INSO
3001-1
2nd.Revision
2014

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

استاندارد ملی ایران
۳۰۰۱-۱
تجدید نظر دوم
۱۳۹۳

سترونی وسایل پزشکی-آزمون سترونی
قسمت۱:روش مستقیم

Sterilization of medical devices-Test of sterility
Part 1:Direct method

ICS:11.080.01 ; 07.100.10

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب بند یک مادهٔ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات 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.

نام موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب یکصد و پنجاه و دومین جلسه شورای عالی اداری مورخ ۹۰/۶/۲۹ به سازمان ملی استاندارد ایران تغییر و طی نامه شماره ۲۰۶/۳۵۸۳۸ مورخ ۹۰/۷/۲۴ جهت اجرا ابلاغ شده است .

تدوین استاندارد در حوزه های مختلف در کمیسیون های فنی مرکب از کارشناسان سازمان ، 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 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 می شود.

پیش نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان های علاقه مند و ذی صلاح 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 شوند که بر اساس مفاد نوشته شده در استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تدوین و در کمیتهٔ ملی استاندارد مربوط که سازمان ملی استاندارد ایران تشکیل می‌دهد به تصویب رسیده باشد.

سازمان ملی استاندارد 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 پیشرفت های علمی ، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین‌المللی بهره‌گیری می‌شود .

سازمان ملی استاندارد ایران می تواند با رعایت موازین پیش بینی 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.

سازمان 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 سازمان ها و مؤسسات فعال در زمینهٔ مشاوره ، آموزش ، بازرسی ، ممیزی و صدور گواهی سیستم های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی ، آزمایشگاه ها و مراکز کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش ، سازمان ملی استاندارد ایران این گونه سازمان ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می کند و در صورت احراز شرایط لازم ، گواهینامهٔ تأیید صلاحیت به آن ها اعطا و بر عملکرد آن ها 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 سازمان است .

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

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

«سترونی وسایل پزشکی-آزمون سترونی- قسمت ۱: روش مستقیم »

(تجدید نظر دوم)

رئیس:	**سمت و/ یا نمایندگی**
مختاری ، فهیم‌دخت (فوق لیسانس ایمونولوژی)	پژوهشگاه استاندارد- گروه پژوهشی بیولوژی
دبیر:	
داورزنی ، ساره (لیسانس تغذیه)	پژوهشگاه استاندارد- گروه پژوهشی میکروبیولوژی
اعضاء: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)	
ابراهیمی امام ، غلامحسن (لیسانس صنایع غذایی)	پژوهشگاه استاندارد- پژوهشکده غذایی وکشاورزی
احمدزاده ، مسلم (لیسانس شیمی)	شرکت صانع طب
درویش حیدری ، سیما (لیسانس میکروبیولوژی)	شرکت سها
دوچشمه ، مهدی (فوق لیسانس مهندسی محیط زیست)	پژوهشگاه استاندارد - گروه پژوهشی میکروبیولوژی
زاهدی نیا ، حمیده (کاردان علوم آزمایشگاهی)	پژوهشگاه استاندارد -گروه پژوهشی میکروبیولوژی
عاملی، سودا (لیسانس میکروبیولوژی)	پژوهشگاه استاندارد -گروه پژوهشی میکروبیولوژی

عطائی کچوئی، سعید (دکترای ایمونولوژی)	موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی
مرندی، وحید (فوق لیسانس مهندسی فرایند)	انستیتو پاستور ایران
مهرپور ، رامش (لیسانس صنایع-گرایش کنترل کیفیت)	پژوهشگاه استاندارد- گروه پژوهشی میکروبیولوژی

فهرست مندرجات

عنوان **صفحه**

	آشنایی با سازمان ملی استاندارد	ب
	کمیسیون فنی تدوین استاندارد	ج
	پیش گفتار	ه
	مقدمه	و
۱	هدف و دامنه کاربرد	۱
۲	مراجع الزامی	۱
۳	اصطلاحات و تعاریف	۲
۴	اصول آزمون	۴
۵	مواد	۵
۶	وسایل	۹
۷	شرایط آزمون	۹
۸	نمونه برداری	۱۰
۹	حجم آزمونه	۱۰
۱۰	روش آزمون	۱۱
۱۱	بررسی نتایج	۱۲
۱۲	تفسیر نتایج	۱۲
	پیوست الف (الزامی) - روش تهیه سوسپانسیون میکروبی محیط کشت برای آزمون رشد دهندگی یا قابلیت رشد محیط کشت	۱۶
	پیوست ب (اطلاعاتی) – نمونه برداری وسایل پزشکی سترون	۱۸

پیش گفتار

استاندارد " سترونی وسایل پزشکی-آزمون سترونی - قسمت ۱: روش مستقیم" نخستین بار در سال ۱۳۶۸ تدوین شد. این استاندارد بر اساس پیشنهادهای رسیده و تایید کمیسیون‌های مربوط برای دومین بار مورد تجدید نظر قرار گرفت و در سیصد و شصت و پنجمین اجلاس کمیته ملی استاندارد میکروبیولوژی و بیولوژی مورخ ۹۳/۳/۱۷ تصویب شد. اینک این استاندارد به استناد بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران ، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱، به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می شود .

برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت های ملی و جهانی در زمینه 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 .

این استاندارد جایگزین استاندارد ملی ایران شماره ۱-۳۰۰۱ : سال ۱۳۷۷ است.

منابع و ماخذی که برای تهیه این استاندارد مورد استفاده قرار گرفته به شرح زیر است:

1- ISO 11737-1:2006 + Cor 1:2007 Sterilization of medical devices – Microbiological methods- Part 1:Determination of a population of microorganisms on products
2- British pharmacopeia, BP, 2013
3- The United States pharmacopeia, USP 35, 2012

سترونی وسایل پزشکی-آزمون سترونی –قسمت ۱: روش مستقیم

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد ارائه روشی برای آزمون سترونی یا تایید سترون بودن وسایل پزشکی با استفاده از روش کشت مستقیم می‌باشد.

این استاندارد برای انواع وسایل پزشکی یکبار مصرف سترون، کاربرد دارد.

یادآوری- در مواردی که استفاده از این آزمون به دلیل فعالیت باکتری ایستایی[1]/قارچ ایستایی[2] نمونه و یا ماهیت نمونه برای غوطه‌ور کردن در محیط کشت، مناسب نباشد از روش فیلتراسیون (صافی غشایی) مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۲-۳۰۰۱ استفاده می شود.

۲ مراجع الزامی

مدارک الزامی زیر حاوی مقرراتی است که در متن این استاندارد ملی ایران به آن‌ها ارجاع داده شده است. بدین ترتیب آن مقررات جزئی از این استاندارد ملی ایران محسوب می شود.

در صورتی که به مدرکی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد،اصلاحیه‌ها و تجدید نظرهای بعدی آن مورد نظر این استاندارد ملی ایران نیست. در مورد مدارکی که بدون ذکر تاریخ انتشار به آن‌ها ارجاع داده شده است، همواره آخرین تجدید نظر و اصلاحیه‌های بعدی آن‌ها مورد نظر است.

استفاده از مراجع زیر برای این استاندارد الزامی است:

۲-۱ استاندارد ملی ایران شماره ۱۰۵۰۵، ضدعفونی کننده‌ها و گندزداهای شیمیایی – نگهداری ارگانیسم‌های آزمون مورد استفاده در تعیین فعالیت باکتری کشی، مایکوباکتریوم کشی، اسپورکشی و قارچ کشی

۲-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۱۰۷۶۷، سترونی محصولات پزشکی - واژه نامه

۲-۳ استاندارد ملی ایران شماره ۱۱۰۶۸، میکروبیولوژی - فرآورده های بهداشتی ، آرایشی-راهنمای کلی برای آزمون های میکروبیولوژی

۲-۴ استاندارد ملی ایران شماره ۱-۶۲۵۲، اتاق های تمیز و محیط های کنترل شده - قسمت اول: طبقه بندی تمیزی هوا

1- Bacteriostatic
2- Fungistatic

۳ اصطلاحات وتعاریف

در این استاندارد، اصطلاحات و یا تعاریف زیر به کار می روند :

یادآوری- اصطلاحات و یا تعاریف زیر مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۱۰۷۶۷ می باشد.

۳-۱

سترون[1]

عاری بودن از میکروارگانیسم های قابل رشد است.

۳-۲

سترونی[2]

وضعیت عاری بودن از میکروارگانیسم های قابل رشد است.

یادآوری- در عمل، امکان عدم وجود میکروارگانیسم ها بطور مطلق وجود ندارد.

۳-۳

آزمون سترونی[3]

آزمونی که وجود یا عدم وجود میکروارگانیسم های قابل رویش در فرآورده را، وقتی که در شرایط تعریف شده کشت قرار می گیرد، تعیین می کند.

۳-۴

سترون سازی[4]

فرآیند صحه گذاری شده مورد استفاده برای به دست آوردن محصولی است که عاری از میکروارگانیسم های قابل رشد می باشد.

۳-۵

فرآیند سترون سازی[5]

مجموعه اقدامات متوالی یا عملیات مورد نیاز برای دست یابی به الزامات خاص برای سترونی است.

1- Sterile
2- Sterility
3- Test of Sterility
4- Sterilization
5- Sterilization Process

۶-۳

عامل سترون کننده[1]

یک عامل فیزیکی یا شیمیایی، یا تلفیقی از عواملی که با فعالیت ضد میکروبی کافی برای دست یابی به سترونی تحت شرایط تعریف شده می باشد.

۷-۳

صحه گذاری[2]

روش اجرایی مستند شده برای دست یابی، گزارش دهی و تفسیر نتایج لازم برای تعیین اینکه یک فرآیند بطور پیوسته محصولی مطابق با ویژگی های از پیش تعیین شده ارائه خواهد داد.

۸-۳

سری ساخت[3]

مقدار معینی از محصول با خصوصیت و کیفیت یکسان که در طی یک چرخه تولید معین ساخته شده است.

۹-۳

بهر[4] **محیط کشت**

هر محیط کشت با یک سری ساخت و تاریخ تولید یکسان را گویند.

۱۰-۳

ماده‌ی خنثی کننده[5]

ماده ای که مانع تأثیر بازدارنده های رشد میکروارگانیسم می گردد.

۱۱-۳

وسایل پزشکی یکبار مصرف[6]

وسایل پزشکی که پس از یکبار مصرف باید دور انداخته شوند و مجددا قابل سترون کردن نیستند.

1- Sterilizing agent
2- Validation
3- Batch
4- lot
5- Neutralizer
6-Single-use

۳-۱۲

بسته[1]

منظور بسته بندی اولیه است که درتماس مستقیم با فرآورده بوده و در واقع اولین لایه محافظ در برابر شرایط خارجی است .

۳-۱۳

آزمایه [2]

نمونه های وارد شده به آزمایشگاه که از یک بهر سترون جهت انجام آزمایش های مختلف برداشته شده است.

۳-۱۴

آزمونه[3]

قسمتی از آزمایه است که از آن برای انجام آزمون استفاده می شود.

۳-۱۵

کنترل شرایط کار

منظور کنترل شرایط و محیط کار از نظر سترونی در مراحل انجام آزمون می باشد.

۳-۱۶

بهر سترونی

محموله ای با ویژگی های یکسان است که در یک زمان وارد سیستم سترونی می شود .

۳-۱۷

آزمون باکتری ایستائی/قارچ ایستائی

آزمونی که بوسیله میکروارگانیسم های انتخابی، به منظور تشخیص حضور موادی است که از تکثیر این میکروارگانیسم ها در آزمون سترونی جلوگیری می کنند.

1- Package
2- Test sample
3- Test portion

۳-۱۸

آزمون رشد دهندگی یا قابلیت رشد محیط های کشت[1]

آزمونی که به منظور نشان دادن قابلیت یک محیط کشت برای رشد میکروارگانیسم ها انجام می شود.

۳-۱۹

وسیله پزشکی[2]

وسیله پزشکی شامل وسیله، دستگاه، ابزار، ماشین، اسباب، کاشتنی ها، معرف یا کالیبره کننده برون تنی، نرم افزار، مواد خام یا سایر اقلام مرتبطی است که به منظور یک یا چند هدف مشخص زیر، سازنده آن را به صورت تک یا تلفیقی برای انسان به کار می برد. اهداف عبارتند از :

الف- تشخیص، پیشگیری، پایش، درمان یا تسکین بیماری

ب- تشخیص، پیشگیری، پایش، درمان یا تسکین یا ترمیم یک جراحت

پ- تحقیق، جایگزینی، اصلاح یا حمایت از آناتومی یا یک فرآیند فیزیولوژیک

ت- حمایت یا ادامه حیات

ث- کنترل حاملگی

ج- ضدعفونی وسایل پزشکی

چ- فراهم نمودن اطلاعات برای اهداف پزشکی به وسیله بررسی های آزمایشگاهی نمونه های بدن انسان

هم‌چنین شامل آن دسته از وسایلی است که تاثیر اولیه آن ها از طریق روش های داروشناسی،ایمنی شناسی یا متابولیک بر یا در بدن انسان عمل نمی کند اما ممکن است این وسایل با چنین روش هایی اعمال شود.

۴ اصول آزمون

این روش براساس غوطه‌ور شدن و تماس مستقیم همه قسمت‌های آزمونه با محیط کشت انجام می شود. محیط کشت تلقیح شده در دما و زمان مناسب گرمخانه‌گذاری شده، سپس با توجه به محیط های کشت کنترل شرایط کار، بررسی می شوند. حجم محیط کشت باید به اندازه‌ای باشد که غوطه‌ور شدن کامل آزمونه‌ها در آن امکان‌پذیر باشد.

۵ مواد

۵-۱ آب مقطر

آب مقطر مورد استفاده باید به طور تازه تهیه شده و ویژگی‌های آن باید مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۱۱۰۶۸ باشد.

1-Growth Promotion test

2- Medical device

یادآوری۱ –در صورتیکه آب مقطر مورد استفاده در طول تهیه محیط‌های کشت سترون می‌گردد، نیاز به سترون کردن جداگانه آن نمی‌باشد.

یادآوری۲ –درصورتیکه آب مقطر با کیفیت مناسب در دسترس نباشد، می‌توان از آب مقطر تهیه شده برای مصارف تزریقی استفاده کرد.

۵-۲ محیط‌های کشت و محلول‌ها

مواد و محیط‌های کشت مورد استفاده باید دارای درجهٔ خلوص آزمایشگاهی و/یا از نظر میکروبی مناسب بوده و باید عاری از مواد سمی و یا مواد ممانعت کننده رشد ارگانیسم‌های آزمون باشند.

در صورت استفاده از محیط‌های کشت آماده تجاری، باید طبق دستورالعمل سازنده تهیه شود.

اگر محیط کشت تهیه شده بلافاصله پس از سترون‌شدن مورد استفاده قرار نمی‌گیرد آن را در دمای ۲°C -۲۵°C نگهداری نمایید. در ظرف محیط کشت باید کاملا بسته باشد تا از نفوذ هوا به داخل آن جلوگیری شود.

برای بررسی کارایی محیط‌های کشت، باید برای هر بهر از هر محیط کشت تجاری یا تهیه شده در آزمایشگاه، آزمون رشد دهندگی یا قابلیت رشد طبق بند ۱۰-۱-۲ انجام شود.

۵-۲-۱ محیط کشت فلوئید تیوگلیکولات[1] (FTG)

محیط کشت فلوئید تیوگلیکولات، محیط کشت انتخابی برای باکتری‌های بی‌هوازی می‌باشد، ولی برای بررسی باکتری‌های هوازی نیز به کار می رود.

۵-۲-۱-۱ مواد تشکیل دهنده:

نام مواد	مقدار
ال – سیستین[2]	۰/۵ g
آگار	۰/۷۵ g
سدیم کلراید [3]	۲/۵ g
گلوکز با یک مولکول آب/یا	۵/۵g
گلوکز بدون آب	۵/۰g
عصاره مخمر[4]	۵/۰ g

1- Fluid Thioglycollate Medium
2- L-Cystine
3- Sodium chloride
4- Yeast Extract

کازئین هضم شده پانکراتیک[1]	۱۵/۰ g
سدیم تیوگلیکولات[2] یا	۰/۵g
اسید تیوگلیکولیک[3]	۰/۳ ml
محلول سدیم رسازورین [4]	۱/۰ ml
آب مقطر	۱۰۰۰ml

روش تهیه:

ال- سیستین، آگار، گلوکز، عصاره مخمر و کازئین هضم شده پانکراتیک را درآب مقطر حل کنید و به آرامی‌حرارت دهید تا به صورت محلول یکنواختی درآید. سپس تیوگلیکولات سدیم یا تیو گلیکولیک اسید را به محلول اضافه کنید. سپس محلول سدیم رسازورین را به محلول فوق اضافه کنید و محیط کشت را در حالیکه داغ است ضمن همزدن در ظروف مناسب تقسیم کنید به طوری که در هر ظرف نسبت مناسبی بین سطح و عمق برقرار شودکه پس از پایان گرمخانه گذاری در ظروف حاوی محیط کشت، تغییر رنگ صورتی ناشی از دریافت اکسیژن در بیشتر از نصف ظرف مشاهده نشود. محیط کشت را در اتوکلاو در دمای ۱۲۱°C به مدت زمان ۱۵min سترون کنید. pH محیط کشت را به گونه‌ای تنظیم کنید که پس از سترون سازی ۷/۱±۰/۲ باشد. محیط کشت آماده مصرف شفاف می باشد و باید در صورت امکان تازه تهیه شود پس از اتوکلاو کردن نباید فورا در یخچال قرار داد، باید اجازه داد تا در دمای اتاق خنک شود تا ورود اکسیژن اتمسفر به محیط کشت را به حداقل برساند.

یادآوری- اگر محیط کشت تهیه شده بلافاصله پس از سترون شدن مورد استفاده قرار نمی‌گیرند، آن را در دمای ۲°C-۲۵°C نگهداری کنید. در این مدت اگر بیش از یک سوم ارتفاع محیط کشت صورتی رنگ شد می توانید یکبار در حمام آب حرارت دهید که رنگ صورتی از بین برود و بلافاصله به دمای اتاق برسانید. محیط کشت را هیچگاه بیش از یکبار حرارت ندهید.

۵-۲-۲ محلول سدیم رسازورین

۵-۲-۲-۱ مواد تشکیل دهنده:

نام مواد	مقدار
سدیم رسازورین	۱/۰g
آب مقطر	تاحجم ۱۰۰۰ml

1- Pancreatic digest of casein
2-Sodium thioglycollate
3-Thioglycolic acid
4- Resazurin sodium solution

روش تهیه:

سدیم رسازورین را در آب مقطر حل کرده و به حجم ۱۰۰۰ ml برسانید. محلول سدیم رسازورین باید تازه تهیه شود.

۵-۲-۳ محیط کشت تیوگلیکولات مایع[1]

محیط کشت تیوگلیکولات مایع برای وسایلی که مسیر عبور مواد در آن بسیار باریک است کاربرد دارد.

در صورت استفاده از محیط کشت تیوگلیکولات مایع که جایگزین محیط کشت فلوئید تیوگلیکولات (طبق بند ۵-۲-۱) می باشد، در شرایط بی هوازی گرمخانه گذاری شود.

مخلوطی را مشابه با ترکیب ذکر شده در محیط کشت فلوئید تیوگلیکولات (طبق بند ۵-۲-۱) آماده کنید. سدیم رسازورین و آگار را حذف کنید. سپس در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ ^{o}C به مدت زمان ۱۵min سترون کنید.

pH محیط کشت را به گونه‌ای تنظیم کنید که پس از سترون سازی ۰/۲ ± ۷/۱ باشد.

۵-۲-۴ محیط کشت سوی بین کازئین دایجست[2]مایع (تریپتیک سوی براث[3] TSB)

محیط کشت سوی بین کازئین دایجست مایع برای رشد قارچ‌ها و باکتری‌های هوازی مناسب می‌باشد.

۵-۲-۴-۱ مواد تشکیل دهنده:

نام مواد	مقدار
پپتون از کازئین[4]	۱۷/۰ g
پپتون از سویا[5]	۳/۰ g
سدیم کلراید	۵/۰ g
دی پتاسیم هیدروژن فسفات[6]	۲/۵ g
گلوکز با یک مولکول آب/یا	۲/۵g
گلوکز بدون آب	۲/۳ g
آب مقطر	۱۰۰۰ ml

1- Thioglycollate medium
2- Soybean-casein digest medium
3- Tryptic soy broth
4- Pepton from casein
5- Peptone from soymeal
6- Dibasic potassium phosphate

روش تهیه:

مواد فوق را در آب مقطر حل کرده و به آرامی حرارت دهید تا به صورت محلول یکنواختی درآید. در صورت لزوم برای شفاف سازی محیط کشت آن را توسط کاغذ صافی مناسب صاف کنید. محیط کشت را در ظروف مناسب تقسیم کرده و در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ ºC به مدت زمان ۱۵min سترون کنید.

pH محیط کشت را به گونه‌ای تنظیم کنید که پس از سترون سازی ۷٫۳±۰٫۲ باشد.

۶ وسایل

از وسایل معمول در آزمایشگاه میکروبیولوژی مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۱۱۰۶۸ و همچنین وسایل زیر استفاده کنید:

۶-۱ اتوکلاو، قابل تنظیم در دمای ۱۲۱º C±۲ ºC برای سترون سازی با حرارت مرطوب

۶-۲ فور، قابل تنظیم در دمای ۱۶۰ ºC تا ۱۸۰ºC برای سترون سازی با حرارت خشک

۶-۳ گرمخانه، قابل تنظیم در دمای ۳۲±۲ºC-۳۵ºC

۶-۴ گرمخانه، قابل تنظیم در دمای ۲۲/۵±۲/۵ ºC-۲۵ºC

۶-۵ pH متر، با دقت ۰/۱± واحد pH در دمای ۲۰ºC

۶-۶ بطری در پیچ‌دار با حجم مناسب

۶-۷ ارلن و وسایل شیشه ای

۶-۸ قیچی

۶-۹ پنس

۷ شرایط آزمون

۷-۱ کلیات

آزمون سترونی باید در شرایط آسپتیک انجام شود که شامل کنترل شرایط محیطی، کنترل شرایط کار و شرایط کارکنان می‌باشد.

۷-۲ شرایط محیطی

به علت حساس بودن روش کار و پراکنده بودن میکروارگانیسم‌ها در همه جا آزمون باید در شرایطی انجام شود که سبب ایجاد پاسخ‌های کاذب نشود. آزمون کنترل سترونی باید در محیطی که از سایر مکان‌های آزمایشگاه جدا است طبق برنامه ریزی مشخص انجام شود. این محیط باید مختص آزمون‌های سترونی بوده و هیچ آزمون دیگری در آن انجام نشود.

هوای اتاقک کشت باید توسط قرار دادن چند پلیت حاوی محیط‌های کشت مناسب برای رشد باکتری‌ها و قارچ‌ها به صورت درباز در نقاط مختلف آن به مدت زمان ۱۵min پایش شود. پس از گرمخانه‌گذاری پلیت‌ها در

دمای ۳۰ºC-۳۵ºC به مدت ۳ روز برای باکتری‌ها و ۲۰ºC-۲۵ºC به مدت ۵ روز برای قارچ‌ها، رشد بیش از یک کلنی در هر پلیت، نشان دهنده عدم انطباق شرایط محیطی می باشد.

۷-۳ شرایط کار

به منظور فراهم کردن شرایط مناسب برای آزمون سترونی باید از اتاقک کشت سترون مجهز به جریان هوای لایه‌ای[1] با طبقه تمیزی ISIRI طبقه ۲ یا معادل آن استفاده شود.

برای کنترل شرایط کار باید هم‌زمان با هر آزمون، یک ظرف از هر محیط کشت را به عنوان کنترل به صورت درباز در اتاقک کشتی که آزمون انجام می‌شود قرار داده و سپس طبق شرایط آزمون سترونی از نظر دما و زمان، گرمخانه‌گذاری کرده و سپس بررسی کنید. هیچگونه رشدی نباید در محیط‌ها مشاهده شود. مشاهده کدورت ناشی از رشد در ظروف کنترل، نشان دهنده عدم انطباق شرایط کار بوده و آزمون باید تکرار شود.

یادآوری- به منظور تأمین شرایط مناسب، اتاقک باید در محیطی قرار گیرد که شرایط لازم برای طبقه تمیزی ISIRI طبقه ۲ مربوطه را فراهم کند.

۷-۴ شرایط کارکنان

به دلیل اینکه آزمون سترونی از حساسیت زیادی برخوردار است کوچکترین تماسی با اجسام آلوده می‌تواند در نتیجه بدست آمده اختلال ایجاد کند. کارکنان باید از ماسک و دستکش سترون استفاده نمایند و موها نیز با پوشش مناسب پوشانده شود.

۸ نمونه برداری

نمونه دریافت شده توسط آزمایشگاه باید نمایانگر واقعی فرآورده باشد و هنگام حمل و نقل و نگهداری آسیب ندیده باشد. نمونه برداری باید با مستندات مناسب و خاصی انجام شود(طبق پیوست ب).

۹ حجم آزمونه

حجم نمونه باید متناسب با حجم محیط کشت مورد استفاده باشد. مقدار آن باید کمتر از ٪۱۰ حجم محیط کشت باشد. برای تهیه آزمونه از نمونه های مختلف به ترتیب زیر عمل کنید :

1-Laminar air flow cabinet

۹-۱ وسایل سترون سلولزی

ازسه نقطه مختلف هر بسته در شرایط آسپتیک قطعاتی به اندازه $۱۰cm^2$ برای هر ظرف محیط کشت جدا کنید از نمونه‌هایی که به صورت تکی بسته بندی شده‌اند در صورت کوچک بودن نمونه (۲۵mm× ۷۵mm)، تمام قطعه را بردارید.

۹-۲ نخ های جراحی

برای هر ظرف محیط کشت از پنج نخ استفاده کنید. در صورتیکه نخ ها به صورت چند تایی بسته بندی شده باشند، باید هر نخ از بسته جداگانه انتخاب شود.

۹-۳ وسایل تزریقی سترون و سایر وسایل

شامل وسایلی است که از یک یا چند قطعه تشکیل شده اند. برای محصولاتی با اندازه و شکل مناسب که غوطه‌ور شدن آن ها در حداقل ۱۰۰ml محیط کشت امکان پذیر است، تمام نمونه و در غیر اینصورت قطعاتی از نمونه را که سترون شدن آن ها مشکل‌تر از بقیه قسمت ها می باشد را انتخاب کنید. در صورت امکان بهتر است قطعـاتی از داخلی ترین قسمت های نمونه را در شرایط عاری از میکروب جدا کنید.

۱۰ روش آزمون

۱۰-۱ مناسب بودن[1] آزمون سترونی

به منظور اعتباربخشی به نتایج آزمون سترونی، آزمون‌ها باید طبق بندهای ۱۰-۱-۱ تا ۱۰-۱-۳ انجام شود. در صورت مغایرت، نتایج آزمون سترونی نامعتبر محسوب می‌شود.

۱۰-۱-۱ آزمون تایید سترونی محیط‌های کشت

همزمان با هر آزمون سترونی، باید آزمون تایید سترونی محیط‌های کشت نیز انجام شود. برای این منظور، یک ظرف از هر محیط کشت را پس از سترون کردن، طبق شرایط آزمون سترونی از نظر دما و زمان گرمخانه‌گذاری کنید. پس از پایان مدت گرمخانه‌گذاری، هیچگونه رشدی نباید مشاهده شود.

۱۰-۱-۲ آزمون رشد دهندگی یا قابلیت رشد محیط‌های کشت

آزمون رشد دهندگی یا قابلیت رشد باید در مورد هر بهر از محیط‌های کشت مورد استفاده، طبق جدول شماره ۱ انجام شود. برای این منظور ظروف حاوی محیط‌های کشت را با سوسپانسیونی حاوی حداکثر $۱۰۰cfu^{۲}$ میکروارگانیسم تلقیح کرده و در شرایط مناسب گرمخانه‌گذاری کنید.

1- Suitability
2- Colony Forming Unit(CFU)

۱۰-۱-۲-۱ بررسی نتایج

در صورتیکه رشد میکروبی در تمام ظروف تلقیح مشاهده شود، محیط مورد استفاده برای آزمون سترونی کارایی لازم را دارد. این آزمون باید قبل از آزمون سترونی انجام شود تا کارایی محیط کشت مورد استفاده، تایید شود.

یادآوری۱- اگر آزمون رشددهندگی یا قابلیت رشد همزمان با آزمون سترونی انجام شود، ولی پس از پایان مدت گرمخانه‌گذاری رشد میکروبی مشاهده نشود، نتایج آزمون سترونی فاقد اعتبار خواهد بود.

یادآوری ۲– برای آماده سازی سویه‌های مورد استفاده جهت آزمون رشددهندگی یا قابلیت رشد از استاندارد ملی ایران شماره ۱۰۵۰۵ استفاده کنید.

یادآوری ۳- نسبت حجم سوسپانسیون تلقیح به محیط کشت نباید بیش از ٪۱- ٪۰/۵ باشد.

جدول ۱- سویه های میکروارگانیسم های مناسب برای استفاده درآزمون رشد دهندگی یا قابلیت رشد محیط کشت و صحه گذاری

میکروارگانیسم		محیط کشت	گرمخانه گذاری		
			دما	شرایط	مدت
باکتری های هوازی	*استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC[1]6538, CIP[2]4.83, NCTC[3] 10788, NCIMB[4] 9518, NBRC[5] 13276	فلوئید تیوگلیکولات تیوگلیکولات مایع	۳۰ºC-۳۵ºC	هوازی	حداکثر ۳ روز
	باسیلوس سوبتیلیس ATCC 6633, CIP 52.62, NCIMB8054, NBRC 3134				
	سودوموناس آئروژینوزا ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118, NBRC 13275				
باکتری بی هوازی	*کلستردیوم اسپوروژنز* ATCC 19404, CIP 79.3, NCTC 532 or ATCC 11437, NBRC 14293	فلوئید تیوگلیکولات	۳۰ºC-۳۵ºC	بی هوازی	حداکثر ۳ روز
قارچ ها	*کاندیدا آلبیکنس* ATCC 10231, IP[6] 48.72, NCPF 3179, NBRC 1594	سوی بین کازئین دایجست مایع	۲۰ºC-۲۵ºC	هوازی	حداکثر ۵ روز
	آسپرژیلوس نایجر ATCC 16404, IP 143.83, IMI 149007, NBRC 9455				

۱۰-۱-۳ آزمون باکتری ایستایی و قارچ ایستایی نمونه

فعالیت باکتری ایستائی و یا قارچ ایستائی نمونه مورد آزمون، به‌وسیله این آزمون قابل بررسی است.

این آزمون باید قبل از انجام آزمون سترونی یا همزمان با آن به منظور بررسی مناسب بودن روش آزمون برای نمونه مورد نظر انجام شود. اگر آزمون مناسب بودن همزمان با آزمون سترونی انجام شود، ولی پس از پایان مدت گرمخانه‌گذاری رشد میکروبی مشاهده نشود، نتایج آزمون سترونی فاقد اعتبار خواهد بود.

1- ATCC : American Type Culture Collection
2- CIP : Collection de l'Institut Pasteur
3- NCTC : National Collection of Type Cultures
4- NCIMB : National Collection of Industrial Marine Bacteria
5- NBRC : NITE Biological Resource Center, JP
6- IP: Institut Pasteur

برای انجام آزمون، از میکروارگانیسم‌ها و شرایط گرمخانه‌گذاری ذکرشده در جدول شماره ۱ استفاده کنید. پس از اضافه کردن آزمونه به محیط کشت، سوسپانسیونی حاوی حداکثر ۱۰۰ میکروارگانیسم (طبق جدول شماره ۱ و پیوست الف) را در ظرف تلقیح کرده و در شرایط مناسب (طبق جدول شماره ۱) برای باکتری‌ها حداکثر سه روز و برای قارچ‌ها حداکثر پنج روز گرمخانه‌گذاری کنید.

پس از پایان مدت گرمخانه‌گذاری باید رشد میکروارگانیسم‌ها در ظروف حاوی نمونه و سوسپانسیون میکروبی مشاهده شود، در صورت عدم رشد، نمونه دارای فعالیت ضدمیکروبی است و نتایج آزمون سترونی فاقد اعتبار است. اگر شرایط آزمون و نمونه‌ها تغییر نکرده باشد، انجام آزمون مناسب بودن روش در هر بار آزمون سترونی ضرورت ندارد.

اثر ضدمیکروبی نمونه را می‌توان با افزودن یک ماده خنثی کننده مناسب سترون یا با افزایش حجم محیط کشت و یا کم کردن مقدار نمونه، خنثی کرد. در این صورت آزمون سترونی نیز باید با شرایط ایجاد شده انجام شود.

یادآوری- از آزمون رشد دهندگی یا قابلیت رشد محیط کشت طبق بند ۱۰-۱-۲ به عنوان کنترل مثبت استفاده کنید.

۱۰-۲ روش مستقیم

برای هر نمونه یک ظرف محیط کشت حاوی ۱۰۰ml-۵۰۰ml فلوئید تیوگلیکولات (طبق بند ۵-۲-۱) و یک ظرف محیط کشت حاوی ۱۰۰ml-۵۰۰mlسوی بین کازئین دایجست مایع (طبق بند ۵-۲-۴) اختصاص دهید.

قسمت‌هایی از هر آزمایه را در شرایط آسپتیک به وسیله قیچی و یا سایر وسایل سترون، بریده و داخل ظروف محیط کشت غوطه‌ور کنید. اگر اندازه نمونه به‌قدری کوچک باشد که با توجه به حجم محیط کشت غوطه‌ورکردن همه آزمونه در ظروف محیط کشت امکان‌پذیر باشد، آن را در محیط کشت بیندازید.

محیط کشت فلوئید تیوگلیکولات را در دمای ۳۵ºC -۳۰ºC و محیط کشت سوی بین کازئین دایجست مایع را در دمای ۲۵ºC -۲۰ºC به مدت زمان ۱۴ روز گرمخانه‌گذاری کنید.

۱۱ بررسی نتایج

در طول مدت زمان گرمخانه گذاری و پس از آن محیط کشت حاوی نمونه را از نظر رشد میکروبی قابل مشاهده بررسی کنید.

اگر پس از پایان زمان گرمخانه‌گذاری کدورت مشاهده نشود نمونه مطابق با آزمون سترونی است.

اگر پس از پایان زمان گرمخانه‌گذاری کدورت مشاهده شود نمونه مغایر با آزمون سترونی است.

اگر پس از پایان زمان گرمخانه‌گذاری میزان کدورت مشاهده شده در محیط کشت به گونه ای باشد که وجود یا عدم وجود رشد میکروبی با بررسی ظاهری امکان پذیر نباشد برای تایید آن از روش زیر استفاده کنید:

حداقل۱ml از محیط کشت دارای کدورت را به ظرف جدید از همان محیط کشت منتقل کنید و حداقل به مدت ۴ روز طبق شرایط آزمون سترونی گرمخانه‌گذاری کنید.

در صورتیکه رشد میکروبی مشاهده نشود نمونه مطابق با آزمون سترونی می باشد.

در صورتیکه رشد میکروبی مشاهده شود نمونه مغایر با آزمون سترونی می باشد مگر اینکه به وضوح نشان داده شود که موارد غیر مرتبط به نمونه آزمون شده نامعتبر بوده است

آزمون نامعتبر در نظر گرفته می شود اگر یک مورد یا بیشتر موارد زیر را شامل شود:

الف- مشاهده عدم انطباق در مناسب بودن آزمون سترونی (طبق بند ۱۰-۱)

ب- مشاهده عدم انطباق در آزمون‌های بررسی شرایط (طبق بند ۷)

درصورتیکه آزمون نامعتبر گزارش شود تکرار آزمون را با همان تعداد آزمونه انجام دهید. اگر رشد میکروبی تایید نشد نمونه مطابق با آزمون سترونی است. اگر رشد میکروبی تایید شود، نمونه مغایر با آزمون سترونی است.

۱۲ تفسیر نتایج

نتایج بدست آمده باید به صورت زیر تفسیر می شود:

الف- عدم رشد در محیط کشت فلوئید تیوگلیکولات

باکتری‌های هوازی	منفی
باکتری‌های بی هوازی	منفی

ب- عدم رشد در محیط کشت سوی بین کازئین دایجست مایع

قارچ‌ها	منفی

پیوست الف

(الزامی)

روش تهیه سوسپانسیون میکروبی محیط کشت برای آزمون رشد دهندگی یا قابلیت رشد محیط کشت

الف-۱ محیط‌های کشت و محلول ها

الف-۱-۱ کلیات

مواد و محیط‌های کشت مورد استفاده باید دارای درجهٔ خلوص آزمایشگاهی و/یا از نظر میکروبی مناسب بوده و باید عاری از مواد سمی و یا مواد ممانعت کننده رشد ارگانیسم‌های آزمون باشند.

در صورت استفاده از محیط‌های کشت آماده تجاری، باید طبق دستورالعمل سازنده تهیه شود.

الف-۱-۲ محیط کشت سوی بین کازئین دایجست[1]مایع (تریپتیک سوی براث[2] TSB)

الف-۱-۲-۱ مواد تشکیل دهنده:

نام مواد	مقدار
پپتون از کازئین[3]	۱۷٫۰ g
پپتون از سویا[4]	۳٫۰ g
سدیم کلراید	۵٫۰ g
دی پتاسیم هیدروژن فسفات[5]	۲/۵ g
گلوکز با یک مولکول آب/یا	۲٫۵ g
گلوکز بدون آب	۲٫۳ g
آب مقطر	۱۰۰۰ ml

روش تهیه:

مواد فوق را در آب مقطر حل کرده و به آرامی حرارت دهید تا به صورت محلول یکنواختی درآید. در صورت لزوم برای شفاف سازی محیط کشت آن را توسط کاغذ صافی مناسب صاف کنید. محیط کشت را در ظروف مناسب تقسیم کرده و در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ °C به مدت زمان ۱۵min سترون کنید.

1- Soybean-casein digest medium
2- Tryptic soy broth
3- Pepton from casein
4- Peptone from soymeal
5- Dibasic potassium phosphate

pH محیط کشت را به گونه‌ای تنظیم کنید که پس از سترون سازی ۰/۲±۷/۳ باشد

الف-۱-۳ تریپتون سوی آگار[1] (TSA)

الف-۱-۳-۱ مواد تشکیل دهنده:

نام مواد	مقدار
پپتون از کازیئن	۱۵/۰ g
پپتون ازسویا	۵/۰ g
سدیم کلراید	۵/۰ g
آگار	۱۵/۰g
آب مقطر	۱۰۰۰ml

روش تهیه:

مواد بالا را با استفاده از حرارت همراه با هم زدن، در آب مقطر حل کرده و در اتوکلاو سترون کنید. pH محیط کشت را به گونه‌ای تنظیم کنید که پس از سترون سازی برابر ۰/۱ ± ۷/۳ در دمای۲۰°C±۱°C باشد.

الف-۲ تهیه سوسپانسیون میکروبی

الف-۲-۱ کشت های کاری میکروارگانیسم آزمون

به منظور تهیه کشت کاری میکروارگانیسم های آزمون یک کشت خطی از کشت ذخیره آن با استفاده از لوله های حاوی محیط کشت تریپتون سویا آگار به شکل شیبدار یا پلیت‌های حاوی این محیط کشت تهیه و گرمخانه‌گذاری کنید. پس از ۱۸h تا ۲۴h گرمخانه‌گذاری،کشت دومی از این محیط کشت را به همین روش تهیه کرده و به مدت زمان ۱۸h تا ۲۴h گرمخانه‌گذاری کنید. از این کشت دوم، به همین روش می توان کشت سوم را تهیه کرد. از کشت های دوم و سوم به عنوان کشت کاری استفاده کنید.

اگر تهیه کشت کاری دوم، در زمان مورد نظر (۱۸h تا ۲۴h) امکان پذیر نمی‌باشد، می‌توان برای تهیه کشت‌های کاری بعدی، از کشت ۴۸ ساعته هم استفاده کرد مشروط بر اینکه کشت ذکر شده در طول این مدت (۴۸h) در گرمخانه قرار گرفته باشد.

هیچ گاه کشت کاری چهارم را تهیه و استفاده نکنید.

1- Triptic soy agar

الف-۲-۲ سوسپانسیون آزمون

الف-۲-۲-۱ با استفاده از یک حلقه کشت سترون، باکتریهای کشت بند ۲-۱ را به داخل مقادیر کمی از تریپتون سوی براث منتقل کنید. اطمینان حاصل کنید که باکتریهای آزمون به طور یکنواخت منتشر شده‌اند.

الف-۲-۲-۲ تعداد سلولهای زنده سوسپانسیون باکتریایی را در $۱۰^{۸}$ تا $۱۰^{۸} \times ۵$ واحد تشکیل دهنده کلنی[1] (CFU) در هر میلی‌لیتر رقیق کننده تنظیم کنید. تعداد واحد تشکیل دهنده کلنی را با یک روش مناسب تخمین بزنید. این سوسپانسیون را در مدت دو ساعت استفاده کنید.

یادآوری- برای تنظیم سلول های میکروارگانیسم ها ، استفاده از اسپکتروفتومتر (با طول موج ۶۲۰ nm) توصیه می شود. روش کلرومتری روش جایگزین مناسبی می باشد.

الف-۲-۲-۳ به منظور شمارش سوسپانسیون باکتری مورد آزمون، یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون بند ۲-۲-۲ را به صورت دوتایی بردارید و هر میلی‌لیتر را در پلیت‌های جداگانه ریخته و ۱۲ تا ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت تریپتون سویا آگار را که ذوب شده و تا دمای ۴۵°C خنک شده است به آن اضافه کنید. پلیت ها را به مدت ۱۸ h تا ۲۴ h در دمای ۳۲°C±۲°C گرمخانه‌گذاری کنید.

1- Colony forming unit

پیوست ب

(الزامی)

نمونه برداری وسایل پزشکی سترون

حداقل تعداد محصول مورد نظر برای آزمون با توجه به تعداد محصولات در هر بهر سترون

تعداد محصولات در هر بهر سترون بر حسب بسته بندی	حداقل تعداد آزمایه برای هرمحیط کشت (مگر در مواردی غیر از این مجوز یا توجیه داشته باشد)	حداقل تعداد آزمونه برای هرمحیط کشت (مگر در مواردی غیر از این مجوز یا توجیه داشته باشد)
کمتر از ۱۰۰ محصول	٪۲ یا ۴ جعبه	کل وسیله پزشکی
بیشتر از ۱۰۰ و کمتر از ۵۰۰ محصول	۱۰ جعبه	
بیشتر از ۵۰۰ محصول	٪۱۰یا ۴ جعبه	
لباس جراحی، باند و گاز	٪۲ یا ۵ بسته (حداکثر ۲۰ بسته)	به ازای هر بسته ۱۰۰mg
نخ بخیه یکبار مصرف که به طور مجزا بسته بندی شده اند		کل وسیله پزشکی
نخ بخیه کت گوت و سایر نخ های بخیه جراحی مخصوص دامپزشکی		

کتابنامه

۱- 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

۲- استاندارد ملی ایران شماره ۲-۳۰۰۱، سترونی وسایل پزشکی-آزمون سترونی-قسمت۲: روش صافی غشایی