

نمونه‌های کنترل تازه در هر تاریخ تلقیح با تلقیح محلول نمکی (برای باکتری و مخمر) یا محلول نمکی برای کپک به همان صورتی‌که برای تلقیح نمونه است، اجرا می‌شوند. تعداد نظری را می‌توان با محاسبه مجموع تجمعی از آخرین تلقیح، به‌علاوه شمارش باقی‌مانده میکروارگانیسم آخر در نمونه فرموله شده، بدست آورد.

ب-۲-۴-۲ کنترل محیط رشد

رقت یک‌دهم از محصول نگهداری‌شده در محیط کشت آبگوشتی خنثی‌کننده صحه‌گذاری شده را حرکت گردابی دهید (۱ میلی‌لیتر در ۹ میلی‌لیتر). اجاز دهید تا خنثی‌سازی کامل شود. یک لوله کنترل دوم را با ۱۰ میلی‌لیتر از یک رقیق‌کننده مناسب آماده کنید (به‌عنوان مثال DPBST). لوله‌ها را با ماده تلقیحی مناسب تلقیح کنید تا منجر به $10cfu$ تا $100cfu$ ارگانیسم آزمون در هر پلیت شود. برای یک دوره زمانی مناسب در دمای محیط گرم‌خانه‌گذاری کنید. مقدار مناسبی از هر لوله را بر روی پلیت‌های سه‌گانه آگار کشت دهید (مگر آن‌که طور دیگری تعریف شده باشد).

پلیت‌های باکتری کشت داده شده را در دمای (۳۰ تا ۳۵) درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری کنید. پلیت‌های مخمر کشت داده شده را در دمای (۲۰ تا ۲۵) درجه سلسیوس یا (۳۰ تا ۳۵) درجه سلسیوس گرم‌خانه-گذاری کنید. پلیت‌های کپک کشت داده شده را در دمای (۲۰ تا ۲۵) درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری کنید. حداقل زمان‌های گرم‌خانه گذاری برای رشد بهینه باکتری، مخمر و کپک را تعیین کنید.

بررسی کنید که رشد در محیط کشت آبگوشتی خنثی‌کننده حداقل ۵۰ درصد از رشد در لوله کنترل دوم باشد. این کنترل را برای هر ارگانیسم مورد آزمون انجام دهید.

درصورتی‌که رقت بیشتر از یک‌دهم برای خنثی کردن مورد نیاز است، باید از روش فیلتراسیون غشایی استفاده شود.

خنثی‌سازی محصول را در ابتدا و به‌صورت دوره‌ای تعیین کنید.

ب-۲-۵ معیارهای عملکرد

اگر تعداد باکتری باقی‌مانده به اندازه سه logs در روز چهاردهم کاهش یابد و تعداد باکتری و قارچ پس از آن افزایش نیابند، تاریخ امحاء تایید می‌شود.[۱]

ب-۲-۶ گزارش آزمون

توصیه می‌شود گزارش آزمون به‌صورتی که در زیربند ۵-۷ مشخص‌شده است، باشد.

۱- تعداد ارگانیسم کشت داده شده حاصل از یک نمونه آزمون، بیشتر از مجموع شمارش‌های میکروبی تلقیح و شمارش آخرین باقی‌مانده میکروارگانیسم‌ها از واریانس لگاریتم ۰٫۵± نمی‌شود. (یعنی تکثیر ارگانیسمی که رخ نداده است).

پیوست پ

(آگاهی دهنده)

روش اجرایی تاریخ امحاء

پ-۱ اصول کلی

پ-۱-۱ آزمون، شامل آماده‌سازی با یک ماده تلقیحی مشخص از میکروارگانیسم‌های مناسب، ذخیره آماده‌سازی تلقیح شده در یک دمای مشخص، برداشتن نمونه‌ها در فواصل زمانی مشخص از ظرف و شمارش ارگانیسم‌ها در نمونه‌های برداشته‌شده می‌شود. قابلیت جلوگیری از رشد مجدد در محصول، با شمارش ارگانیسم‌های زنده در دوره‌های زمانی طولانی‌تر تایید می‌شود.

پ-۱-۲ میزان نمونه میکروبی انتخاب شده در این آزمون، در عمل به‌عنوان نماینده کل نمونه‌های احتمالی در نظر گرفته نمی‌شود، اما تعداد قابل شمارشی که برآورد سرعت و اندازه قابلیت زیستی ازدست-رفته باشد را می‌تواند تعیین کند.

پ-۱-۳ آماده‌سازی در ابتدا باید الزامات نگه‌داری محصول مراقبتی عدسی تماسی را به‌صورت کافی داشته باشد و استفاده شبیه‌سازی‌شده‌ای را در زمان تاریخ امحاء دنبال کند (معیارهای عملکرد در زیربند پ-۲-۷ آورده شده است).

پ-۱-۴ برای غیر فعال‌سازی و یا حذف عوامل ضدمیکروبی باقی‌مانده در طول مدت کشت و شمارش بقیه میکروارگانیسم‌ها، بهتر است اقدامات مناسبی به‌کار گرفته شود؛ اثربخشی این اقدامات نیز بهتر است صحه‌گذاری شود. توصیه می‌شود کارایی این فرایند در مدت آزمون با به‌کارگیری کنترل‌های مناسب اثبات شود.

پ-۲ روش‌های آزمون

پ-۲-۱ مواد و واکنشگرها

پ-۲-۱-۱ ارگانیسم‌های آزمون

توصیه می‌شود ارگانیسم‌های آزمون به صورتی که در زیربند ۵-۱-۱ مشخص شده است، باشند.

پ-۲-۱-۲ محیط کشت آزمون

توصیه می‌شود محیط کشت آزمون به صورتی که در زیربند ۵-۱-۲ مشخص شده است، باشد.

پ-۲-۱-۳ تجهیزات آزمایشگاهی

توصیه می‌شود تجهیزات آزمایشگاهی به صورتی که در زیربند ۵-۱-۳ مشخص شده است، باشند.

پ-۲-۱-۴ نمونه‌های آزمون

توصیه می‌شود محصول مراقبتی عدسی تماسی که آزمون می‌شود، معرف محصولی باشد که می‌خواهد وارد بازار شود. بهتر است سه عدد از محصول آزمون شود و توصیه می‌شود بلافاصله به صورت مستقیم از ظرف محصول نهایی قبل از آزمون، گرفته شوند. بهتر است تعداد مناسبی از ظروف جهت اطمینان از در دسترس بودن محصول کافی برای انجام آزمون پس از استفاده شبیه‌سازی‌شده، به‌کار رود. (یعنی می‌توان با ادغام چند ظرف، محصول کافی برای انجام آزمون را فراهم کرد).

توصیه می‌شود نگه‌داری محیط کشت به صورتی که در زیربند ۵-۲ مشخص شده است، باشد.

پ-۲-۲ آماده‌سازی آزمون میکروبی (ماده تلقیحی)

توصیه می‌شود ارگانیسم‌ها کشت داده شوند و به‌صورتی که در زیربند ۵-۳ مشخص شده است، برداشت شوند.

پ-۲-۳ روش‌اجرایی آزمون ماده تلقیحی

پ-۲-۳-۱ یک لوله حاوی حداقل ۱۰ میلی‌لیتر از محلول آزمون را برای هر ارگانیسم مورد آزمون آماده کنید. سوسپانسیون ارگانیسم‌های آزمون را به لوله نمونه محصولی که باید مورد آزمون قرار گیرد، به اندازه کافی تلقیح کنید تا شمار نهایی بین $1.0\times10^{5}\ cfu/ml$ و $1.0\times10^{6}\ cfu/ml$ فراهم شود. مطمئن شوید که حجم ماده تلقیحی از یک درصد حجم نمونه بیشتر نشود. از پراکندگی کامل ماده تلقیحی به‌وسیله مخلوط‌کردن کافی مطمئن شوید.

پ-۲-۳-۲ محصول تلقیح شده را در دمای (۲۰ تا ۲۵) درجه سلسیوس نگه‌داری کنید. دما باید با استفاده از یک دستگاه کالیبره شده، نظارت شده و ثبت شود.

درصورتی‌که محصول مراقبتی عدسی تماسی به نور حساس است، توصیه می‌شود در مدت آزمون از آن محافظت شود.

پ-۲-۳-۳ مقدار ۱٫۰ میلی‌لیتر از محصول تلقیح شده را برای شمارش تعداد سلول‌های زنده در روز هفتم و روز چهاردهم بردارید.

پ-۲-۳-۴ پس از برداشتن نمونه ۱۴روزه، هر نمونه را به‌صورتی که در زیربند ث-۲-۳-۱ مشخص شده است، با استفاده از سطح ماده تلقیحی $1.0\times10^{4}\ cfu/ml$ تا $1.0\times10^{5}\ cfu/ml$ ، مجدداً آزمون کنید.

پ-۲-۳-۵ مقدار ۱٫۰ میلی‌لیتر از محصول تلقیح شده را برای شمارش تعداد سلول‌های زنده در روز بیست‌ویکم و روز بیست‌وهشتم بردارید.

پ-۲-۳-۶ هر یک از مقادیر ۱٫۰ میلی‌لیتری از نمونه‌ها که در فواصل زمانی مشخص برداشته شده‌اند را با رقت‌های اعشاری مناسب به محیط‌های کشت خنثی‌سازی صحه‌گذاری شده انتقال دهید. سوسپانسیون را با حرکت گردابی شدید، به‌خوبی مخلوط کنید و اجازه دهید تا خنثی‌سازی کامل شود.

اگر یک عامل ضدمیکروبی در فرمولاسیون نتواند به‌طور مناسب غیرفعال یا خنثی شود، با استفاده از یک روش‌اجرایی فیلتراسیون غشایی صحه‌گذاری شده، آن‌را حذف کنید (به پیوست الف مراجعه شود).

پ-۲-۳-۷ تعداد سلول‌های زنده ارگانیسم‌ها در رقت‌های مناسب را با آماده‌سازی پلیت‌های سه‌گانه (مگر آن‌که طور دیگری تعریف شده باشد) از یک محیط رشد مناسب، (به‌عنوان مثال از TSA برای باکتری و از SDA برای کپک و مخمر) تعیین کنید.

اگر روش فیلتراسیون غشایی برای حذف یا خنثی‌سازی عوامل ضدمیکروبی استفاده شده است، غشاها را روی این محیط‌های کشت، به‌صورت مناسب کشت دهید.

اگر روش پور-پلیت مورد استفاده قرار می‌گیرد، قبل از ریختن آگار در پلیت‌ها، آن‌را در دمای زیر ۵۰ درجه سلسیوس نگه دارید.

یادآوری- در صورت نیاز محیط‌های کشت حاوی آگار استفاده شده برای شمارش تعداد سلول‌های زنده می‌توانند دارای غیرفعال‌سازها یا خنثی‌سازهای ضدمیکروبی نیز باشد.

پ-۲-۳-۸ پلیت‌های باکتری کشت داده شده را در دمای (۳۰ تا ۳۵) درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری کنید. پلیت‌های مخمر کشت داده شده را در دمای (۲۰ تا ۲۵) سلسیوس درجه یا (۳۰ تا ۳۵) درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری کنید. پلیت‌های کپک کشت داده شده را در دمای (۲۰ تا ۲۵) درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری کنید. توصیه می‌شود زمان‌های گرم‌خانه‌گذاری برای رشد بهینه باکتری، مخمر، کپک تعیین شوند. حداقل زمان‌های گرم‌خانه‌گذاری بهتر است بر اساس آزمون کنترل محیط رشد باشند (به زیربند ث-۲-۶-۲ مراجعه شود).

پ-۲-۳-۹ تعداد میانگین واحدهای تشکیل پرگنه بر روی پلیت‌های قابل شمارش را تعیین کنید. کاهش میکروبی در نقاط زمانی مشخص را محاسبه کنید.

یادآوری- پلیت‌های قابل شمارش، به جز زمانی که پرگنه‌ها تنها برای پلیت‌هایی با رقت‌های 10^{0} یا 10^{-1} مشاهده می‌شوند، به $30\ cfu$ تا $300\ cfu$ بر پلیت برای باکتری و مخمر، و $8\ cfu$ تا $80\ cfu$ بر پلیت برای کپک‌ها، اشاره دارد.

پ-۲-۳-۱۰ توصیه می‌شود زمانی که پلیت‌های حاوی تمامی رقت‌های یک نمونه در یک زمان مشخص هیچ رشدی از میکروارگانیسم‌ها ندارند، ثبت شود.

پ-۲-۳-۱۱ در هر نقطه زمانی غلظت باقی‌مانده‌ها محاسبه می‌شود. غلظت ارگانیسم‌های زنده پس از ۱۴ روز آزمون مجدد برابر با مجموع غلظت ماده تلقیحی مورد آزمون و غلظت باقی‌مانده میکروارگانیسم‌ها پس از ۱۴روز است.

پ-۲-۴ استفاده شبیه‌سازی‌شده

با استفاده از محصول آزمون نشده در ظروف اصلی، با پراکندگی مقدار مناسب از ظروف برای دوره‌ای که کم‌تر از تاریخ امحاء آن نیست، محصول را در معرض استفاده شبیه‌سازی‌شده قرار دهید (یعنی به مدت سه ماه، یک میلی‌لیتر را هر سه روز در میان پراکنده کنید).

بهتر است تعداد مناسبی از ظروف جهت اطمینان از در دسترس بودن محصول کافی برای انجام آزمون پس از استفاده شبیه‌سازی‌شده، به‌کار رود. (یعنی می‌توان با ادغام چند ظرف، محصول کافی برای انجام آزمون فراهم کرد).

پ-۲-۵ آزمون ماده تلقیحی پس از استفاده شبیه‌سازی‌شده

در پایان دوره استفاده شبیه‌سازی‌شده، روش اجرایی آزمون ماده تلقیحی را به‌صورتی که در زیربند ث-۲-۳ شرح داده شده است، تکرار کنید.

پ-۲-۶ کنترل‌ها

پ-۲-۶-۱ کنترل‌های ماده تلقیحی

غلظت‌های ابتدایی و آزمون مجدد ماده تلقیحی با پراکندگی مقدار یکسانی از ماده تلقیحی در یک رقیق‌کننده مناسب با همان استفاده شده در زیربند پ-۲-۳-۱ محاسبه می‌شوند تا غلظت نهایی برای ماده تلقیحی ابتدایی کم‌تر از $1.0\times10^{5}\ cfu/ml$ تا $5.0\times10^{6}\ cfu/ml$ و یا برای برای ماده تلقیحی آزمون مجدد کم‌تر از $1.0\times10^{4}\ cfu/ml$ تا $1.0\times10^{5}\ cfu/ml$ نباشد. حجم ماده تلقیحی نباید بیشتر از یک درصد حجم نمونه باشد. از پراکندگی ماده تلقیحی با مخلوط کردن کافی مطمئن شوید. این نمونه کنترل را برای واحدهای تشکیل پرگنه بر میلی‌لیتر در شروع آزمون محاسبه کنید، تا مناسب بودن محیط کشت به‌کار رفته برای رشد ارگانیسم آزمون را نشان داده و تخمینی از غلظت ماده تلقیحی اولیه را فراهم کنید. مقدار مناسبی از هر لوله را بر روی پلیت‌های سه‌گانه آگار کشت دهید (مگر آن‌که طور دیگری تعریف شده باشد).

پ-۲-۶-۲ کنترل محیط کشت

رقت یک‌دهم از محصول نگه‌داری شده را در محیط کشت آبگوشتی خنثی‌سازی صحه‌گذاری شده، حرکت گردابی دهید (۱ میلی‌لیتر در ۹ میلی‌لیتر). اجازه دهید تا خنثی‌سازی کامل شود. یک لوله کنترل ثانویه را با ده میلی‌لیتر از یک رقیق‌کننده مناسب آماده کنید (مانند DPBST). لوله‌ها را با ماده تلقیحی مناسب تلقیح کرده تا منجر به ۱۰ cfu تا ۱۰۰ cfu ارگانیسم آزمون در هر پلیت شود. برای یک دوره زمانی مناسب در دمای محیط گرم خانه‌گذاری کنید. مقدار مناسبی از هر لوله را بر روی پلیت‌های سه‌گانه آگار کشت دهید (مگر آن‌که طور دیگری تعریف شده باشد).

پلیت‌های باکتری کشت داده شده را در دمای (۳۰ تا ۳۵) درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری کنید. پلیت‌های کپک کشت داده شده را در دمای (۲۰ تا ۲۵) درجه سلسیوس یا (۳۰ تا ۳۵) درجه سلسیوس گرم‌خانه-گذاری کنید. پلیت‌های کپک کشت داده شده را در دمای (۲۰ تا ۲۵) درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری کنید. حداقل زمان‌های گرم‌خانه‌گذاری برای رشد بهینهٔ باکتری، مخمر و کپک را تعیین کنید.

بررسی کنید که رشد در محیط کشت آبگوشتی خنثی‌کننده حداقل ۵۰ درصد از رشد در لوله کنترل دوم باشد. این کنترل را برای هر ارگانیسم مورد آزمون انجام دهید.

در صورتی‌که برای خنثی‌کردن رقت بیشتر از یک‌دهم مورد نیاز است، باید از روش فیلتراسیون غشایی استفاده شود.

خنثی‌سازی محصول را در ابتدا و به‌صورت دوره‌ای تعیین کنید.

پ-۲-۷ معیارهای عملکرد

پ-۲-۷-۱ کلیات

محصولات باید معیارهای عملکرد برای هردو آزمون اولیه و نهایی پس از استفاده شبیه‌سازی‌شده را دارا باشند.

پ-۲-۷-۲ باکتری

توصیه می‌شود تعداد ارگانیسم‌های رشد داده شده در هر میلی‌متر به میزانی که کم‌تر از ۳٫۰logs در ۱۴روز نیست، کاهش یابد. پس از آزمون مجدد در ۱۴روز، غلظت باکتری بهتر است دوباره حداقل به میزان میانگین ۳٫۰logs در ۲۸ روز کاهش یابد.

پ-۲-۷-۳ مخمرها و کپک‌ها

توصیه می‌شود تعداد ارگانیسم‌های رشد داده شده در هر میلی‌متر در ۱۴روز در غلظت اولیه یا کم‌تر از آن، (با خطای محاسباتی ۰٫۵ logs±) باقی بمانند. در روز بیست‌وهشتم، غلظت کپک‌ها و مخمرها بهتر است برابر با غلظت کپک‌ها و مخمرهای اولیه یا کم‌تر از آن (با خطای محاسباتی ۰٫۵ logs±) باقی بماند.

پ-۲-۸ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید به‌صورتی که در زیربند ۵-۷ مشخص شده است، باشد.

پیوست ت

(آگاهی دهنده)

روش اجرایی تاریخ امحاء (۳)

ت-۱ اصول کلی

ت-۱-۱ آزمون، شامل آماده‌سازی با یک ماده تلقیحی مشخص از میکروارگانیسم‌های مناسب، ذخیره آماده‌سازی تلقیح شده در دمای مشخص، برداشتن نمونه‌ها در فواصل زمانی مشخص از ظرف و شمارش ارگانیسم‌ها در نمونه‌های برداشته شده می شود. قابلیت جلوگیری از رشد مجدد در محصول با شمارش ارگانیسم‌های زنده در دوره‌های زمانی طولانی‌تر، تایید می‌شود.

ت-۱-۲ میزان نمونه میکروبی انتخاب شده در این آزمون، در عمل به‌عنوان نماینده کل نمونه‌های احتمالی در نظر گرفته نمی‌شود، اما تعداد قابل شمارشی که برآورد سرعت و اندازه قابلیت زیستی از دست-رفته باشد را می‌تواند تعیین کند.

ت-۱-۳ آماده‌سازی باید الزامات نگه‌داری محصول مراقبتی عدسی تماسی را در دوره تاریخ امحاء آن داشته باشد (برای معیارهای عملکرد به زیربند ت-۲-۵ مراجعه شود).

ت-۱-۴ برای غیر فعال‌سازی و یا حذف عوامل ضدمیکروبی باقی‌مانده در طول مدت کشت و شمارش بقیه میکروارگانیسم‌ها، بهتر است اقدامات مناسبی به‌کار گرفته شود؛ اثربخش این اقدامات نیز بهتر است صحه‌گذاری شود. توصیه می‌شود کارایی این فرایند در مدت آزمون با به‌کارگیری کنترل‌های مناسب اثبات شود.

ت-۲ روش‌های آزمون

ت-۲-۱ مواد و واکنشگرها

ت-۲-۱-۱ ارگانیسم‌های آزمون

توصیه می‌شود ارگانیسم‌های آزمون به‌صورتی که در زیربند ۵-۱-۱ مشخص شده است، باشند.

ت-۲-۱-۲ محیط کشت آزمون

توصیه می‌شود محیط کشت آزمون به‌صورتی که در زیربند ۵-۱-۲ مشخص شده است، باشد.

ت-۲-۱-۳ تجهیزات آزمایشگاهی

توصیه می‌شود تجهیزات آزمایشگاهی به‌صورتی که در زیربند ۵-۱-۳ مشخص شده است، باشند.

ت-۲-۱-۴ نمونه‌های آزمون

توصیه می‌شود محصول مراقبتی عدسی تماسی‌ای که آزمون می‌شود معرف محصولی که می‌خواهد وارد بازار شود، باشد. بهتر است سه عدد از محصول آزمون شوند. آزمون بهتر است در ظرف محصول واقعی انجام شود. توصیه می‌شود بزرگترین اندازه ظرف پیشنهاد شده برای محصول استفاده شود.

توصیه می‌شود نگه‌داری محیط کشت به‌صورتی که در زیربند ۵-۲ مشخص شده است، باشد.

ت-۲-۲ آماده‌سازی آزمون میکروبی (ماده تلقیحی)

توصیه می‌شود ارگانیسم‌ها کشت داده شوند و به‌صورتی که در زیربند ۵-۳ مشخص شده است، برداشت شوند.

ت-۲-۳ روش اجرایی آزمون ماده تلقیحی

ت-۲-۳-۱ سوسپانسیون ارگانیسم‌های آزمون را به نمونه محصولی که باید مورد آزمون قرار گیرد، به اندازه کافی تلقیح کنید تا شمار نهایی بین $1.0\times10^{5}\ cfu/ml$ و $1.0\times10^{6}\ cfu/ml$ فراهم شود. مطمئن شوید که حجم ماده تلقیحی از یک درصد حجم نمونه بیشتر نشود. از پراکندگی کامل ماده تلقیحی به‌وسیله مخلوط‌کردن کافی مطمئن شوید.

ت-۲-۳-۲ محصول تلقیح شده را در دمای (۲۰ تا ۲۵) درجه سلسیوس نگه‌داری کنید. دما باید با استفاده از یک دستگاه کالیبره شده، نظارت شده و ثبت شود.

درصورتی‌که محصول مراقبتی عدسی تماسی به نور حساس است، توصیه می‌شود در مدت آزمون از آن محافظت شود.

ت-۲-۳-۳ مقدار ۱٫۰ میلی‌لیتر از محصول تلقیح‌شده را برای شمارش تعداد سلول‌های زنده در روز هفتم، روز چهاردهم، روز بیست‌ویکم و روز بیست‌وهشتم بردارید و نمونه‌برداری را در فواصل ۷ روزه تا تمام‌شدن محتویات محصول، ادامه دهید.

ت-۲-۳-۴ هر یک از مقادیر ۱٫۰ میلی‌لیتری از نمونه‌ها که در فواصل زمانی مشخص برداشته شده‌اند را با رقت‌های اعشاری مناسب به محیط‌های کشت خنثی‌سازی صحه‌گذاری شده انتقال دهید. سوسپانسیون را با حرکت گردابی شدید، به‌خوبی مخلوط کنید و اجازه دهید تا خنثی‌سازی کامل شود.

اگر یک عامل ضدمیکروبی در فرمولاسیون نتواند به‌طور مناسب غیرفعال یا خنثی شود، با استفاده از یک روش‌اجرایی فیلتراسیون غشایی صحه‌گذاری شده، آن‌را حذف کنید (به پیوست الف مراجعه شود).

ت-۲-۳-۵ تعداد سلول‌های زنده ارگانیسم‌ها در رقت‌های مناسب را با آماده‌سازی پلیت‌های سه‌گانه (مگر آن‌که طور دیگری تعریف شده باشد) از یک محیط کشت رشد مناسب (برای نمونه TSA برای باکتری‌ها و SDA برای کپک و مخمر)، تعیین کنید.

اگر روش فیلتراسیون غشایی برای حذف یا خنثی‌سازی عوامل ضدمیکروبی استفاده شده است، غشاها را روی این محیط‌های کشت، به‌صورت مناسب کشت دهید.

اگر روش پور-پلیت مورد استفاده قرار می‌گیرد، قبل از ریختن آگار در پلیت‌ها، آن‌را در دمای زیر ۵۰ درجه سلسیوس نگه دارید.

یادآوری- در صورت نیاز محیط‌های کشت حاوی آگار استفاده شده برای شمارش تعداد سلول‌های زنده می‌توانند دارای غیرفعال‌سازها یا خنثی‌سازهای ضدمیکروبی نیز باشد.

ت-۲-۳-۶ پلیت‌های باکتری کشت داده شده را در دمای (۳۰ تا ۳۵) درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری کنید. پلیت‌های مخمر کشت داده شده را در دمای (۲۰ تا ۲۵) سلسیوس درجه یا (۳۰ تا ۳۵) درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری کنید. پلیت‌های کپک کشت داده شده را در دمای (۲۰ تا ۲۵) درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری کنید. توصیه می‌شود زمان‌های گرم‌خانه‌گذاری برای رشد بهینه باکتری، مخمر، کپک تعیین شوند. حداقل زمان‌های گرم‌خانه‌گذاری بهتر است بر اساس آزمون کنترل محیط رشد باشند (به زیربند ت-۲-۴-۲ مراجعه شود).

ت-۲-۳-۷ تعداد میانگین واحدهای تشکیل پرگنه بر روی پلیت‌های قابل‌شمارش را تعیین کنید. کاهش میکروبی در نقاط زمانی مشخص را محاسبه کنید.

یادآوری- پلیت‌های قابل شمارش، به جز زمانی که پرگنه‌ها تنها برای پلیت‌هایی با رقت‌های 10^{0} یا 10^{-1} مشاهده می‌شوند، به $30\ cfu$ تا $300\ cfu$ بر پلیت برای باکتری و مخمر، و $8\ cfu$ تا $80\ cfu$ بر پلیت برای کپک‌ها، اشاره دارد.

ت-۲-۳-۸ توصیه می‌شود زمانی که پلیت‌های حاوی تمامی رقت‌های یک نمونه در یک زمان مشخص هیچ رشدی از میکروارگانیسم‌ها ندارند، ثبت شود

ت-۲-۳-۹ در هر نقطه زمانی غلظت باقی‌مانده‌ها محاسبه می‌شود.

ت-۲-۴ کنترل‌ها

ت-۲-۴-۱ کنترل‌های ماده تلقیحی

غلظت‌های ماده تلقیحی اولیه، با پراکندگی مقدار یکسانی از ماده تلقیحی در یک رقیق‌کننده مناسب با همان حجم استفاده شده در زیربند ت-۲-۳-۱ محاسبه می‌شوند تا غلظت نهایی کم‌تر از $1.0\times10^{4}\ cfu/ml$ تا $5.0\times10^{5}\ cfu/ml$ نباشد. حجم تلقیح بیشتر از یک درصد حجم نمونه نشود. از پراکندگی ماده تلقیحی با مخلوط‌کردن کافی مطمئن شوید. این نمونه کنترل را برای cfu/ml در شروع آزمون بسنجید تا مناسب بودن محیط کشت به‌کار رفته برای رشد ارگانیسم آزمون را نشان داده و تخمینی از غلظت ماده تلقیحی اولیه را فراهم کنید. مقدار مناسبی از هر لوله را بر روی پلیت‌های سه‌گانه آگار کشت دهید (مگر آن‌که طور دیگری تعریف شده باشد).

ت-۲-۴-۲ کنترل محیط کشت

رقت یک‌دهم از محصول نگه‌داری شده را در محیط کشت آبگوشتی خنثی‌سازی صحه‌گذاری شده، حرکت گردابی دهید (۱ میلی‌لیتر در ۹ میلی‌لیتر). اجازه دهید تا خنثی‌سازی کامل شود. یک لوله کنترل ثانویه را با ده میلی‌لیتر از یک رقیق‌کننده مناسب آماده کنید (مانند DPBST). لوله‌ها را با ماده تلقیحی مناسب تلقیح کرده تا منجر به ۱۰ cfu تا ۱۰۰ cfu ارگانیسم آزمون در هر پلیت شود. برای یک دوره زمانی مناسب در دمای محیط گرم خانه‌گذاری کنید. مقدار مناسبی از هر لوله را بر روی پلیت‌های سه‌گانه آگار کشت دهید (مگر آن‌که طور دیگری تعریف شده باشد).

پلیت‌های باکتری کشت داده شده را در دمای (۳۰ تا ۳۵) درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری کنید. پلیت‌های کپک کشت داده شده را در دمای (۲۰ تا ۲۵) درجه سلسیوس یا (۳۰ تا ۳۵) درجه سلسیوس گرم‌خانه-گذاری کنید. پلیت‌های کپک کشت داده شده را در دمای (۲۰ تا ۲۵) درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری کنید. حداقل زمان‌های گرم‌خانه‌گذاری برای رشد بهینهٔ باکتری، مخمر و کپک را تعیین کنید.

بررسی کنید که رشد در محیط کشت آبگوشتی خنثی‌کننده حداقل ۵۰ درصد از رشد در لوله کنترل دوم باشد. این کنترل را برای هر ارگانیسم مورد آزمون انجام دهید.

در صورتی‌که برای خنثی‌سازی رقتی بیشتر از یک‌دهم مورد نیاز است، باید از روش فیلتراسیون غشایی استفاده شود.

خنثی‌سازی محصول را در ابتدا و به‌صورت دوره‌ای تعیین کنید.

ت-۲-۵ معیارهای عملکرد

ت-۲-۵-۱ باکتری، کپک‌ها و مخمرها

توصیه می‌شود تعداد ارگانیسم‌های کشت داده شده در هر میلی‌متر، در غلظت‌های اولیه یا کم‌تر از آن باقی بمانند.

ت-۲-۵-۲ تعیین تاریخ امحاء

توصیه می‌شود تاریخ امحاء محصول مطابق با زمان مشخصی که یک افزایش در تعداد هر یک از ارگانیسم‌ها را نشان می‌دهد، باشد.

برای مثال جدول ت-۱ را ملاحظه فرمایید.

جدول ت-۱

ارگانیسم	شماره روز					
	۰	۷	۱۴	۲۱	۲۸	۳۵
اشریشیا کلی	$۱۰^{۵}$	$۱۰^{۱}$	$۱۰^{۲}$	$۱۰^{۲}$	$۱۰^{۳}$	$۱۰^{۳}$
سودوموناس آئروژینوزا	$۱۰^{۵}$	$۱۰^{۳}$	$۱۰^{۳}$	$۱۰^{۲}$	$۱۰^{۳}$	$۱۰^{۴}$
استافیلوکوکوس اورئوس	$۱۰^{۵}$	<۱۰	<۱۰	<۱۰	<۱۰	<۱۰
کاندیدا آلبیکنس	$۱۰^{۵}$	$۱۰^{۵}$	$۱۰^{۴}$	$۱۰^{۲}$	<۱۰	<۱۰
آسپرژیلوس برازیلینس	$۱۰^{۵}$	$۱۰^{۴}$	$۱۰^{۳}$	$۱۰^{۴}$	$۱۰^{۴}$	$۱۰^{۵}$

یادآوری ۱- نقطه زمانی که افزایش رشد را نشان می‌دهد:

اشریشیا کلی : ۷ روز

سودوموناس آئروژینوزا : ۲۱ روز

آسپرژیلوس برازیلینس : ۱۴ روز

یادآوری ۲- تاریخ امحاء در محصول فرضی بالا، ۷ روز پس از زمان باز شدن می‌باشد.

ت-۲-۶ گزارش آزمون

توصیه می‌شود گزارش آزمون به‌صورتی که در زیربند ۵-۷ مشخص شده است، باشد.

پیوست ث

(آگاهی دهنده)

روش اجرایی تاریخ امحاء (۴)

ث-۱ اصول کلی

ث-۱-۱ آزمون شامل تلقیح بطری‌های محصول با سطح پایین ارگانیسم‌ها می‌شود. نمونه‌های آزمون با ارگانیسم‌های تلقیحی سطح پایین موجود در بطری‌های محصول مکررا مطابق برنامه آزمون می‌شوند.

ث-۱-۲ زمان‌های تلقیح در ابتدا، ۲۴ ساعت، ۱ هفته، ۲ هفته، ۴ هفته، ۶ هفته، ۸ هفته، ۱۲ هفته، ۱۶ هفته، ۱۸ هفته، ۲۴ هفته و همچنین در فواصل ۶ هفته‌ای و/یا تا دو برابر زمانی‌که تاریخ امحاء برچسب گذاری شده یا مطلوب فرا می‌رسد، می‌باشند.

ث-۱-۳ زمان‌های نمونه‌برداری در ۲۴ ساعت و بلافاصله قبل از هر آزمون مجدد و در نقطه پایان آزمون، شروع می‌شوند.

ث-۱-۴ به‌منظور موفقیت آزمون، تمام شمارش‌های نقطه نمونه باید کم‌تر از مجموع بیشترین آزمون اخیر به‌علاوه شمارش باقی‌مانده قبلی باشد.

ث-۱-۵ آزمون تاریخ امحاء به‌عنوان مکمل آزمون اثربخشی نگه‌دارنده محصولات مراقبتی عدسی تماسیِ نگه‌داری شده به‌صورت چنددوزی‌ای که برای تصدیق عمر نگه‌داری برچسب‌گذاری‌شده آن‌ها بکار می‌رود، می‌باشد. الزامات آزمون امحاء باید در سراسر عمر نگه‌داری برچسب‌گذاری‌شده برقرار باشند.

ث-۲ روش‌های آزمون

ث-۲-۱ مواد و واکنشگرها

ث-۲-۱-۱ ارگانیسم‌های آزمون

توصیه می‌شود ارگانیسم‌های آزمون به‌صورتی که در زیربند ۵-۱-۱ مشخص شده است، باشند.

ث-۲-۱-۲ محیط کشت آزمون

توصیه می‌شود محیط کشت آزمون به‌صورتی که در زیربند ۵-۱-۲ مشخص شده است، باشد.

ث-۲-۱-۳ تجهیزات آزمایشگاهی

توصیه می‌شود تجهیزات آزمایشگاهی به‌صورتی که در زیربند ۵-۱-۳ مشخص شده است، باشند.

ث-۲-۱-۴ نمونه‌های آزمون

آزمون‌ها به‌صورت مستقیم در ظروف محصول نهایی انجام می‌شوند. حداقل دو ظرف نمونه برای هر ارگانیسم مورد آزمون، از هر سه قسمت محصول که معرف محصول قابل عرضه به بازار هستند برای آزمون در هر بازه زمانی در برنامه آزمون پایداری انتخاب‌شده برای تاریخ امحاء، انتخاب می‌شوند.

توصیه می‌شود نگه‌داری محیط کشت به‌صورتی که در زیربند ۵-۲ مشخص شده است، باشد.

ث-۲-۲ آماده‌سازی آزمون میکروبی (ماده تلقیحی)

توصیه می‌شود ارگانیسم‌ها کشت داده شوند و به‌صورتی که در زیربند ۵-۳ مشخص شده است، برداشت شوند.

ث-۲-۳ روش اجرایی آزمون ماده تلقیحی

ث-۲-۳-۱ در روز صفر ام، سری‌هایی از ظروف محصول نهایی مورد آزمون را با یک سویه منفرد از ارگانیسم‌های مورد آزمون که به یک سطح برای شمارش $1.0\times10^{3}\ cfu/ml$ تا $2.0\times10^{3}\ cfu/ml$ در حجم محصول مورد آزمون معلق شده‌اند، تلقیح کنید. حجم ماده کشت بهتر است بیشتر از ۰٫۵ درصد حجم نمونه در هر دوره آزمون نشود، تا ریسک رقت نمونه محصول در آزمون‌های مکرر را کاهش دهد. از پراکندگی کامل ماده تلقیحی با مخلوط کردن کافی مطمئن شوید.

ث-۲-۳-۲ محصول تلقیح شده را در دمای (۲۰ تا ۲۵) درجه سلسیوس نگه‌داری کنید. دما باید با استفاده از یک دستگاه کالیبره شده، نظارت شده و ثبت شود.

در صورتی‌که محصول مراقتی عدسی تماسی به نور حساس است، توصیه می‌شود در مدت آزمون از آن محافظت شود.

ث-۲-۳-۳ در ۲۴ ساعت، مقدار ۱٫۰ میلی‌لیتر از محصول تلقیح شده را برای شمارش تعداد سلول‌های زنده بردارید.

ث-۲-۳-۴ با محیط‌های کشت جدید از ازگانیزم ماده تلقیحی یکسان، سطح و کمیتی که در زیربند ث-۲-۳-۱ گفته شده است، مجدد آزمون کنید، در دمای (۲۰ تا ۲۵) درجه سلسیوس تا ۷ روز نگه‌داری کنید و شمارش تعداد سلول‌های زنده، آزمون مجدد، و مراحل ذخیره‌سازی را تکرار کنید. این فرایند را در ۲ هفته، ۴ هفته، ۶ هفته، ۸ هفته، ۱۲ هفته، ۱۸ هفته، ۲۴ هفته و در صورت نیاز در فواصل ۶ هفته‌ای و/یا تا دو برابر زمانی‌که تاریخ امحاء برچسب‌گذاری شده یا مطلوب فرا می‌رسد، تکرار کنید.

ث-۲-۳-۵ هر یک از مقادیر ۱٫۰ میلی‌لیتری از نمونه‌ها که در فواصل زمانی مشخصی برداشته شده‌اند را با رقت‌های اعشاری مناسب به محیط‌های خنثی‌سازی صحه‌گذاری شده انتقال دهید. با حرکت گردابی شدید، سوسپانسیون را به‌خوبی مخلوط کنید و اجازه دهید تا خنثی‌سازی کامل شود.

اگر یک عامل ضدمیکروبی در فرمولاسیون نتواند به‌صورت کافی غیرفعال یا خنثی شود، با استفاده از روش اجرایی فیلتراسیون غشایی صحه‌گذاری شده، آن‌را حذف کنید (پیوست الف را ملاحظه فرمایید).

ث-۲-۳-۶ تعداد سلول‌های زنده ارگانیسم‌ها در رقت‌های مناسب را با آماده‌سازی پلیت‌های سه‌گانه (مگر آن‌که طور دیگری تعریف شده باشد) از یک محیط رشد مناسب (به‌عنوان مثال TSA برای باکتری و SDA برای کپک و مخمر)، تعیین کنید.

اگر روش فیلتراسیون غشایی برای حذف یا خنثی‌سازی عوامل ضدمیکروبی استفاده شده است، غشاها را روی این محیط‌های کشت، به‌صورت مناسب کشت دهید.

اگر روش پور-پلیت مورد استفاده قرار می‌گیرد، قبل از ریختن آگار در پلیت‌ها، آن‌را در دمای زیر ۵۰ درجه سلسیوس نگه دارید.

یادآوری- در صورت نیاز محیط‌های کشت حاوی آگار استفاده شده برای شمارش تعداد سلول‌های زنده می‌توانند دارای غیرفعال‌سازها یا خنثی‌سازهای ضدمیکروبی نیز باشد.

ث-۲-۳-۷ پلیت‌های باکتری کشت داده شده را در دمای (۳۰ تا ۳۵) درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری کنید. پلیت های مخمر کشت داده شده را در دمای (۲۰ تا ۲۵) درجه سلسیوس یا (۳۰ تا ۳۵) درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری کنید. پلیت‌های کپک کشت داده شده را در دمای (۲۰ تا ۲۵) درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری کنید. توصیه می‌شود زمان‌های گرم‌خانه‌گذاری برای رشد بهینه باکتری، کپک و مخمرها تعیین شوند. حداقل زمان‌های لازم برای گرم‌خانه‌گذاری بهتر است بر اساس آزمون کنترل محیط رشد باشند. (به زیربند ث-۲-۴-۲ مراجعه شود).

ث-۲-۳-۸ تعداد میانگین واحدهای تشکیل پرگنه بر پلیت‌های قابل شمارش را تعیین کنید. کاهش میکروبی در نقاط زمان مشخص را محاسبه کنید.

یادآوری- پلیت‌های قابل شمارش، به جز زمانی که پرگنه‌ها تنها برای پلیت‌هایی با رقت‌های 10^{0} یا 10^{-1} مشاهده می‌شوند، به $30\ cfu$ تا $300\ cfu$ بر پلیت برای باکتری و مخمر، و $8\ cfu$ تا $80\ cfu$ بر پلیت برای کپک‌ها، اشاره دارد.

ث-۲-۳-۹ توصیه می‌شود زمانی‌که پلیت‌های حاوی تمام رقت‌های یک نمونه در یک زمان مشخص هیچ‌گونه رشدی از میکروارگانیسم را ندارند، ثبت شوند

ث-۲-۳-۱۰ در هر نقطه زمانی غلظت باقی‌مانده‌ها محاسبه می‌شود.

ث-۲-۴ کنترل‌ها

ث-۲-۴-۱ کنترل‌های ماده تلقیحی

در هر زمان تکراری، بطری‌های حاوی یک رقیق‌کننده مناسب هم‌سان (به‌عنوان مثال DPBST)، در همان زمان به‌عنوان نمونه‌های آزمون برای تعیین سطح ماده تلقیحی، تلقیح می‌شوند. حجم در ظرف کنترل بهتر است تخمینی از حجم باقی مانده در ظرف آزمون باشد. از پراکندگی ماده تلقیحی با مخلوط کردن کافی مطمئن شوید. این نمونه کنترل را برای cfu/ml در شروع آزمون محاسبه کنید تا مناسب بودن محیط کشت استفاده شده برای رشد ارگانیسم آزمون را نشان داده و تخمینی از غلظت ماده تلقیحی اولیه فراهم کند. مقدار مناسبی از هر لوله را بر روی پلیت‌های سه‌گانه آگار کشت دهید (مگر آن‌که طور دیگری تعریف شده باشد).

ث-۲-۴-۲ کنترل محیط رشد

رقت یک‌دهم از محصول نگه‌داری‌شده در محیط کشت آبگوشتی خنثی‌سازی صحه‌گذاری شده را حرکت گردابی دهید (۱ میلی‌لیتر در ۹ میلی‌لیتر). اجاز دهید تا خنثی‌سازی کامل شود. یک لوله کنترل دوم را با ۱۰ میلی‌لیتر از یک رقیق‌کننده مناسب آماده کنید (به‌عنوان مثال DPBST). لوله‌ها را با ماده تلقیحی مناسب تلقیح کنید تا منجر به $10cfu$ تا $100cfu$ ارگانیسم آزمون در هر پلیت شود. برای یک دوره زمانی مناسب در دمای محیط گرم‌خانه‌گذاری کنید. مقدار مناسبی از هر لوله را بر روی پلیت‌های سه‌گانه آگار کشت دهید (مگر آن‌که طور دیگری تعریف شده باشد).

پلیت‌های باکتری کشت داده شده را در دمای (۳۰ تا ۳۵) درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری کنید. پلیت‌های مخمر کشت داده شده را در دمای (۲۰ تا ۲۵) درجه سلسیوس یا (۳۰ تا ۳۵) درجه سلسیوس گرم‌خانه-گذاری کنید. پلیت‌های کپک کشت داده شده را در دمای (۲۰ تا ۲۵) درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری کنید. حداقل زمان‌های گرم‌خانه گذاری برای رشد بهینه باکتری، مخمر و کپک را تعیین کنید.

بررسی کنید که رشد در محیط کشت آبگوشتی خنثی‌کننده حداقل ۵۰ درصد از رشد در لوله کنترل دوم باشد. این کنترل را برای هر ارگانیسم مورد آزمون انجام دهید.

درصورتی‌که رقتی بیشتر از یک‌دهم برای خنثی‌سازی مورد نیاز است، باید از روش فیلتراسیون غشایی استفاده شود.

خنثی‌سازی محصول را در ابتدا و به‌صورت دوره‌ای تعیین کنید.

ث-۲-۵ معیارهای عملکرد

ث-۲-۵-۱ آزمون تا دو برابر زمان امحاء برچسب گذاری شده یا مطلوب، انجام می‌شود.

ث-۲-۵-۲ توصیه می‌شود تعداد ارگانیسم‌های کشت داده شده بیشتر از مجموع ماده تلقیحی اخیر به علاوه شمارش باقی‌مانده قبلی در ۰٫۵± لگاریتم واریانس نباشد، (یعنی چند برابر شدن ارگانیسم‌ها رخ نداده است).

ث-۲-۵-۳ توصیه می‌شود محصولات قادر به حفظ این معیارها در مدت عمر نگه‌داری برچسب‌گذاری شده و برای زمان بیشتر از تاریخ امحاء پس از تاریخ باز شدن در پایان عمر نگه‌داری باشند.

ث-۲-۶ گزارش آزمون

توصیه می‌شود گزارش آزمون به‌صورتی که در زیربند ۵-۷ مشخص شده است، باشد.

پیوست ج

(آگاهی دهنده)

ارگانیسم‌های مورد آزمون از سایر مجموعه‌های کشت

جدول ج-۱- ارگانیسم‌های مورد آزمون از سایر مجموعه‌های کشت

IAM 10374	DSM 1128	CIP 82.118 NRRL B-800	CCM 1961 NCIMB 8626	MUAVCR 278 IFO 13275	*سودوموناس آئروژینوزا*
NCTC 10788	NCIB 9518	IFO 13276	DSM 799	CIP 4.83	استافیلوکوکوس اورئوس
	NCIB 8545	NCDO 904	DSM 1576	CIP 53.126	*اشریشیا کلی*
IFO 1594	DSM 1386	CIP 48.72 VTT C-85161	CCY 29-3-106 NCYC 1363	CBS 6431 NCPF 3179	*کاندیدا آلبیکنس*
NCPF 2275	IFO 9455	IMI 149007	DSM 1988	CBS 733.88	*آسپرژیلوس برازیلینس*
یادآوری- محیط‌های کشت مجموعه‌های مختلف بایستی معادل سویه‌های ATCC باشند.					

جدول ج-۲- مجموعه‌ها و موسسه‌های کشت

ATCC	American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA
MUAVCR	Microbiologický ústav Akademie ved. Ceské republiky, Prague, Czech Republic
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands
CCM	Czech Collection of Microorganisms, Ceská sbirka mikroorganizmu, Prírodovedecká fakulta Masarykovy univerzity, Brno, Czech Republic
CCY	Culture Collection of Yeasts, Chemický ústav SAV, Bratislava, Slovakia
CIP	Collection de bactéries de l'Institut Pasteur, Paris, France
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany
IAM	Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo, Tokyo, Japan
IFO	Institute for Fermentation, Osaka, Japan
IMI	International Mycological Institute, Kew, Surrey, UK
NCDO	National Collection of Dairy Organisms, Shinfield, Reading, Berkshire, UK
NCIB	National Collection of Industrial Bacteria, Aberdeen, Scotland, UK
NCIMB	National Collection of Industrial and Marine Bacteria, Aberdeen, Scotland, UK
NCPF	National Collection of Pathogenic Fungi, Mycological Reference Laboratory, Central Public Health Laboratory, London, UK
NCTC	National Collection of Type Cultures, Central Public Health Laboratory, London, UK
NCYC	National Collection of Yeast Cultures, Nutfield, Surrey, UK
NRRL	Northern Regional Research Center, US. Department of Agriculture, Peoria, IL, USA
VTT	Technical Research Centre of Finland, VTT Collection of Industrial Microorganisms, Espoo, Finland

کتاب‌نامه

[1] Ph. Eur. 1994. Efficacy of antimicrobial preservation. In: European Pharmacopoeia 1994, 2nd ed., Part 11, 18th section. Maisonneuve S.A., Sainte-Ruffine, France, p.V111.14.1-V111.14.4

[2] USP 23. 1994. Antimicrobial preservatives - Effectiveness. In United States Pharmacopoeia , 23rd rev. U.S. Pharmacopoeial Convention, Inc., Rockville, MD, p. 1681

[3] Urban/Hecker/Schiller. Analytical R & D Sandoz AG, Basel. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. A. 1981,172 pp. 478–484