

**راهنمای سریع کنترل میکروبیولوژی  
مواد غذایی ، آشامیدنی ، آرایشی و بهداشتی**

**شامل روش های آزمون روتین**

**دکتر ناهید رحیمی فرد**  
دکترای تخصصی میکروبیشناسی  
عضو هیئت علمی وزارت بهداشت ، درمان و آموزش پزشکی  
اداره کل آزمایشگاه های کنترل غذا و دارو  
بهار 1387

## قوانین شروع کار:

قبل از شروع به کار در آزمایشگاه توجه به قوانین زیر ضروری است:

- 1** در کلیه روش های ذکر شده انجام تمامی عملیات باید در شرایط استریل و بسته با رعایت دقیق نکات ایمنی و به کار بردن تجهیزات و لوازم مناسب برای آزمایشگاه میکروبیولوژی (طبق استاندارد ملی ایران سال 1386 به شماره 9899 جایگزین استاندارد ملی 2747 و 2325) از نظر عدم آلوده ساختن نمونه بطور ثانوی و جلوگیری از آلوده شدن احتمالی فرد آزمایش کننده صورت گیرد.
- 2** روش ها با استفاده از منابع متعدد تحریر شده اند و سعی شده است کامل ترین و دقیق ترین روش برای هر قسمت ارائه شود و در عین حال در صورت وجود استاندارد ملی در آن زمینه، سعی شده است که ویژگی های ذکر شده در استاندارد مربوطه عینا آورده شود و تنها جهت افزایش حساسیت و دقت آزمون، روش بصورت علمی تکمیل تر شده باشد و یا ویژگی هایی که از نظر سلامت فرآورده برای مصرف کننده، براساس منابع علمی، اهمیت خاص داشته اند، با قید نظر کارشناسی افزوده شده اند.
- در انتهای هر روش، در صورت وجود استاندارد ملی ایران در آن زمینه، شماره استاندارد، جهت آگاهی بیشتر و یا مقایسه ذکر شده است.
- 3** محیط های کشت در تمام روشها، باید طبق دستورالعمل سازنده ساخته و اتوکلاوشوند، سپس مورد استفاده قرار گیرند. در روش پورپلایت، محیط های جامد استریل را بایستی قبل از استفاده با قرار دادن در حمام آب گرم (بن ماری) به دمای 45 درجه سلسیوس رسانند.
- 4** در روشهای شمارش، رقت سازی نمونه و استفاده از رقت های اعشاری، باید براساس حد مجاز میکروارگانیزم مورد نظر در نمونه ساخته شود و آخرین رقت نمونه بایستی مقدار حدمجاز را دربرگیرد.

مثال: اگر حدمجاز باسیلوس سرئوس در دو نوع فرآورده به ترتیب 10<sup>2</sup> و 10<sup>2</sup> cfu در g از نمونه باشد، برای شمارش این باکتری در این دو نمونه به ترتیب باید حداقل تا رقت های 1/10 و 1/100 نمونه را رقیق ساخت و سپس برای هر رقت آزمون را بصورت دوپلیکیته (دوتایی) انجام داد.

**5** بطور کلی رقت ها باید بلافاصله قبل از انجام آزمون تهیه و به محیط های کشت تلقیح شوند.

**6** در برخی موارد خاص ، بخصوص نمونه هایی که رقت اولیه ( رقت 1/10) آنها بیش از حد، غلیظ می شود، لازمست که مقدار رقیق کننده را افزایش داد. در این صورت در محاسبه نتایج این مقدار بایستی در نظر گرفته شود.

**7** برای اطمینان از پاسخ آزمون و دقت بیشتر، کلیه آزمون های شمارش بایستی حداقل بصورت دوپلیکیته (دو تایی) کار شود .

**8** به منظور کنترل استریلیتی بایستی شاهد های منفی برای محیط کشت ، هوا ، تجهیزات در طی آزمون استفاده شود.

**9** به منظور کنترل عملکرد محیط های کشت و محلول های مورد استفاده (Performance test) بایستی از تست های لازم بر اساس استاندارد ملی ایران سال 1385 به شماره 2-8663 (ISO/TS 11133-1,2:2003) در این زمینه استفاده شود.

**10** برای شمارش اسپورها ، رقت اولیه را بلافاصله پس از آماده شده بمدت 10 دقیقه در دمای 65 درجه سلسیوس گذاشته و سپس به سرعت خنک کنید.

**11** اساس کلیه روش های شناسایی ، غنی سازی در محیط کشت غنی کننده انتخابی، سپس کشت بر روی یک محیط انتخابی جامد برای جداسازی کلنی های میکروارگانیسم مورد نظر و پس از آن انجام تست های تاییدی برای تکمیل شناسایی است. این نوع آزمون ها زمانی انجام می شود که میکروارگانیسم در مقدار معینی (گرم یا میلی لیتر) از فرآورده باید منفی باشد.

**12** ) اساس کلیه روش های شمارش ،انتقال مقدار معینی (گرم یا میلی لیتر) از فرآورده در یک محیط کشت انتخابی ( مایع ، در روش چند لوله ای MPN برای تعیین تعداد کمتر از 100 cfu در ml یا g از نمونه و جامد، در روش پورپلیت برای تعیین تعداد بیشتر از 100 cfu در ml یا g از نمونه) است که در این روش ها اگر شمارش برای يك ميكروارگانيسم خاص باشد بایستی پس از انجام تست های تاییدی برای شناسایی کلنی های رشد کرده ،شمارش واقعی با استفاده از فرمول های خاص بدست آید. این نوع آزمون ها زمانی انجام می شود که وجود تعدادی از میکروارگانيسم موردنظر ،درمقدار معینی (گرم یا میلی لیتر) از فرآورده، بصورت عددی غیر از صفر(منفی) ،می تواند مجاز باشد.

**13** ) پلیت ها را برای گرمخانه گذاری، در دسته های کمتر از 6 عدد با فاصله معین از یکدیگر و همچنین سقف و دیواره ها در گرمخانه قرار دهید.

**14** ) کلیه دستگاه های مورد استفاده بایستی دارای گواهی کالیبراسیون معتبر باشند و آزمایش کننده از صحت کارآیی آنها اطمینان داشته باشد.

**15** ) برای برداشت و انتقال محلول ها در آزمایشگاه میکروبیولوژی به هیچ عنوان نباید از مکش یا دمیدن پی پت توسط دهان استفاده شود. در صورت استفاده از پی پت بایستی از وسایل مکانیکی دستی یا برقی برای پر یا خالی کردن پی پت استفاده کرد.

**16** ) باید دقت شود در برداشت و انتقال محلول ها یا محیط های کشت مایع مثلا لوله های کشت شده در روش های شمارش چند لوله ای، به هیچ عنوان نباید از پی پت یکسان در لوله ها استفاده کرد، حتی اگر از رقت رقیق به غلیظ عملیات انتقال انجام شود.

**17** ) قضاوت در باره قابلیت مصرف میکروبیولوژی يك نمونه در صورتي امکان پذیر است که برداشت نمونه مورد آزمون از تعداد مشخص نمونه، طبق استاندارد ملی ایران شماره 6597 انجام شده باشد. مثال :در صورتیکه طبق محاسبه، 5 نمونه برای انجام آزمون ضروري باشد بایستی

پس از مخلوط و یکنواخت نمودن کامل محتویات 5 نمونه، مقدار معین (میلی گرم یا میلی لیتر) از آن مخلوط را برای انجام آزمون استفاده کرد.

**18** ) با توجه به اینکه بسیاری از خصوصیات بیوشیمیایی باکتری ها صد در صد نمی باشد و یا حتی گاهی بعلت عدم استفاده از کلنی کامل ایزوله شده در آزمون های تاییدی، در تشخیص صحیح باکتری خطا ایجاد می شود، کارشناسان محترم آزمایشگاه همیشه باید دقت کافی داشته باشند که با عدم تطابق در یک تست بیوشیمیایی مثل تخمیر لاکتوز، ایجاد اندول، مصرف سیترات یا تست لایزین دکربوکسیلازو...نبایستی وجود باکتری مورد جستجو را نفی کرد. بلکه در صورت مشکوک بودن بقیه آزمون ها بایستی با تکرار آزمون های تشخیصی قبلی با دقت بیشتر، افزودن آزمون های تشخیصی تکمیلی، استفاده از جداول تشخیصی بیوشیمیایی درصدی و کمک از تست های سرولوژیکی، به تشخیص با صحت و دقت بالا دست یافت.

**اساس آزمون شمارش یک نوع باکتری خاص در تعداد بیش از 100 cfu در ml یا g از نمونه به روش پورپلیت**

- تهیه رقت های اعشاری متوالی از نمونه با یک رقیق کننده استریل مناسب برای نمونه
- انتقال 1 میلی لیتر از رقت های ساخته شده به پلیت های خالی استریل
- افزودن 15 تا 20 میلی لیتر محیط کشت آگار دار انتخابی برای باکتری مورد وکشت به صورت پورپلیت
- گرمخانه گذاری در دمای 35 تا 37 درجه سلسیوس به مدت 24-48 ساعت (با توجه به زمان و دمای مناسب برای باکتری مورد نظر)
- شمارش کل کلنی های رشد یافته در هر پلیت را انجام دهید = (C)، تعداد کلنی هایی که برای انجام تست های تاییدی انتخاب می کنید را یادداشت کنید = (A)، سپس تست های تاییدی را طی مراحل زیر انجام دهید:
- کشت خطی کلنی های انتخاب شده بر روی محیط کشت نوترینت آگار
- گرمخانه گذاری در 35 تا 37 درجه سلسیوس به مدت 24 ساعت

- انجام آزمون های تاییدی باکتری مورد نظر برای کلنی های رشد کرده و کاملاً ایزوله
- تعداد کلنی هایی که در تست های تاییدی به عنوان باکتری مورد نظر شناخته شدند را یادداشت کنید = (b)
- سپس با استفاده از فرمول  $a = (b/A) \times c$  تعداد باکتری مورد نظر را در هر پلیت (a) را حساب کنید.
- برای بدست آوردن تعداد باکتری مورد نظر در هر گرم یا میلی لیتر نمونه ابتدا از فرمول زیر برای هر پلیت مقدار را حساب کنید:
- $a \times \text{عکس رقت} \times \text{عکس حجم} = \text{ml یا cfu/g}$
- سپس میانگین مقادیر بدست آمده در کل پلیت ها را به عنوان تعداد باکتری مورد نظر در هر گرم یا میلی لیتر از نمونه بیان کنید.
- اساس آزمون شمارش یک نوع باکتری خاص در تعداد کم (از 1 تا 100 cfu در ml یا g از نمونه) به روش **MPN (Most Probable Number)** :
- استفاده از این روش برای شمارش یک نوع باکتری در تعداد کم (از 1 تا 100 cfu در ml یا g از نمونه) توصیه می شود.
- افزودن 10 میلی لیتر از نمونه مورد آزمون (چنانچه مایع باشد) و یا 10 میلی لیتر از رقت 0/1 نمونه جامد به 3 لوله حاوی 10 میلی لیتر محیط کشت مایع انتخابی توصیه شده برای باکتری مورد نظر، با غلظت دو برابر
- افزودن 1 میلی لیتر از نمونه مایع و یا رقت 0/1 نمونه جامد به 3 لوله حاوی 10 میلی لیتر محیط کشت مایع انتخابی توصیه شده برای باکتری مورد نظر، با غلظت معمولی
- افزودن 1 میلی لیتر از رقت 0/1 نمونه مایع و یا رقت 0/01 نمونه جامد به 3 لوله حاوی 10 میلی لیتر محیط کشت مایع انتخابی توصیه شده برای باکتری مورد نظر، با غلظت معمولی
- گرمخانه گذاری 9 لوله فوق در 35-37 درجه سلسیوس به مدت 24 ساعت

- در صورت مشاهده آثار رشد (ایجاد گاز، کدورت، سیاه شدن محیط کشت و... بسته به نوع باکتری و نوع محیط کشت) در لوله ها جهت تایید باکتری مورد نظر برای شمارش مراحل زیر را انجام دهید :
- از لوله های فوق کشت خطی روی محیط جامد انتخابی برای باکتری مورد نظر
- گرمخانه گذاری در دمای 35 تا 37 درجه سلسیوس به مدت 24 ساعت
- انجام آزمون های تاییدی برای کلنی های رشد کرده کاملاً مجزا شامل تست های بیوشیمیایی
- تعداد لوله های تایید شده برای باکتری مورد نظر را یادداشت کنید.
- محتملترین تعداد باکتری مورد نظر را از جدول MPN محاسبه کنید.
- شاخص MPN را از جدول یادداشت کرده ،تعداد میکروارگانیسم ها را در هر میلی لیتر (در فرآورده های مایع) یا در هر گرم (در سایر فرآورده ها) با ضرب کردن شاخص MPN در عکس پائین ترین رقتی که انتخاب شده ( یعنی رقتی که بیشترین مقدار نمونه را داراست) محاسبه کنید.

### اساس آزمون شناسایی یک نوع میکروارگانیسم

- اصولاً طی یک یا دو مرحله کشت در محیط های مایع غنی کننده انتخابی به شرح زیر صورت می گیرد:
- افزودن مقدار معینی از نمونه به حجم مشخصی از محیط مایع غنی کننده انتخابی اول برای میکروارگانیسم موردنظر و یا در بعضی موارد به آب پیتونه بافره
  - گرمخانه گذاری در دمای مناسب رشد میکروارگانیسم موردنظر به مدت معمولاً یک شب
  - افزودن 1 میلی لیتر از سوسپانسیون فوق به لوله حاوی 10 میلی لیتر محیط مایع غنی کننده انتخابی دوم برای میکروارگانیسم موردنظر
  - گرمخانه گذاری در دمای مناسب رشد میکروارگانیسم موردنظر به مدت معمولاً یک شب
  - پس از گرمخانه گذاری ، کشت خطی از لوله ها روی محیط جامد انتخابی برای میکروارگانیسم موردنظر

- گرمخانه گذاری در دمای مناسب رشد میکروارگانیزم موردنظر به مدت معمولاً یک شب
- انجام آزمون های تاییدی بیوشیمیایی برای کلیه های رشد کرده و کاملاً ایزوله
- انجام آزمون های تاییدی سرولوژیکی برای تشخیص نهایی

### آماده سازی نمونه:

- یکنواخت نمودن کامل نمونه تحت شرایط استریل
- در نمونه های مایع قبل از برداشت بایستی نمونه کاملاً مخلوط و یکنواخت شود.
- در نمونه های نیمه جامد دو فاز جامد و مایع توسط استومکر ، پالسیفایر و یا هاون استریل تحت شرایط استریل کاملاً مخلوط و یکنواخت شود.
- در نمونه های جامد توسط استومکر ، پالسیفایر و یا هاون استریل تحت شرایط استریل نمونه کاملاً مخلوط و یکنواخت شود.
- برخی نمونه ها نیاز به گرمخانه گذاری قبل از انجام آزمون دارند، بطور مثال:  
شیر و خامه استریل: بطور همزمان 10 روز در دمای 30 درجه سلسیوس و 7 روز در دمای 55 درجه سلسیوس
- مواد غذایی کم اسید در ظروف نفوذ ناپذیر: بطور همزمان 10 روز در دمای 30 تا 35 درجه سلسیوس و 5 تا 7 روز در دمای 55 درجه سلسیوس
- مواد غذایی اسیدی در ظروف نفوذ ناپذیر: بطور همزمان 10 روز در دمای 25 تا 30 درجه سلسیوس و 5 تا 7 روز در دمای 55 درجه سلسیوس

- استاندارد ملی ایران شماره های 1-8923-8923 سال 1386 (جایگزین استاندارد ملی شماره

356)، 2836 و 6597 سال 1382.

### تهیه رقت :

بطور کلی تمام رقت ها باید بلافاصله قبل از انجام آزمون تهیه و در زمان کوتاهی به محیط های کشت تلقیح شوند.

محلول رقیق کننده اغلب مواد غذایی، محلول رینگراست ولی برای بعضی فرآورده ها استفاده از محلول های خاص توصیه می شود که در اینصورت از محلول رقیق کننده توصیه شده بایستی استفاده شود. بطور مثال: برای پنیر، سببترات سدیم 2%، برای قند و شکر، آب مقطر استریل، برای کره رینگرا آگار دار و برای مواد آرایشی، کازئین دایجست سوی لستین پلی سوربات به عنوان محلول رقیق کننده استفاده می شوند.

معمولا برای تهیه اولین رقت در آزمون هایی که نیاز به رقت سازی دارند، 10 گرم یا 10 میلی لیتر نمونه، از مخلوط تعداد مشخص نمونه که کاملا یکنواخت شده است (طبق استاندارد ملی ایران سال 1382 شماره 6597) به 90 میلی لیتر محلول رقیق کننده در یک ظرف استریل افزوده می شود.

رقت تهیه شده ( رقت 0/1) بایستی کاملا مخلوط و یکنواخت شود ( ترجیحا توسط شیکر به مدت زمان کافی تا ایجاد یک محلول کاملا یکنواخت).

در برخی موارد خاص، بخصوص نمونه هایی که رقت اولیه ( رقت 1/10) آنها بیش از حد، غلیظ می شود، لازمست که مقدار رقیق کننده را افزایش داد. در این صورت در محاسبه نتایج این مقدار بایستی در نظر گرفته شود.

در صورتیکه نمونه بععل مختلف براحتی در محلول رقیق کننده حل و یکنواخت نشود بایستی تحت شرایط خاص مثل افزودن آنزیم های معین برای بعضی نمونه ها و توپین 80 در نمونه های با پایه چربی، مشکل را برطرف کرد تا محلول کاملا یکنواخت حاصل شود.

در صورتیکه نمونه بععل مختلف پس از افزودن به محلول رقیق کننده حجیم شود بایستی مقدار نمونه و محلول رقیق کننده بصورتی تغییر یابد که نسبت 1/10 وزن به حجم حاصل شود.

#### تهیه رقت های اعشاری مورد نیاز:

بطور کلی رقت ها باید بلافاصله قبل از انجام آزمون تهیه و به محیط های کشت تلقیح شوند.

در روشهای شمارش، رقت سازی نمونه و استفاده از رقت های اعشاری ، باید براساس حد مجاز میکروارگانیزم مورد نظر در نمونه ساخته شود و آخرین رقت نمونه بایستی مقدار حد مجاز را دربرگیرد. برای تهیه رقت های متوالی معمولاً از نسبت های ده دهی یا اعشاری استفاده می شود. به این ترتیب که از رقت اولیه (1/10) پس از اطمینان از یکنواخت سازی کامل آن یک میلی لیتر به 9 میلی لیتر محلول رقیق کننده در لوله استریل دیگر افزوده می شود که این رقت، رقت 1/100 خواهد بود با هم زدن و یکنواخت کردن کامل محتویات لوله رقت 1/100 می توان یک میلی لیتر از آن را به 9 میلی لیتر محلول رقیق کننده در یک لوله دیگر رقت 1/1000 حاصل می شود. به همین ترتیب رقت ها را تا جایی که لازم است باید ساخت. باید دقت شود که در رقت سازی چون از غلظت غلیظ به رقیق عملیات انجام می شود نباید با یک وسیله (پی پت، نوک سمپلرو...) عمل انتقال محلول، از لوله ها به یکدیگر صورت گیرد، بلکه بایستی وسیله برداشت محلول (پی پت، نوک سمپلرو...) برای هر لوله تعویض شود.

● استاندارد ملی ایران شماره های 1-8923-8923 سال 1386 (جایگزین استاندارد ملی شماره

356)، 2836 و 6597 سال 1382.

### شمارش کلی میکروارگانیزم ها در 30 درجه سلسیوس:

- انتقال 1 میلی لیتر از رقت های مورد نیاز به پلیت های خالی استریل
- در اغلب نمونه ها، افزودن 15 تا 20 میلی لیتر PCA (Plate Count Agar) با دمای 45 تا 50 درجه سلسیوس
- در مورد لبنیات، افزودن 15 تا 20 میلی لیتر Plate Count Skim Milk Agar
- کشت به روش پورپلیت یک لایه ای و چرخاندن پلیت به صورت 8 در سطح افقی بطوری که محتویات آن با در پلیت تماس پیدا نکند.
- پس از بسته شدن آگار، گذاردن پلیت ها به صورت وارونه در دمای 30 درجه سلسیوس به مدت 72 ساعت

- شمارش کل کلنی های رشد یافته اعم از باکتری، کپک و مخمر روی هر پلیت با استفاده از فرمول زیر:
- تعداد کل کلنی ها  $\times$  عکس رقت  $\times$  عکس حجم استفاده شده = تعداد کلنی در یک گرم یا یک میلی لیتر از نمونه (cfu /g or ml) ، colony forming unit = cfu (واحد تشکیل دهنده کلنی)
- میانگین تعداد بدست آمده از کل پلیت ها را به عنوان پاسخ آزمون شمارش کلی میکروارگانیسم ها در 30 درجه سلسیوس گزارش کنید.
- در نمونه های شیر و فراورده های آن بعلت افزودن شیرخشك بدون چربی به میزان 0/01% در محیط کشت (طبق استاندارد ملی 5484) ، شمارش کلنی ها بایستی در نور ملایم انجام گیرد. تا کلنی های سرسوزنی با ذرات ته نشین شده اشتباه نشوند .
- استاندارد ملی ایران سال 1386 شماره 5272

### شمارش کلی باکتری های هوازی مزوفیل:

- انتقال 1 میلی لیتر از رقت های مورد نیاز به پلیت های خالی استریل
- در اغلب نمونه ها، افزودن 15 تا 20 میلی لیتر PCA (Plate Count Agar) با دمای 45 تا 50 درجه سلسیوس
- در مورد لبنیات، افزودن 15 تا 20 میلی لیتر Plate Count Skim Milk Agar
- کشت به روش پورپلیت یک لایه ای و چرخاندن پلیت به صورت 8 در سطح افقی بطوری که محتویات آن با در پلیت تماس پیدا نکند.
- پس از بسته شدن آگار، گذاردن پلیت ها به صورت وارونه در دمای 35 تا 37 درجه سلسیوس به مدت 24 تا 48 ساعت
- شمارش کلنی باکتری های رشد یافته روی هر پلیت با استفاده از فرمول زیر:

تعداد کلنی باکتری ها  $\times$  عکس رقت  $\times$  عکس حجم استفاده شده = تعداد کلنی در یک گرم گرم یا یک میلی لیتر از نمونه (cfu /g or ml) ، colony forming unit = cfu (واحد تشکیل دهنده کلنی)

■ میانگین تعداد بدست آمده از کل پلیت ها را به عنوان پاسخ آزمون شمارش کلی باکتری های هوازی مزوفیل گزارش کنید.

### شناسایی کپک و مخمر:

- انتقال 10 میلی لیتر از رقت 0/1 به 10 میلی لیتر SD Broth حاوی کلرامفنیکل با غلظت دو برابر (Sabouraud Dextrose Broth)
- گرمخانه گذاری به مدت 3 تا 5 روز در دمای 25 درجه سلسیوس
- کشت خطی بر روی پلیت حاوی SD Agar حاوی کلرامفنیکل یا YGC Agar (Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar)
- گرمخانه گذاری به مدت 3 تا 5 روز در دمای 25 درجه سلسیوس
- بررسی وجود کپک و مخمر
- استاندارد ملی ایران سال 1374 شماره 997

### شمارش کپک و مخمر:

- انتقال 0/5 میلی لیتر از رقت مورد نیاز به صورت سطحی بر روی پلیت حاوی SD Agar (Sabouraud Dextrose Agar) دارای کلرامفنیکل یا YGC Agar (Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar)
- گرمخانه گذاری به مدت 3 تا 5 روز در دمای 25 درجه سلسیوس
- شمارش کلنی های کپک و مخمر به طور مجزا
- تعداد کلنی  $\times$  عکس رقت  $\times$  عکس حجم استفاده شده = تعداد کلنی در یک گرم از نمونه
- استاندارد ملی ایران سال 1374 شماره 997

### شناسایی انتروباکتریاسه :

- افزودن 1 گرم نمونه جامد یا 1 میلی لیتر از نمونه مایع به 10 میلی لیتر آب پیتونه بافره
- گرمخانه گذاری در دمای 35 تا 37 درجه سلسیوس به مدت 16 تا 20 ساعت ، دقت شود زمان گرمخانه گذاری بیشتر از 20 ساعت نشود.

- افزودن 1 میلی لیتر از سوسپانسیون فوق به لوله حاوی 10 میلی لیتر EE Broth دارای لوله دورهام (Enterobacteriacea Enrichment Broth) یا BGBG Broth (Brilliant Green Bile Glucose Broth) ، با غلظت معمولی و دارای لوله دورهام

- گرمخانه گذاری در دمای 35 تا 37 درجه سلسیوس به مدت 18 تا 24 ساعت
- پس از گرمخانه گذاری ، از لوله های فوق کشت خطی روی محیط انتخابی

VRBG Agar یا 1% گلوکز یا Mc-Conkey Agar حاوی

(Violet Red Bile Glucose Agar)

- گرمخانه گذاری در دمای 35 تا 37 درجه سلسیوس به مدت 24 ساعت
- کشت خطی کلنی های قرمز یا ارغوانی با هاله رسوبی قرمز روی محیط کشت نوترینت آگار

- گرمخانه گذاری در دمای 35 تا 37 درجه سلسیوس به مدت 24 ساعت
- انجام آزمون های تاییدی آنتروباکتریاسه برای کلنی های رشد کرده و کاملاً ایزوله شامل اکسیداز تست و تخمیر گلوکز در محیط گلوکز آگار
- آنتروباکتریاسه اکسیداز منفی و قادر به تخمیر گلوکز هستند.

- استاندارد ملی ایران سال 1386 شماره 2461

**شمارش آنتروباکتریاسه :**

1- تعداد باکتری ها بیش از 100 cfu در ml یا g از نمونه :

- افزودن 1 میلی لیتر از رقت 0/1 نمونه جامد یا 1 میلی لیتر از نمونه مایع به پلیت خالی استریل

- افزودن 15 تا 20 میلی لیتر Mc-Conkey Agar حاوی 1% گلوکز یا VRBG Agar (Violet Red Bile Glucose Agar) و کشت به صورت پورپلیت دولایه ای
- گرمخانه گذاری دردمای 35 تا 37 درجه سلسیوس به مدت 24-48 ساعت
- به طور همزمان، افزودن 10 میلی لیتر از رقت 0/1 نمونه جامد به لوله حاوی 10 میلی لیتر Brilliant Green Bile Glucose Broth (BGBG) یا Enterobacteriacea (EEB) Enrichment Broth با غلظت دو برابر و دارای لوله دورهام
- یا 1 میلی لیتر از نمونه مایع به 10 میلی لیتر BG broth حاوی گلوکز با غلظت معمولی دارای لوله دورهام، دردمای 35 تا 37 درجه سلسیوس به مدت 24-48 ساعت
- در صورت مشاهده گاز در لوله ها
- شمارش کل کلنی های قرمز ارغوانی در هر پلیت را انجام دهید = (c)، تعداد کلنی هایی که برای انجام تست های تاییدی انتخاب می کنید را یادداشت کنید = (A)، سپس تست های تاییدی را طی مراحل زیر انجام دهید:
- کشت خطی کلنی های انتخاب شده بر روی محیط کشت نوترینت آگار
- گرمخانه گذاری در 35 تا 37 درجه سلسیوس به مدت 24 ساعت
- انجام آزمون های تاییدی آنروباکتریاسه برای کلنی های رشد کرده و کاملاً ایزوله شامل اکسیداز تست و تخمیر گلوکز در محیط گلوکز آگار
- آنروباکتریاسه اکسیداز منفی و قادر به تخمیر گلوکز هستند.
- تعداد کلنی هایی که در تست های تاییدی به عنوان آنروباکتریاسه شناخته شدند را یادداشت کنید = (b)
- سپس با استفاده از فرمول  $a = (b/A) \times c$  تعداد آنروباکتریاسه را در هر پلیت (a) را حساب کنید.
- برای بدست آوردن تعداد آنروباکتریاسه در هر گرم یا میلی لیتر نمونه ابتدا از فرمول زیر برای هر پلیت مقدار را حساب کنید:

●  $X a$  عکس رقت  $\times$  عکس حجم =  $ml$  یا  $cfu/g$

● سپس میانگین مقادیر بدست آمده در کل پلیت ها را به عنوان تعداد انتروباکتریاسه در هر گرم یا میلی لیتر از نمونه بیان کنید.

● استاندارد ملی ایران سال 1386 شماره 2461

2-(روش MPN) تعداد باکتری ها از 1 تا 100  $cfu$  در  $ml$  یا  $g$  از نمونه :

● افزودن 10 میلی لیتر از نمونه مورد آزمون (چنانچه مایع باشد) و یا 10 میلی لیتر از رقت

0/1 نمونه جامد به 3 لوله حاوی 10 میلی لیتر Brilliant Green Bile Glucose

Broth ، با غلظت دو برابر و دارای لوله دورهام

● افزودن 1 میلی لیتر از نمونه مایع و یا رقت 0/1 نمونه جامد به 3 لوله حاوی 10 میلی

لیتر Brilliant Green Bile Glucose Broth ، با غلظت معمولی و دارای لوله

دورهام

● افزودن 1 میلی لیتر از رقت 0/1 نمونه مایع و یا رقت 0/01 نمونه جامد به 3 لوله

حاوی 10 میلی لیتر Brilliant Green Bile Glucose Broth ، با غلظت معمولی و

دارای لوله دورهام

● هر 9 لوله را در 35-37 درجه سلسیوس به مدت 24 ساعت قرار دهید

● در صورت مشاهده گاز در لوله ها جهت تایید انتروباکتریاسه برای شمارش مراحل زیر را

انجام دهید :

● از لوله های فوق کشت خطی روی محیط انتخابی

Mc-Conkey Agar حاوی 1% گلوکز یا VRBG Agar

(Violet Red Bile Glucose Agar)

● گرمخانه گذاری در دمای 35 تا 37 درجه سلسیوس به مدت 24 ساعت

● کشت خطی کلنی های قرمز یا ارغوانی با هاله رسوبی قرمز روی محیط کشت نوترینت

آگار

- گرمخانه گذاری در دمای 35 تا 37 درجه سلسیوس به مدت 24 ساعت
- انجام آزمون های تاییدی آنتروباکتریاسه برای کلنی های رشد کرده کاملا مجزا شامل اکسیداز تست و تخمیر گلوکز در محیط گلوکز آگار
- تعداد لوله های تایید شده از نظر آنتروباکتریاسه را یادداشت کنید.
- محتملترین تعداد آنتروباکتریاسه را از جدول MPN محاسبه کنید.
- استاندارد ملی ایران سال 1386 شماره 2461

### شناسایی آنتروباکتر ساکازاکی:

این روش غالباً بعلت گزارشات وقوع مننژیت در نوزادان توسط این باکتری، در شیر خشک نوزادان استفاده می شود ولی در فراورده های دیگر نیز برای شناسایی این باکتری می تواند استفاده شود.

- افزودن 67 گرم نمونه شیر خشک به 603 میلی لیتر آب پیتونه بافره با دمای 45 درجه سلسیوس
- گرمخانه گذاری در دمای 35 تا 37 درجه سلسیوس به مدت 20-16 ساعت ، دقت شود زمان گرمخانه گذاری بیشتر از 20 ساعت نشود.
- افزودن 1 میلی لیتر از سوسپانسیون فوق به لوله حاوی 10 میلی لیتر EE Broth دارای لوله دورهام (Enterobacteriaceae Enrichment Broth)
- یا BGBK Broth (Brilliant Green Bile Glucose Broth) ، با غلظت معمولی و دارای لوله دورهام
- گرمخانه گذاری در دمای 35 تا 37 درجه سلسیوس به مدت 24-18 ساعت
- پس از گرمخانه گذاری ، از لوله های فوق کشت خطی روی محیط انتخابی Mc-Conkey Agar حاوی 1% گلوکز یا VRBG Agar (Violet Red Bile Glucose Agar)
- گرمخانه گذاری در دمای 35 تا 37 درجه سلسیوس به مدت 24 ساعت

- کشت خطی کلنی های قرمز یا ارغوانی با هاله رسوبی قرمز روی محیط کشت نوترینت آگار
- گرمخانه گذاری دردمای 35 تا 37 درجه سلسیوس به مدت 24 ساعت
- انجام آزمون های تاییدی آنتروباکتریاسه برای کلنی های رشد کرده و کاملاً ایزوله شامل اکسیداز تست و تخمیر گلوکز در محیط گلوکز آگار
- آنتروباکتریاسه اکسیداز منفی و قادر به تخمیر گلوکز هستند.
- انجام آزمون های تاییدی آنتروباکتر ساکازاکی برای کلنی های تایید شده در آزمون تایید آنتروباکتریاسه به شرح زیر:
- D-Sorbitol منفی ، ایجاد پیگمان زرد روی محیط تریپتی کیز سوی آگار ، سیمون سیترات مثبت ، آرژنین دهیدرولاز منفی ، متیل رد منفی، وژز پروسکاور VP مثبت ، دولسیتول منفی ، x متیل D گلوکوزاید منفی
- استاندارد ملی ایران سال 1386 شماره ---

### شناسایی کلی فرم ها:

- افزودن 1 میلی لیتر از نمونه مایع به لوله حاوی 10 میلی لیتر Lauryl sulfate tryptose broth با غلظت معمولی یا 10 میلی لیتر از رقت 0/1 نمونه جامد به لوله حاوی 10 میلی لیتر Lauryl sulfate tryptose broth با غلظت دو برابر و حاوی لوله در هام
- گرمخانه گذاری دردمای 35 تا 37 درجه سلسیوس به مدت 24-48 ساعت
- در صورت عدم مشاهده گاز در لوله پس از 48 ساعت ، نمونه از نظر وجود کلی فرم منفی است .
- در صورت مشاهده گاز در لوله پس از 48 ساعت ، انتقال 1 تا 2 قطره از محتویات لوله به 10 میلی لیتر Brilliant Green Bile Lactose Broth دارای لوله دورهام و همزمان کشت خطی روی محیط انتخابی

### Mc-Conkey Agar یا VRB Agar (Violet Red Bile Agar)

■ گرمخانه گذاری در دمای 35 تا 37 درجه سلسیوس به مدت 48-24 ساعت

■ در صورت عدم مشاهده گاز در لوله پس از 48 ساعت و عدم رشد کلنی های ارغوانی

روی محیط انتخابی Mc-Conkey Agar یا VRB Agar

(Violet Red Bile Agar) ، نمونه از نظر وجود کلی فرم منفی است .

■ در صورت مشاهده گاز در لوله پس از 48 ساعت یا رشد کلنی های ارغوانی روی محیط

انتخابی

### Mc-Conkey Agar یا VRB Agar (Violet Red Bile Agar)

، نمونه از نظر وجود کلی فرم مثبت تلقی می گردد.

■ استاندارد ملی ایران سال 1386 شماره 437

### شمارش کلی فرم ها:

1- تعداد باکتریها بیش از 100 cfu در ml یا g از نمونه :

■ افزودن 1 میلی لیتر از رقت 0/1 نمونه جامد یا 1 میلی لیتر از نمونه مایع به پلیت خالی

استریل

■ افزودن 15-20 میلی لیتر Mc-Conkey Agar یا VRB Agar

(Violet Red Bile Agar) و کشت به صورت پورپلیت دولایه ای

■ گرمخانه گذاری در دمای 35 تا 37 درجه سلسیوس به مدت 48-24 ساعت

برای لینیات دمای 30 درجه سلسیوس به مدت 24 ساعت

■ به طور همزمان با انجام روش فوق، افزودن 10 میلی لیتر از رقت 0/1 نمونه جامد به

لوله حاوی 10 میلی لیتر BGBL broth با غلظت دو برابر دارای لوله دورهام

(Brilliant Green Bile Lactose Broth)

یا 1 میلی لیتر از نمونه مایع به 10 میلی لیتر BGBL broth با غلظت معمولی دارای لوله

دورهام

- گرمخانه گذاری در دمای 35 تا 37 درجه سلسیوس به مدت 24-48 ساعت
  - برای لینیات دمای 30 درجه سلسیوس به مدت 24 ساعت
  - در صورت مشاهده گاز در لوله BGBL broth, شمارش کلنی های قرمز ارغوانی در پلیت های مرحله اول (کشت پورپلیت دولایه ای)
  - در صورت ایجاد کدورت بدون گاز در لوله BGBL broth کشت خطی از لوله فوق روی محیط آگار Mc- Conkey برای مشاهده وجود کلنی های قرمز ارغوانی پس از گرمخانه گذاری و در صورت وجود، شمارش کلنی های قرمز ارغوانی در پلیت های مرحله اول (کشت پورپلیت دولایه ای)
  - سپس تعداد شمارش شده را در فرمول زیر قرار داده و تعداد کلی فرم را در هر گرم یا میلی لیتر از نمونه گزارش کنید:
  - تعداد کلنی قرمز شمارش شده  $\times$  عکس رقت  $\times$  عکس حجم = cfu/g
  - استاندارد ملی ایران سال 1386 شماره 437
- 2-(روش MPN) تعداد باکتریها از 1 تا 100 cfu در ml یا g از نمونه :
- بر اساس روش MPN ذکر شده برای شمارش انتروباکتریاسه است با این تفاوت که از محیط کشت انتخابی اولیه Lauryl Sulfate Tryptose Broth در 9 لوله و محیط کشت انتخابی BG broth جهت تائید ، باید استفاده شود.
- استاندارد ملی ایران سال 1386 شماره 437

### شناسایی اشریشیا کلی :

- 10 میلی لیتر از رقت 0/1 نمونه جامد به 10 میلی لیتر LST broth
- با غلظت دو برابر دارای لوله دورهام, یا 1 میلی لیتر از نمونه مایع به 10 میلی لیتر LST broth (Lauryl Sulfate Tryptose Broth) با غلظت معمولی دارای لوله دورهام,
- گرمخانه گذاری به مدت 24 تا 48 ساعت در دمای 37 درجه سلسیوس

□ در صورت مشاهده گاز یا کدورت در لوله فوق ، 1-2 قطره از آن را به 10 میلی لیتر EC broth با غلظت معمولی و حاوی لوله در هام بیفزیاید. در برخی از فرآورده های شیری (مانند کازئین) لوله در هام ممکن است به ته لوله محیط کشت فرو رود در این صورت اگر پس از 48 ساعت دوره گرمخانه گذاری ، کدورت مشاهده شد، اما گاز تولید نگردید نیز، 1-2 قطره از آن را به 10 میلی لیتر EC broth با غلظت معمولی و حاوی لوله در هام بیفزیاید.

□ گرمخانه گذاری به مدت 24 تا 48 ساعت در بین ماری با دمای 44 تا 45 درجه سلسیوس  
□ در صورت مشاهده گاز یا کدورت در لوله EC broth:

1) 1-2 قطره از آن را به آب پپتونه بدون اندول Peptone water, indol free افزوده و به مدت 24 تا 48 ساعت در بین ماری با دمای 44 تا 45 درجه سلسیوس گرمخانه گذاری کنید. سپس 0/5 میلی لیتر معرف کواکس به لوله افزوده و پس از يك دقیقه ایجاد رنگ قرمز در سطح محیط کشت (واکنش اندول مثبت) را بررسی کنید.

2) کشت خطی از EC broth بر روی محیط کشت Mc-Conkey agar برای دیدن

کلنی های ارغوانی لاکتوز مثبت و سپس کشت خطی از کلنی های فوق بر روی نوترینت آگار جهت ایجاد کلنی ایزوله برای انجام تست های تاییدی

تست های تاییدی شامل کشت در محیط کشت افتراقی TSI ، اندول ، متیل رد، سیمون سیترات، (IMViC) برای کلنی های ایزوله شده جهت مشاهده واکنش های زیر:

TSI : گاز ، اسید / اسید ( تمام لوله زرد) بدون SH2

IMViC: - - + + (اندول و متیل رد مثبت ، وی پی و سیترات منفی )

□ استاندارد ملی ایران سال 1385 شماره 2946

**شمارش اشریشیا کلی:**

1- تعداد باکتریها بیش از 100 cfu در ml یا g از نمونه :

□ انتقال 1 میلی لیتر از رقت 0/1 یا رقت مورد نیاز به پلیت خالی

- افزودن 15 میلی لیتر VRBL agar یا Mc conkey agar و پور پلیت یک لایه ای
- گرمخانه گذاری به مدت 24 ساعت در دمای 35 تا 37 درجه سلسیوس
- شمارش کل کلنی های قرمز مایل به ارغوانی=(c) ، در نظر گرفتن تعداد مشخص از این کلنی ها برای انجام تست های تاییدی=(A)
- انجام آزمون های تائیدی شناسایی /شریشیا کلی برای کلنی های فوق شامل :
- تست TSI و IMViC بر روی کلونی های مشکوک جهت ایجاد واکنش های زیر:
- TSI : گاز، اسید / اسید ( تمام لوله زرد )
- IMViC : - - + + ( اندول و متیل رد مثبت ،وی پی و سیترات منفی )
- یادداشت تعداد کلنی هایی که مورد تایید در تست های فوق قرار گرفتند = (b)
- سپس با استفاده از فرمول  $a = (b/A) \times c$  تعداد اشیشیا کلی را در هر پلیت یا همان a را حساب کنید.
- برای بدست آوردن تعداد اشیشیاکلی در هر گرم یا میلی لیتر نمونه ابتدا از فرمول زیر برای هر پلیت مقدار را حساب کنید:
- $a \times \text{عکس رقت} \times \text{عکس حجم} = \text{ml یا cfu/g}$
- سپس میانگین مقادیر بدست آمده در کل پلیت ها را به عنوان تعداد اشیشیاکلی در هر گرم یا میلی لیتر از نمونه بیان کنید.
- استاندارد ملی ایران سال 1385 شماره 2946
- 2-(روش MPN ) تعداد باکتریها از 1 تا 100 cfu در ml یا g از نمونه :
- بر اساس روش MPN ذکر شده برای شمارش انتروباکتریاسه است با این تفاوت که محیط کشت انتخابی اولیه Lauryl Sulfate Tryptose Broth در 9 لوله و جهت تائید محیط کشت انتخابی EC broth یا BG broth باید استفاده شود.
- استاندارد ملی ایران سال 1385 شماره 2946

### شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس:

■ انتقال 1 میلی لیتر یا 1 گرم از نمونه به 10 میلی لیتر محیط کشت مایع جیولتی کانتونی  
Giolitti-Cantoni broth حاوی تلوریت پتاسیم ( در صورت ممکن نبودن این روش  
برحسب نوع نمونه ، 10 میلی لیتر از رقت 0/1 نمونه به 10 میلی لیتر برات فوق با غلظت  
دو برابر افزوده شود.)

■ افزودن واز- پار به سطح برات برای ایجاد شرایط بی هوازی

■ گرمخانه گذاری در دمای 35 تا 37 درجه سلسیوس به مدت 24-48 ساعت

■ کشت خطی از محیط فوق بر روی Baird-Parker agar (حاوی تلوریت پتاسیم 1% و  
امولسیون زرده تخم مرغ 5% )

■ گرمخانه گذاری در دمای 35 تا 37 درجه سلسیوس به مدت 24-48 ساعت

■ برای کلنی های مشکوک ( گرد, محدب, مشکی براق با هاله باریک شفاف نفتی) آزمونه های

تاییدی ، مانند تست کواگولاز با ایجاد لخته درپلاسمای خرگوش , تخمیر هوازی و بی

هوازی مانیتول در محیط کشت افتراقی Mannitol Salt Agar باید انجام شود.

■ استاندارد ملی ایران سال 1386 شماره 3-6806

### شمارش استافیلوکوکوس اورئوس:

1-تعداد باکتریها بیش از 100 cfu در ml یا g از نمونه:

کشت سطحی نیم میلی لیتر از رقت مورد نیاز بر روی محیط کشت Baird-Parker agar )  
حاوی تلوریت پتاسیم و امولسیون زرده تخم مرغ (

■ گرمخانه گذاری در دمای 35 تا 37 درجه سلسیوس به مدت 24-48 ساعت

■ شمارش کلنی های مشکوک ( گرد, محدب, مشکی براق با هاله باریک شفاف نفتی) = (c)

■ انتخاب تعداد معینی از کلنی های فوق برای انجام تست های تاییدی = (A)

■ آزمونه های تاییدی ، مانند تست کواگولاز با ایجاد لخته درپلاسمای خرگوش , تخمیر هوازی

و بی هوازی مانیتول در محیط کشت افتراقی Mannitol Salt Agar انجام

شود. تعداد کلنی هایی که مورد تایید قرار گرفتند را یادداشت کنید = (b)

■ تعداد کلنی های استافیلوکوکوس اورئوس را در هر پلیت = (a) را مطابق فرمول

$$a = (b/A) \times c$$

حساب کنید.

■ برای بدست آوردن تعداد استافیلوکوکوس اورئوس در هر گرم یا میلی لیتر نمونه ابتدا از

فرمول زیر برای هر پلیت مقدار را حساب کنید:

$$a \times \text{عکس رقت} \times \text{عکس حجم} = \text{cfu/ml یا cfu/g}$$

■ سپس میانگین مقادیر بدست آمده در کل پلیت ها را به عنوان تعداد استافیلوکوکوس اورئوس

در هر گرم یا میلی لیتر از نمونه بیان کنید.

2-(روش MPN) تعداد باکتریها از 1 تا 100 cfu در ml یا g از نمونه :

■ براساس روش MPN ذکر شده برای شمارش انتروباکتریاسه است با این تفاوت که محیط

کشت انتخابی اولیه Modified Giolitti– Cantoni broth حاوی تلوریت پتاسیم در 9

لوله استفاده می شود و پس از تلقیح به لوله ها 2-3 میلی لیتر آگار یا پارافین با دمای 47-

44 درجه سلسیوس ریخته ،پس از جامد شدن آگاریا پارافین در سطح لوله ها، آنها را در دمای

37 درجه سلسیوس بمدت 24 ساعت گرمخانه گذاری و لوله هایی که سیاهی یا رسوب سیاه

در آنها مشاهده شود را پس از انجام تست های تاییدی (کشت سطحی روی بردپارکر آگارو

انجام تست کواگولاز) و لوله های دیگر را تا 48 ساعت گرمخانه گذاری و تمامی آنها با یا

بدون سیاهی یا رسوب سیاه در آنها را پس از انجام تست های تاییدی (کشت سطحی روی

بردپارکر آگارو کواگولاز) بررسی می کنید.

■ استانداردهای ملی ایران سالهای 1384 و 1386 شماره 1-6806 , 3-6806

## شمارش باسیلوس سرئوس:

1-تعداد باکتریها بیش از 100 cfu در ml یا g از نمونه:

کشت سطحی 1 میلی لیتر از رقت 0/1 (یا رقت مورد نیاز) بر روی سه پلیت MYP Agar  
*Bacillus Cereus Selective Agar* (Mannitol egg Yolk Polymyxin) یا

و گرمخانه گذاری به مدت 24 ساعت در 30 درجه سلسیوس

● شمارش مجموع کلنی های پهن, خشن, با هاله رسوبی کدر بزرگ در زمینه صورتی رنگ  
در سه پلیت = (c)

● انتخاب تعداد معینی از کلنی های فوق برای انجام تست های تاییدی = (A)

● تستهای تاییدی باسیلوس سرئوس:

● همولیز بتا بر روی بلاد آگار با خون گوسفند

● مقاومت به پنی سیلین 10 IU (عدم مشاهده هاله رشد در اطراف دیسک آنتی بیوتیک)

● رشد سریع در 45 درجه سلسیوس

● تعداد کلنی هایی که مورد تایید قرار گرفتند را یادداشت کنید = (b)

● تعداد کلنی های باسیلوس سرئوس را در هر پلیت = (a) را مطابق فرمول  $a=(b/A) \times c$   
حساب کنید.

● برای بدست آوردن تعداد باسیلوس سرئوس در هر گرم یا میلی لیتر نمونه ابتدا از فرمول  
زیر برای هر پلیت مقدار را حساب کنید:

●  $a \times$  عکس رقت  $\times$  عکس حجم = cfu/ml یا g

● سپس میانگین مقادیر بدست آمده در کل پلیت ها را به عنوان تعداد باسیلوس سرئوس در  
هر گرم یا میلی لیتر از نمونه بیان کنید.

استاندارد ملی ایران سال 1385 شماره 2324

2-(روش MPN) تعداد باکتریها از 1 تا 100 cfu در ml یا g از نمونه :

بر اساس روش MPN ذکر شده برای شمارش انتروباکتریاسه است با این تفاوت که محیط کشت انتخابی اولیه *Bacillus Cereus Selective Broth* در 9 لوله استفاده می شود. استاندارد ملی ایران سال 1386 شماره ----

### شناسایی/انتروکوکوس ها :

- افزودن 10 میلی لیتر از رقت 0/1 نمونه به 10 میلی لیتر گلوکز آزاید برات با غلظت دو برابر (معرف pH: بروموکرزول ارغوانی, آزاید: مهارکننده)
  - گرمخانه گذاری در دمای 35 تا 37 درجه سلسیوس به مدت 24-48 ساعت
  - در صورت تغییر رنگ محیط کشت به رنگ زرد, کشت خطی بر روی KF Agar (حاوی 1% TTC)
  - گرمخانه گذاری در دمای 35 تا 37 درجه سلسیوس به مدت 24-48 ساعت
  - انجام تست های تاییدی برای کلنی های صورتی - قرمز رنگ
  - نتیجه تست های تاییدی/انتروکوکوس ها:
- در رنگ آمیزی گرم مشاهده کوکسی گرم مثبت, کاتالاز منفی, توانایی رشد در 6/5 % نمک, توانایی رشد در دمای 45 درجه سلسیوس
- استاندارد ملی ایران سال 1386 شماره 2198

### شمارش/انتروکوکوس ها:

- انتقال 1 میلی لیتر از رقت مورد نیاز به پلیت خالی استریل و افزودن 15 تا 20 میلی لیتر KF Agar با دمای 45 تا 50 درجه سلسیوس (حاوی 1% TTC) و کشت به صورت پور پلیت
- گرمخانه گذاری در دمای 35 تا 37 درجه سلسیوس به مدت 24-48 ساعت
- شمارش کلنی های صورتی ارغوانی تا قرمز رنگ, انتخاب تعداد معینی از آنها برای تست های تاییدی, انجام تست های تاییدی, تعیین تعداد کلنی هایی که تایید شده اند.
- استفاده از فرمول برای شمارش تعداد باکتری در هر پلیت

● تعیین شمارش باکتری در مقدار معین از نمونه با استفاده از فرمول:

$a \times \text{عکس رقت} \times \text{عکس حجم} = \text{cfu/g یا ml}$  ، که در آن  $a$  تعداد باکتری در پلیت است.

● استاندارد ملی ایران سال 1386 شماره 2198

### آزمون میکروبیولوژی غذاهای کنسرو شده:

■ ضدعفونی کردن یکی از ظروف نمونه با محلول حاوی 100 میکروگرم در لیتر کلر یا با الکل

اتانل 70 درصد به مدت 10 تا 15 دقیقه

■ باز نمودن ظرف تحت شرایط استریل

■ اندازه گیری pH محتویات ظرف مطابق با استاندارد ملی ایران 3195

■ تعیین روش آزمون 1 یا 2 برحسب مقدار pH نمونه به شرح زیر:

### 1- آزمون مواد غذایی کم اسید که دارای pH بیشتر از 4/6 هستند:

این مواد غذایی باید از نظر باکتری های مزوفیل هوازی و بی هوازی و همچنین باکتری های گرمادوست هوازی و بی هوازی منفی در گرم یا میلی لیتر باشند. لذا آزمون طی مراحل زیر باید انجام شود:

#### الف ( جداسازی باکتری های مزوفیل هوازی و بی هوازی :

■ گرمخانه گذاری نمونه قبل از باز کردن: حداقل یک نمونه به مدت 10 روز دردمای 30 تا

35 درجه سلسیوس

■ ضدعفونی کردن ظرف با محلول حاوی 100 میکروگرم در لیتر کلر یا با الکل اتانل 70

درصد به مدت 10 تا 15 دقیقه

■ باز نمودن ظرف تحت شرایط استریل

■ برای رسیدن به پاسخ دقیق و گاهی زمان کوتاه ترکشت طی دو مرحله بطور همزمان انجام

می شود : کشت باغنی سازی و کشت مستقیم

■ کشت با غنی سازی:

- انتقال 1 تا 2 میلی لیتر یا 1 تا 2 گرم از محتویات ظرف پس از مخلوط و یکنواخت شدن کامل محتویات ، به 2 لوله محیط کشت کوکدمیت ( cooked meat media )
- انتقال 1 تا 2 میلی لیتر یا 1 تا 2 گرم از محتویات ظرف پس از مخلوط و یکنواخت شدن کامل محتویات ، به 2 لوله محیط کشت PE2 ( Pepton yeast extract )  
bromocresol purple broth)
- گرمخانه گذاری لوله های فوق به مدت 2 تا 5 روز دردمای 30 تا 35 درجه سلسیوس در شرایط هوازی برای محیط کشت کوکد میت و در شرایط بی هوازی برای محیط کشت PE2
- بررسی لوله ها از نظر کدورت، بوی تعفن و تولید اسیدوگاز
- از لوله های مشکوک بصورت دوپلیکیت مقدار 1 میلی لیتر در 4 پلیت انتقال داده و کشت پورپلیت با محیط کشت آگار حاوی جگر و گوشت گوساله ( LVA ) ( یا آگار تقویت شده کلستریدیوم ( Reinforced Clostridial Agar =RCA ) ) و محیط کشت پلیت کانت آگار ( یا تریپتیک سوی آگار) انجام دهید
- گرمخانه گذاری پلیت ها به مدت 2 تا 5 روز دردمای 35 درجه سلسیوس تحت شرایط بی هوازی برای محیط کشت LVA و شرایط هوازی برای محیط کشت پلیت کانت آگار
- بررسی پلیت ها و تهیه لام از کلنی های رشد کرده و رنگ آمیزی گرم
- کشت مستقیم:
- همزمان با انتقال نمونه در مرحله کشت با غنی سازی، 1 تا 2 میلی لیتر یا 1 تا 2 گرم از محتویات ظرف پس از مخلوط و یکنواخت شدن کامل محتویات را به 4 پلیت انتقال داده و کشت پورپلیت با محیط کشت آگار حاوی جگر و گوشت گوساله ( LVA ) ( یا آگار تقویت شده کلستریدیوم ( Reinforced Clostridial Agar =RCA ) ) و محیط کشت پلیت کانت آگار ( یا تریپتیک سوی آگار) انجام دهید
- گرمخانه گذاری پلیت ها به مدت 2 تا 5 روز دردمای 30 تا 35 درجه سلسیوس تحت شرایط بی هوازی برای محیط کشت LVA و شرایط هوازی برای محیط کشت پلیت کانت آگار

■ بررسی پلیت ها و تهیه لام از کلنی های رشد کرده و رنگ آمیزی گرم

**(ب) جداسازی باکتری های گرمادوست هوازی و بی هوازی:**

■ گرمخانه گذاری نمونه قبل از باز کردن: حداقل یک نمونه به مدت 5 تا 7 روز دردمای 55 درجه سلسیوس

■ ضد عفونی کردن ظرف با محلول حاوی 100 میکروگرم در لیتر کلریا با الکل اتانل 70 درصد به مدت 10 تا 15 دقیقه

■ باز نمودن قوطی تحت شرایط استریل

■ برای رسیدن به پاسخ دقیق و گاهی زمان کوتاه تر کشت طی دو مرحله بطور همزمان انجام می شود : کشت باغنی سازی و کشت مستقیم

■ کشت با غنی سازی:

■ انتقال 1 تا 2 میلی لیتر یا 1 تا 2 گرم از محتویات ظرف پس از مخلوط و یکنواخت شدن

کامل محتویات ، به 2 لوله محیط کشت کوکدمیت (cooked meat media)

■ انتقال 1 تا 2 میلی لیتر یا 1 تا 2 گرم از محتویات ظرف پس از مخلوط و یکنواخت شدن

کامل محتویات ، به 2 لوله محیط کشت PE2 ( Pepton yeast extract )

bromocresol purple broth)

■ یک لوله از هر یک از محیط های کشت کوکدمیت و PE2 را به مدت 10 دقیقه در بن

ماری آب گرم با دمای 80 درجه سلسیوس قرار داده تا شوک حرارتی صورت گیرد

■ گرمخانه گذاری تمامی لوله های فوق به مدت 3 تا 5 روز دردمای 55 درجه سلسیوس در

شرایط هوازی برای محیط کشت کوکدمیت و در شرایط بی هوازی برای محیط کشت PE2

■ بررسی لوله ها از نظر کدورت، بوی تعفن و تولید اسیدوگاز

■ از لوله های مشکوک بصورت دوپلیکیت مقدار 1 میلی لیتر در 4 پلیت انتقال داده و کشت

پورپلیت با محیط کشت آگار حاوی جگر و گوشت گوساله ( LVA ) (یا آگار تقویت شده

کلستریدیوم ( Reinforced Clostridial Agar =RCA ) ( ) و محیط کشت پلیت کانت

آگار (یا تریپتیک سوی آگار) انجام دهید

■ گرمخانه گذاری پلیت ها به مدت 2 تا 5 روز دردمای 55 درجه سلسیوس تحت شرایط بی

هوازی برای محیط کشت LVA و شرایط هوازی برای محیط کشت پلیت کانت آگار

■ بررسی پلیت ها و تهیه لام از کلنی های رشد کرده و رنگ آمیزی گرم

■ کشت مستقیم:

■ همزمان با انتقال نمونه در مرحله کشت با غنی سازی، 1 تا 2 میلی لیتر یا 1 تا 2 گرم

از محتویات ظرف پس از مخلوط و یکنواخت شدن کامل محتویات را به 4 پلیت انتقال داده و

کشت پورپلیت با محیط کشت آگار حاوی جگر و گوشت گوساله ( LVA ) (یا آگار تقویت

شده کلستریدیوم ( Reinforced Clostridial Agar =RCA ) ( ) و محیط کشت پلیت کانت

آگار (یا تریپتیک سوی آگار) انجام دهید

■ گرمخانه گذاری پلیت ها به مدت 2 تا 5 روز دردمای 55 درجه سلسیوس تحت شرایط بی

هوازی برای محیط کشت LVA و شرایط هوازی برای محیط کشت پلیت کانت آگار

■ بررسی پلیت ها و تهیه لام از کلنی های رشد کرده و رنگ آمیزی گرم

## 2-آزمون مواد غذایی اسیدی که دارای pH 4/6 و یا کمتر هستند:

این مواد غذایی باید از نظر باکتری های مزوفیل هوازی ، باکتری های گرمادوست هوازی و

همچنین کپک و مخمر ، منفی در گرم یا میلی لیتر باشند. لذا آزمون طی مراحل زیر باید انجام شود:

### الف ( جداسازی باکتری های مزوفیل هوازی:

■ گرمخانه گذاری نمونه قبل از باز کردن: حداقل یک نمونه به مدت 10 روز دردمای 25 تا

30 درجه سلسیوس

■ ضد عفونی کردن ظرف با محلول حاوی 100 میکروگرم در لیتر کلر یا با الکل اتانل 70

درصد به مدت 10 تا 15 دقیقه

■ باز نمودن ظرف تحت شرایط استریل

- برای رسیدن به پاسخ دقیق و گاهی زمان کوتاه تر کشت طی دو مرحله بطور همزمان انجام می شود : کشت باغنی سازی و کشت مستقیم
- کشت با غنی سازی:
- انتقال 1 تا 2 میلی لیتر یا 1 تا 2 گرم از محتویات ظرف پس از مخلوط و یکنواخت شدن کامل محتویات ، به 2 لوله حاوی محیط کشت آبگوشت اسیدی (AB(Acid Broth) و یا DTB(Dextrose Tryptone Broth)
- گرمخانه گذاری به مدت 2 تا 5 روز دردمای 25 تا 30 درجه سلسیوس در شرایط هوازی
- بررسی لوله ها از نظر کدورت، بوی تعفن و تولید اسیدوگاز
- از لوله های مشکوک بصورت دوپلیکیت مقدار 1 میلی لیتر در 4 پلیت انتقال داده و کشت پورپلیت با محیط کشت OSA(orange Serum Agar) و محیط کشت APT(All-Purpose Medium with Tween) انجام دهید
- گرمخانه گذاری پلیت ها به مدت 2 تا 5 روز دردمای 30 درجه سلسیوس تحت شرایط هوازی
- بررسی پلیت ها و تهیه لام از کلنی های رشد کرده و رنگ آمیزی گرم
- کشت مستقیم:
- همزمان با انتقال نمونه در مرحله کشت با غنی سازی، 1 حلقه کامل کشت ( لوپ) از محتویات ظرف پس از مخلوط و یکنواخت شدن کامل محتویات را روی 4 پلیت حاوی محیط های کشت OSA(orange Serum Agar) و محیط کشت APT(All-Purpose Medium with Tween) بصورت دوپلیکیت کشت خطی دهید.
- گرمخانه گذاری پلیت ها به مدت 2 تا 5 روز دردمای 30 درجه سلسیوس تحت شرایط هوازی
- بررسی پلیت ها و تهیه لام از کلنی های رشد کرده و رنگ آمیزی گرم

### **ب) جداسازی باکتری های گرمادوست هوازی:**

- گرمخانه گذاری نمونه قبل از باز کردن: حداقل یک نمونه به مدت 5 تا 7 روز دردمای 55 درجه سلسیوس
- ضد عفونی کردن ظرف با محلول حاوی 100 میکروگرم در لیتر کلریا با الکل اتانل 70 درصد به مدت 10 تا 15 دقیقه
- باز نمودن قوطی تحت شرایط استریل
- برای رسیدن به پاسخ دقیق و گاهی زمان کوتاه تر، کشت طی دو مرحله بطور همزمان انجام می شود : کشت باغنی سازی و کشت مستقیم
- کشت با غنی سازی:
- انتقال 1 تا 2 میلی لیتر یا 1 تا 2 گرم از محتویات ظرف پس از مخلوط و یکنواخت شدن کامل محتویات ، به 2 لوله حاوی محیط کشت آبگوشت اسیدی (AB(Acid Broth) و یا DTB(Dextrose Tryptone Broth)
- گرمخانه گذاری تمامی لوله های فوق به مدت 5 روز دردمای 55 درجه سلسیوس در شرایط هوازی
- بررسی لوله ها از نظر کدورت، بوی تعفن و تولید اسیدوگاز
- از هر لوله مشکوک بصورت دوپلیکیت مقدار 1 میلی لیتر در پلیت انتقال داده و کشت پور پلیت با محیط کشت ترمواسیدورانس (TA) انجام دهید
- گرمخانه گذاری پلیت ها به مدت 2 تا 5 روز دردمای 55 درجه سلسیوس تحت شرایط هوازی
- بررسی پلیت ها و تهیه لام از کلنی های رشد کرده و رنگ آمیزی گرم
- کشت مستقیم:
- همزمان با انتقال نمونه در مرحله کشت با غنی سازی، 1 حلقه کامل کشت ( لوپ) از محتویات ظرف پس از مخلوط و یکنواخت شدن کامل محتویات را روی 4 پلیت حاوی محیط های

## کشت OSA(orange Serum Agar) و محیط کشت APT(All-Purpose

Medium with Tween) بصورت دوپلیکیت کشت خطی دهید.

■ گرمخانه گذاری پلیت ها به مدت 2 تا 5 روز دردمای 55 درجه سلسیوس تحت شرایط هوازی

■ بررسی پلیت ها و تهیه لام از کلنی های رشد کرده و رنگ آمیزی گرم

### پ) جداسازی کپک و مخمر:

■ گرمخانه گذاری نمونه قبل از باز کردن: حداقل یک نمونه به مدت 10 روز دردمای 25 تا 30 درجه سلسیوس

■ ضد عفونی کردن ظرف با محلول حاوی 100 میکروگرم در لیتر کلر یا با الکل اتانل 70 درصد به مدت 10 تا 15 دقیقه

■ باز نمودن ظرف تحت شرایط استریل

■ برای رسیدن به پاسخ دقیق و گاهی زمان کوتاه تر کشت طی دو مرحله بطور همزمان انجام می شود : کشت باغنی سازی و کشت مستقیم

■ کشت با غنی سازی:

■ انتقال 1 تا 2 میلی لیتر یا 1 تا 2 گرم از محتویات ظرف پس از مخلوط و یکنواخت شدن کامل محتویات ، به 2 لوله حاوی محیط کشت آبگوشت اسیدی AB(Acid Broth) و یا

### DTB(Dextrose Tryptone Broth)

■ گرمخانه گذاری به مدت 5 روز دردمای 25 تا 30 درجه سلسیوس در شرایط هوازی

■ بررسی لوله ها از نظر کدورت، بوی تعفن و تولید اسیدوگاز

■ از هر لوله مشکوک بصورت دوپلیکیت مقدار 1 حلقه کامل کشت ( لوپ) روی پلیت حاوی

محیط کشت SDA(Sabouraud Dextrose Agar) یا YGC(Yeast extract

Glucose Chloramphenicol agar) کشت خطی انجام دهید.

■ گرمخانه گذاری پلیت ها به مدت 2 تا 5 روز دردمای 30 درجه سلسیوس تحت شرایط

هوایی

■ بررسی پلیت ها و تهیه لام از کلنی های رشد کرده و رنگ آمیزی گرم

■ کشت مستقیم:

■ همزمان با انتقال نمونه در مرحله کشت با غنی سازی، 1 حلقه کامل کشت ( لوپ) از محتویات

ظرف پس از مخلوط و یکنواخت شدن کامل محتویات را روی 4 پلیت حاوی محیط های

کشت SDA(Sabouraud Dextrose Agar) یا YGC(Yeast extract

Glucose Chloramphenicol agar) بصورت دوپلیکیت کشت خطی دهید.

■ گرمخانه گذاری پلیت ها به مدت 2 تا 5 روز دردمای 25 درجه سلسیوس تحت شرایط

هوایی

■ بررسی پلیت ها و تهیه لام از کلنی های رشد کرده و رنگ آمیزی گرم

■ استاندارد ملی ایران سال 1385 شماره 2326

### **شناسایی کلستریدیوم های احیا کننده سولفیت:**

قرار دادن دو لوله حاوی 10 میلی لیتر محیط کشت Cooked Meat در بن ماری جوش به

مدت 10 دقیقه جهت هوا گیری

الف) شناسایی کلستریدیوم های احیا کننده سولفیت:

■ انتقال 1 میلی لیتر از رقت اولیه نمونه به یکی از لوله های Cooked Meat خنک

شده فوق

ب) شناسایی اسپور کلستریدیوم های احیا کننده سولفیت:

■ شوک حرارتی باقیمانده نمونه (10 دقیقه در بن ماری با دمای 65 درجه سلسیوس )

■ انتقال 1 میلی لیتر از نمونه حرارت دیده به یکی دیگر از لوله های Cooked Meat

■ افزودن چند میلی لیتر وازپار ( وازلین- پارافین) به سطح تمام لوله های مرحله الف و ب

جهت ایجاد شرایط بی هوایی

■ گرمخانه گذاری لوله ها در دمای 35 تا 37 درجه سلسیوس به مدت 48 ساعت

■ کشت خطی از لوله های Cooked Meat بر روی SPS Agar

(Sulfite Polymyxin Sulfadiazine)

یا (Tryptose Sulfite Cycloserine) TSC Agar

■ گذاردن پلیت ها در جار بی هوای

■ گرمخانه گذاری در دمای 35 تا 37 درجه سلسیوس به مدت 48 ساعت

■ بررسی وجود کلنی های سیاه رنگ

■ استاندارد ملی ایران سال 1385 شماره 2197

**شمارش کلستریدیوم های احیا کننده سولفیت:**

الف) شمارش کلستریدیوم های احیا کننده سولفیت:

■ افزودن 1 میلی لیتر از رقت مورد نیاز نمونه مستقیماً به پلیت خالی استریل

ب) شمارش اسپور کلستریدیوم های احیا کننده سولفیت:

■ ایجاد شوک حرارتی به رقت تهیه شده از نمونه (10 دقیقه در بن ماری با دمای 65 درجه

سلسیوس) و سپس افزودن 1 میلی لیتر از آن به پلیت خالی استریل

■ افزودن 15 تا 20 میلی لیتر SPS Agar یا TSC Agar به کل پلیت های مرحله الف و ب

و کشت به روش پور پلیت

■ گذاردن پلیت ها در جار بی هوای

■ گرمخانه گذاری در دمای 35 تا 37 درجه سلسیوس به مدت 48 ساعت

■ شمارش کلنی های سیاه رنگ x عکس رقت x عکس حجم استفاده شده

■ استاندارد ملی ایران سال 1385 شماره 2197

**شناسایی کلستریدیوم پرفرنژنس:**

■ برای تایید کلستریدیوم پرفرنژنس از کلنی های سیاه رنگ در انتهای آزمون شناسایی و یا

شمارش کلستریدیوم های احیا کننده سولفیت تست های زیر را انجام دهید:

■ رنگ آمیزی گرم برای مشاهده باسیل گرم مثبت، اسپور بطور نادر دیده می شود و ساب ترمینال است، کاتالاز منفی، قدرت رشد در شرایط بی هوازی، عدم رشد در شرایط هوازی، لاکتوز، گلوکز و مالتوز: مثبت، مانیتول: منفی، آزمایش شیر لیتموس: ایجاد لخته طوفانی، اندول: منفی، اوره آز: منفی، حرکت: منفی، احیا نترات: مثبت، هیدرولیز ژلاتین: مثبت، لستیناز: مثبت، نگلر تست: مثبت، لپیز: منفی

■ استاندارد ملی ایران سال 1385 شماره 2197

### شناسایی سم کستریدیوم بوتولینوم به روش بیولوژیکی (مستقیم و غیر مستقیم):

در روش شناسایی سم بطور مستقیم از ابتدا ماده غذایی مشکوک را از نظر وجود این سم مورد آزمون قرار می دهیم و در روش غیر مستقیم ابتدا کشت ماده غذایی انجام می گردد و سپس بر روی باکتری رشد کرده تست شناسایی سم انجام می شود.

نمونه را باید تا زمان آزمون در یخچال نگهداری کرد و از یخ زدن آن جلوگیری شود.

ضد عفونی کردن قوطی های کنسرو یا ظرف با محلول حاوی 100 میکروگرم در لیتر کلر یا با

الکل اتانل 70 درصد به مدت 10 تا 15 دقیقه

### جستجوی سم به روش مستقیم:

مقداری از نمونه مورد آزمون تا 25 گرم را با حداقل مایع در یک هاون استریل ریخته و به ازای هر گرم نمونه یک میلی لیتر بافر ژلاتین فسفات بیفزایید.

به مدت 10 دقیقه مخلوط فوق را کاملا یکنواخت کنید.

سپس به یک لوله آزمایش استریل منتقل کنید.

به مدت 15 دقیقه با دور 15000g در دمای 5 درجه سلسیوس سانتریفوژ کنید.

pH مایع رویی را پس از سانتریفوژ با استفاده از اسید کلریدریک یا سود 1 نرمال بین 6 تا 6/2

تنظیم کنید. (محلول آزمون)

1 تا 3 میلی لیتر از محلول آزمون را به یک لوله آزمایش منتقل کرده و 10 دقیقه در حمام آب

جوش قرار دهید. (محلول کنترل)

3/6 میلی لیتر از محلول آزمونه را به یک لوله آزمایش منتقل کرده، 0/4 میلی لیتر تریپسین 10% به آن افزوده و آن را یک ساعت در 35 تا 37 درجه سلسیوس گرمخانه گذاری کنید. (محلول حاوی تریپسین)

6 موش سفید آزمایشگاهی با وزن تقریبی 15 تا 18 گرم انتخاب کرده سپس به هر 2 موش یکی از محلول های تهیه شده در فوق (محلول آزمونه، محلول کنترل و محلول حاوی تریپسین) را تزریق کنید. موش ها را از زمان تزریق تا 48 ساعت تحت نظر قرار داده و علائم مسمومیت و مرگ و میر آنها را ثبت کنید.

چنانچه تلفاتی در موش ها مشاهده نشود ماده غذایی عاری از سم بوتولیسم بوده ولی ممکن است باکتری کلستریدیوم در ماده غذایی وجود داشته باشد که به سبب نامساعد بودن شرایط قادر به تولید سم نبوده است. لذا باید آزمایش غیرمستقیم به شرح زیر انجام شود:

#### **جستجوی سم به روش غیر مستقیم :**

در صورتیکه شک وجود کلستریدیوم بوتولینوم در ماده غذایی وجود داشته باشد، به روش زیر کشت از نمونه انجام داده تا کلنی باکتری حاصل شود. سپس آزمایش جستجوی سم به روش مستقیم را دقیقاً و عیناً روی سوسپانسیون کشت کلنی های باکتری بجای نمونه غذایی مجدد انجام دهید.

■ ضد عفونی کردن ظرف با محلول حاوی 100 میکروگرم در لیتر کلر یا با الکل اتانل 70

درصد به مدت 10 تا 15 دقیقه

■ باز نمودن ظرف تحت شرایط استریل

■ هواگیری کردن محیط های کشت قبل از افزودن نمونه ، در بخار آب یا آب جوش به مدت 10

تا 15 دقیقه. در این عمل ابتدا در لوله ها را به مقدار بسیار اندک بطرف باز شدن بچرخانید، و

طوری در آب جوش قرار دهید که سطح آب با دهانه لوله کاملاً فاصله داشته باشد. پس از

زمان لازم بدون تکان دادن لوله به آرامی در آن را کامل بسته و به سرعت زیر آب سرد

گرفته تا سرد شود.

- انتقال 1 تا 2 میلی لیتر یا 1 تا 2 گرم از محتویات ظرف پس از مخلوط و یکنواخت شدن کامل محتویات ، به 2 لوله محیط کشت کوکدمیت (cooked meat media ) هواگیری شده
- انتقال 1 تا 2 میلی لیتر یا 1 تا 2 گرم از محتویات ظرف پس از مخلوط و یکنواخت شدن کامل محتویات ، به 2 لوله محیط کشت (تریپتی کاز پپتون دارای عصاره گوشت و مخمر) TPGY یا PE2 Pepton yeast extract bromocresol purple (broth)
- گرمخانه گذاری لوله های فوق به مدت 7 روز در شرایط بی هوازی دردمای 30 تا 35 درجه سلسیوس برای محیط کشت کوکد میت و در دمای 26 تا 28 درجه سلسیوس برای محیط کشت TPGY یا PE2
- بررسی لوله ها از نظر کدورت، بوی تعفن ، تولید گاز و تجزیه نسبی ذرات گوشت
- با توجه به اینکه بیشترین غلظت سم بوتولیسم بعد از 7 روز گرمخانه گذاری ایجاد خواهد شد، در صورت عدم ایجاد علائم فوق و شواهد رشد باکتری گرمخانه گذاری را تا 10 روز دیگر ادامه دهید.
- برای جداسازی اسپورهای کلستریدیوم بوتولینوم از لوله های رشد یافته ، 1 تا 2 میلی لیتر از لوله های رشد یافته فوق را با هم حجم آن الکل اتانل مطلق که توسط صافی غشایی با منافذ 0/2 میکرون استریل شده باشد در یک لوله استریل مخلوط کرده و به مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار دهید. (با استفاده از حرارت در دمای 80 درجه سلسیوس به مدت 10 تا 15 دقیقه نیز می توان سلول های رویشی باکتری را از بین برد ولی این روش به علت احتمال وجود انواع غیر پروتئولیتیک توصیه نمی شود و بهتر است از الکل برای این منظور طبق روش ذکر شده استفاده کرد)

- از لوله های فوق 1 تا 2 حلقه کشت (1 تا 2 لوپ) در دوسری روی محیط کشت Anaerobic egg yolk agar یا (LVEY) Liver Veal Egg Yolk agar یا آگار تقویت شده کلستریدیوم (Reinforced Clostridial Agar =RCA) ) کشت خطی انجام دهید.
- یک سری از پلیت ها به مدت 2 تا 5 روز دردمای 35 درجه سلسیوس تحت شرایط بی هوازی و یک سری از آن ها را در شرایط هوازی گرمخانه گذاری کنید.
- بررسی پلیت ها و انتخاب کلنی های برجسته یا صاف، نرم یا خشن، اغلب دارای کمی حالت پخش شدگی با لبه نامنظم (کلنی های انواع C, D و E معمولاً در اثر فعالیت لسیتریناز دارای هاله رسوبی زرد رنگ بزرگ تری نسبت به انواع A و B هستند).
- از حداقل 5 کلنی مشخص انتخاب شده توسط سیم کشت (انس) بطور جداگانه در محیط های کشت کوکدمیت (cooked meat media) و TPGY یا PE2 کشت انجام دهید.
- کوکد میت را در دمای 35 درجه سلسیوس و TPGY یا PE2 را در دمای 26 درجه سلسیوس به مدت 5 روز در شرایط بی هوازی گرمخانه گذاری کنید.
- از لوله های مشکوک 1 تا 2 حلقه کشت (1 تا 2 لوپ) در دوسری روی پلیت حاوی محیط کشت Anaerobic egg yolk agar یا (LVEY) Liver Veal Egg Yolk agar یا آگار تقویت شده کلستریدیوم (Reinforced Clostridial Agar =RCA) ) کشت خطی انجام دهید.
- یک سری از پلیت ها به مدت 48 ساعت دردمای 35 درجه سلسیوس تحت شرایط بی هوازی و یک سری از آن ها را در شرایط هوازی گرمخانه گذاری کنید.
- در صورتیکه در پلیت های گرمخانه گذاری شده در شرایط هوازی و بی هوازی کلنی یکسان رشد کرد نمونه از نظریه وجود کلستریدیوم بوتولینوم منفی است .
- در صورتیکه در پلیت های گرمخانه گذاری شده در شرایط هوازی و بی هوازی کلنی غیریکسان رشد کرد ،لوله های کوکد میت و TPGY یا PE2 مربوطه که در شرایط بی هوازی گرمخانه گذاری شده بودند را طبق آزمون جستجوی سم به روش مستقیم، سانتریفوژ

کرده و محلول رویی آن را برای مراحل بعدی آزمون جستجوی سم به روش مستقیم استفاده کنید.

■ در صورتیکه در پلیت های گرمخانه گذاری شده در شرایط هوای رشدی مشاهده نشود و در شرایط بی هوای کلنی رشد کرده باشد، لوله های کوکد میت و TPGY یا PE2 مربوطه که در شرایط بی هوای گرمخانه گذاری شده بودند را طبق آزمون جستجوی سم به روش مستقیم، سانتریفوژ کرده و محلول رویی آن را برای مراحل بعدی آزمون جستجوی سم به روش مستقیم استفاده کنید.

■ استانداردهای ملی ایران سال 1385 شماره های 2323 و 2326 و 2197

### شناسایی سودوموناس آئروژینوزا:

■ در مورد نمونه های جامد، غنی سازی نمونه در مالاشیت گرین برات غلیظ یا آبگوشت اسپارازین با اتانول ( در مورد نمونه های مایع قابل فیلتر، عبور از فیلتر باکتریولوژیک)

■ گرمخانه گذاری دردمای 35 تا 37 درجه سلسیوس به مدت 48 ساعت

■ در صورت ایجاد کدورت در برات، کشت خطی بر روی محیط کشت

*Pseudomonas Selective agar* یا Cetrimide آگار دارای گلیسیرین

■ گرمخانه گذاری دردمای 35 تا 37 درجه سلسیوس به مدت 48 ساعت

■ انجام تستهای تاییدی برای کلنی های مشکوک

تستهای تاییدی سودوموناس آئروژینوزا: وجود رنگدانه سبز- آبی، فلورسنت تحت UV، اکسیداز

مثبت ( معرف اکسیداز: تترامتیل پارافنیلن دی آمین هیدروکلراید)، رشد در دمای 42 درجه

سلسیوس، هیدرولیز کازئین (در سیتیریماید آگار حاوی شیر خشک)، واکنش آلکالن/آلکالن فاقد

H<sub>2</sub>S در TSI آگار، احیای نیترات، ذوب ژلاتین، حرکت مثبت، کاتالاز مثبت، عدم رشد در دمای

4 درجه سلسیوس

■ استاندارد ملی ایران سال 1373 شماره 3140

### شناسایی سالمونلا:

- 25 گرم نمونه در 225 میلی لیتر Buffered Peptone Water
- گرمخانه گذاری به مدت 18 تا 24 ساعت در 35 تا 37 درجه سلسیوس
- افزودن 1 میلی لیتر از محلول فوق در 10 میلی لیتر از هر یک از محیط های کشت غنی کننده و انتخابی
- 1) Selenite Enrichment Broth ,
- 2) Tetrathionate Broth (یا Tetrathionate Crystal-violet Enrichment (Broth acc. To PREUSS
- 3) Rappaport vassiliadis broth
- حداقل دو محیط کشت از محیط کشت های فوق استفاده شود. توصیه می شود محیط کشت Rappaport vassiliadis broth حتما استفاده شود.
- گرمخانه گذاری به مدت 18 تا 24 ساعت در دمای 35 تا 37 درجه سلسیوس برای محیط کشت اول و دمای 41 تا 43 درجه سلسیوس برای دو محیط کشت بعدی در صورتیکه از محیط کشت تتراتیونات با کریستال ویوله استفاده می کنید گرمخانه گذاری به مدت 18 تا 24 ساعت در دمای 35 تا 37 درجه سلسیوس باید باشد.
- کشت خطی از سه محیط فوق بر روی محیط های کشت انتخابی سالمونلا مانند:  
,Chrom agar, Hecton entric agar, SS, XLD, BG Agar...
- حداقل 2 محیط کشت از محیط کشت های فوق استفاده شود.
- گرمخانه گذاری به مدت 18 تا 24 ساعت در 35 تا 37 درجه سلسیوس
- مشاهده و بررسی کلنی های رشد کرده روی محیط های استفاده شده و انتخاب کلنی های مشکوک به شرح زیر برای انجام تست های تاییدی بعدی :
- در HE Agar (Hecton entric agar): کلنی آبی متمایل به سبز , با یا بدون مرکز مشکی

■ در XLD Agar (Xylose Lysine Deoxycholate): کلنی هم رنگ محیط، شفاف، با

یا بدون مرکز مشکی

■ در SS Agar (*Salmonella Shigella* agar): کلنی بیرنگ، کرم، زرد و شفاف، با

یا بدون مرکز مشکی

■ در BG Agar (Brilliant Green agar): کلنی صورتی

تستهای تاییدی بیوشیمیایی سالمونلا:

■ کشت در ONPG broth

(Ortho Nitro Phenyl-β-D-Galactopyranoside):

گرمخانه گذاری به مدت 1-6 ساعت در دمای 35 تا 37 درجه سلسیوس

نتیجه: عدم تجزیه ONPG در سالمونلاها و عدم تغییر رنگ محیط به رنگ زرد

■ کشت در TSI (Triple Sugar Iron Agar):

کشت به صورت عمقی و سطحی

گرمخانه گذاری در دمای 37 درجه سلسیوس به مدت 16 تا 24 ساعت

نتیجه: رنگ قرمز در سطح و رنگ زرد در عمق (اسید / آلكالن) با یا بدون رنگ مشکی در

بخش تحتانی

■ کشت در LIA (Lysine Iron Agar):

کشت به صورت عمقی و سطحی

گرمخانه گذاری در دمای 37 درجه سلسیوس به مدت 16 تا 24 ساعت

نتیجه در مورد اغلب سالمونلاها: تمام آگار بنفش رنگ با یا بدون رنگ مشکی در بخش تحتانی

(سالمونلا پاراتایفی A در عمق زرد رنگ)

■ کشت در SIM (Sulfite Indole Motility):

کشت به صورت عمقی با حداقل حرکت سوزن کشت

گرمخانه گذاری در دمای 37 درجه سلسیوس به مدت 16 تا 24 ساعت

نتیجه: اندول منفی, حرکت معمولاً مثبت,  $H_2S$  معمولاً مثبت

(سالمونلا پاراتایفی A:  $H_2S$  منفی)

■ کشت در **Simmon Citrate Agar**:

کشت به صورت سطحی

گرمخانه گذاری دردمای 37 درجه سلسیوس به مدت 16 تا 24 ساعت

نتیجه: مثبت (ایجاد رنگ آبی در آگار) (سالمونلا پاراتایفی A و گروه D دارای نتیجه منفی هستند

و رنگ محیط کشت به رنگ سبز باقی می ماند)

■ کشت در **urea** برات یا **urea** آگار :

انتقال کلنی مشکوک به **urea** برات یا کشت در **urea** آگار

گرمخانه گذاری دردمای 37 درجه سلسیوس به مدت 16 تا 24 ساعت

نتیجه: به علت نبود آنزیم اوره آز تغییر رنگی مشاهده نمی شود.

■ کشت در متیل رد برات (MR):

گرمخانه گذاری دردمای 37 درجه سلسیوس به مدت 16 تا 24 ساعت

افزودن چند قطره معرف متیل رد

نتیجه: تغییر رنگ از زرد به قرمز (متیل رد مثبت)

در صورتیکه با انجام تست های تاییدی بیوشیمیایی ، سالمونلا تشخیص داده شود و یا بطور

مشکوک تشخیص داده شود بایستی با انجام تست های سرولوژیکی تشخیص قطعی تر و سپس

نتیجه اعلام شود.

تست سرولوژیکی سالمونلا:

■ انتقال کلنی مشکوک به يك قطره سرم فیزیولوژی بر روی لام و تهیه يك مخلوط یکنواخت

■ افزودن يك قطره آنتی سرم و بررسی وجود آگلوتیناسیون با حرکت آهسته لام

■ در صورت عدم تشکیل آگلوتیناسیون:

- تهیه سوسپانسیون از کلنی مشکوک در لوله آزمایش حاوی سرم فیزیولوژی
- قرار دادن لوله در بن ماری جوش به مدت 10 دقیقه جهت حذف کیپسول
- تکرار آزمون با يك قطره از سوسپانسیون حرارت دیده
- استاندارد ملی ایران سال 1381 شماره 1810

### شمارش مخمرهای اسموفیلیک:

بعنوان رقیق کننده توصیه می شود از بافر فسفات حاوی 40% گلوکز استفاده می شود.

- انتقال 1 میلی لیتر از رقت مورد نیاز به پلیت خالی استریل
- افزودن 15 تا 20 میلی لیتر آگار عصاره مالت و مخمر با 40% گلوکز (MY40G)
- کشت به صورت پورپلیت یک لایه ای
- گرمخانه گذاری به مدت 5 تا 7 روز در دمای 25 تا 30 درجه سلسیوس
- شمارش کلنی:

تعداد کلنی  $\times$  عکس رقت  $\times$  عکس حجم = cfu/g

(نکات مهم: به علت تغلیظ محیط کشت، آگار را در موقع کشت خوب مخلوط نموده و به علت گرمخانه گذاری طولانی، از رطوبت کافی انکوباتور اطمینان حاصل کنید.)

- استاندارد ملی ایران سال 1370 شماره 3196