Microbial limit tests

آزمون های محدودیت میکروبی

شمارش کلی میکروارگانیسم های هوازی زنده

این آزمایش برای مشخص کردن باکتری ها و قارچ های مزوفیل هوازی به کارمی رود.

روش ها:
صاف کردن از غشاء، شمارش در پلیت یا لوله متعدد

- جهت جلوگیری از آلودگی اتفاقی ماده مورد آزمایش، آماده سازی نمونه و انجام آزمایش باید در شرایط عاری از میکروب صورت گیرد این احتیاط ها نباید تأثیری روی میکروارگانیسم های نمونه داشته باشد.

آزمایش مقدماتی (قبل از انجام آزمایش)

- نتایج این آزمایش ها وقتی دارای ارزش می باشد که دقیقاً نشان داده شود نمونه های مورد آزمایش خود مانع از تکثیر میکروارگانیسم هایی که ممکن است در فرآورده وجود داشته باشند، نمی گردد.

استافیلوکوکوس اورئوس	مانند	ATCC 6538P (NCIB 8625 , CIP 53.156)
	یا	ATCC 6538 (NCIB 9518 , CIP 4.83)
باسیلوس سوبتیلیس	مانند	ATCC 6633 (NCIB 8054 , CIP 52.62)
اشریشیاکلی	مانند	ATCC 8739 (NCIB 8545 , CIP 53.126)
کاندیدا آلبیکنس	مانند	ATCC 2091 (CIP 1180.79)
	یا	ATCC 10231 (NCPF 3179 , CIP 48.72)
آسپرژیلوس نیجر	مانند	ATCC 16404 (IMI149007, IP 1431.83)

- سوش های آزمایشی فوق ر ا جداگانه در لوله های حاوی محیط مایع سوی بین کازئین دایجست در 30 تا 35درجه سانتی گراد به مدت 18 تا 24 ساعت و برای قارچ ها، سوش های مورد نظر را به طور جداگانه بر روی محیط آگار مناسب مانند سابورو و دکستروز آگار فاقد آنتی بیوتیک در دمای 20 تا 25 درجه سانتی گراد کشت دهید. مدت گرمخان هگذاری برای کاندیدا آلبیکنس 48 ساعت و برای آسپرژیلوس نیجر 7 روز می باشد.

- آنگاه از هر کشت رقتی تهیه می گردد، به طوری که پس از افزودن 1 میلی لیتر از سوسپانسیون میکروبی به اولین رقت از ماده مورد آزمایش ،حدود 100 واحد تشکیل دهنده کلنی در هر میلی لیتر آن وجود داشته باشد .

- پس از طی دوره گرمخانه گذاری شمارش هر یک از ارگانیسم های آزمایشی نباید کمتر از 20 % تعداد میکروارگانیسم های اضافه شده باشد. در غیر این صورت تغییراتی در روش به ترتیب ذیل لازم است:

1. افزایش حجم رقیق کننده با ثابت نگهداشتن مقدار ماده مورد آزمایش.
2. افزودن مقدار کافی از یک عامل (یا عوامل) غیر فعال کننده مناسب به رقیق کننده. به عنوان مثال از سوی لستین و یا پلی سوربات 20- درصورتی که هر کدام از تغییرات فوق الذکر جداگانه اثربخش نباشند ، ترکیب مناسبی از این دو روش به کارگرفته می شود.
3. صاف کردن از صافی غشایی
4. چنانچه هنوز هم رشد و بازیا فت میکروارگانیسم های زنده امکان پذیر نباشد و ماهیت نمونه آزمایشی به گونه ای باشد که نتوان از روش های صاف کردن با صافی های غشایی نیز استفاده نمود ، می توان فرض کرد که عدم امکان جدانمودن ارگانیسم تلقیح شده ، مربوط به کشندگی(باکتری و قارچ) فرآورده می باشد و احتمال آلودگی فرآورده به گونه ارگانیسم مورد آزمایش وجود ندارد.

معتبرسازی سترونی محیط کشت و رقیق کننده مصرفی

روش شمارش تعداد میکروب های هوازی زنده با استفاده از حلال یا رقیق کننده مورد مصرف به عنوان نمونه آزمایشی انجام می گردد و نباید رشد میکروبی مشاهده شود.

انجام آزمایش- نمونه برداری

- به جز در مواردی که در تک نگار نمونه آزمون ذکرشده، در سایر موارد 10 گرم یا 10 میلی لیتر از ماده آزمایشی با احتیاط های ذکرشده برداشته می شود. برای تهیه مقدار نمونه لازم، چندین قسمت از ماده بالک یا محتویات تعداد کافی از ظروف فرآورده که به صورت تصادفی انتخاب شده اند با هم مخلوط می شوند.

آماد ه سازی نمونه

- نمونه آزمایشی را با توجه به ماهیت آن با کمک یک مایع مناسب مانند **بافرفسفات، محلول بافره شده کلرید سدیم پپتون** یا **محیط مایع سوی بین کازئین دایجست** یا در صورت لزوم با محیط ***پپتون سوی بین کازئین دایجست پلی سوربات 20*** رقیق، حل، سوسپانسیون یا امولسیون کنید، به نحوی که تعداد و نوع میکروارگانیسم هایی که از ابتد ا در آن حضور داشته اند تغییر ننماید.
- هرگونه اثر ضد میکروبی فرآورده مورد آزمایش باید با رقیق سازی، خنثی سازی یا صاف کردن حذف شود .
- نمونه آماده شده باید هر چه سریعتر و حداکثر طی یک ساعت مورد آزمایش قرارگیرد.

- **در مورد نمونه های مایع یا جامد حل شدنی**

شامل محلول های حقیقی، سوسپانسیو ن های آبی یا حامل های هیدروالکلی که حاوی کمتر از 30 % الکل باشند و در مورد جامداتی که به سهولت در 90 میلی لیتر از مایعات مشخص شده حل گردند، نمونه با همین مایعات رقیق و آماده می شود.

- **در مورد مواد جامدی که به طور کامل قابل انحلال نمی باشند**

ماده را به صورت پودر نسبتاً نرمی درآورده و در حامل مشخص شده پراکنده نمایید.

در صورت لزوم سوسپانسیون حاصل را به روش مکانیکی همگن نمایید.

- **در مورد نمونه های جامد نامحلول در آب**

با کمک مایعات مشخص شده سوسپانسیون تهیه کرده و در صورت لزوم سوسپانسیون حاصل را به روش مکانیکی همگن کنید.

خصوصیات بعضی نمونه ها استفاده از حجم های بیشتر را ضروری می سازد. برای کمک به تهیه سوسپانسیون موادی که به سختی تَر می شوند از یک عامل فعال در سطح مانند پلی سوربات 80 سترون، به میزان یک گرم در لیتر می توان استفاده نمود.

در مورد مایعات غیر قابل اختلاط با آب، پمادها، کرم ها و موم ها

با کمترین مقدار از یک عامل امولسیون کننده مناسب سترون (مانند یکی از پلی سوربات ها) به کمک مخلو ط کن مکانیکی و در صورت لزوم گرم کردن تا حداکثر 45 درجه سانتی گراد یک امولسیون همگن تهیه نمایید. مدت گرم کردن باید کوتاه بوده از 30 دقیقه تجاوز ننماید.

- **<u>برای نمونه های مایعی که به شکل آئروسل می باشند:</u>**

- ظرف آنرا در مخلوط الکل یخ خشک به مدت تقریباً یک ساعت سر د نمایید . سپس ظرف را بریده، بگذارید تا به حرارت اتاق برسد مواد فرار آن خارج شوند در صورت لزوم از گرما استفاده کنید. آنگاه مقدار ماده آزمایشی مورد نیاز را برداشت نمایید.
- در مواقعی که 10 میلی لیتر یا 10 گرم از نمونه (هر کدام که میسر است) از 10 ظرف آ ئروسل به دست نیاید، تمام محتوی 10 ظرف سرد شده آئروسل را به محیط کشت منتقل نموده و بگذارید تا مواد فرار آن خارج گردند و آزمایش را روی باقیمانده انجام دهید.
- چنانچه نتایج آزمایش قاطع نبوده یا مشکوک باشد، آزمایش را با 20 ظرف دیگر آئروسل تکرار نمایید.

آزمایش نمونه آماده شده

1. روش صاف کردن از غشاء - Membrane filtration method

از این روش بخصوص در مورد پمادها، کر م ها و مواد روغنی استفاده می شود. در این روش از صافی های باکتریولوژیکی که اندازه اسمی منافذ آن 0/45 میکرومتر باشد استفاده می گردد. قطر صافی هایی که برای این منظور به کار می روند 47 تا 50 میلی متر است .

برای محلول های آبی، روغنی و الکلی ضعیف، صافی هایی از جنس نیترات سلولز و جنس استات سلولز برای محلولهای الکلی قوی مناسب است.

این صافی ها قابل سترون شدن با بخار (اتوکلاو)، اشعه و اتیلن اکسید می باشند. قبل از آزمایش می باید دستگاه نگه دارنده صافی و صافی را با روش مناسب سترون نموده و در شرایط عاری از میکروب مورد استفاده قرارداد . برای عمل صا ف کردن از خلأ یا فشار استفاده می شود.

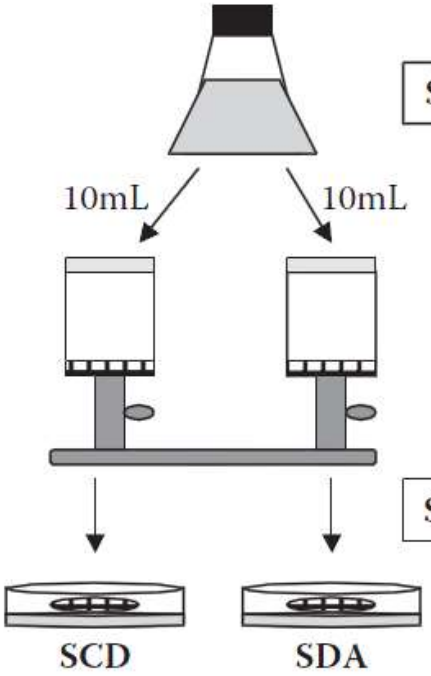
سرعت عبور مایع از صافی باید در حدود 75 – 50 میلی لیتر آب در دقیقه در فشار 70 سانتی متر جیوه باشد.

- در عمل 10 میلی لیتر یا حجمی از هر رقت که معادل 1 گرم نمونه آزمایشی باشد را بر روی هر دو صافی غشایی منتقل کرده و بلافاصله صاف کنید. در صورت نیاز نمونه باید طوری رقیق شود که تعداد کلنی های ایجادشده در سطح صافی پس از گرمخانه گذاری 100 - 10 عدد باشد .
- بلافاصله پس از عبور نمونه از صافی، آن را سه بار یا بیشتر هر بار با مقادیر 100 میلی لیتری از یک مایع شستشوی مناسب مانند محلول بافر شده *کلرید سدیم پپتون یا بافر فسفات* شستشو دهید.
- در مورد مواد چرب، مایع شستشو باید حاوی یک عامل فعال در سطح مناسب مانند پلی سوربات 20 یا 80 به میزان یک گرم در لیتر باشد .
- یکی از صافی ها را به منظور تعیین تعداد باکتری ها به سطوح پلیت حاوی سوی بین کازئین دایجست آگار و صافی دوم را برای شمارش تعداد قارچ به سطح پلیت حاوی محیط سابورودکستروز آگار منتقل کنید. پلیت مربوط به شمارش باکتری را به مدت 5 روز در گرمخانه 35- 30 درجه سانتی گراد و پلیت دیگر را به مدت 7-5 روز در گرمخانه 25 - 20 درجه سانتی گراد بگذارید، مگر اینکه شمارش قابل قبولی در مدت زمان کوتاه تر حاصل شود .
- تعداد کلنی های تشکیل شده را شمارش کرده و تعداد باکتری ها و قارچ ها را در هر گرم یا میلی لیتر ماده مورد آزمایش تعیین نمایید.

Interpretation of results
(Membrane filtration)

- If no colonies are present, report results as 0 CFU per gram or milliliter of product.
- Alternatively, if the equivalent of 10 g or 10 mL of sample was processed, report results as 0 CFU per 10 g or 10 mL of product.

Step 1: 10g or 10mL of product + 90mL of diluent (1:10 dilution). Dissolve sample.



Step 2: Filter equivalent of 1g or 1mL of product.

Step 3: Rinse w/ 3 × 100mL diluent.

Step 4: Remove filter; place onto solidified agar plate

Step 5: Incubate plates

Invert and incubate SCD at 30–35°C for 3–5 days

Invert and incubate SDA at 20–25°C for 5–7 days

Step 6: Remove plates from incubation; count colonies

TAMC and TYMC via membrane filtration method.

1. روش شمارش در پلیت

- برای نمونه های محلول یا نمونه های نیمه شفافی
- در این روش پلیت هایی با قطر 10 از 9 سانتی متر مورد استفاده قرارمی گیرد.

- روش ها:

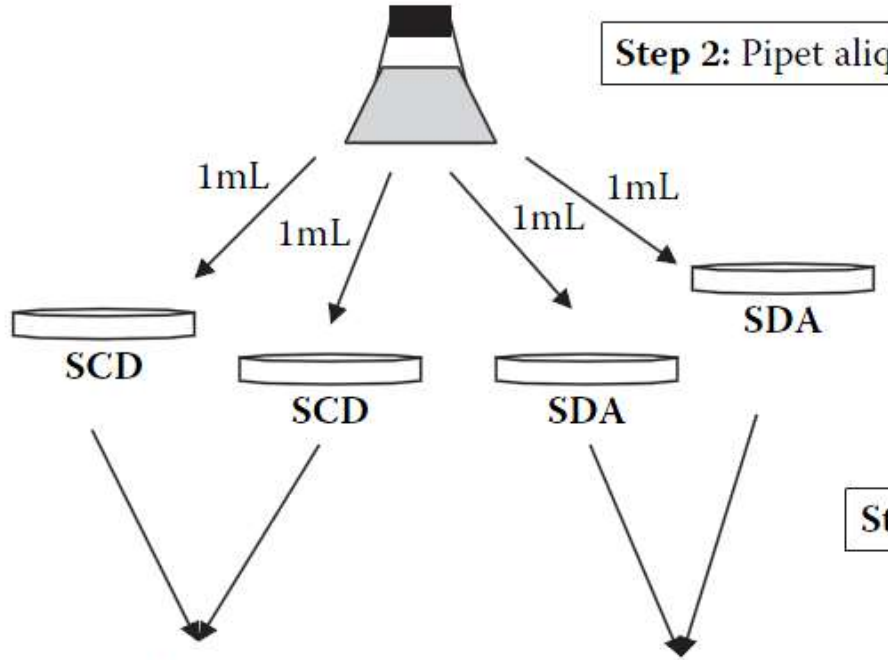
Pour plate methodریختن در پلیت

Spread plate method کشت سطحی

- در مورد باکتری ها در صورت لزوم مایع آزمایشی را بیشتر رقیق نموده طوری که 1 میلی لیتر آن در محیط 300 کلنی ایجاد نماید .
- 1 میلی لیتر از رقت نهایی را به هر کدام از دو پلیت سترون منتقل کنید و بلافاصله به هرکدام 20- 15 میلی لیتر محیط سوی بین کازئین دایجست آگار ذوب شده و خنک شده تا حدود 45 درجه سانتی گراد اضافه نمایید. در پلیت ها را گذاشته و با حرکت دورانی ظروف، نمونه را با محیط آگار مخلوط کنید و بگذارید که محتویات آن در دمای اتاق ببندد . پلیت ها را برگردانده و به مدت 5 روز در گرمخانه 30 - 35 درجه سانتی گراد قراردهید مگر اینکه در مدت کوتاه تر نتیجه قابل قبولی حاصل شود .
- تعداد کلنی ها را شمارش کرده و میانگین شمارش دو پلیت را در عکس فاکتور رقت ضرب نموده تا تعداد باکتری ها در هر گرم یا میلی لیتر نمونه به دست آید.

- برای شمارش قارچ ها رقت نمونه آماده شده باید در حدی باشد که 1 میلی لیتر آن در محیط 100 کلنی یا کمتر ایجاد نماید . 1 میلی لیتر از رقت نهایی را به هر کدام از دو پلیت سترون منتقل کنید و فور اً به هر کدام 15-20 میلی لیتر محیط سابور و دکستروز آگار (حاوی آنتی بیوتیک) که قبلا ذوب شد ه و تا حدود 45 درجه سانتی گراد خنک گردیده است اضافه نمایید . در ظروف را گذاشته و با حرکت دورانی، نمونه را مخلوط کنید و بگذارید محتویات آن در دمای اتاق ببندد . پلیت ها را برگردانده و به مدت 5-7 روز در گرمخانه 20 -25 درجه سانتی گراد بگذارید مگر در موارد ی که نتیجه قابل قبولی طی مدت کوتا ه تر حاصل شود .
- آنگاه با روش ذکرشده در قبل تعداد قارچ ها را در هر گرم یا میلی لیتر نمونه محاسبه نمایید.

Step 1: 10g or 10mL of product + 90mL of diluent (1:10 dilution). Mix well.



Step 5: Remove plates from incubation; count colonies

TAMC and TYMC tests via pour-plate method.

Incubation and Results Calculation (pour plate)

- When a 1:10 sample dilution is prepared and either a 1-mL sample is tested by the pour-plate method, or a 0.1-mL sample is tested by the spread-plate method, the following statements apply:

- If counts are recovered, average the number of CFU from the duplicate plates and multiply by the dilution factor. Results are reported separately for the TAMC and TYMC tests.
- If no colonies are present, report results as < 10 CFU per gram or milliliter of product for the pour-plate method.
- If no colonies are present, report results as < 100 CFU per gram or milliliter of product for the spread-plate method.

- **Example 1: For a 1:10 sample dilution where 1-mL aliquots are plated, the dilution**

- If 3 CFU are recovered on one SCD agar plate, and 5 CFU are recovered
- on the duplicate SCD agar plate

- The preceding example uses the USP-recommended initial product dilution (1:10)

- when using the pour-plate method. Many products that do not have inhibitory properties or that are relatively soluble or miscible in buffer solutions can be tested at this proposed sample dilution. However, some products, either because they are inhibitory or due to their physical properties, must be tested using higher volumes of diluent. In such cases, alternate sample dilution schemes need to be attempted and qualified as described in Chapter 7. The following are some examples of sample preparations using alternate dilution schemes and the corresponding reporting of test results.

- **Example 2:**

  A 10-mL sample aliquot is diluted using 190 mL of buffer to make a 1:20

- no colonies are recovered

- Dilution factor calculation:
- 10 mL of sample into 190 mL diluent (1:20 dilution) × 1 mL (aliquot plated). × DF (dilution factor) = 1 (result per milliliter). Therefore, DF = 20.

- the test result is reported as < 20 CFU per milliliter of product.

- **2a. Duplicate 1-mL aliquots are plated with SCD agar for the TAMC test. After**
- incubation, no colonies are recovered. Because 1-mL aliquots are plated, and results
- are averaged for the duplicate plates, the dilution factor is 20 [10 mL sample ÷ 200
- mL total volume (1:20 dilution) × 1-mL aliquot × 20 (dilution factor) = 1] for reporting
- results per 1 mL basis. Therefore, for this example, the test result is reported as < 20
- CFU per milliliter of product.
- Dilution factor calculation:
- 10 mL of sample into 190 mL diluent (1:20 dilution) × 1 mL (aliquot plated).
- × DF (dilution factor) = 1 (result per milliliter). Therefore, DF = 20.
- In order to increase the test sensitivity, 2-mL aliquots of the sample preparation can
- be plated instead of 1-mL aliquots. Plating duplicate 2-mL aliquots and averaging the
- counts result in a dilution factor of 10, as explained in Example 2b.
- **2b. Duplicate 2-mL aliquots are plated with SCD agar for the TAMC test. After**
- incubation, 2 CFU are recovered on one plate, and 1 CFU is recovered on the duplicate
- SCD agar plate. The average recovery is therefore 1.5 CFU, which is rounded to
- 2 CFU. (*Note: Never report tenths of a microbial colony. Always round the number of*
- CFU recovered to the nearest whole value.)

- We are able to increase the test sensitivity and achieve a dilution factor of 10 by increasing the volume of the aliquot plated to 2 mL (1:20) sample dilution

- If 2 colonies (mean) are recovered The result reported is then 20 CFU per milliliter of product.

- If no colonies are detected, the result is reported as $<$ 10 CFU per milliliter.

- Dilution factor calculation:

10 mL of sample into 190 mL diluent (1:20 dilution) $\times$2 mL (aliquot plated).

$\times$ DF (dilution factor) = 1 (result per milliliter). Therefore, DF = 10.

Example 3:
A 10-mL sample aliquot is diluted in 390 mL of buffer to make a 1:40 sample dilution.

- **3a. Duplicate 1-mL aliquots are plated with SCD agar for the TAMC test.**

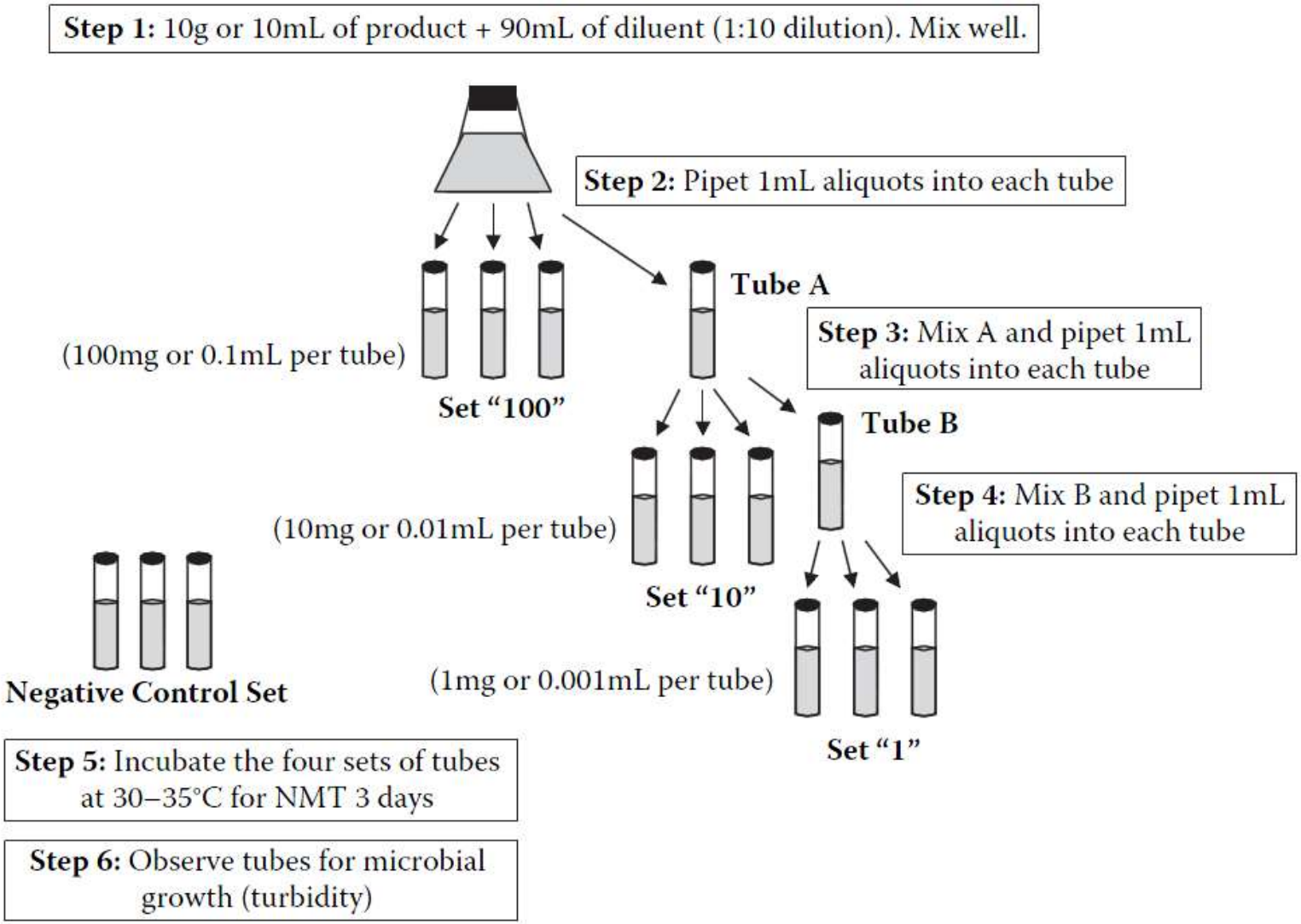
- 2 CFU are recovered on one of the SCD agar plates and 5 CFU on the duplicate SCD agar plate. Because volumes equal to 1 mL were plated, the dilution factor is 40 [10 mL sample ÷ 400 mL total volume (1:40 dilution) × 1-mL aliquot × 40 (dilution factor) = 1].

- The calculated average of 3.5 CFU is rounded to 4 CFU, which is
- then multiplied by the dilution factor 40. Therefore, the result is reported as 160 CFU per milliliter of product.

- Dilution factor calculation:
- 10 mL of sample into 390 mL diluent (1:40 dilution) × 1 mL (aliquot plated). × DF (dilution factor) = 1 (result per milliliter). Therefore, DF = 40.

1. روش لوله های متعدد یا رقتهای متوالی (Multiple tube method)

- این روش برای مواردی که تعداد میکروارگانیسم ها کم می باشد حساس تر است. کاربرد این روش به ویژه در مورد فرآورده های غیر شفاف می باشد.
- در این روش یک سری 14 تایی از لوله هایی با اندازه یکسان حاوی 9 میلی لیتر محیط مایع سوی بین کازئین دایجست سترون فراهم نمایید.



TAMC via MPN method.

- 12 لوله را در 4 سری سه تایی مرتب کنید. سه لوله را به عنوان شاهد کنار بگذارید. در هر یک از سه لوله 1 میلی لیتر محلول یا سوسپانسیون نمونه رقیق شده ریخته ((Aسری اول (سری 100) و در یک لو له چهارم که جزء سری ها ((Bبرداشته و در یک لوله باقیمانده ((Aو مخلوط نمایید . یک میلی لیتر از محتوی لوله نمی باشد ریخته و مخلوط کنید.
- این دو لوله به ترتیب ح اوی 100 میل ی گرم (یا 100 میکرولیتر) و 10 میلی گرم (یا 10 میکرولیتر) از نمونه و به هر یک Aمورد آزمایش م یباشند، به هر یک از سه لوله سری دوم (سری 10) یک میلی لیتر از محتوی لوله را دور ((Bو (Aاضافه نمایید . باقیمانده دو لوله Bاز سه لوله سری سوم (سری 1) یک میلی لیتر از محتوی لوله 30 درجه سانتی گراد - بریزید. درب لوله ها را به خوبی بسته و تمام لوله ها را به مدت حداقل 5 روز در گرمخانه 35
- قراردهید. پس از این مدت لوله ها را از نظر شواهد رشد بررسی نمایید.
- سه لوله شاهد م ی باید شفاف باقی بمانند. اگر خوا ندن نتایج به دلیل ماهیت فرآورده مورد آزمایش مشکل بوده یا قطعی نباشد، از محتوی لوله ها به محیط کشت مایع یا جام د برده می شود و نتایج پس از طی یک دوره دیگر گرمخان هگذاری خوانده م یشود.
- محتمل ترین تعداد میکروارگانیسم ها در هر گرم یا میلی لیتر نمونه با مراجعه به جدول ذیل مشخص می گردد.

شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها با احتمال نزدیک به یقین در روش لوله‌های متعدد

مجموع تعداد لوله‌هایی که در هر سری در آنها رشد مشاهده شده‌است			تعداد میکروارگانیسم‌ها در هر گرم یا هر میلی‌لیتر با احتمال نزدیک به یقین
مقدار میلی‌گرم(یا میکرولیتر)از نمونه در هر لوله			
۱۰۰	۱۰	۱	
۳	۳	۳	>۱۱۰۰
۳	۳	۲	۱۱۰۰
۳	۳	۱	۵۰۰
۳	۳	۰	۲۰۰
۳	۲	۳	۲۹۰
۳	۲	۲	۲۱۰
۳	۲	۱	۱۵۰
۳	۲	۰	۹۰
۳	۱	۳	۱۶۰
۳	۱	۲	۱۲۰
۳	۱	۱	۷۰
۳	۱	۰	۴۰
۳	۰	۳	۹۵
۳	۰	۲	۶۰
۳	۰	۱	۴۰
۳	۰	۰	۲۳

تکرار آزمایش

- در مواردی که نتایج حاصل مشکوک باشد، آزمایش با 25 گرم یا میلی لیتر از نمونه تکرار می گردد.

Miles & Misra

drop plate method

- Blood cultures
- O.02 ml drop on the surface of agar plate (blood agar)
- 10-30 colony depending on the size of colonies

Final Interpretation of the TAMC and TYMC Test Results

- A significant change to the harmonized USP microbial limit tests is in the interpretation of test results. It is well known that microbial contamination is not uniform;
- hence the greater-than-normal test variability encountered when performing microbial tests for bioburden determination. In order to accommodate for such test variability, the revised USP Chapter <61> allows variability in test results equal to a factor of 2.

- For example, if the specified microbial limit is 10 CFU, the maximum microbial count that still meets product specifications is 20 CFU.
- When the specified microbial limit is 100 CFU, the maximum acceptable count is 200, and so on. This change was introduced in an effort to harmonize with the specified EP interpretation of results for microbial contamination.

بررسی خواص تغذ ی های و ا ختصاصی محیط های کشت و معتبرسازی آزمایش برای میکروارگانیسم های مشخص شده

- سویه های مورد آزمایش را مطابق با شرایط مندرج در جدول رشد دهید و از هرکدام سوسپانسیونی تهیه نمایید که دارای حدود 1000 میکروارگانیسم زنده در هر میلی لیتر باشد.
- حدود 100 میکروارگانیسم از هر سو یه را جداگانه در حضور و غیاب فرآورده مورد آزمایش به کاربرید و رشد میکروب را پیگیری کنید .

- در این آزمایش، باید یک نتیجه مثبت برای هر سویه از میکروارگانیسم به دست آید.

شرایط رشد میکروارگانیسم‌های مورد استفاده برای معتبرسازی آزمایش شناسایی و تشخیص میکروارگانیسم‌های مشخص‌شده

میکروارگانیسم	سویه	محیط کشت	دما (درجه‌سانتی‌گراد)	زمان (ساعت)
استافیلوکوکوس اورئوس	مانند NCIMB8625 (ATCC6538P,CIP53.156) NCIMB 9518 CIP4.83,ATCC6538)	محیط مایع سوی‌بین‌کازئین دایجست	۳۲/۵ ± ۲/۵	۲۴ – ۴۸
پسودوموناس آئروژینوزا	مانند NCIMB 8626 (CIP82.118, ATCC 9027)	محیط مایع سوی‌بین‌کازئین دایجست	۳۲/۵ ± ۲/۵	۲۴ – ۴۸
اشریشیاکلی	مانند NCIMB8545 (CIP53.126,ATCC8739)	محیط مایع لاکتوز	۳۲/۵ ± ۲/۵	۲۴ – ۴۸
سالمونلاتیفی موریوم	*	محیط مایع لاکتوز	۳۲/۵ ± ۲/۵	۲۴ – ۴۸
کاندیدا آلبیکنس	مانند ATCC 2091 (CIP 1180.79) ATCC 10231(NCPF 3179 , CIP 48.72)	محیط مایع سابورو دکستروز	۲۲/۵ ± ۲/۵	حداقل ۵ روز

* شماره سویه توصیه نشده‌است. یک سالمونلا غیربیماری‌زا برای انسان مانند سالمونلا ابوتی (CIP80.39, NCTC 6017) ممکن‌است به‌کاررود.

محلول‌ها

۱ـ بافر فسفات با pH=۷/۲

محلول مادر ـ ۳۴ گرم *پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات* را در یک لیتر بالن ژوژه ۱۰۰۰ میلی‌لیتری در حدود ۵۰۰ میلی‌لیتر *آب* حل کنید. pH آن را با اضافه‌کردن محلول هیدروکسید سدیم *TS* (در حدود ۱۷۵ میلی‌لیتر) در ۷/۲±۰/۱ تنظیم نمایید. با *آب* حجم آن را به ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسانیده، مخلوط کنید. در ظروف تقسیم و سترون نموده، در یخچال نگهداری کنید.

برای مصرف، محلول مادر را به نسبت ۱ به ۸۰۰ با آب رقیق کرده و سترون نمایید.

۲ـ محلول بافرشده کلرید سدیم ـ پپتون با pH=۷/۰

پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات	۳/۵۶ گرم
دی‌سدیم هیدروژن فسفات	۷/۲۳ گرم
کلرید سدیم	۴/۳۰ گرم
پپتون(گوشت یا کازئین)	۱/۰۰ گرم
آب	۱۰۰۰ میلی‌لیتر

محیط‌ها

۱ـ محیط مایع کازئین دایجست ـ سوی لستین ـ پلی‌سوربات ۲۰ [۳۵]

کازئین هضم شده توسط پانکراتین	۲۰/۰ گرم
سوی لستین	۵/۰ گرم
پلی سوربات ۲۰	۴۰/۰ میلی‌لیتر
آب	۹۶۰ میلی‌لیتر

کازئین هضم شده توسط پانکراتین و *سوی لستین* را در ۹۶۰ میلی‌لیتر *آب* حل نموده، در حمام آب ۴۸ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد در حدود ۳۰ دقیقه حرارت دهید تا کاملاً حل گردد. ۴۰ میلی‌لیتر *پلی‌سوربات ۲۰* به آن افزوده، مخلوط و در ظروف مناسب تقسیم نمایید.

۲ـ محیط مایع سوی‌بین‌ـکازئین دایجست [۳۶]

کازئین هضم شده توسط پانکراتین	۱۷/۰ گرم
سوی‌بین میل هضم شده توسط پاپائین [۳۷]	۳/۰ گرم
کلرید سدیم	۵/۰ گرم
پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات	۲/۵ گرم
دکستروز ($C_6H_{12}O_6 . H_2O$)	۲/۵ گرم
آب	۱۰۰۰ میلی‌لیتر

۳ـ محیط سوی‌بین‌ـکازئین دایجست آگار[۳۸]

کازئین هضم شده توسط پانکراتین	۱۵/۰ گرم
سوی‌بین میل هضم شده توسط پاپائین	۵/۰ گرم
کلرید سدیم	۵/۰ گرم
آگار	۱۵/۰ گرم
آب	۱۰۰۰ میلی‌لیتر

pH بعد از سترون‌سازی ۷/۳ ±۰/۲

۴ـ محیط سابورو ـ دکستروز آگار[۳۹]

پپتون(گوشت یا کازئین)	۱۰/۰ گرم
دکستروز($C_6H_{12}O_6.H_2O$)	۴۰/۰ گرم
آگار	۱۵/۰ گرم
آب	۱۰۰۰ میلی‌لیتر

pH بعد از سترون‌سازی ۵/۶ ± ۰/۲

توجه: در صورت لزوم برای تهیه محیط سابورو‌ـدکستروز آگار حاوی آنتی‌بیوتیک، درست قبل از مصرف، به هر لیتر از محیط سترون ۰/۱۰ گرم *سدیم بنزیل پنی‌سیلین* و ۰/۱۰ گرم *تتراسیکلین* به‌صورت محلول‌های

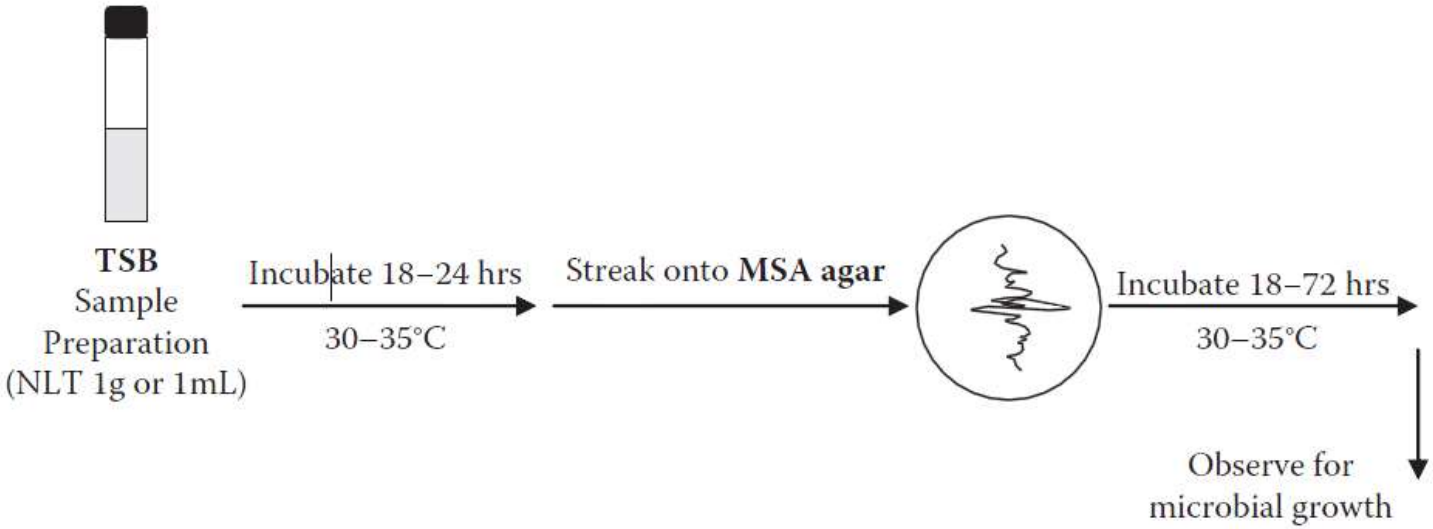
جستجو و تشخیص میکروارگانیسم های مشخص شده

- آزمایش برای استافیلوکوکوس اورئوس و پسودوموناس آئروژینوزا

SELECTIVE AND DIFFERENTIAL MEDIA

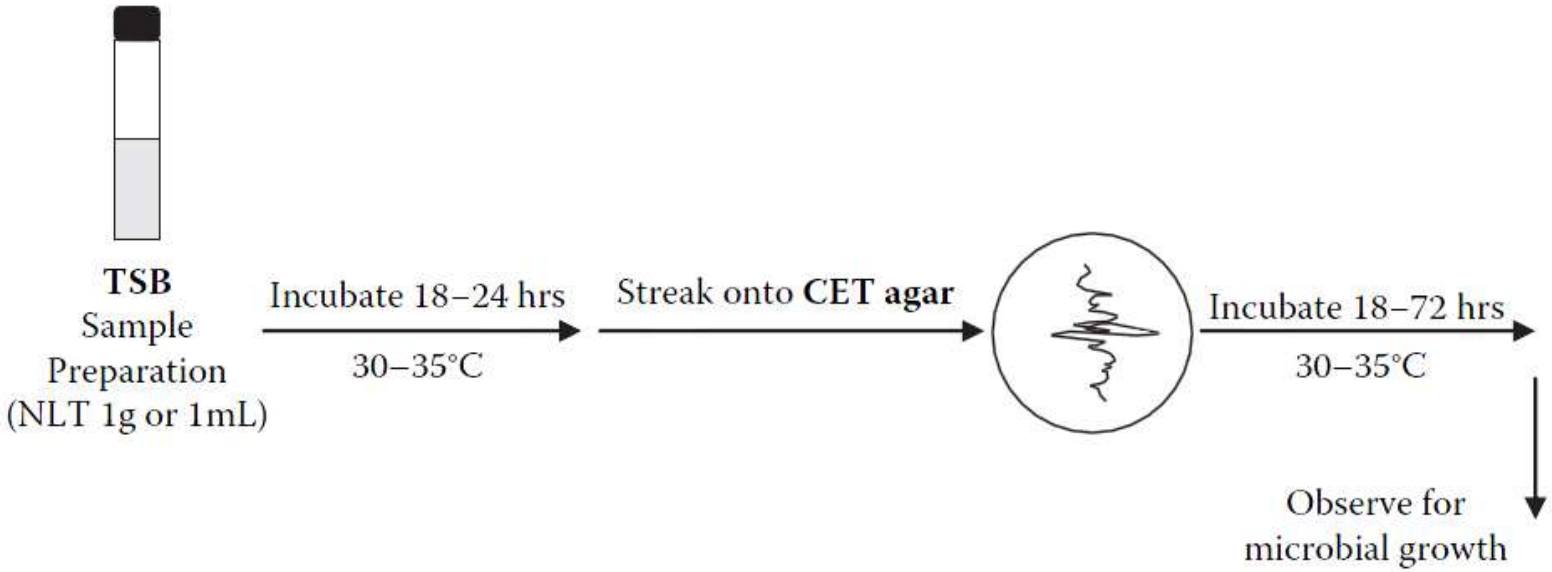
- Selective media allow certain types of organisms to grow, and inhibit the growth of other organisms. The selectivity is accomplished in several ways.
  - For example, organisms that can utilize a given sugar are easily screened by making that sugar the only carbon source in the medium.

- Differential media are used to differentiate closely related organisms or groups of organisms.
  - Owing to the presence of certain dyes or chemicals in the media, the organisms will produce characteristic changes or growth patterns that are used for identification or differentiation.



- Presence of yellow-to-white colonies surrounded by a yellow zone could indicate presence of *Staphylococcus aureus* which must be confirmed using suitable microbial identification tests.

Test for absence of *Staphylococcus aureus*.



- Any microbial growth is suspect and presence/absence of *Pseudomonas aeruginosa* must be confirmed using suitable microbial identification tests.

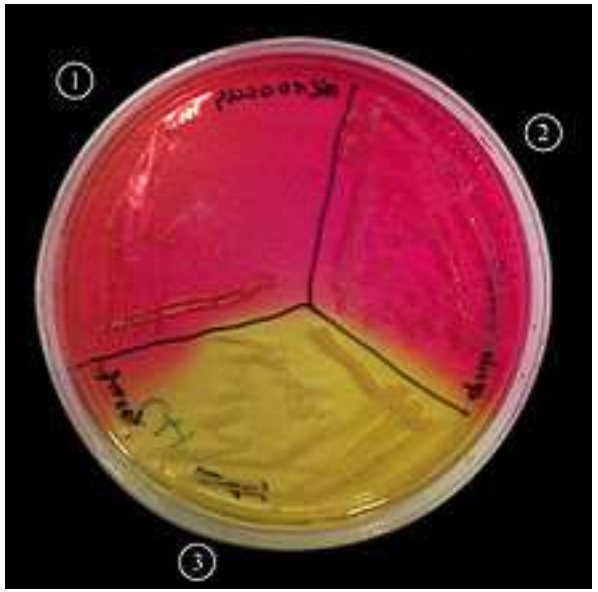
Test for absence of *Pseudomonas aeruginosa*.

جدول شمارهٔ ۱. خصوصیات شکل ظاهری استافیلوکوکوس اورئوس روی محیط‌های انتخابی

محیط انتخابی	خصوصیات ظاهری کلنی	رنگ‌آمیزی گرم
محیط وگل‌ـجانسون آگار	کلنی‌های سیاه با هاله زرد	کوکسی‌های مثبت (خوشه‌ای)
محیط مانیتول‌ـسالت آگار	کلنی‌های زرد با هاله زرد	کوکسی‌های مثبت (خوشه‌ای)
محیط برد‌ـپارکر آگار	سیاه، درخشان، احاطه شده با هالـه شفاف، به قطر ۲ تا ۵ میلی‌متر	کوکسی‌های مثبت (خوشه‌ای)

Manitol salt agar (selective and differential)

NaCl 7.5-10% (selective for Staphylococci)
Manitol (differential)
Phenol red



Vogel Johnson agar (selective and differential)

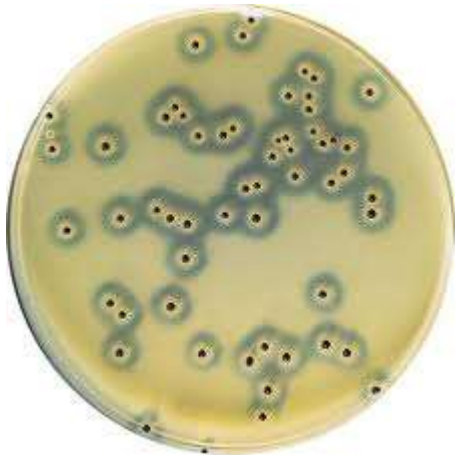
litium chloride + potassium tellurite , inhibition of MO other than Staphylococci

Manitol 10 g
lithium chloride 5 g
potassium tellurite solution 1%
(reduction of tellurite by coagulase + Staph)
dipotassium phosphate
Phenol red

Baird Parker agar (selective and differential)

litium chloride + potassium tellurite , inhibition of MO other than Staphylococci

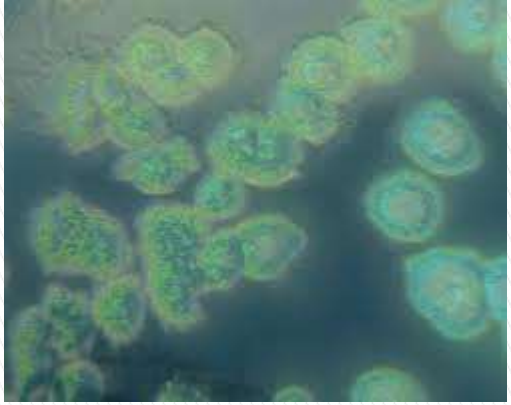
lithium chloride 5 g
potassium tellurite solution 1%
(reduction of tellurite by coagulase + Staph)
egg yolk emulsion (clear zone due to lecitinase)



آزمایش کواگولاز (برای تایید استافیلوکوکوس اورئوس)

- به وسیله یک حلقه تلقیح از هر یک از کلنی های مشکوک در روی محیط مانیتول سالت آگار (یا محیط بر د پارکر آگار یا محیط و گل جانسون آگار) برداشت نموده و به لوله های جداگانه ای که هر یک حاوی 0/5 میلی لیتر پلاسمای پستانداران، ترجیحاً اسب و خرگوش، که ممکن است دارای مواد افزودنی مناسب باشد منتقل کنید.
- در حمام آب با حرارت 37 درجه سانتی گراد قرارداده و لوله ها را بعد از سه ساعت و سپس در فواصل زمانی مناسب تا 24 ساعت برر سی نمایید. کنترل های مثبت و منفی را نیز به طور هم زمان با نمونه ها آزمایش کنید. اگر هیچ انعقادی با هر اندازه ای مشاهده نشود، نمونه آزمایشی عاری از استافیلوکوکوس اورئوس تلقی می شود.

Cetrimide agar



- Cetrimide : (selective for G-)
- MgCl2 & KCl: Increase of pseudomonas pigments (fluorscein: yellow-orange, pyocyanin: blue-green)

PAMF

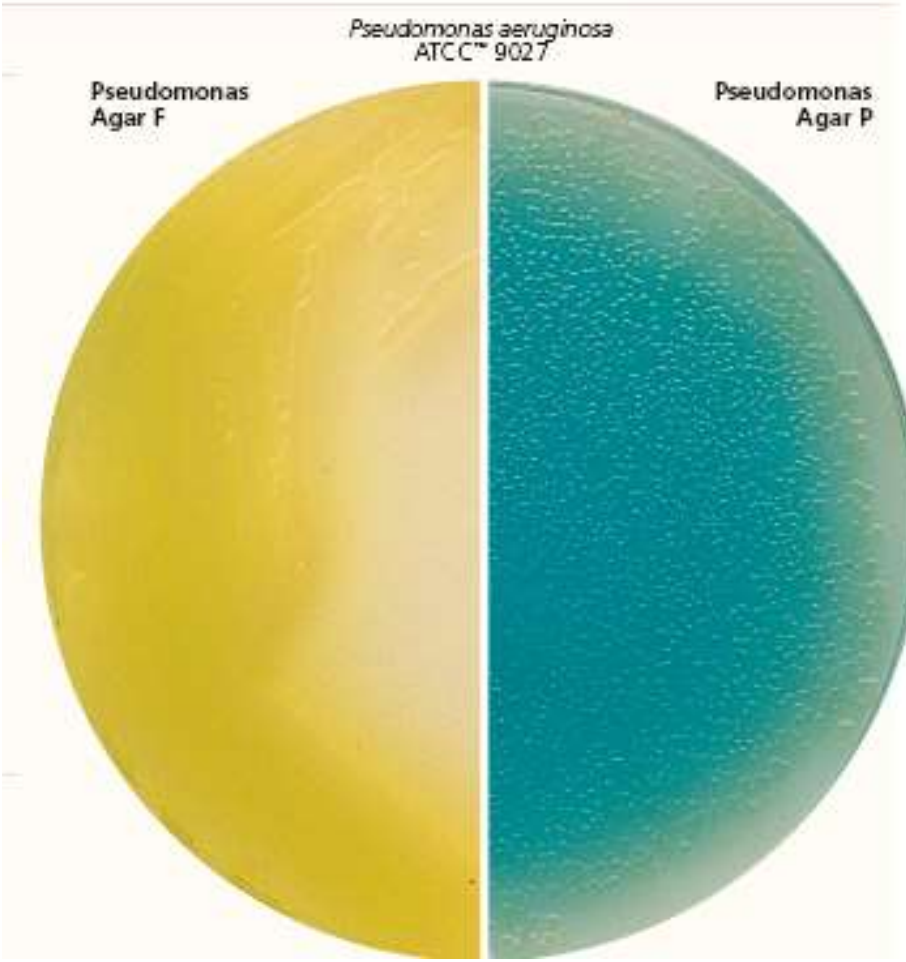
Pseudomonas Agar (For Fluorescein)

- **$MgSO_4$ & K_2HPO_4**: increase fluorescein, inhibition of pyocyanin
- Plates under UV (254 nm): fluorescence greenish-yellow

PAMP

Pseudomonas agar (for Pyocyanin)

- **Pyocyanin:** blue- nonfluorescent
- **MgCl2 & K2SO4** activation of pyocyanin production
- **Low Phosphorous** (low inhibition of pyocyanin)


Pseudomonas aeruginosa
ATCC™ 9027
Pseudomonas
Agar F
Pseudomonas
Agar P

آزمایش های اکسیداز و پیگمان(برای تایید پسودوموناس آئروژینوزا)

- به وسیله یک حلقه تلقیح، از کلنی های مشکوک در روی محیط ستریمید آگار به محیط پسودوموناس آگار برای تشخیص فلوئورسین و محیط پسودوموناس آگار برای تشخیص پیوسیانین که در ظر وف پتری تهیه شده اند به شکل مخطط منتقل کنید سر ظروف را گذاشته ظروف را برگردانده و در گرمخانه 30-35 درجه سانتی گراد به مدتی که کمتر از 3 روز نباشد قراردهید. سطوح کشت داده شده را زیر نور فرابنفش ملاحظه نمایید . پلیت ها را از نظر خصوصیات کلنی ها مطابق آ نچه در جدول آمده است نیز بررسی کنید.
- کلنی های مشکوک به پسودوموناس آئروژینوزا که روی یک یا چند محیط رشد کرد ه اند را با آزمایش اکسیداز تأیید *نمایید*. نوارها یا دیس کهای کاغذ صافی را که قبلاً *به N,N* - دی متیل پارا فنیلن د ی آمین د ی هیدروکلراید آغشته شده است روی کلنی های رشد نموده قرارداده یا کلنی ها را بر روی معرف منتقل نمایید.
- اگر یک رنگ صورتی که به تدریج شدیدتر شده و به ارغوانی تبدیل می شود دیده نشود، نمونه مورد آزمایش فاقد پسودوموناس آئرو ژینوزا تلقی می شود. در صورت لزوم می توان وجود پسودومو ناس آئروژینوزا را به وسیله آزمایشهای کشت و بیوشیمیایی مناسب دیگر تأیید نمود.

آزمایش برای گونه های سالمونلا و اشریشیاکلی

- به 10 گرم یا 10 میلی لیتر از نمونه مورد آزمایش آنقدر از محیط مایع لاکتوز اضافه نمایید تا حجم آن به 100 میلی لیتر برسد و در گرمخانه 35-30 درجه سانتی گراد به مدت 24 تا 48 ساعت قراردهید . محیط را از نظر رشد بررسی نمایید و چنانچه رشد مشاهده گردید، با حرکت ملایم مخلوط نمایید . مقادیر 1 میلی لیتری از آن را به ظروفی که به ترتیب حاوی 10 میلی لیتر محیط مایع سلنیت سیستین و محیط مایع تتراتیونات می باشند منتقل کرده و به مدت 12 تا 24 ساعت در دمای 35-30 درجه سانتی گراد در گرمخانه قراردهید (بقیه محیط مایع لاکتوز را نگهداری نمایید.)

آزمایش برای گونه های سالمونلا

- به وسیله یک حلقه تلقیح مقداری از هر یک از دو محیط مایع سلنیت سیستین و تترا تیونات را روی محیط بریلیانت گرین آگار ، محیط گزیلوز لیزین دزاکسی کولات آگار و محیط بیسموت سولفیت آگار که در ظروف پتری تهیه شده اند به طور مخطط کشت دهید .
- سر ظروف را گذاشته، آنها را برگردانده و در گرمخانه 35-30 درجه سانتی گراد به مدت 48-24 ساعت قر اردهید. در بررسی پلیت ها، اگر هیچ یک از کلنی ها با خصوصیات داده شده در جدول مطابقت نداشتند نمونه مورد آزمایش عاری از جنس سالمونلا می باشد.

تایید گونه های سالمونلا

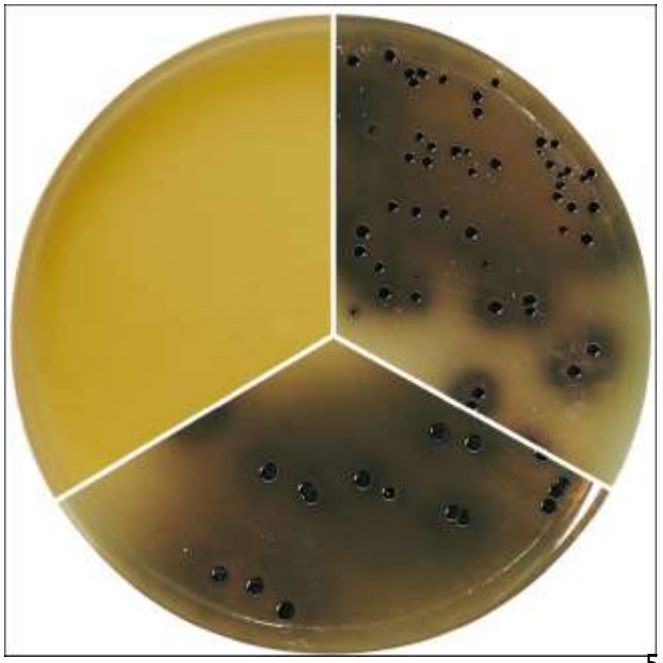
- اگر کلنی های باسیل های گرم منفی که با خصوصیات مندرج در جدول تطابق داشته باشند یافت شوند، تشخیص ر ا بیشتر ادامه داده و به وسیله یک سیم تلقیح کلنی های مشکوک را به طور جداگانه به یک لوله بات اسلنت محیط ترپیل شوگر آیرون آگار منتقل نمایید، به این ترتیب که ابتدا سطح قسمت شیبدار را به شکل مخطط کشت داده و سپس سیم را به طور مستقیم داخل قسمت عمقی آگار وارد نمایید . و در دمای35-30 درجه سانتی گراد به مدت 48 - 24 ساعت در گرمخانه قراردهید . چنانچه در لوله تغییراتی به این ترتیب که قسمت
- شیب دار آن قلیا یی(قرمز) و قسمت عمقی آن اسید ی (زرد)، (همراه با سیا ه شدن قسمت عمقی لوله به دلیل تولید سولفید هیدروژن، یا بدون سیا ه شدن) مشاهده نشود، نمونه مورد آزمایش از شرایط لازم برای عدم وجود جنس سالمونلا برخوردار است.

جدول شمارهٔ ۳ . خصوصیات شکل ظاهری گونه‌های سالمونلا روی محیط‌های آگار انتخابی

محیط انتخابی	خصوصیات ظاهری کلنی
محیط بریلیانت گرین آگار	کوچک، شفاف، بی‌رنگ یا صورتی تا سفید کدر (غالباً به‌وسیله هاله صورتی تا قرمز احاطه شده‌است)
محیط گزیلوز ـ لیزین ـ دزاکسی کولات آگار	قرمز، با مرکز سیاه یا بدون آن
محیط بیسموت سولفیت آگار	سیاه یا سبز

Bismuth sulphite agar (selective and differential)

bismuth sulphite + brilliant green (inhibition of G+ and coliforms)
$FeSO_4$ (reuced to H_2S + Fe: FeS)



Xylose lysine deoxycholate citrate (XLDA) (selective and differential)

(for salmonella and Shigella)

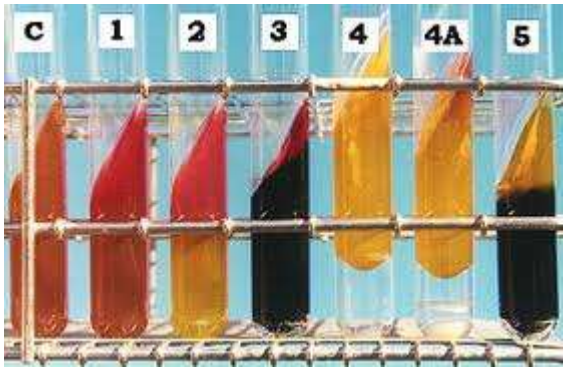
sodium deoxycholate (inhibition of G+)
xylose + lactose + sucrose
phenol red
lysine (lysine dcarboxylase: free amines : alkaline pH)
sodium thiosulfate + ferric amonium citrate (H2S: FeS)

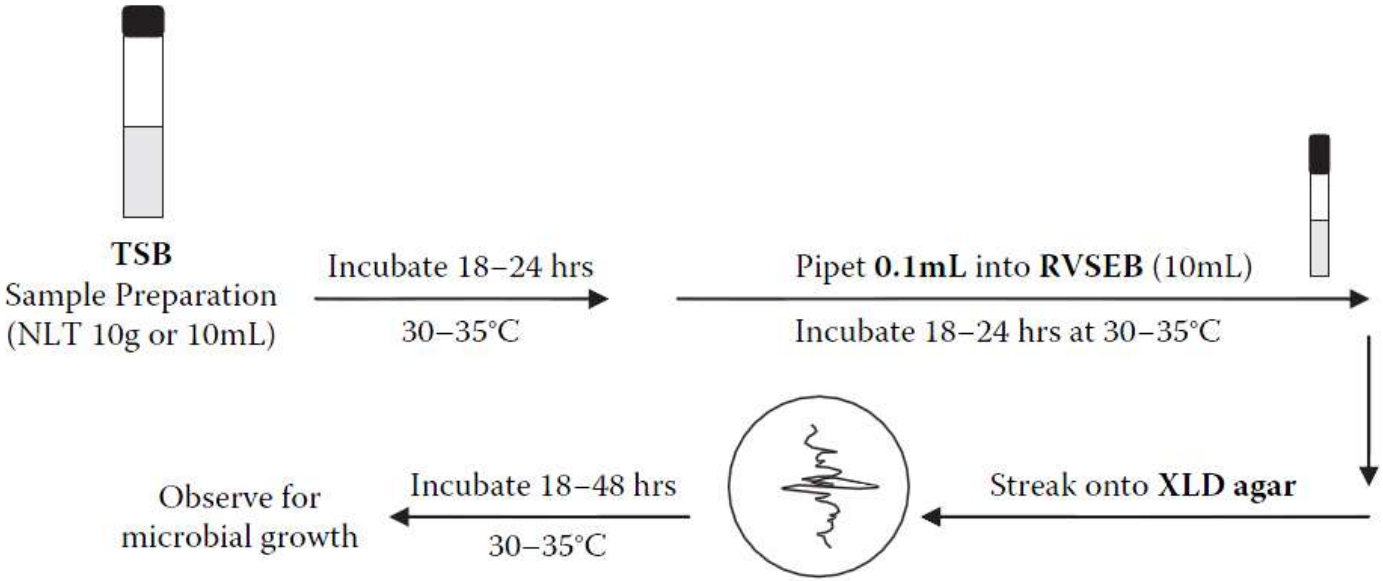
Brilliant green agar

brilliant green (inhibition of G+ and most G- except Salmonella)
lactose + sucrose (are not fermented by Salmonella sp.)
phenol red

Triple sugar iron agar (TSI) (differential)

Lactose + sucrose + glucose
FeSO4
Phenol red





- Presence of well-developed red colonies with or without black centers could indicate presence of *Salmonella* which must be confirmed using suitable microbial identification tests.

Test for absence of *Salmonella* spp.

آزمایش برای اشریشیاکلی

- به وسیله یک حلقه تلقیح مقداری از باقیمانده محیط مایع لاکتوز را روی سطح محیط مک کانکی آگار به صورت مخطط کشت دهید و به مدت 24-48 ساعت در دمای 30-35 درجه سانتی گراد قراردهید .
- در بررسی، اگر هیچ کدام از کلنی ها مطابق شرحی که در جدول برای این محیط داده شده است نباشند، نمونه آزمون فاقد اشریشیاکلی تلقی می شود.
- چنانچه کلنی هایی که با خصوصیات مندرج در جدول مطابقت داشته باشند یافت شوند، برای تشخیص بیشتر، هر یک از کلنیهای مشکوک را به طور جداگانه به محیط لوین ائوزین متیلن بلو آگار که در ظرف پتری تهیه شده است منتقل نمایید. سر ظروف را گذاشته، برگردانده و به مدت 24-48 ساعت در دمای 30-35 درجه سانتی گراد قراردهید. اگر هیچ کدام از کلنی ها دارای دو خصوصیت درخشش فلزی در ز یر نور انعکاسی و رنگ آ بی سیاه در زیر نور انتقا لی نباشد، نمونه مورد آزمایش فاقد اشریشیاکلی تلقی می شود. ،
- اشریشیاکلی را می توان به وسیله آزمایشهای کشت و بیوشیمیایی مناسب مانند IMVIC بیشتر تأیید نمود.

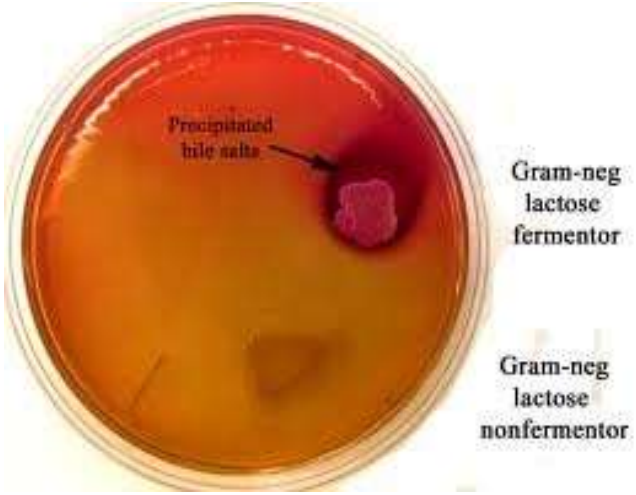
جدول شمارهٔ ۴. خصوصیات شکل ظاهری اشریشیاکلی روی محیط مک‌کانکی آگار

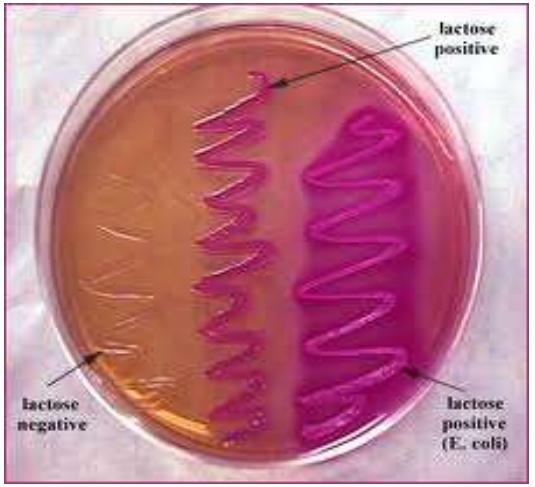
رنگ‌آمیزی گرم	خصوصیات ظاهری کلنی
میله‌های منفی(کوکوباسیل)	قرمز-آجری، ممکن‌است دارای هاله رسوب صفروای باشد

McConkey agar (selective and differential)

for enteric G- bacilli

lactose (fermentation: pink color and bile salts percipitation)
neutral red
bile salt + crystal violet (inhibition of G+ cocci)

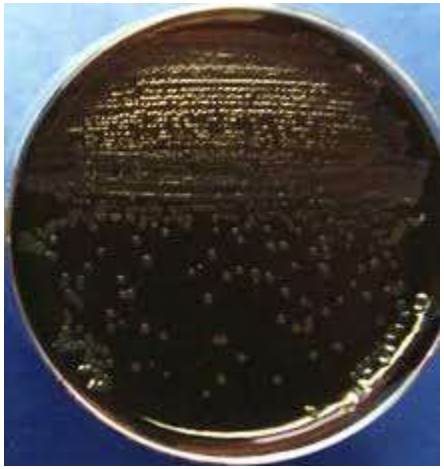


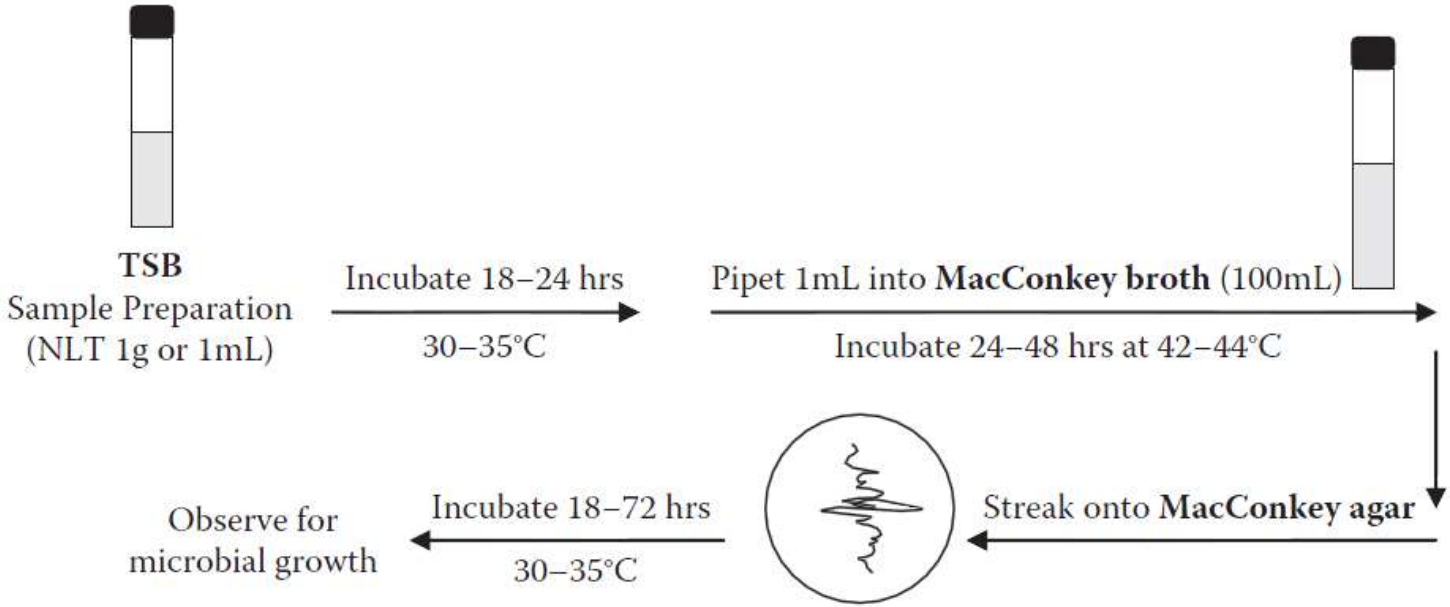


Eosine methylene blue agar

(selective and differential)

methylene blue (inhibition of G+)
Eosine (color change in acidic pH to black –dark with green shine)
lactose (fermenter: colored colonies)





"NLT" Denotes "Not less than".

- Any microbial growth is suspect and presence/absence of *E. coli* must be confirmed using suitable microbial identification tests.

Test for absence of *Escherichia coli*.

جستجو، تشخیص و تأیید کاندیدا آلبیکنس

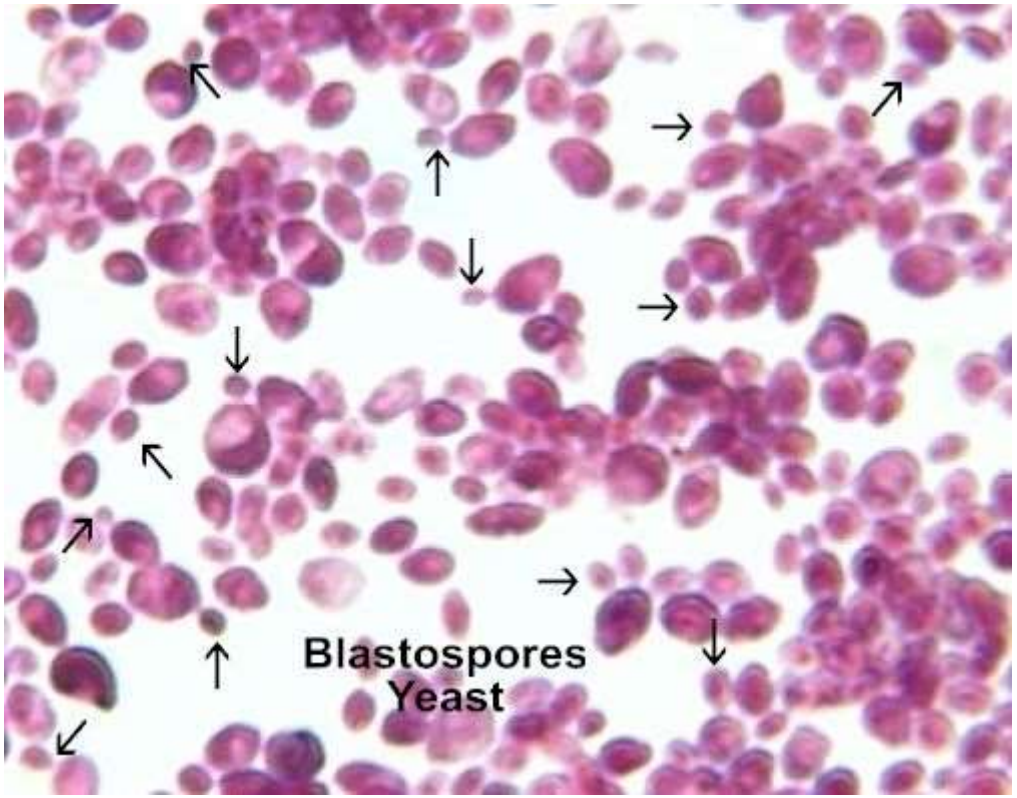
- یک نمونه 10 گرمی یا 10 میلی لیتری از فرآورده مورد آزمایش تهیه کرده و با محیط مایع سابورو دکستروز حجم آن را به 100 میلی لیتر برسانید و به مدت دو هفته در گرمخانه 25-20 درجه سانتی گراد قراردهید .
- چنانچه در این مدت رشدی حاصل شود، محتوی آن را مخلوط نموده و با کمک یک حلقه تلقیح نمونه ها یی از آن بر روی محیط های سابورو دکستروز آگار و سابورو آگار با کلرامفنیکل و سیکلوهگزامید به طور مخطط منتقل نمایید و در گرمخانه 25-20 درجه سانتی گراد قراردهید. محیط های کشت داده شده را هر 24 ساعت یکبار از نظر رشد کاندیدا بررسی نمایید. معمولاً پس از 4-3 روز کلنی ها ظاهر می شوند. چنانچه کلنی های سفید خامه ای نرم و خمیری ظاهر شد، با یک بررسی میکروسکوپی به طریقه رنگ آمیزی گرم و یا تهیه لام مرطوب توسط لاکتوفنل کاتن بلو و رؤیت اجرام کروی یا بیضی و جوانه دار یا بدون آن، تشخیص احتمالی را تأیید نمایید.

آزمایش برای کلامیدوسپور

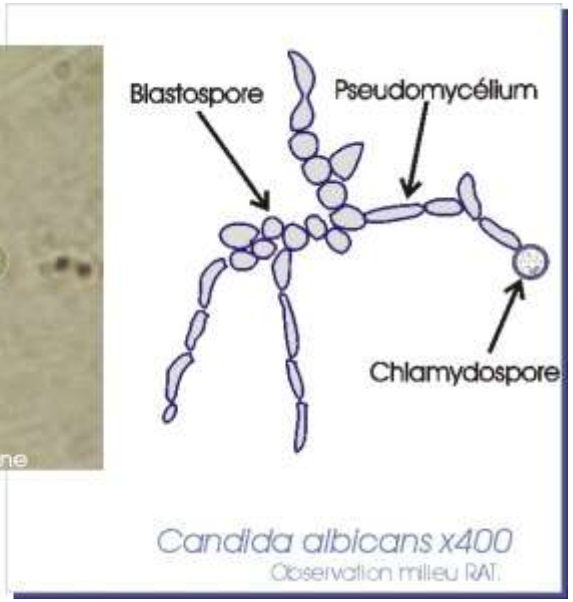
- از کلنی های مشکوک به وسیله یک سیم تلقیح که انتهای آن به فاصله تقریباً 5 میلی متری از انتها به شکل زاویه دار خم شده است برداشت نموده و بر روی محیط کورن میل آگار در پلیت به شکل چند خط موازی با یکدیگر، با فشا ر ملایمی که به محیط داده می شود و محیط کمی بریده می گردد، منتقل نمایید . روی نصف برش ها با دقت و بدون ایجاد آلودگی یک لامل سترون قراردهید.
- پلیت ها را در حرارت 25 درجه سانتی گراد یا حرارت اتاق قرارداده و پس از 24 ساعت در زیر میکروسکوپ بررسی نمایید. کاندیدا آلبیکنس تولید میسلیوم، اسپور، بلاستوسپور و کلامیدوسپور می نماید.

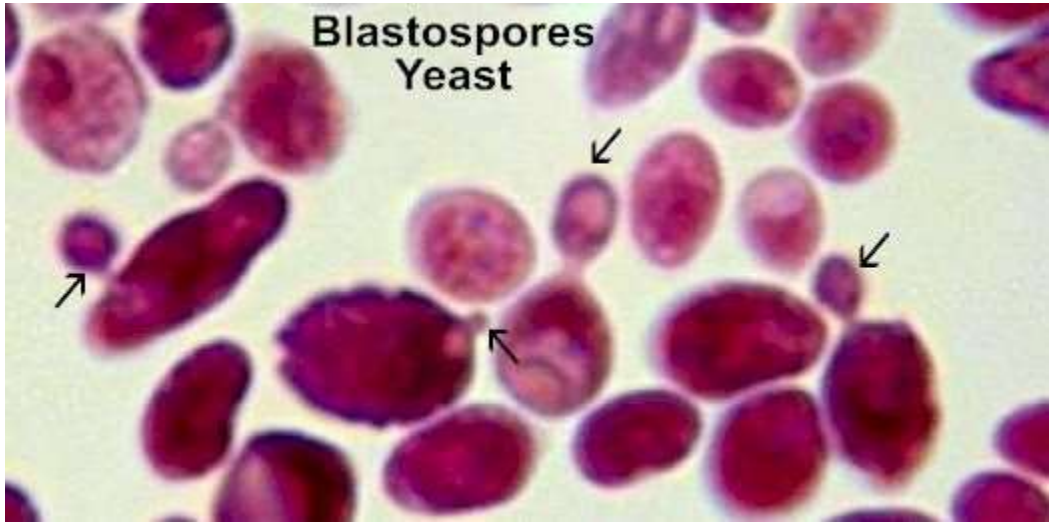
آزمایش جرم تیوب یا رشد لوله ای شکل

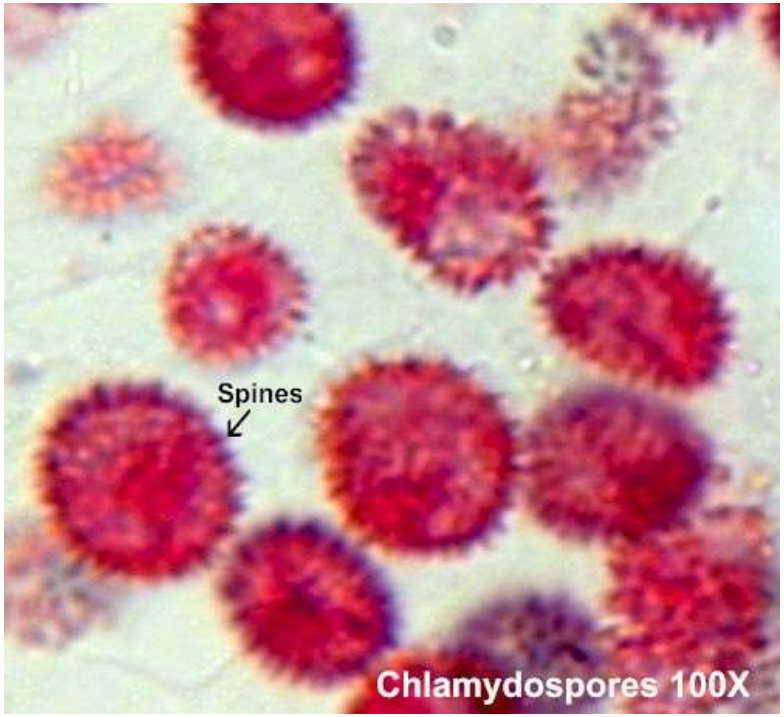
- از هر یک از کلنی های مشکوک به طورجداگانه مقدار کمی برداشت نموده و به لوله های همولیزی که حاوی 5 /0 میلی لیتر سرم خون انسان، گاو یا گوسفند می باشد اضافه و مخلوط نمایید و به مدت 2-3 ساعت در حمام آبی 37 درجه سانتی گراد قرارداده و سپس قطره ای از آن را بین لام و لامل قرارداده و به وسیله میکروسکوپ مشاهده کنید.
- وجود لوله های استوانه ای شکل چسبیده به سلول های گرد یا بیضی شکل مخمرها نشانه یک آزمایش مثبت است. بلندی این لوله ها تا 20 میکرون می رسد.
- در صورت عدم تشکیل کلامیدوسپور در محیط کورن میل آگار و عدم رشد لوله ای شکل متصل به اجرام کروی یا بیضی شکل مخمرها در سرم، نمونه آزمایشی از شرایط لازم برای عاری بودن از کاندیدا آلبیکنس برخوردار می باشد.

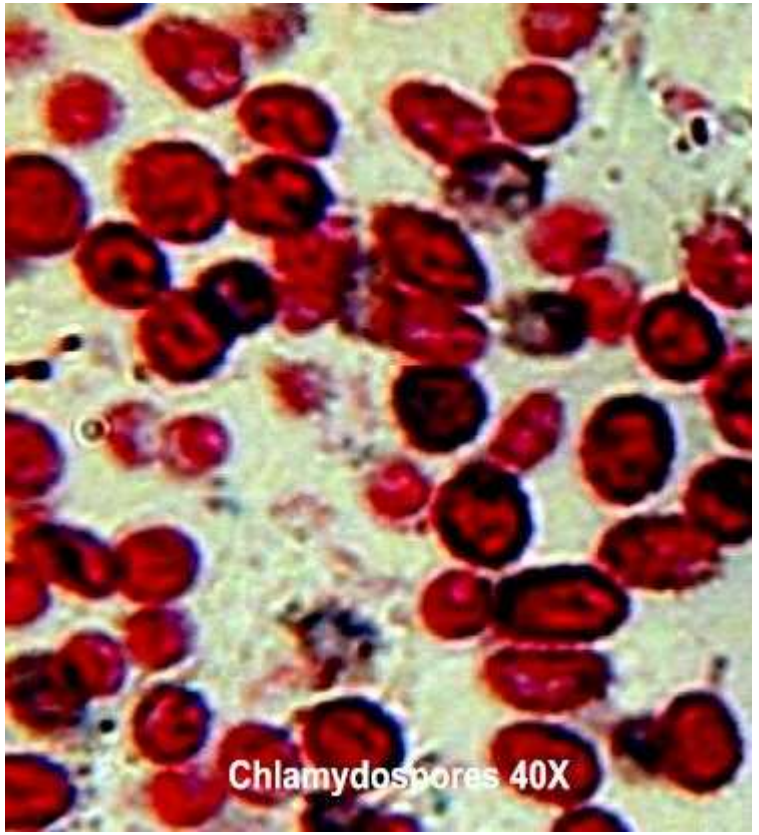

Blastospores
Yeast

R. Moreda - Lycée Docteur Lacroix - Narbonne


Blastospore
Pseudomycélium
Chlamydospore
Candida albicans x400
Observation milieu RAT.


Blastospores
Yeast


Spines
Chlamydospores 100X


Chlamydospores 40X

Test for Absence of Bile-Tolerant Gram-Negative Bacteria

- Prepare a 1:10 sample dilution using not less than 1 g or 1 mL of product and **TSB** as the test diluent.
- Homogenize the sample preparation and incubate at 20–25°C for 2–5 h. This preincubation step is designed to resuscitate any bacteria that might be present in the sample without allowing them to multiply.
- Following the preincubation step, mix the sample preparation well and transfer an aliquot of the sample preparation to a suitable volume of **mossel enterobacteriaceae enrichment broth (MEEB).** Typically, a sample aliquot equivalent to a minimum of 1 g or 1 mL of product is added to 100 mL of MEEB.

Mossel EEB

Formulae

Difco™ EE Broth Mossel Enrichment

Approximate Formula* Per Liter

Pancreatic Digest of Gelatin	10.0	g
Dextrose	5.0	g
Disodium Phosphate	8.0	g
Monopotassium Phosphate	2.0	g
Brilliant Green	15.0	mg
Oxgall	20.0	g

Brilliant green and oxgall are selective agents.

Acid production causes the color of EE Broth Mossel Enrichment to become yellow. A negative reaction results in no color change and the medium remains green.

- The MEEB sample preparation incubates at 30–35°C for 24–48 h.

- Following this incubation period, subculture a portion of the MEEB preparation, using a sterile loop, onto the surface of a **violet red bile glucose (VRBG) agar plate, and incubate** at 30–35°C for 18–24 h.

- Once incubation of the VRBG plate is complete, observe the agar surface for presence of red colonies surrounded by a reddish precipitate.

- If no microbial growth is observed or growth does not meet the previously described colonial morphology, the product complies with the test for absence of bile-tolerant Gram-negative bacteria.

violet red bile glucose (VRBG) agar

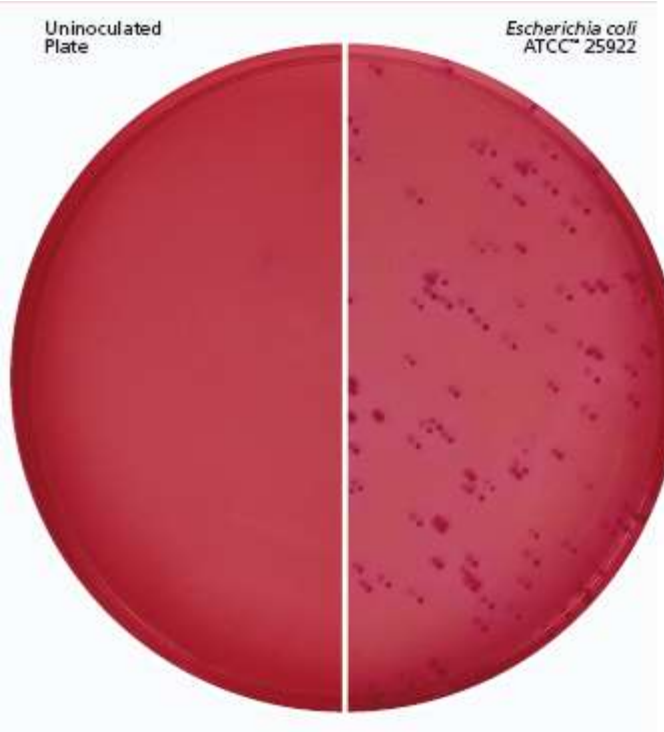
Violet Red Bile Glucose Agar is used for detecting and enumerating *Enterobacteriaceae* in food and dairy products.

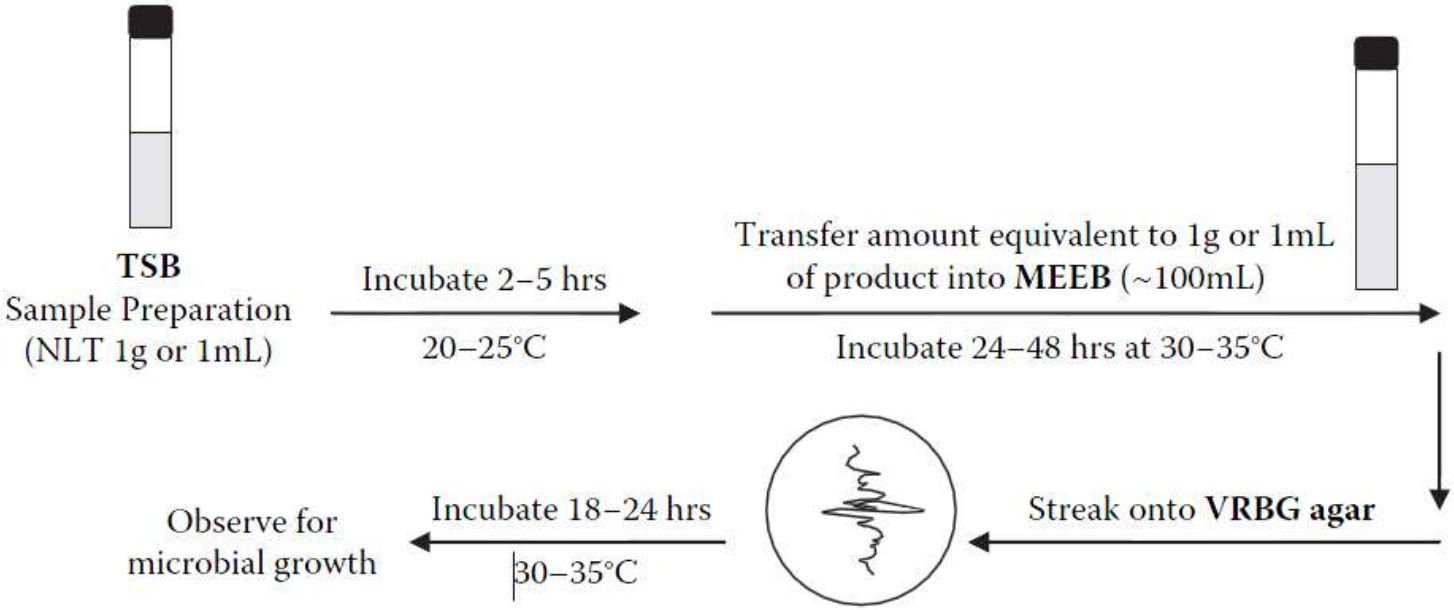
The *Enterobacteriaceae* group includes lactose-fermenting coliform bacteria, lactose-nonfermenting strains of *E. coli*, and lactose-nonfermenting species, such as *Salmonella* and *Shigella*. When examining some foods, it is desirable to detect *Enterobacteriaceae* rather than the coliform bacteria.[4]

Enterobacteriaceae are glucose-fermenting bacteria. Mossel et al.[5] modified lactose-containing Violet Red Bile Agar by adding glucose to improve the recovery of *Enterobacteriaceae*. Later work by Mossel et al.[6,7] demonstrated that lactose could be omitted, resulting in the formulation known as Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA).

- Bile salts and crystal violet inhibit gram-positive bacteria.
- Glucose fermenters produce red colonies with red-purple halos (bile precipitation) in the presence of neutral red, a pH indicator.

- Enterobacteriaceae ferment glucose, produce acid products and form red to dark purple colonies surrounded by red-purple halos.





- Presence of red colonies surrounded by a reddish precipitate indicates presence of bile-tolerant gram-negative bacteria.

Test for absence of bile-tolerant Gram-negative bacteria.

Quantitative Test for Bile-Tolerant Gram-Negative Bacteria

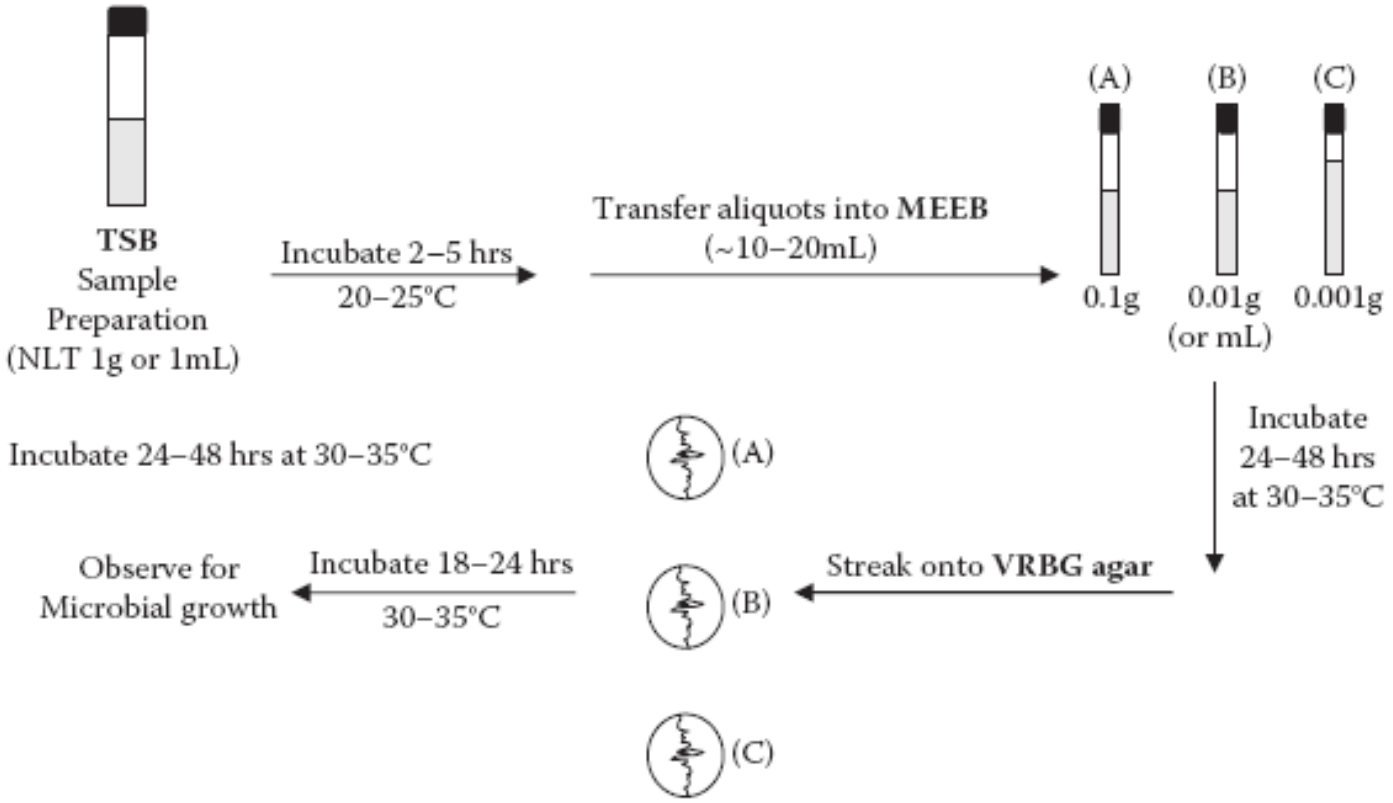
- Prepare a 1:10 sample dilution using not less than 1 g or 1 mL of product and TSB as the test diluent. Homogenize the sample preparation and incubate at 20–25°C for 2–5 h. The preincubation step is designed to resuscitate any bacteria that might be present in the sample, without allowing them to multiply. Following preincubation, mix the sample preparation well, and transfer aliquots equivalent to 0.1 g, 0.01 g, and 0.001 g (or 0.1 mL, 0.01 mL, and 0.001 mL) into separate containers with a suitable volume of **MEEB. Typically, test tubes are used for this test, and the volume of** medium in each tube is between 10 and 20 mL.

- The MEEB sample preparations should be incubated at 30–35°C for 24–48 h. Following this incubation period, subculture a portion of each MEEB sample preparation, using separate sterile loops, onto the surface of **VRBG agar plates and** incubate at 30–35°C for 18–24 h. Once incubation of the VRBG plates is complete, observe the agar surface for presence of red colonies surrounded by a reddish precipitate (positive). Use Table 3.2 to evaluate the test results obtained and to determine the MPN of bile-tolerant Gramnegative bacteria in the sample. See Figure 3.11 for an outline of this test.

TABLE 3.2
Most Probable Number of Bile-Tolerant Gram-Negative Bacteria

Test Results			Most Probable Number (MPN) of Bacteria per Gram or Milliliter of Product
0.1 g or 0.1 mL	0.01 g or 0.01 mL	0.001 g or 0.001 mL	
+	+	+	More than 10^3
+	+	–	Less than 10^3 and more than 10^2
+	–	–	Less than 10^2 and more than 10
–	–	–	Less than 10

Note: Adapted from the harmonized compendial chapter.



- Presence of red colonies surrounded by a reddish precipitate indicates presence of