جمهوری اسلامی ایران

وزارت جهاد کشاورزی

Iran veterinary organization

دستورالعمل اجرایی

خود کنترلی معیارهای بهداشتی فرآیند تولید در کشتارگاههای دام و طیور

Executive Directive Of:

Animal Slaughterhouses Process Hygiene Criteria Self Control

آدرس: تهران، خیابان ولیعصر، دوراهی یوسف آباد، ابتدای خیابان سیدجمال الدین اسدآبادی، ساختمان سازمان دامپزشکی کشور

تلفن: ۸۸۹۶۲۳۸۰ - ۸۸۹۵۰۸۷۶ دورنویس: ۸۸۹۵۷۲۵۲

پایگاه اینترنتی: WWW. IVO.IR

مقررات ملی دامپزشکی

IVO/ ۹۹/۰۴

اردیبهشت ۱۳۹۹

دفتر نظارت بر بهداشت عمومی و مواد غذایی

IVO / ۰٤ /۹۹

May - ۲۰۲۰

مقدمه: دستورالعمل اجرایی «خودکنترلی معیارهای بهداشتی فرآیند تولید در کشتارگاههای دام و طیور» توسط دفتر نظارت بر بهداشت عمومی و مواد غذایی تدوین و پس از اخذ نظرات ادارات کل دامپزشکی استان‌ها و تایید شورای هماهنگی مدیران معاونت بهداشتی و پیشگیری با کد دامپزشکی(IVO / ۰۴ /۹۹) توسط ریاست سازمان دامپزشکی کشور ابلاغ گردید.

ماده ۱- هدف:

۱-۱- تعیین و ارائه روش‌های نمونه‌برداری از لاشه‌های دام و طیور کشتار شده در کشتارگاه‌های صنعتی دام و طیور

۱-۲- تعیین معیارهای بهداشتی کنترل فرآیند تولید در کشتارگاههای دام و طیور

۱-۲- خود کنترلی بهداشتی فرآیند تولید (کشتار) در راستای اعمال سامانه HACCP به منظور کنترل نقاط بحرانی و اصلاح فرآیند تولید

۱-۲- برنامه‌های مراقبت یا پایش شیوع و یا تعیین وضعیت آلودگی میکروب‌های بیماری زا در لاشه ها

ماده ۲ – تعاریف، واژه‌ها و اصطلاحات:

واژه ها و اصطلاحات تعریف شده در این دستورالعمل دارای مفاهیم زیر می باشد:

- سازمان: سازمان دامپزشکی کشور
- آزمایشگاه: آزمایشگاه دولتی یا غیردولتی همکار مورد تایید سازمان
- اداره کل: اداره کل دامپزشکی استان
- دام: گاو، گاومیش، شتر،گوسفند و بز
- روش برشی: برداشتن قسمت‌های اندازه گیری شده بافت سطحی یا پوست بوسیله برش
- روش سواب‌برداری (سواب‌کشی): روشی است برای جمع آوری میکروب ها از سطح لاشه با استفاده از مواد جاذب مانند اسفنج و یا سواب تامپون
- سازمان: سازمان دامپزشکی کشور
- طیور: در این دستورالعمل شامل مرغ و خروس، اردک، غاز، بوقلمون، مرغ شاخدار، قرقاول، کبک، بلدرچین
- کشتارگاه: کشتارگاه های صنعتی دام و طیور
- لاشه: جسم حیوان پس از کشتار و تخلیه اندرونه سینه‌ای و شکمی
- مالک/ متصدی: اشخاص حقیق یا حقوقی (اعم از شرکت‌های دولتی، وابسته به دولت، بخش خصوصی و یا تعاونی) که به نحوی در امور تولید، استحصال، تهیه، جمع‌آوری، نگهداری، بسته‌بندی، حمل و نقل و توزیع فرآورده‌های خام دامی فعالیت دارند.
- مسئول فنی بهداشتی: شخصی که پس از تایید صلاحیت توسط سازمان نظام دامپزشکی و با اخذ پروانه از ادارات کل، وظیفه کنترل بهداشتی را در مراکز مشمول این شیوه‌نامه، مطابق شرح وظایف ابلاغی از سوی سازمان بر عهده دارد.
- محل نمونه‌برداری: قسمتی از لاشه که نمونه از آنجا گرفته می‌شود.
- مرحله (نقطه) نمونه‌برداری: مرحله‌ای در خط تولید که در آن مرحله، نمونه گرفته می‌شود.

- معیار بهداشتی فرآیند[1]: معیاری است که نشان دهنده عملکرد قابل قبول فرآیند تولید است. چنین معیاری برای قضاوت محصولاتی که در بازار عرضه شده‌اند، کاربرد ندارد.

ماده ۳- دامنه کاربرد:

این دستورالعمل در خصوص تعیین و ارائه روش‌های نمونه‌برداری از سطح و یا قسمت‌هایی از لاشه‌های دام و طیور برای شناسایی و شمارش میکروب‌های هدف به منظور اعمال برنامه خود کنترلی بهداشتی فرآیند تولید (کشتار) در کشتارگاه های صنعتی دام و طیور دارای پروانه بهداشتی از سازمان و یا برنامه‌های مراقبت یا پایش میکروب‌های بیماری‌زا در لاشه‌های دام و طیور، کاربرد دارد.

ماده ٤ - مسئولیت اجرا:

مالک/ متصدی کشتارگاه موظف به تامین شرایط، امکانات و لوازم مورد نیاز برای نمونه برداری و انجام آزمایشات لازم در آزمایشگاه کشتارگاه یا آزمایشگاه مورد تایید سازمان به منظور انجام آزمایشات مورد نظر این دستورالعمل با هدف اجرای برنامه خود کنترلی بهداشتی فرآیند تولید (کشتار) می‌باشد. مسئولیت انجام نمونه برداری و صحه گذاری بر روند نمونه برداری و انجام آزمایشات بر عهده مسئول فنی و بهداشتی کشتارگاه می‌باشد.

ماده ٥ – منابع، قوانین، مقررات و استانداردهای ملی و بین المللی مورد بهره برداری:

- قانون سازمان دامپزشکی کشور – مصوب ۱۳۵۰
- آئین‌نامه مبارزه با بیماری های دامی و جلوگیری از سرایت و انتشار آنها – مصوب ۱۳۹۱
- برنامه ملی ارتقاء کیفیت بهداشتی گوشت مرغ–۱۳۹۸
- دستورالعمل نحوه صدور پروانه تاسیس و بهره برداری کشتارگاههای دام به شماره ۱–۴۴–۸۳
- آئین‌نامه اجرایی ماده «۱۸» قانون سازمان دامپزشکی کشور (بازرسی و معاینه بهداشتی گوشت در کشتارگاه‌های کشور)– مصوب ۱۳۵۲
- آیین‌نامه اجرایی ماده (۳۴) قانون برنامه پنجساله ششم توسعه اقتصادی، اجتماعی و فرهنگی جمهوری اسلامی ایران مصوب ۱۳۹۷/۱۱/۱۷

-FINAL DRAFT ISO/FDIS ۱۷۶۰۴-Microbiology of the food chain-Carcass sampling for microbiological analysis (۲۰۱۵)

- Commission Regulation (EC) No ۲۰۷۳/۲۰۰۵ of ۱۵ November ۲۰۰۵ on microbiological criteria for foodstuffs (۰۱,۰۱,۲۰۱۸)

- ISO ۱۸۵۹۳-۲۰۰۴ : Microbiology of food and animal feeding stuff Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swab

(میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – روش های جامع نمونه برداری از سطوح با استفاده از پلیت های تماسی و سوآب – استاندارد ملی ایران به شماره ۴۸۰۶–تجدید نظر اول)

[1] .Process hygiene criteria

-ISO ۶۸۸۷-۱ :۱۹۹۹ Microbiology of food and animal feeding stuffs– Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination, Part ۱: General rules for the preparation of initial suspension and decimal dilution

(میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – آماده سازی آزمایه،سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری برای آزمون های میکروبیولوژی . قسمت اول : مقررات کلی برای آماده سازی سوسپانسیون اولیه در رقت های اعشاری – استاندارد ملی ایران به شماره ۱-۸۹۲۳ چاپ اول)

- ISO ۶۸۸۷-۲ :۲۰۱۷, Microbiology of the food chain-Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination- Part۲:Specific rules for the preparation of meat and meat products

(میکروبیولوژی زنجیره مواد غذایی – آماده سازی آزمایه ها،سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری برای آزمون میکروبیولوژی . قسمت ۲ : مقررات ویژه برای آماده سازی گوشت و فرآورده های آن– استاندارد ملی ایران به شماره ۲-۸۹۲۳ تجدید نظر اول ۱۳۹۷)

- ISO ۷۲۱۸ : ۲۰۰۷ , Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations

(میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام –راهنمای الزامات کلی برای آزمون–استاندارد ملی شماره ۹۸۹۹ چاپ اول)

ماده ٦ – اصول کلی نمونه برداری:

٦-١- انتخاب روش نمونه‌برداری:

به طور کلی به هدف آزمایش میکروبی، حساسیت مورد نیاز و ملاحظات عملی بستگی دارد.

٦-٢- برنامه نمونه‌برداری:

برنامه‌های نمونه‌برداری باید با هدف آزمایش مرتبط بوده و بر اساس شرایط به‌کار گرفته شود.

در مورد خودکنترلی فرآیند توصیه می شود زمان و فراوانی نمونه برداری با سطح/رتبه بندی بهداشتی کشتارگاه همخوانی داشته باشد.

در مورد پایش و مراقبت میکروارگانیسم های بیماریزا؛ زمان نمونه برداری، محل‌های نمونه برداری از لاشه و فراوانی نمونه برداری باید احتمال تشخیص یا شمارش این میکروارگانیسم ها را به حداکثر برساند.

٦-٣- تواتر نمونه‌برداری:

تواتر نمونه برداری از لاشه‌های دام و طیور برای برنامه خود کنترلی بهداشتی فرآیند تولید در کشتارگاههای صنعتی دام و طیور به شرح زیر می‌باشد:

۶-۳-۱- کشتارگاههای صنعتی طیور (بر اساس برنامه ملی ارتقاء کیفیت بهداشتی گوشت مرغ):

- کشتارگاه رتبه +A: هر ۶۰ روز یک‌بار در صورت تولید مرغ رتبه +A ، در غیر اینصورت هر ۳۰ روز یک‌بار
- کشتارگاه رتبه A: هر ۴۵ روز یک‌بار در صورت تولید مرغ رتبه A ، در غیر اینصورت هر ۳۰ روز
- کشتارگاه رتبه B: هر۳۰ روز یک‌بار

۶-۳-۲- کشتارگاههای صنعتی دام (بر اساس دستورالعمل نحوه صدور پروانه تاسیس و بهره برداری کشتارگاههای دام به شماره ۱-۴۴-۸۳):

- کشتارگاه الگوی یک: هر ۶۰ روز یک‌بار
- کشتارگاه الگوی دو: هر۳۰ روز یک‌بار

*توجه: در صورت مشاهده نتایج عدم انطباق در آزمایشات خود کنترلی بهداشتی فرآیند تولید، مالک/متصدی کشتارگاه موظف به اقدامات اصلاحی در فرآیند تولید تا حصول نتایج آزمایشگاهی منطبق با معیارهای میکروبی مندرج در این دستورالعمل می‌باشد.

٦-٤- مراحل (نقاط) نمونه برداری در خط تولید:

به منظور خود کنترلی بهداشتی فرآیند تولید (کشتار)، نمونه برداری در لاشه دام پس از انجام عملیات شستشوی لاشه و پیش از ورود لاشه به اتاق سرد (Chilling Room) و در لاشه طیور پس از خنک سازی انجام می‌پذیرد. در مواردی که نتایج آزمایشگاهی مطلوب نباشد به منظور ردیابی علل آلودگی لاشه در فرآیند کشتار، لازم است نسبت به نمونه برداری در مراحل مختلف فرآیند تولید (به شرح ذیل) اقدام نمایند:

- پس از مرحله شستشوی لاشه طیور و پیش از ورود به چیلرهای آبی
- پس از مرحله پوست کنی دام در کشتارگاه
- پس از تخلیه اندرونه لاشه های دام و طیور و پیش از مرحله شستشوی لاشه
- بلافاصله قبل از سرمادهی یا انجماد لاشه های دام و طیور
- بلافاصله پس از خروج لاشه های طیور از اتاق سرد
- پس از مرحله خنک سازی و یا انجماد لاشه های دام و طیور
- در اتاق سرد نگهداری لاشه های دام و طیور

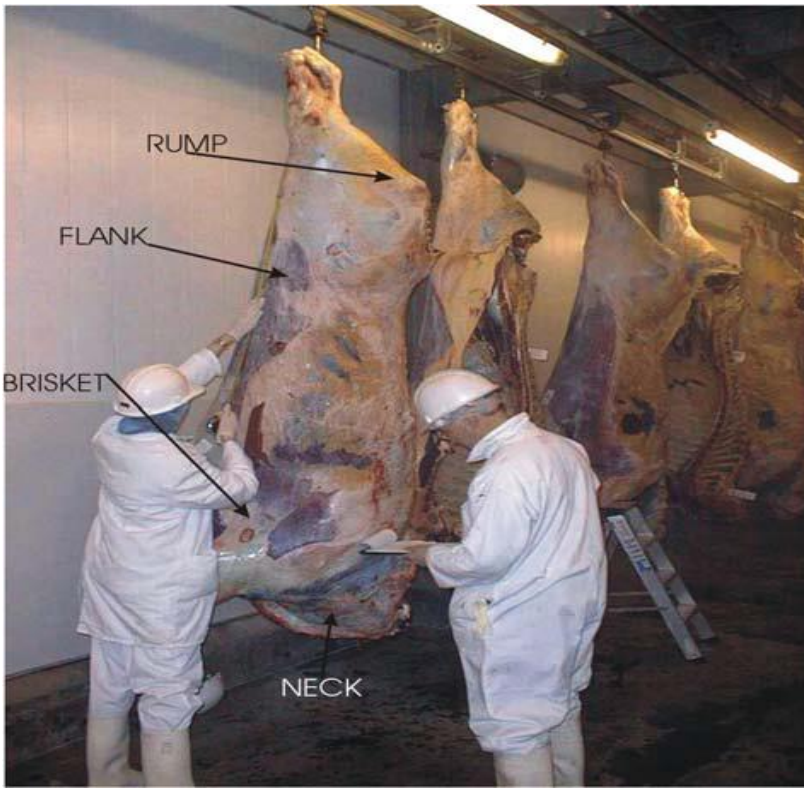
٦-٥- محل‌های نمونه برداری در لاشه:

برای هر گونه، نمونه ها باید از محل‌هایی برداشته شوند که بیشترین احتمال آلودگی را داشته باشند (تصاویر شماره ۱تا ۳ و پیوست شماره ۲) .

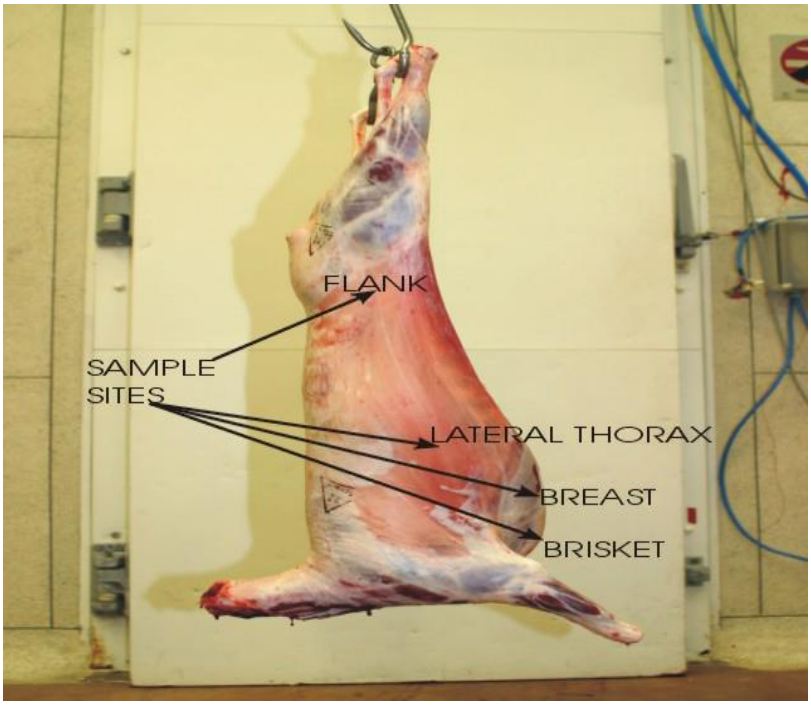
۶-۵-۱- دام:

هدف باید آزمایش محل‌هایی از لاشه با بیشترین میزان آلودگی باشد.

برای تشخیص تغییرات در الگوی مشاهدات در طول یک دوره زمانی، ثبات محل‌های نمونه برداری در طول زمان مهم است. روش‌های کشتار مورد استفاده، بر روی محل‌هایی که بیشترین میزان آلودگی را دارند تاثیر می‌گذارد.

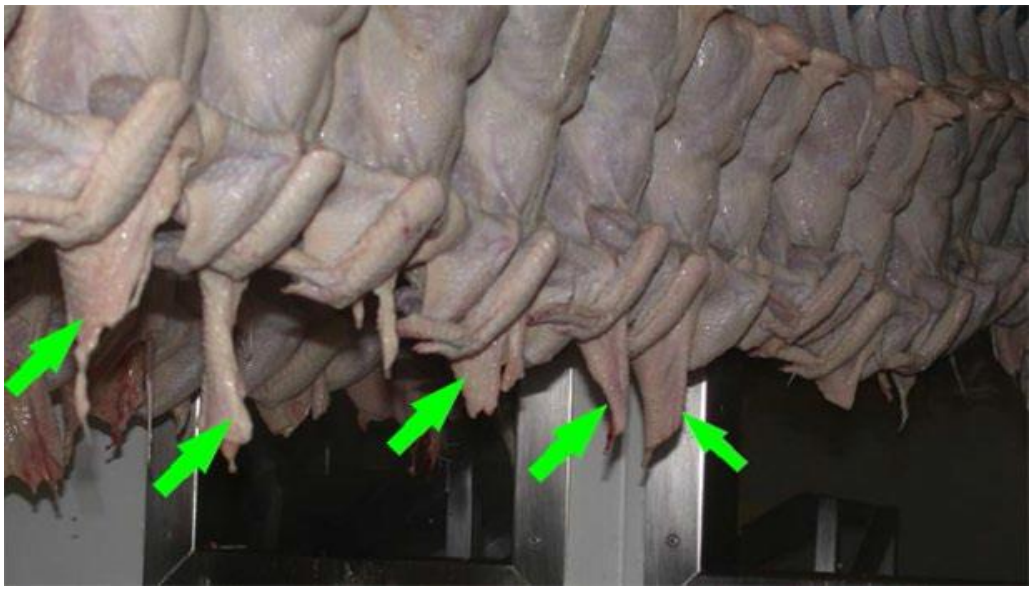


تصویر شماره ۱) محل های توصیه شده برای نمونه برداری از لاشه گاو



تصویر شماره ۲) محل های توصیه شده برای نمونه بردای از لاشه گوسفند

۶-۵-۲- طیور: از پوست گردن و در صورتی‌که وجود نداشته باشد معمولا" از پوست سینه نمونه‌برداری می‌شود.



تصویر شماره ۳) محل نمونه برداری از لاشه طیور (پوست گردن)

۶-۵-۳- شترمرغ: محل های نمونه برداری می تواند مشابه دام (بند ۶-۵-۱) باشد.

ماده ۷ – روش‌های نمونه برداری:

به طورکلی برای نمونه برداری می‌توان از دو روش زیر استفاده نمود:

الف) روش برشی (تخریبی)

ب) روش سواب‌برداری (غیر تخریبی)

وقتی از سطح لاشه نمونه برداری می شود، نتایج به صورت واحدهای تشکیل دهنده کلنی[۱] در هر سانتیمتر مربع (cfu/cm^2) بیان می‌شود و هنگامی که از پوست لاشه های طیور نمونه برداری می‌شود نتایج به صورت واحدهای تشکیل دهنده کلنی درهر گرم (cfu/g) بیان می‌شود.

***توجه:**

- در هر نوبت نمونه‌برداری برای اطمینان از قابل مقایسه بودن نتایج باید تنها از یکی از روش‌های نمونه‌برداری استفاده کرد.

-**تعدادی از** نمونه‌های اخذ شده از یک لاشه یا از چندین لاشه از محل نمونه برداری مشابه می‌تواند با همدیگر مخلوط شده تا یک نمونه ترکیبی بدست آید و نمونه مذکور برای بررسی به آزمایشگاه ارسال شود.

۷-۱- روش برشی یا تکه برداری (تخریبی):

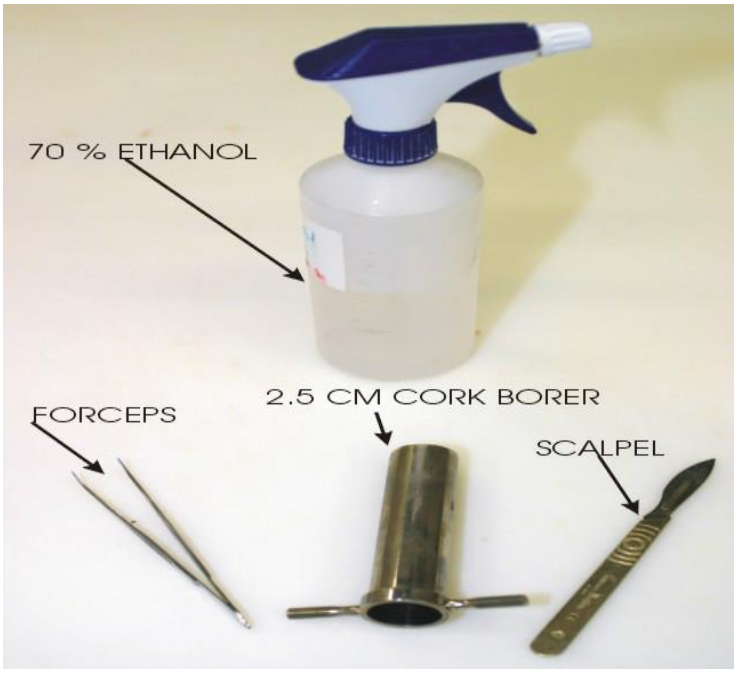
در این روش از سطح گوشت نمونه برداری می‌شود زیرا معمولا" بخش داخلی گوشت سترون می باشد (تصاویر شماره ۶ و ۷).

۷-۱-۱- مواد و لوازم (تصویر شماره ٤):

- اتانول ۷۰ درصد از نظر حجمی
- چاقوهای جراحی (اسکالپل‌های) استریل

[۱]. Colony Forming Unit (cfu)

- پنس‌های استریل
- تکه‌بردار[۱] استریل با سطح تکه‌برداری حداقل ۵ سانتی‌متر مربع (قطر قسمت تکه‌برداری ۲/۵ سانتی متر)
- قیچی‌های استریل
- گاز قابل حمل کوچک یا چراغ الکلی قابل حمل
- تنظیف یا پنبه
- کیسه‌های پلاستیکی استریل برای همگن ساز ضربه-ایی[۲] یا سونیک[۳] با اندازه ای متناسب با نمونه‌های برداشته شده و حجم رقیق کننده ای که افزوده می شود.



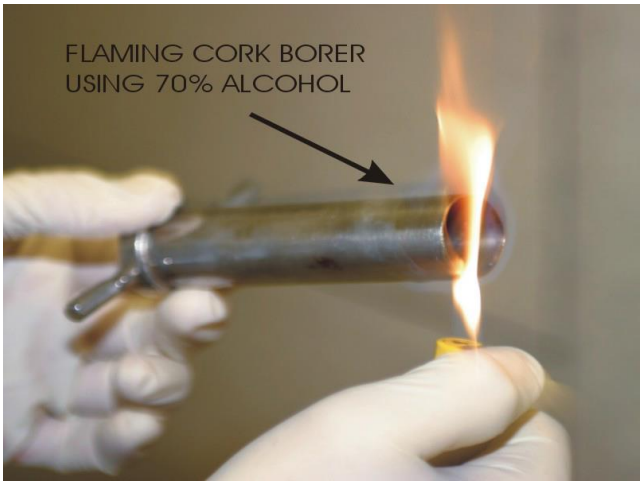
تصویر شماره ۴) قسمتی از وسایل مورد نیاز برای نمونه برداری از لاشه به روش برشی یا تکه برداری

۷-۱-۲- تمیز و استریل کردن لوازم:

هر نمونه باید با لوازم تمیز و استریل اخذ شود. استریلیزاسیون به‌طور مثال می‌تواند بوسیله اتوکلاو انجام شود. همچنین تجهیزات می‌توانند در حین نمونه برداری مورد استفاده مجدد قرار گیرند مشروط بر این که بین نمونه برداری به دقت تمیز و ضد عفونی شوند که می‌تواند به صورت زیر انجام شود:

- ابتدا تمیز و ضد عفونی نمودن کامل ابزار نمونه‌برداری با تنظیف یا پنبه آغشته به اتانول ۷۰ درصد و سپس غوطه‌وری ابزار در ظرف حاوی اتانول ۷۰ درصد
- سپس سوزاندن اتانول روی لوازم به کمک آتش (در صورتی که استفاده از آتش خطرناک باشد اجازه دهید تا اتانول به طور کامل تبخیر شود).
- اجازه دهید تا لوازم خنک شود.

۱. Cork borer
۲. peristaltic
۳. sonic



تصویر شماره ۵) استریل نمودن تکه بردار بوسیله الکل ۷۰ درصد

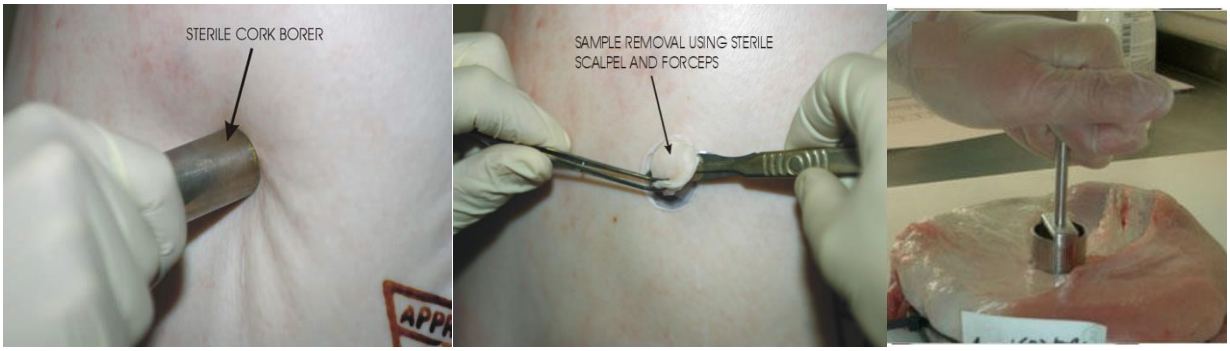
***توجه:**

– به واسطه زمان‌بر بودن تمیز و ضدعفونی کردن لوازم در هنگام نمونه‌برداری بهتر است چندین سری لوازم نمونه‌برداری استریل آماده داشته باشید یا از لوازم استریل یک بار مصرف (مثل تیغه استریل اسکالپل) استفاده کنید.

– اگر نمونه‌ها باهم مخلوط می‌شوند لازم نیست که بین اخذ نمونه‌ها لوازم را تمیز و ضدعفونی نمایید.

۷-۱-۳- نحوه جمع‌آوری نمونه‌ها:

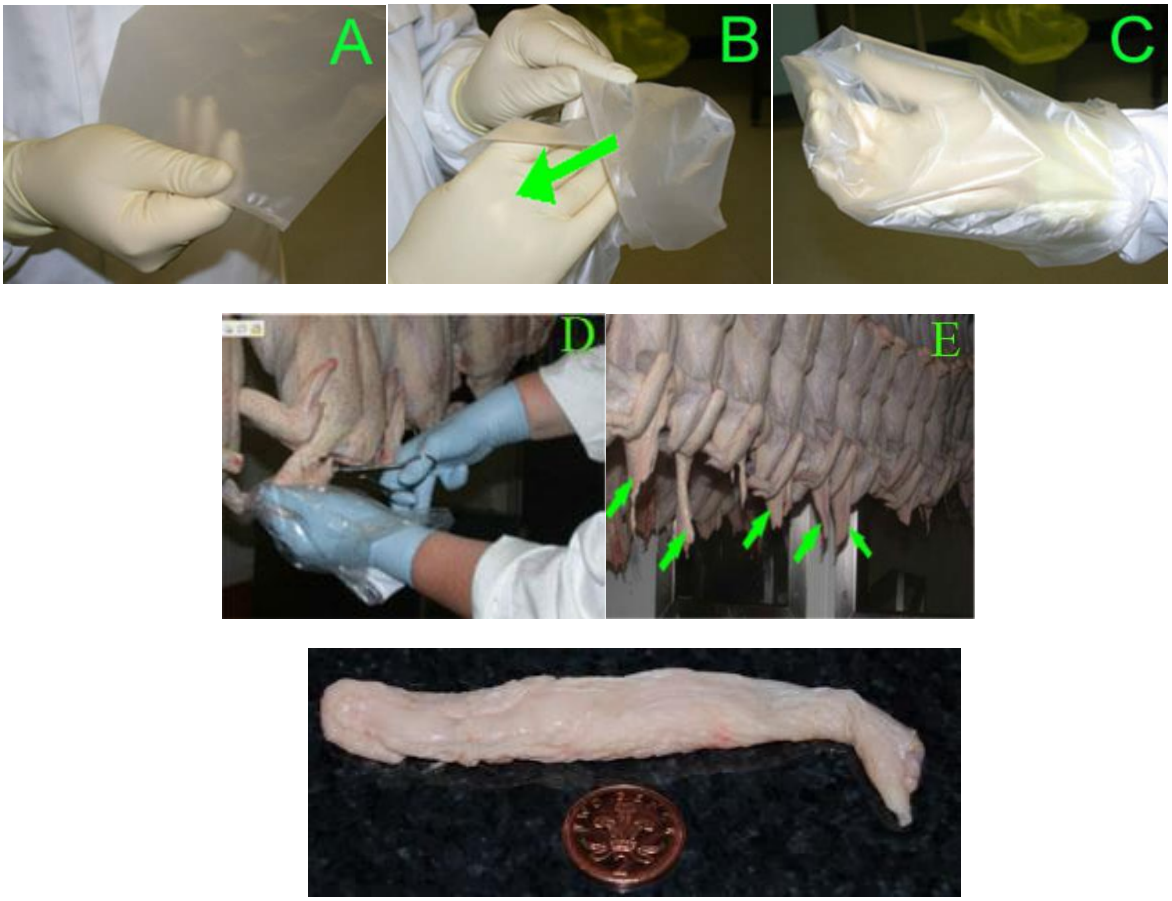
- برای نمونه برداری با دستگاه تکه‌بردار (تصویر شماره ۶) پس از تعیین محل‌های اخذ نمونه در لاشه، دستگاه تکه بردار را روی محل نمونه برداری قرار داده و قسمت گرد نمونه‌برداری شده بافت (با ضخامت تقریبی ۲ میلی متر) را با کمک پنس گرفته و با اسکالپل یا قیچی استریل بریده و از لاشه جدا و سپس نمونه داخل کیسه پلاستیکی استریل برچسب‌گذاری شده، قرار داده شود.



تصویر شماره ۶) نحوه نمونه برداری با دستگاه تکه بردار (روش برشی یا تخریبی)

- برای نمونه برداری از پوست گردن طیور (به صورت انفرادی یا نمونه مخلوط)، ابتدا یک کیسه پلاستیک استریل برداشته و آن را از درز پایین محکم در دست گرفته بدون تماس باسطح داخلی استریل آن، در کیسه را بازکرده و برعکس نموده تا سطح داخلی کیسه به سمت بیرون قرار گیرد. پوست گردن لاشه را با استفاده از کیسه محکم گرفته و هر چه سریع‌تر آن را با

استفاده از اسکالپل یا قیچی استریل بریده و قطع کنید. نمونه را وزن کنید (یک پوست گردن معمولاً حدود ۱۰ گرم وزن دارد). در صورت لزوم باید چندین نمونه پوست گردن در یک کیسه قرار گیرد تا وزن دلخواه نمونه حاصل شود (تصویر شماره ۷).



تصویر شماره ۷) مراحل نمونه برداری از پوست گردن در لاشه طیور

۷-۲- روش‌های سواب برداری:

روش سواب برداری روش غیرتخریبی است که معمولا" برای نمونه‌برداری از سطوح پهن‌تر لاشه با استفاده از سواپ، تامپون یا اسفنج انجام شود که بسته به شرایط و محل مورد آزمون انتخاب می‌شود.

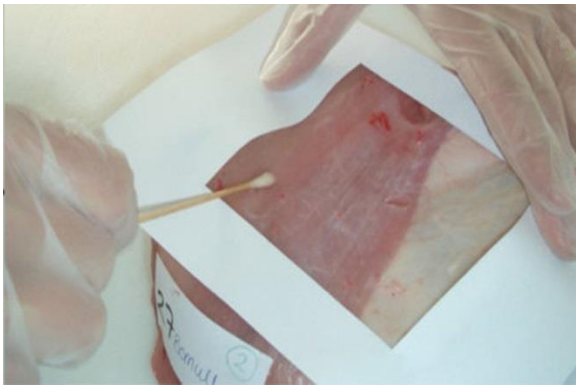
۷-۲-۱- روش سواب چوبی خشک و مرطوب:

۷-۲-۱-۱- مواد و لوازم:

- رقیق کننده استریل برای استفاده عمومی (براساس استاندارد ISO ۶۸۸۷-۱) توزیع شده در مقادیر ۱۰ml در لوله ها یا بطری‌ها.
- سواب پنبه‌ای استریل با دسته چوبی: اندازه سواب به محل سواب برداری بستگی دارد. بطور مثال از سواب کوچک برای سواب کشی ۱۰cm^2 و سواب بزرگ برای سواب کشی ۵۰cm^2 برای سواب برداری از لاشه دام
- شابلون‌های مربع استریل از جنس پلاستیک یا فلز: برای تعیین محل نمونه‌بردای استفاده می‌شوند مثلاً ۵۰cm^2 یا بزرگتر

۷-۲-۱-۲- نحوه جمع آوری نمونه ها:

سواب را در ۱۰ میلی لیتر رقیق‌کننده خیس نمایید. در محل انتخاب شده برای نمونه‌برداری لاشه، شابلون را محکم روی سطح فشار دهید. سپس سواب را در تمام سطح با فشار و حداقل آن را در دو جهت مالش دهید به طور مثال اول افقی و بعد عمودی و حداقل ۱۰ بار در هر سمت. پس از آن سواب را داخل لوله یا شیشه حاوی رقیق‌کننده قرارداده انتهای چوب آن را بشکنید. سپس برای جذب مایع باقیمانده از سواب مرطوب، با یک سواب خشک با استفاده از روش فوق دوباره از همان ناحیه نمونه برداری کرده و این سواب را نیز در همان لوله یا شیشه رقیق‌کننده با شکستن انتهای چوب آن، قرار دهید.
شابلون‌ها را می‌توان به مشابه روش قبلی تمیز و ضد عفونی کرده و دوباره استفاده نمود ولی در مورد شابلون‌های پلاستیکی نمی‌توان از روش سوزاندن (شعله دادن) برای این امر استفاده نمود (تصویر شمار ۸).



تصویر شماره ۸) روش نمونه برداری سواب چوبی خشک و مرطوب[۱]

۷-۲-۲- روش اسفنج/ سواب تامپونی:

از اسفنج ها و سواب‌های تامپونی (تصاویر شماره ۹ و۱۰ و ۱۱) برای نمونه‌برداری از محل‌های پهن‌تر استفاده می‌شود.

۷-۲-۲-۱- مواد و لوازم:

- رقیق کننده استریل برای استفاده عمومی (براساس استاندارد ISO ۶۸۸۷-۱)
- اسفنج نمونه‌گیری استریل (عاری از مواد ممانعت‌کننده از رشد میکروب‌ها) ۲۵ تا ۵۰ سانتی متر مکعب در کیسه پلاستیکی استریل. اسفنج سلولزی بزرگ نیز می‌تواند مناسب برای این امر باشد.
- سواب تامپون استریل: از سواب پارچه‌ای جاذب بزرگ با لایه‌های چند تایی توری یا پنبه‌ای که داخل پارچه توری[۲] پیچیده شده، تشکیل می شوند. حوله بهداشتی یا تامپون (عاری از مواد ضد میکروبی) که به همین شکل ساخته شده است، اغلب مورد استفاده قرار می‌گیرد.
- کیسه های پلاستیکی استریل برای دستگاه همگن‌کننده از نوع ضربه ایی[۳] یا سونیک
- شابلون استریل با سطح داخلی توخالی حداقل ۱۰۰cm^2
- دستکش استریل

---

۱. Wet-dry double swab
۲. Gauze
۳. Peristaltic.

تصویر شماره ۹) نمونه ای از اسفنج‌های نمونه برداری

تصویر شماره ۱۰) نمونه برداری با گاز استریل[۱]

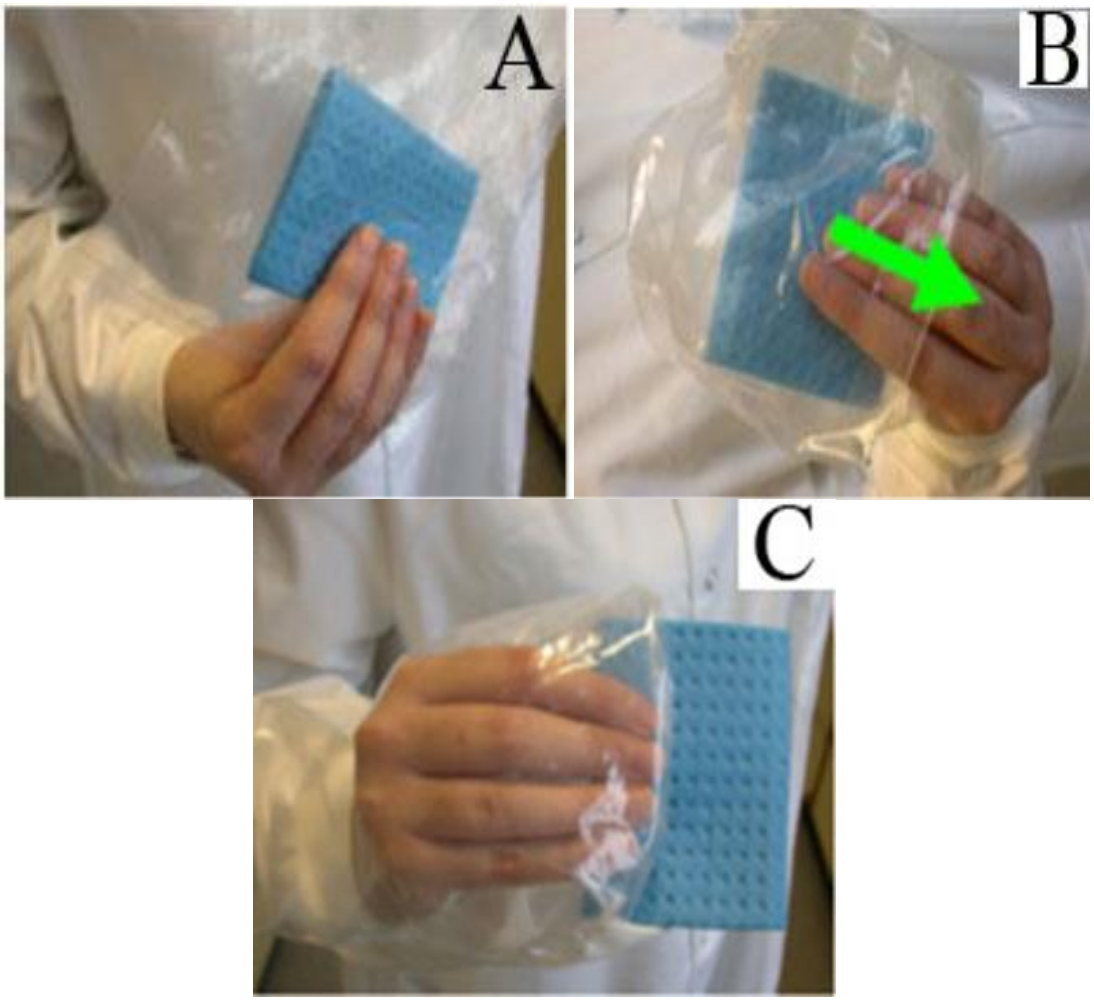
تصویر شماره ۱۱) نمونه برداری با سواب اسفنجی[۲]

۷-۲-۲-۲- نحوه جمع آوری نمونه ها:

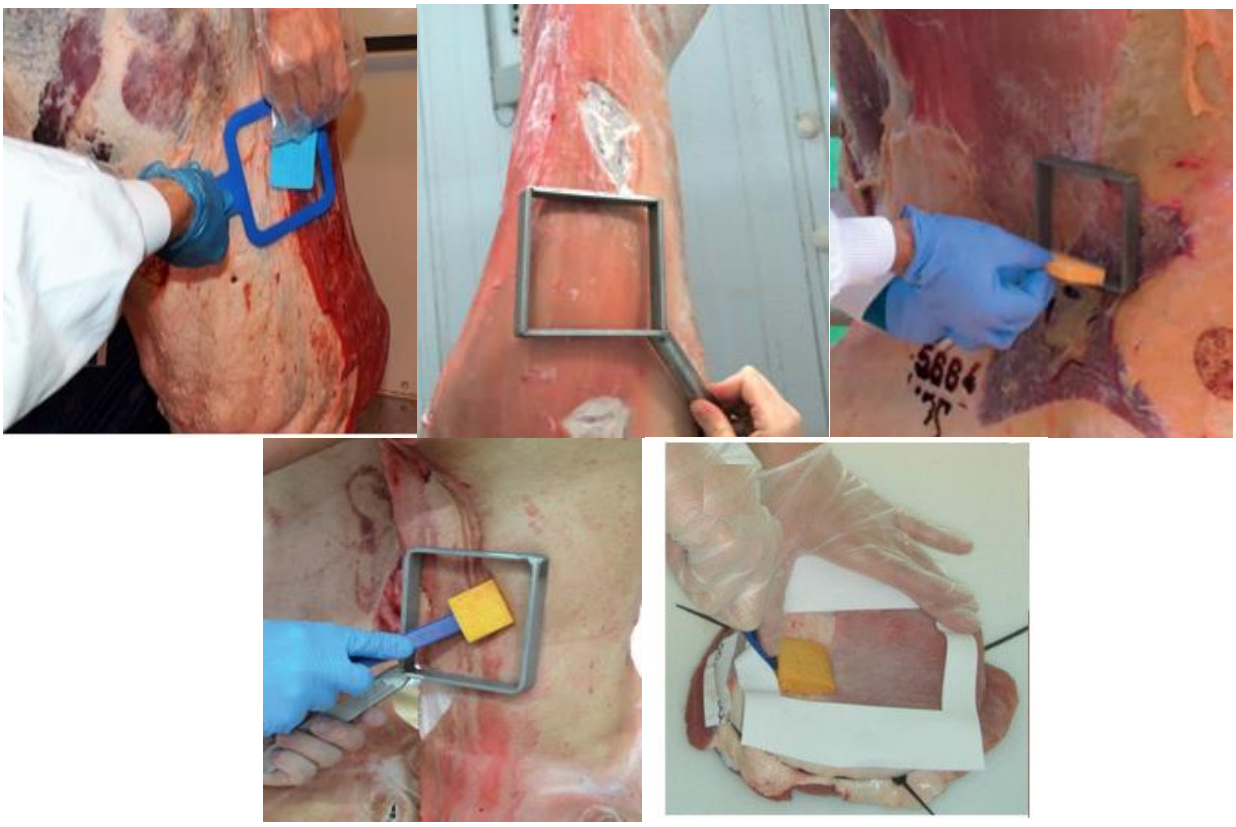
در مراحل (نقاط) نمونه‌گیری، درب کیسه پلاستیکی که حاوی اسفنج استریل یا سواب تامپون استریل است را باز کرده و به مقدار کافی به آن رقیق‌کننده از حجم معین رقیق‌کننده بیفزایید. این حجم مثلاً ۲۵ میلی لیتر یا ۱۰۰ میلی لیتر است و مقداری از آن را

۱. Gauze cloth swab
۲. Sponge swab

به اسفنج اضافه می‌کنیم تا اسفنج یا سواب تامپون را مرطوب نماید به گونه‌ای که فاقد مایع اضافی مشخصی باشد. اسفنج یا سواب تامپون را از طرف خارج کیسه ماساژ دهید تا کاملاً آغشته به رقیق‌کننده شود. شابلون را در محل نمونه‌برداری قراردهید. از کیسه به‌عنوان دستکش استفاده کرده و به گونه‌ای آن را بگیرد که سطح داخلی آن با اسفنج یا تامپون در تماس باشد مانند حالتی که پوست گردن طیور را می‌گرفتید یا از یک جفت دستکش استریل برای کشیدن اسفنج یا سواب تامپون به محل نمونه‌برداری استفاده کنید. نمونه‌برداری را بوسیله مالش اسفنج استریل یا سواب تامپون استریل حداقل در دو مسیر متفاوت به طور مثال اول افقی و سپس عمودی حداقل۱۰ بار در هر مسیر انجام دهید. پس از سواب‌برداری، اسفنج یا سواب تامپون را به داخل کیسه پلاستیکی برگردانده و مابقی رقیق‌کننده را به آن اضافه کنید. شابلون ممکن است پس از تمیز و استریل کردن مجدداً استفاده شود (تصاویر شماره ۱۲ و ۱۳).



تصویر شماره ۱۲) نحوه برگرداندن کیسه پلاستیکی و استفاده از آن به عنوان دستکش



تصویر شماره ۱۳) روش اسفنج/ سواب تامپونی در نمونه برداری از لاشه دام

ماده ۸- مقررات نمونه‌برداری:

۸-۱- نمونه برداری از لاشه دام:

- در هر نوبت نمونه‌برداری باید از پنج لاشه به صورت تصادفی، نمونه‌گیری انجام شود.
- محل‌های نمونه‌برداری براساس تکنولوژی (فناوری) کشتار مورد استفاده در هر کشتارگاه انتخاب می‌شوند.
- زمانی که برای آزمایش آنتروباکتریاسه و شمارش کلی میکروبی نمونه‌برداری می‌شود:

۱- باید از چهار محل در هر لاشه نمونه‌برداری شود.

۲- در روش تخریبی، چهار نمونه بافتی با سطح کلی $۲۰cm^۲$ باید نمونه‌برداری شود. با توجه به قطر تکه بردار که ۲.۵ cm است مساحت هر نمونه بافتی برداشتی حدود $۵ cm^۲$ و در نتیجه چهار نمونه، $۲۰cm^۲$ خواهد بود.

۳- در روش غیر تخریبی محل نمونه‌برداری باید حداقل $۱۰۰cm^۲$ برای لاشه گاو و $۵۰cm^۲$ برای لاشه گوسفند و بز در هر ناحیه نمونه‌برداری باشد (جمع کل محل‌های نمونه‌برداری در لاشه گاوی۴۰۰ سانتی متر مربع و در لاشه گوسفند و بز ۲۰۰ سانتی متر مربع).

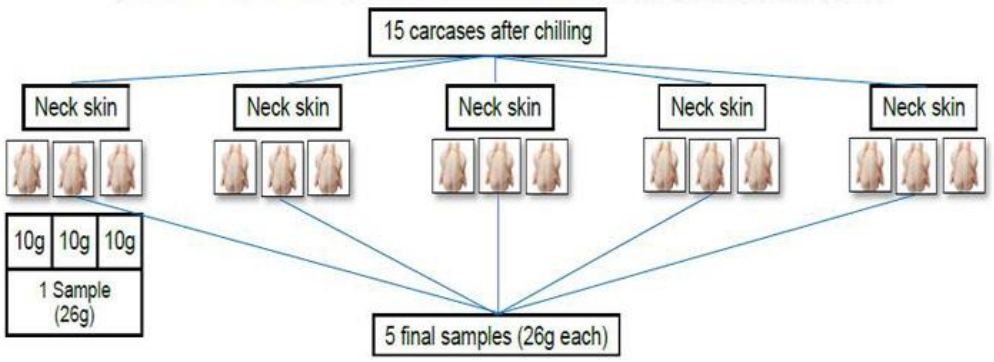
- برای نمونه برداری به منظور بررسی وضعیت سالمونلا در لاشه دام، باید از نمونه‌برداری با روش اسفنج ساینده استفاده شود. محل‌ها با بیشترین احتمال آلودگی باید نمونه‌برداری شوند. کل محل نمونه‌برداری باید حداقل ۴۰۰ سانتی متر مربع را پوشش دهد.

- وقتی نمونه‌ها از محل‌های نمونه‌برداری متفاوتی از یک لاشه نمونه‌گیری می‌شوند، نمونه‌ها باید پیش از آزمایش باهم مخلوط شوند.

۸-۲- مقررات نمونه برداری از لاشه طیور:

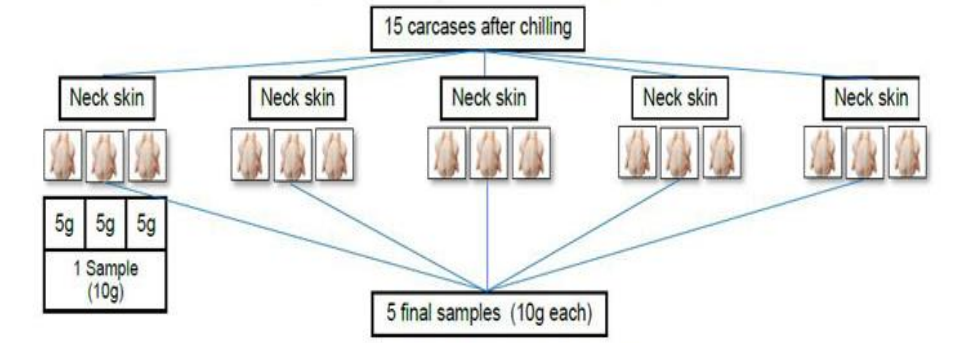
- کشتارگاه‌ها باید برای آزمایش سالمونلا و کمپیلوباکتر از لاشه‌های طیور که پوست گردن دارند، نمونه بگیرند.
- نمونه‌برداری برای خودکنترلی بهداشتی فرآیند تولید در کشتارگاه باید لاشه‌های طیور گله‌هایی که وضعیت سالمونلای آنها نامشخص است یا نتایج آزمایش گله از نظر سالمونلا انتریتیدیس[۱] یا سالمونلا تیفی موریوم[۲] یا مثبت است را در برگیرد.
- زمانی که آزمایش برای معیارهای بهداشتی فرآیند کشتار برای سالمونلا و کمپیلوباکتر در لاشه‌های طیور در کشتارگاه‌ها مد نظر است و آزمایش‌ها برای سالمونلا و کمپیوباکتر در یک آزمایشگاه انجام می‌شود، باید پوست گردن حداقل ۱۵ لاشه طیور (پنج سری سه تایی مطابق تصویر شماره ۱۴) به صورت تصادفی پس از خنک سازی در هر نوبت، نمونه‌گیری شود. پیش از آزمایش نمونه‌های پوست گردن، حداقل سه لاشه طیور از یک گله باید به عنوان یک نمونه ۲۶ گرمی در ظرف نمونه برداری با هم جمع شود. بنابراین نمونه‌های پوست نهایتاً ایجاد ۵ نمونه ۲۶ گرمی می‌کنند.
- در صورتی که هدف از نمونه برداری صرفا" آزمایش کمپیلوباکتر باشد، نحوه نمونه برداری از لاشه طیور در کشتارگاه مطابق تصویر شماره ۱۵ عمل شود.
- وقتی آزمایش بررسی معیارهای بهداشتی فرایند در مورد سالمونلا و کمپیلوباکتر در لاشه طیور در کشتارگاه‌ها، در دو آزمایشگاه مختلف انجام می‌شود، پوست گردن حداقل ۲۰ لاشه طیور باید به صورت تصادفی پس از خنک سازی در هر نوبت نمونه‌برداری، نمونه‌گیری شود .

پیش از آزمایش نمونه‌های پوست گردن حداقل ۴ لاشه طیور از یک گله باید به عنوان یک نمونه ۳۵ گرمی با هم جمع شوند. سپس از ۵ نمونه پوست گردن ۳۵ گرمی، ۵ نمونه نهایی ۲۵ گرمی (برای آزمایش سالمونلا) و۵ نمونه نهایی۱۰ گرمی (برای آزمایش کمپیلوباکتر) تهیه کنیم.(تصویر شماره ۱۶)

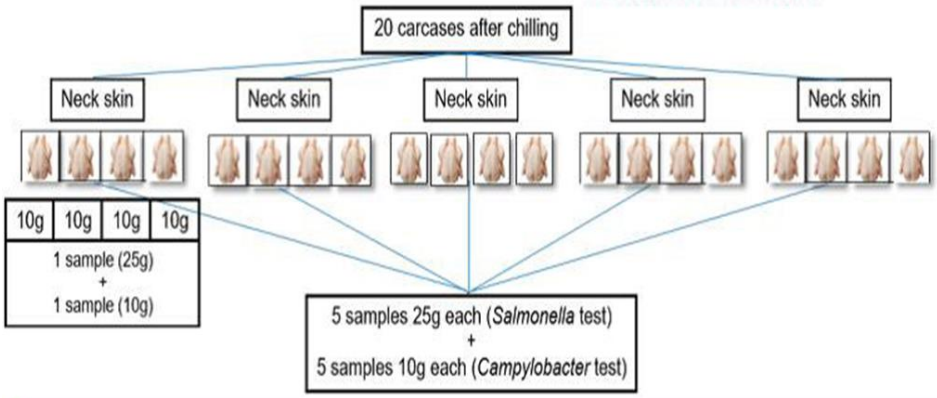


تصویر شماره ۱۴) نحوه نمونه برداری از لاشه طیور در کشتارگاه، وقتی هر دو آزمایش سالمونلا و کمپیلوباکتر در یک آزمایشگاه انجام می شود.

۱. Salmonella Enteritidis
۲. Salmonella Typhimurium



تصویر شماره ۱۵) نحوه نمونه برداری از لاشه طیور در کشتارگاه، وقتی صرفا" هدف از نمونه برداری آزمایش کمپیلوباکتر باشد.



تصویر شماره ۱۶) نحوه نمونه برداری از لاشه طیور در کشتارگاه، وقتی آزمایش سالمونلا و کمپیلوباکتردر دو آزمایشگاه مختلف انجام می شود.

ماده ۹- آماده سازی نمونه‌های مورد آزمایش:

به منظور تهیه سوسپانسیون اولیه در آزمایشگاه به ۲۶ گرم نمونه باید حجم ۹ برابر (۲۳۴میلی لیتر) بافر آب پپتونه اضافه شود. آب پپتونه پیش از اضافه شدن باید در دمای اتاق قرارداده شود. نمونه مخلوط جهت آماده شدن باید در استومیکر[۱] برای تقریباً یک دقیقه قرار داده شود. باید با خارج کردن هوا از کیسه استومیکر از ایجاد کف ممانعت کرد.

۱۰ میلی لیتر (معادل ۱ گرم) از این سوسپانسیون اولیه باید به یک لوله استریل خالی منتقل شود و ۱ میلی لیتر از این ۱۰ میلی لیتر برای شمارش کمپیلوباکتردر محیط انتخابی استفاده کرد.

باقی مانده این سوسپاسیون اولیه (۲۵۰ میلی لیتر معادل ۲۵ گرم) باید برای تشخیص سالمونلا استفاده شود.

ماده ۱۰- نگهداری و حمل و نقل نمونه:

رعایت موارد زیر در نگهداری و حمل و نقل نمونه الزامی است:

- نمونه‌ها را باید در ظروف خنک عایق‌دار حاوی قالب‌های یخ، یخ خردشده و یا در شرایط یخچالی حمل نمود.
- از انجماد نمونه‌ها یا تماس مستقیم نمونه‌ها با قالب‌های یخ باید جلوگیری شود.

[۱] Stomaker

- دمای ۱ تا ۸ درجه سانتی‌گراد باید در طول مدت زمان حمل و نقل حفظ شود.
- نمونه‌ها باید دراولین فرصت ممکن پس از دریافت آن توسط آزمایشگاه، مورد آزمون قرار گیرد در غیر این صورت نمونه‌ها را باید در دمای بین ۲±۳ درجه سانتی‌گراد برای حداکثر ۲۴ ساعت نگهداری نمود.
- نمونه‌هایی که دمای آن‌ها به صفر درجه سانتی گراد می‌رسد برای آزمون کمپیلوباکتر نباید مورد استفاده قرار گیرند.

ماده ۱۱- آزمایش‌های میکروبی:

برای اطلاع از قواعد کلی آزمون های میکروبیولوژی به استاندارد ISO ۷۲۱۸ مراجعه شود.

۱۱-۱- آماده سازی اولیه نمونه‌ها:

وقتی نمونه‌برداری با استفاده از انواع مختلف سواب انجام می‌شود میکروب‌ها باید از سواب جدا شوند و این کار بوسیله افزودن حجم مناسب مایع (رقیق‌کننده، محیط کشت مایع یا محیط کشت غنی کننده) و تکان‌ها یا ماساژ سواپ داخل کیسه پلاستیکی انجام می‌شود.

- ۱۱-۱-۱- روش‌های سواب‌برداری (سواب کشی): جهت اطلاع از دستورالعمل‌های کلی آماده سازی و محاسبه برای سواب ها به استاندارد ISO ۱۸۵۹۳ مراجعه نمایید.
- ۱۱-۱-۱-۱- روش سواب مرطوب / سواب خشک: قبل از رقیق سازی و کشت طبق استاندارد ISO ۶۸۸۷-۱ ، آزاد سازی میکروب‌ها از این دوسواب به داخل رقیق‌کننده بوسیله همزدن در مخلوط کن نوع Vortex(حالت گردابی) صورت می-پذیرد.
- ۱۱-۱-۱-۲- روش اسفنج و سواب تامپونی: قبل از رقیق سازی و کشت طبق استاندارد ISO ۶۸۸۷-۱ ، کیسه حاوی اسفنج یا سواب تامپونی و رقیق‌کننده به مدت یک دقیقه در همگن‌کننده ضربه ایی (پریستالتیک) یا به مدت ۳۰ ثانیه در همگن ساز با حرکت افقی قرار می‌گیرد.
- ۱۱-۱-۲- روش برشی: آماده سازی نمونه‌ها باید بر اساس ISO ۶۸۸۷-۲ انجام شود. برای شناسایی تعداد کم میکروب‌ها، بهتر است سوسپانسیون اولیه در نسبت پایین‌تر به‌طور مثال ۱ به ۱ (۱در۲) یا ۱ به ۴ (۱در ۵) به جای روش معمول ۱ به ۹ (۱در۱۰) انجام شود.

۱۱-۲- شناسایی و شمارش میکروب‌ها:

شناسایی و شمارش میکروب‌ها باید بر طبق روش‌های مرتبط انجام گیرد. نتایج کمی نمونه‌های حاصل با روش برشی یا سواب - برداری باید به عنوان تعداد واحد تشکیل دهنده کلنی در هر سانتی متر مربع (cfu/cm^2) بیان شوند. به غیر از نتایج حاصل از پوست گردن طیور که می‌تواند به عنوان (cfu/gr) بیان شود.

در مورد روش‌های غنی‌سازی، گزارش میکروب هدف به عنوان حضور یا عدم حضور در محل مورد آزمایش یا در لاشه آزمایش شده عنوان می‌شود.

ماده ۱۲- معیارهای بهداشتی فرایند کشتار: مطابق جدول شماره ۱

جدول (۱) معیارهای بهداشتی فرایند کشتار

	آزمون	تعداد نمونه	C	روش مرجع آزمون	m	M	مرحله نمونه برداری در خط تولید
لاشه دام	شمارش کلی میکروب های هوازی	۵		ISO ٤٨٣٣-١	۳.۵ log cfu/ cm^2 لگاریتم متوسط روزانه	۵ log cfu/ cm^2 لگاریتم متوسط روزانه	لاشه پس از تخلیه اندرونه و پیش از اتاق سرد
	آنتروباکتریاسه	۵		ISO ٢١٥٢٨-٢	۱.۵ log cfu/ cm^2 لگاریتم متوسط روزانه	۲.۵ log cfu/ cm^2 لگاریتم متوسط روزانه	لاشه پس از تخلیه اندرونه و پیش از اتاق سرد
	سالمونلا	۵۰*	۵**	ISO ٦٥٧٩-١	عدم حضور در محل آزمایش شده هر لاشه		لاشه پس از تخلیه اندرونه و پیش از اتاق سرد
لاشه طیور	سالمونلا	۵۰*	۱۰**	ISO ٦٥٧٩-١	عدم حضور در ۲۵ گرم نمونه کلی پوست گردن		لاشه پس از خنک سازی
	کمپیلو باکتر	۵۰*	۱۵	ISO ١٠٢٧٢-٢	۱×۱۰^3 Cfu/gr		لاشه پس ازخنک سازی

(*) ۵۰ نمونه باید از ۱۰ سری نمونه‌برداری متوالی، براساس این دستورالعمل در نظر گرفته شود.

(**) تعداد نمونه‌هایی که سالمونلا در آن شناسایی شده است.

در مورد آنتروباکتریاسه و شمارش کلی میکروب های هوازی در لاشه دام:

- مطلوب: اگر لگاریتم متوسط روزانه کمتر یا مساوی m باشد.
- قابل قبول: اگر لگاریتم متوسط روزانه بیش از m و کمتر یا مساوی M باشد.
- نامطلوب: اگر لگاریتم متوسط روزانه بیش از M باشد.

در مورد سالمونلا در لاشه دام و طیور:

پس از هر نوبت نمونه گیری نتایج ۱۰ نوبت نمونه برداری آخر باید ارزیابی شود.

- مطلوب: اگر حضور سالمونلای شناسایی شده حداکثر c/n نمونه‌ها باشد.
- نامطلوب: اگرحضورسالمونلای شناسایی شده بیش از c/n نمونه‌هاباشد.

در مورد کمپیلو باکتر در لاشه طیور:

- مطلوب: اگر حداکثر c/n کمتر از M باشد.
- نامطلوب: اگرمیزان c/n بیش از M باشد.

*نمونه هایی از اقدامات اصلاحی که باید در موارد نتایج نامطلوب (عدم انطباق) انجام گیرد:

- ارزیابی بهداشت و نظافت حیوانات کشتاری

- بهبود بهداشت کشتار و بررسی کنترل‌های فرایند کشتار
- بهبود و ارتقاء دستورالعمل‌های کاری در قالب نظام نامه HACCP واحد
- آموزش مجدد پرسنل
- بررسی مواد تمیز کننده و ضدعفونی کننده و تجهیزات و وسایل مربوط به نظافت و ضد عفونی مورد استفاده درکشتارگاه
- افزایش نظارت بر فرآیند تولید
- کنترل سلامت دام/طیور کشتاری
- اقدامات امنیت زیستی در دامداری/مرغداری

ماده ۱۳- ضمائم:

پیوست شماره ۱: مثال در مورد شمارش کلی میکروبهای هوازی

در صورتی که با روش برشی اقدام به نمونه برداری کرده باشید نتایج به صورت cfu/cm^2 برای نمونه های مخلوط شده برای هر لاشه از فرمول زیر بدست می‌آید:

$$cfu/cm^2 = \frac{\text{میانگین cfu/plate} \times \text{(ml) حجم سوسپانسیون اولیه}}{\text{B ((تعداد برش) ۴ × مساحت قسمت تکه برداری شده به سانتی متر مربع)× ضریب رقت}}$$

در صورتی که حجم سوسپانسیون اولیه استفاده شده ml ۱۰۰ باشد و از رقت $۱۰^{-۱}$ کشت انجام شده باشد و با توجه به اینکه از تکه بردار با قطر ۲/۵ سانتی متر استفاده شده است مساحت قسمت برش داده شده حدود ۵ سانتی متر مربع خواهد بود . اگر تعداد کلنی شمارش شده در پلیت کشت ۶۵ عدد باشد :

$$cfu/cm^2 = \frac{۶۵ \times ۱۰۰}{۲۰ \times ۱۰^{-۱}}$$

درنتیجه $cfu/cm^2 = ۳۲۵۰$

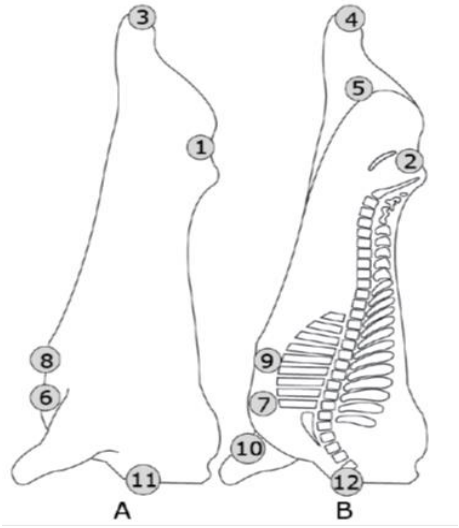
در صورتی که برای چهار لاشه دیگر به طور مثال نتایج ۱۵۰۰۰۰ ، ۵۰۰۰، ۳۵۰۰۰، ۴۵۰۰ بدست آمده باشد Mean Log به روش زیر محاسبه میگردد :

شماره لاشه	تعداد کلنی شمارش شده (cfu/cm^2)	(log ۱۰)
۱	۳۲۵۰	۳,۵
۲	۱۵۰۰۰۰	۵,۲
۳	۵۰۰۰	۳,۷
۴	۳۵۰۰۰	۴,۵
۵	۴۵۰۰	۳,۶
میانگین حسابی		۴,۱
Mean log	(لگاریتم متوسط روزانه)	۴,۱

در این مثال با توجه به اینکه لگاریتم متوسط روزانه (۴,۱) بیشتر از m و کمتر از M است نتیجه قابل قبول میباشد .

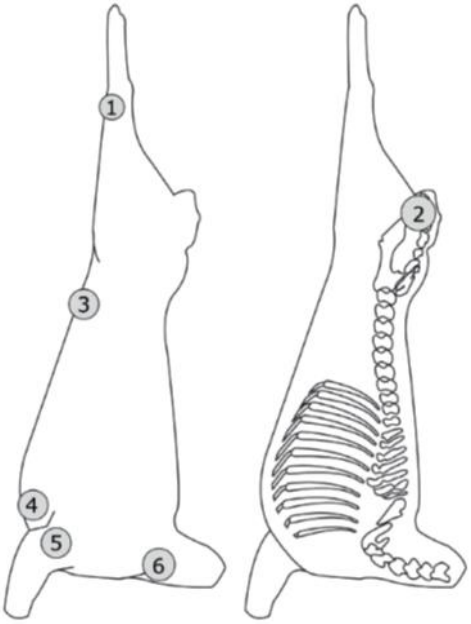
پیوست شماره ۲: محل‌های نمونه‌برداری بر روی لاشه گاو و گوسفند

تصویر شماره ۱۷) مثال‌هایی از محل‌های نمونه‌برداری لاشه گاوی (چپ = قسمت خارجی، راست = قسمت داخلی)



۱. بخش داخلی کانال لگن
۲. بخش خارجی کانال لگن
۳. بخش خارجی مفصل خرگوشی (hock)
۴. بخش داخلی مفصل خرگوشی (hock)
۵. بخش داخلی ران
۶. بخش خارجی جناغ سینه
۷. بخش داخلی جناغ سینه
۸. بخش خارجی زائده خنجری (xiphoid)
۹. بخش داخلی زائده خنجری (xiphoid)
۱۰. بخش داخلی اندام حرکتی قدامی
۱۱. بخش داخلی ناحیه اطلسی پس سری
۱۲. بخش خارجی ناحیه اطلسی پس سری

تصویر شماره ۱۸) مثال‌هایی از محل‌های نمونه‌برداری لاشه گوسفندی(چپ = قسمت خارجی، راست = قسمت داخلی)



۱. جهت خارجی زانو
۲. داخل کانال لگنی
۳. بخش خارجی شکم
۴. بخش خارجی قسمت قدامی جناغ
۵. جهت خارجی آرنج و اندام حرکتی قدامی
۶. گردن ، بخش خارجی منطقه پیش کتفی