ISIRI

2324

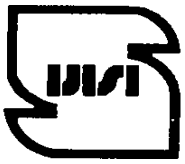
2nd.edition

جمهوری اسلامی ایران

Islamic Republic of Iran

مؤسسه استاندارد وتحقیقات صنعتی ایران

Institute of Standards and Industrial Research of Iran



استانداردملی ایران

۲۳۲۴

تجدیدنظر دوم

میکروبیولوژی موادغذایی و خوراک دام- روش شمارش باسیلوس سرئوس احتمالی به روش شمارش کلنی در دمای ۳۰ درجه سلسیوس- روش آزمون

Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the enumeration of presumptive Bacillus cereus - Colony-count technique at 30°c-Test method

بسمه تعالی

آشنایی با مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب قانون، تنها مرجع رسمی کشور است که عهده دار وظیفه تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) میباشد.

تدوین استاندارد در رشته های مختلف توسط کمیسیون های فنی مرکب از کارشناسان مؤسسه، صاحبنظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی واقتصادی آگاه ومرتبط با موضوع صورت میگیرد. سعی بر این است که استانداردهای ملی، در جهت مطلوبیت ها و مصالح ملی وبا توجه به شرایط تولیدی، فنی و فن آوری حاصل از مشارکت آگاهانه و منصفانه صاحبان حق و نفع شامل: تولیدکنندگان ،مصرف کنندگان، بازرگانان، مراکز علمی و تخصصی و نهادها و سازمان های دولتی باشد.پیش نویس استانداردهای ملی جهت نظرخواهی برای مراجع ذینفع واعضای کمیسیون های فنی مربوط ارسال میشود و پس از دریافت نظرات وپیشنهادها در کمیته ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب به عنوان استاندارد ملی (رسمی) چاپ و منتشر می شود.

پیش نویس استانداردهایی که توسط مؤسسات و سازمان های علاقمند و ذیصلاح و با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می شود نیز پس از طرح و بررسی در کمیته ملی مربوط و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی چاپ ومنتشرمی گردد. بدین ترتیب استانداردهایی ملی تلقی می شود که بر اساس مفاد مندرج در استاندارد ملی شماره ((۵)) تدوین و در کمیته ملی مربوط که توسط مؤسسه تشکیل میگردد به تصویب رسیده باشد.

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران از اعضای اصلی سازمان بین المللی استاندارد میباشد که در تدوین استانداردهای ملی ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی های خاص کشور، از آخرین پیشرفت های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین المللی استفاده می نماید.

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران می تواند با رعایت موازین پیش بینی شده در قانون به منظور حمایت از مصرف کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی وعمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردها را با تصویب شورای عالی استاندارد اجباری نماید. مؤسسه می تواند به منظور حفظ بازارهای بین المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه بندی آن را اجباری نماید.

همچنین بمنظور اطمینان بخشیدن به استفاده کنندگان از خدمات سازمان ها و مؤسسات فعال در زمینه مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و گواهی کنندکان سیستم های مدیریت کیفیت ومدیریت زیست محیطی، آزمایشگاه ها و کالیبره کنندگان وسایل سنجش، مؤسسه استاندارد اینگونه سازمان ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران مورد ارزیابی قرار داده و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامه تأیید صلاحیت به آنها اعطا نموده و بر عملکرد آنها نظارت می نماید. ترویج سیستم بین المللی یکاها ، کالیبراسیون وسایل سنجش ، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی از دیگر وظایف این مؤسسه می باشد.

نشانی مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران : کرج ـ شهر صنعتی، صندوق پستی ۱۶۳-۳۱۵۸۵

دفتر مرکزی : تهران ـ بالاتر از میدان ولیعصر، کوچه شهید شهامتی، پلاک ۱۴، صندوق پستی ۶۱۳۹-۱۴۱۵۵

تلفن مؤسسه در کرج: ۸-۲۸۰۶۰۳۱-۰۲۶۱

تلفن مؤسسه در تهران: ۹-۸۹۰۹۳۰۸-۰۲۱

دورنگار: کرج ۲۸۰۸۱۱۴-۰۲۶۱ ـ تهران ۸۸۰۲۲۷۶ – ۰۲۱

بخش فروش ـ تلفن: ۲۸۰۷۰۴۵-۰۲۶۱ دورنگار: ۲۸۰۷۰۴۵-۰۲۶۱

پیام نگار: Standard @ isiri.or.iran

بهاء: ۲۲۵۰ ریال

Headquarter : ***Institute Of Standards And Industrial Research Of IRAN***

P.O.Box: ***Karaj – IRAN 31585-163***

Cenral Office : *NO.14,Shahid Shahamati St. , Valiasr Ave. Tehran*

P*.O.Box:* ***14155-6139***

Tel.(Karaj): ***0098 261 2806031-8***

Tel.(Tehran): ***0098 21 8909308-9***

Fax.(Karaj): ***0098 261 2808114***

Fax.(Tehran): ***0098 21 8802276***

Email: ***Standard @ isiri.or.iran***

Price: ***22500”RLS***

کمیسیون استاندارد میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام-
روش شمارش باسیلوس سرئوس احتمالی به روش شمارش کلنی
در دمای ۳۰ درجه سلسیوس – روش آزمون
(تجدیدنظر)

رئیس	سمت یا نمایندگی
رحیمی فرد ، ناهید (دکترای میکروب شناسی)	وزارت بهداشت،درمان و آموزش پزشکی اداره کل آزمایشگاه های کنترل غذا و دارو

اعضاء

ابراهیمی ، غلامحسن (لیسانس صنایع غذایی)	موسسه استانداردوتحقیقات صنعتی ایران
زرسازی ، برتا (لیسانس بهداشت عمومی)	موسسه استانداردوتحقیقات صنعتی ایران
شاه حسینی ، مهناز (فوق لیسانس علوم و صنایع غذایی)	شرکت صنعتی پارس مینو
فروهش تهرانی ، هما (فوق لیسانس میکروبیولوژی)	دانشگاه علوم پزشکی ایران
فیاضی ، اکرم سادات (لیسانس تغذیه)	موسسه استانداردوتحقیقات صنعتی ایران
قربانپور اسکویی ، بیژن (لیسانس میکروبیولوژی) غلامی ، سپیده (لیسانس میکروبیولوژی)	آزمایشگاه همکار دانش یاخته آذربایجان شرقی شرکت صنعتی پارس مینو
مهدی زاده ، مهرانگیز (فوق لیسانس میکروبیولوژی)	وزارت بهداشت،درمان و آموزش پزشکی اداره کل آزمایشگاه های کنترل غذا و دارو
نوری ، زهرا (لیسانس میکروبیولوژی)	وزارت بهداشت،درمان و آموزش پزشکی اداره کل آزمایشگاه های کنترل غذا و دارو

وثوقی مرند ، سهیلا
(لیسانس صنایع غذایی)

مرکز پژوهش های غلات

دبیر

شکراالهی ، فتانه
(فوق لیسانس صنایع غذایی)

مؤسسه استانداردوتحقیقات صنعتی ایران

فهرست اعضاء شرکت کننده در نودوسومین اجلاسیه کمیته ملی استاندارد میکروبیولوژی ۸۵/۵/۲۹

رئیس	سمت یا نمایندگی
رحیمی فرد ، ناهید پزشکی (دکترای میکروب شناسی)	وزارت بهداشت،درمان و آموزش اداره کل آزمایشگاه های کنترل غذا و دارو
اعضاء	
ابراهیمی ، غلامحسن (لیسانس صنایع غذایی)	موسسه استانداردوتحقیقات صنعتی ایران
زند وکیلی ، فاطمه ایران (فوق لیسانس تغذیه و بهداشت)	موسسه استانداردوتحقیقات صنعتی
زرسازی ، برتا (لیسانس بهداشت عمومی)	موسسه استانداردوتحقیقات صنعتی ایران
شاه حسینی ، مهناز (فوق لیسانس علوم و صنایع غذایی)	شرکت صنعتی پارس مینو
شکرالهی، فتانه (فوق لیسانس صنایع غذایی)	موسسه استانداردوتحقیقات صنعتی ایران
فلاح پور ، مسعود ایران (دکتری بیوتکنولوژی)	سازمان پژوهشهای علمی وتخصصی
فیاضی ، اکرم سادات (لیسانس تغذیه)	موسسه استانداردوتحقیقات صنعتی ایران
قربانپور اسکویی ، بیژن (لیسانس میکروبیولوژی)	آزمایـشگاه همکار دانـش یاخته آذربایجان شرقی
غلامی ، سپیده (لیسانس میکروبیولوژی)	شرکت صنعتی پارس مینو

کرمی، گیتی **(لیسانس تغذیه)**	**مرکز پژوهش های غلات**
مهدی زاده ، مهرانگیز **پزشکی** **(فوق لیسانس میکروبیولوژی)** **دارو**	**وزارت بهداشت،درمان و آموزش** **اداره کل آزمایشگاه های کنترل غذا و**
مرتضویان ،امیر **(دکتری صنایع غذایی)**	**هیئت علمی**
نوروزی ، سعید **استاندارد** **(دکتری دامپزشکی)**	**مشاور نماینده ریاست موسسه**
وثوقی مرند ، سهیلا **(لیسانس صنایع غذایی)**	**مرکز پژوهش های غلات**

دبیر

پیراوی ونک ، زهرا (فوق لیسانس صنایع غذایی)	مؤسسه استانداردوتحقیقات صنعتی ایران

فهرست مندرجات

صفحه

پیشگفتار	ب
مقدمه	پ
هدف و دامنه کاربرد	۱
مراجع الزامی	۲
اصطلاحات و تعاریف	۳
اساس آزمایش	۳
نمونه برداری	۳
مواد لازم	٤
وسایل لازم	۸
آماده کردن آزمایه	۱۰
روش اجرای آزمون	۱۰
بیان نتایج	۱۳
گزارش آزمون	۱۷
پیوست الف- حدود اطمینان برای شمارش تخمینی کلنی ها (الزامی)	۱۸

پیش گفتار

استاندارد میکروبیولوژی موادغذایی خوراک دام- روش شمارش باسیلوس سرئوس احتمالی به روش شمارش کلنی در دمای ۳۰ درجه سیلسیوس – روش آزمون که نخستین بار در سال ۱۳٦۰ تهیه شده این استاندارد براساس پیشنهادهای رسیده و بررسی و تأیید کمیسیون های مربوط برای دومین بار مورد تجدیدنظر قرار گرفت و در نودوسومین جلسه کمیته ملی استاندارد میکروبیولوژی‌مورخ ۸۵/۵/۲۹مطرح و تصویب شد.

اینک این استاندارد به استناد بند ۱ ماده ۳ قانون اصلاح و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می شود .

برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفتهای ملی و جهانی در زمینه صنایع ، علوم و خدمات استانداردهای ملی ایران در مواقع لزوم تجدیدنظر خواهد شد و هرگونه پیشنهادی که برای اصلاح یا تکمیل این استانداردها ارائه شود ، در هنگام تجدیدنظر در کمیسیون فنی ، مربوط مورد توجه قرار خواهد گرفت . بنابراین برای مراجعه به استانداردهای ملی ایران باید همواره از آخرین تجدیدنظر آنها استفاده کرد .

در تهیه و تدوین این استاندارد سعی شده است که ضمن توجه به شرایط موجود و نیازهای جامعه ، در حد امکان بین این استاندارد و استاندارد ملی کشورهای صنعتی و پیشرفته هماهنگی ایجاد شود .

منابع و مآخذی که برای تهیه این استاندارد بکار رفته به شرح زیر است :

۱- استاندارد ملی ایران ۲۳۲٤ : سال ۱۳۷۲ ، تجدیدنظر اول روش جدا کردن ، شمارش و شناسایی باسیلوس سرئوس

–2- ISO 7932 : 2004 Microbiology of food and animal feeding stuffs –Horizontal method for the enumeration of presumptive bacillus cereus Colony - count technique at 30°C .

مقدمه

اسیلوس سرئوس[1] باسیل گرم مثبت ، اسپورزا ، هوازی بی هوازی اختیاری ، معمولاً متحرک و مقاوم به پنی سیلین می باشد. این باکتری در طبیعت بطور گسترده ای پراکنده است . باسیلوس سرئوس تا دمای ٤٨ درجه سلسیوس قادر به رشد بوده و دمای مناسب رشد آن ۳۰ تا ۳۵ درجه سلسیوس می باشد. این باکتری آنتروتوکسین ، همولیزین و لستیناز C ترشح می کند که در بیماریزایی و تشخیص آن مهم است . باسیلوس سرئوس یکی از علل مسمومیت غذایی می باشد.

مسمومیت غذایی ناشی از باسیلوس سرئوس هنگامی روی می دهد که موادغذایی پخته شده قبل از مصرف به مدت چندین ساعت بدون یخچال گذاری مناسب نگهداری گردند. موادغذایی که تا به حال سبب همه گیری مسمومیت با این باکتری شده اند ، شامل گوشت پخته ، سبزیجات ، برنج پخته و سرخ شده ، سس وانیل ، غذاهای خمیری[2] ، کرم کاستارد ، سوپ ها و جوانه گیاهان خام می باشند. دو نوع بیماری در رابطه با مصرف موادغذایی آلوده به باسیلوس سرئوس نسبت داده می شود. نوع اول و شناخته شده تر آن با درد شکمی ، اسهال و دوره نهفتگی ٤ تا ٦ ساعته مشخص می گردد و علائم آن ۱۲ تا ٢٤ ساعت بطول می انجامد. نوع دوم که با حملات حاد تهوع و استفراغ مشخص می گردد در زمان بین ۱ تا ۵ ساعت پس از مصرف غذای آلوده رخ می دهد. اسهال یک شکل رایج در این نوع بیماری نمی باشد.

1- Bacillus cereus
2- Pasta

میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – شمارش باسیلوس سرئوس[1] احتمالی[2] به روش شمارش کلنی در دمای ۳۰ درجه سلسیوس- روش آزمون (تجدیدنظر)

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد تعیین روش شمارش باسیلوس سرئوس احتمالی زنده به شیوه شمارش کلنی در دمای ۳۰ درجه سلسیوس می باشد.

این استاندارد برای مواد غذایی مورد مصرف انسان ، خوراک دام و همچنین نمونه های در تماس با مواد غذایی کاربرد دارد.

یادآوری : **در این استاندارد برای دست یابی به روش آزمون دارای قابلیت اجرایی ، منحصراً از محیط کشت MYP[3] و آزمون همولیز استفاده می شود. چون این روش قادر به تمیز دادن باسیلوس سرئوس از سایر انواع مشابه باسیلوس ها نظیر باسیلوس آنتراسیس[4] ، باسیلوس تورینجینسیس[5] ، باسیلوس وینس تیفاننسیس[6] و باسیلوس میکوئیدیس[7] نمی باشد بنابراین از واژه احتمالی استفاده می شود.**

در صورت مشکوک بودن به وجود باسیلوس آنتراسیس ، می توان از آزمون حرکت[8] برای تمایز آن از باسیلوس سرئوس استفاده نمود. باسیلوس آنتراسیس غیرمتحرک می باشد..

1- Bacillus cereus
2- Presumptive
3- Mannitol-egg yolk-polymyxin (MYP) agar
4- B.anthracis
5- B.thuringiensis
6- B. weihenstephanensis
7-B.mycoides
8- Motility

۲ مراجع الزامی

مـدارک الزامـی زیـر حاوی مقرراتی است که در متن این استاندارد به آنها ارجاع شده است. بدیـن ترتیـب آن مقـررات جزئـی از این استاندارد محسوب می شود. در مورد مراجع دارای تاریخ چاپ و/یا تجدید نظر، اصلاحیه ها و تجدید نظرهای بعدی این مدارک مورد نظر نیست. معهذا بهتر است کاربران ذینفع این استاندارد امکان کاربرد آخرین اصلاحیه ها و تجدید نظرها ی مـدارک الزامـی زیـر را مـورد بررسـی قرار دهند. در مورد مراجع بدون تاریخ چاپ و/ یا تجدید نظر آخرین چاپ و/ یا تجدیدنظر آن مدارک الزامی ارجاع داده شده مورد نظر است.

استفاده از مراجع زیر برای کاربرد این استاندارد الزامی است.

۲-۱ استاندارد ملی ایران ۳۵٦ : سال ۱۳۸۰ – تجدیدنظر دوم– میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- تهیه سوسپانسیون اولیه و رقتهای اعشاری برای آزمایشهای میکروبیولوژی

۲-۲ استاندارد ملی ایران ۲۷٤۷ : سال ۱۳۸۰ – تجدیدنظر اول- میکروبیولوژی - آئین کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی

۲-۳ استاندارد ملی ایران ۲۳۲۵ : سال ۱۳۸۰ – تجدیدنظر اول- میکروبیولوژی - آئین کاربرد روشهای عمومی آزمایشهای میکروبیولوژی

2-4 ISO/TS 11133-2 : 2003 Microbiology of food and animal feeding part – Guidelines on preparation and production of culture media –stuffs 2 : Practical guidelines on performance testing of culture media

2-5 ISO 7932 : 2004 Microbiology of food and animal feeding stuffs– Horizontal method for the enumeration of presumptive bacillus cereus – Colony- count technique at 30°C .

۳ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد اصطلاح و/یا واژه با تعریف زیر بکار می رود :

۳-۱ باسیلوس سرئوس احتمالی

میکروارگانیسمی است که براساس روش تعیین شده در این استاندارد ، با رشد در محیط کشت جامد انتخابی کلنی های مشخص و در آزمون تأییدی واکنش مثبت ایجاد نماید.

۴ اساس آزمایش

۴-۱ مقدار مشخصی از آزمایه (فرآورده های مایع یا سوسپانسیون اولیه برای سایر فرآورده ها) روی سطح محیط کشت جامد انتخابی درون پلیت ها کشت داده می شود. این عمل در شرایط مشابه با استفاده از رقت های اعشاری تهیه شده از آزمایه یا سوسپانسیون اولیه روی سایر پلیت های مشابه تکرار می شود.

۴-۲ پلیت ها در شرایط هوازی به مدت ۱۸ تا ۲٤ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری می شوند.

۴-۳ تعداد باسیلوس سرئوس در هر گرم یا میلی لیتر نمونه از روی تعداد کلنی های تأیید شده در پلیت های انتخابی که نتیجه معنی داری می دهند ، محاسبه می شود.

۵ نمونه برداری

نمونه برداشته شده باید نماینده واقعی از کل محموله باشد و در هنگام حمل ونقل و انبارش آسیب ندیده و تغییری در آن ایجاد نشده باشد. برای آگاهی از شرایط کلی نمونه برداری و نگهداری نمونه به استاندارد ملی ۲۳۲۵ : سال ۱۳۸۰ مراجعه شود.

۶ مواد لازم

جهت آگاهی بیشتر با اصول کلی آزمایش های میکروبی به استاندارد ملی ۲۳۲۵ : سال ۱۳۸۰ مراجعه کنید.

یادآوری : **در صورت استفاده از محیط های کشت تجاری آن را طبق دستور سازنده آماده نمایید.**

۶-۱ محلول های رقیق کننده

با توجه به نوع فرآورده ، برای تهیه محلول های رقیق کننده به استاندارد ملی ۳۵٦ : سال ۱۳۸۰ مراجعه کنید.

۶-۲ محیط های کشت و معرف ها

۶-۲-۱ محیط کشت پایه MYP آگار

۶-۲-۱-۱ مواد تشکیل دهنده

نـــام	مقدار
عصاره گوشت[1]	۱ گرم
هضم شده آنزیمی کازئین[2]	۱۰ گرم
د- مانیتول[3]	۱۰ گرم
کلرید سدیم[4] (Nacl)	۱۰ گرم
فنل رد[5]	۰/۰۲۵ گرم
آگار	۱۲ تا ۱۸ گرم[6]
آب مقطر	۹۰۰ میلی لیتر

۶-۲-۱-۲ روش تهیه

مواد فوق را در آب حل نموده و در صورت لزوم آن را حرارت دهید. pH را به گونه ای تنظیم کنید تا محیط کامل پس از سترون شدن ، در دمای ۲۵ درجه سلسیوس ۰/۲ ± ۷/۲ باشد. محیط

1- Beef extract
2- Enzymatic digest of casein
3- D-Mannitol
4-Sodium chloride
5-Phenol red

٦- بستگی به قدرت ژله ای شدن آگار دارد.

کشت را در حجم های ۹۰ میلی لیتری در ظروف با حجم مناسب تقسیم کنید و سپس در ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو سترون نمایید.

۶-۲-۲ محلول پلی میکسین B[1]

۶-۲-۲-۱ مواد تشکیل دهنده

نـــام	مقدار
سولفات پلی میکسین B	10^6 واحد بین المللی
آب مقطر	۱۰۰ میلی لیتر

۶-۲-۲-۲ روش تهیه

سولفات پلی میکسین B را در آب مقطر حل نموده و به وسیله صافی غشایی سترون کنید.

۶-۲-۳ امولسیون زرده تخم مرغ

تخم مرغ تازه و سالم را با استفاده از برس و مواد پاک کننده شستشو داده و آبکشی نمایید. پس از غوطه ور کردن به مدت ۳۰ ثانیه در الکل اتیلیک ۷۰ درصد حجمی آن را خارج نموده و خشک کنید. با رعایت شرایط اسپتیک از انتها (طرفی که اتاقک هوایی وجود دارد) با پنس پوسته را به قطر تقریبی دو سانتی متر سوراخ نموده ، پس از کنار زدن غشاء لیفی تا حد امکان سفیده را خارج کنید. سپس سوراخ ایجاد شده را کمی بزرگتر کرده با استفاده از یک پی پت مناسب (با دهانه گشاد) سفیده باقیمانده در اطراف زرده را کاملاً خارج نمایید. زرده را داخل یک استوانه مدرج ریخته و چهار برابر حجم آن آب مقطر اضافه نموده و آن را به یک ارلن منتقل و کاملاً مخلوط کنید. این مخلوط را در حمام آب گرم با دمای ٤٤ تا ٤٧ درجه سلسیوس به مدت دو ساعت قرار دهید سپس بگذارید به مدت ۱۸ تا ٢٤ ساعت در دمای ۳ ± ۵ درجه سلسیوس بماند تا رسوب تشکیل شود. در شرایط اسپتیک[1] ، لایه رویی امولسیون تشکیل شده را جهت اضافه کردن به محیط کشت ، جمع آوری نمایید. این امولسیون را حداکثر برای مدت ۷۲ ساعت می توان در دمای ۳ ± ۵ درجه سلسیوس نگهداری و مصرف نمود.

1- Polymyxin B
1- Aseptic

یادآوری ۱ : **کلیه وسایل و آب مقطر استفاده شده ، باید سترون باشد.**

یادآوری ۲ : **در صورت استفاد ه از امولسیون تجاری طبق دستورالعمل سازنده عمل نمایید.**

۶-۲-۴ محیط کشت کامل M YP آگار

۶-۲-۴-۱ مواد تشکیل دهنده

نـــام	مقدار
محیط کشت پایه (طبق بند ٦-٢-١)	۹۰ میلی لیتر
محلول سولفات پلی میکسین B (طبق بند ٦-٢-٢)	۱ میلی لیتر
امولسیون زرده تخم مرغ(طبق بند ٦-٢-٣)	۱۰ میلی لیتر

۶-۲-۴-۲ روش تهیه

محیط کشت پایه ذوب شده را در حمام آب گرم (طبق بند٧-٤) به دمای ٤٤ تا٤٧ درجه سلسیوس رسانده ، سپس بقیه مواد را به ترتیب به آن اضافه و کاملاً مخلوط کنید. محیط کامل را بلافاصله مجدداً به دمای ٤٤ تا ٤٧ درجه سلسیوس برسانید.

۶-۲-۵ آماده کردن پلیت ها

۱۵تا۲۰ میلی لیتر ازمحیط کشت کامل(طبق بند ٦-٢-٤) را در پلیت های (طبق بند ٧-٦) سترون ریخته و بگذارید تا ببندد. بلافاصله پیش از استفاده سطح پلیت های حاوی محیط کشت را خشک کنید. برای این کار پلیت‌ها را با در باز و وارونه در گرمخانه تنظیم‌شده در دمای۳۷ تا ۵۵ درجه سلسیوس قرار دهید. پلیت‌ها را می توان قبل از خشک کردن حداکثر به مدت ٤ روز در دمای ۳ ± ۵ درجه سلسیوس نگهداری کرد.

۶-۲-۶ آزمون عملکرد[1] جهت تضمین کیفیت محیط کشت

جهت آزمون عملکرد محیط کشت به استاندارد ملی ...[2] مراجعه کنید.

۶-۳ آگـار خوندار [3] گوسفند

۶-۳-۱ محیط کشت پایه شماره ۲ [4]

۶-۳-۱-۱ مواد تشکیل دهنده

نـــام	مقدار
پروتئوزپپتون یا پپتون با خواص مشابه[5]	۱۵ گرم
جگر آبکافت شده (هیدرولیز شده)[6]	۲/۵ گرم
عصاره مخمر[7]	۵ گرم
کلرید سدیم	۵ گرم
آگار	۱۲تا۱۸ گرم[8]
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

۶-۳-۱-۲ روش تهیـه

مواد تشکیل دهنده را به کمک جوشاندن در آب حل کنید. در صورت لزوم pH آن را به گونه ای تنظیم نمایید که پس از سترون کردن مقدار آن ۰/۲ ± ۷ در ۲۵ درجه سلسیوس باشد. سپس محیط کشت را در ظروف مناسب تقسیم کرده به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس سترون نمایید.

۶-۳-۲ خون گوسفند بدون فیبرین[1]

1- Performance testing

۲- تا تدوین استاندارد ملی ایران به استاندارد بین المللی ISO/TS 11133-2 : 2003 مراجعه کنید.

3- Sheep blood agar
4- Blood agar base No.2
5- Protease peptone or equivalent peptone
6- Liver hydrolysate
7- Yeast extract

۸- بستگی به قدرت ژله‌ای شدن آگار دارد.

1- Defibrinated sheep blood

۶-۳-۳ محیط کشت کامل

۶-۳-۳-۱ مواد تشکیل دهنده

نام	مقدار
محیط کشت پایه (طبق بند ٦-٣-١)	۱۰۰ میلی لیتر
خون گوسفند بدون فیبرین (طبق بند ٦-٣-٢)	۵ تا ۷ میلی لیتر

۶-۳-۳-۲ روش تهیه

پس از خنک شدن محیط کشت پایه ذوب شده در ٤٤ تا ٤٧ درجه سلسیوس ، خون گوسفند بدون فیبرین را به آن اضافه و مخلوط کنید. سپس حداقل ۱۲ میلی لیتر از آن را در پلیت های سترون (طبق بند ٧-٦)ریخته و اجازه دهید تا ببندد.

۷ وسایل لازم

از وسایل معمول در آزمایشگاه میکروبیولوژی به ویژه وسایل زیر استفاده کنید .

یادآوری : **در صـــورت داشتن ویژگی های مشابه ، از وسایل یکبار مصرف به جای ظروف شیشه ای می توان استفاده کرد.**

۷-۱ دستگاه سترون‌کننده خشک(آون[1]) و ستگاه سترون‌کننده مرطوب (اتوکلاو[2])

به استاندارد ملی ایران ۲۷٤۷ : سال ۱۳۸۰ مراجعه کنید.

۷-۲ دستگاه خشک کن یا گرمخانه

دارای سیستم تهویه از طریق همرفت[3] برای خشک کردن سطوح پلیت ها ، قابل تنظیم در محدوده دمایی ۱ ±۳۷ تا ۱ ± ۵۵ درجه سلسیوس

۷-۳ گرمخانه[4]

1- Oven
2- Autoclave
3- Convection
4- Incubator

قابل تنظیم در دمای ۱ ± ۳۰ درجه سلسیوس

۴-۷ حمام آب گرم

قابل تنظیم در دمای ٤٤ تا ٤٧ درجه سلسیوس

۵-۷ pH سنج

با دقت اندازه گیری ۰/۱ ± واحد pH در دمای ۲۵ درجه سلسیوس

۶-۷ پلیت های شیشه ای یا پلاستیکی

با قطر ۹۰ تا۱۰۰ میلی متر و در صورت لزوم ۱٤۰ میلی متر

۷-۷ پی پت های مدرج کالیبره برای مصارف باکتریولوژی

با ظرفیت ۱۰ و ۱ میلی لیتر که به ترتیب با تقسیمات ۰/۵ و ۰/۱ میلی لیتری درجه بندی شده باشد (با دهانه خروجی ۲-۳ میلی متر).

۸-۷ پخش کننده

میله شیشه ای یا پلاستیکی با قطر ۳/۵ میلی متر و طول ۲۰ سانتی متر که در ۳ سانتی متر انتها خمیده و کاملاً صیقلی و صاف باشد.

۸ آماده کردن آزمایه

برای آماده سازی آزمایه به استاندارد ملی ۳٥٦ : سال ۱۳۸۰ مراجعه نمایید . در صورت موجود بودن استاندارد خاص هر فرآورده ، مطابق با آن عمل کنید.

۹ روش اجرای آزمون

۱-۹ تهیه آزمونه ، سوسپانسیون اولیه و رقت ها

برای تهیه آزمونه ، سوسپانسیون اولیه و رقت های بعدی اعشاری به استاندارد ملی ۳٥٦ : سال ۱۳۸۰ و استانداردهای خاص هر فرآورده مراجعه کنید.

۲-۹ تلقیح و گرمخانه گذاری

۹-۲-۱ با استفاده از پی پت سترون ، یکدهم میلی لیتر از آزمایه (فرآورده های مایع) یا یکدهم میلی لیتر از سوسپانسیون اولیه (سایر فرآورده ها) را به هر یک از دو پلیت حاوی محیط کشت (طبق بند ٦-٢-٤) منتقل کنید. در صورت نیاز ، این عمل را برای رقت های اعشاری بعدی تکرار نمایید.

۹-۲-۲ در مورد فرآورده هایی که احتمال وجود باسیلوس سرئوس در آنها کم می باشد، دقت شمارش را تا ۱۰ برابر افزایش دهید. به این ترتیب که یک میلی لیتر از آزمایه (فرآورده های مایع) یا یک میلی لیتر از سوسپانسیون اولیه (سایر فرآورده ها) را بر روی سطح یک پلیت بزرگ (با قطر ۱٤۰ میلی متر) یا سه پلیت کوچک (با قطر ۹۰ میلی متر) حاوی محیط کشت (طبق بند ٦-٢-٤) منتقل کنید. در این صورت از ضریب رقت ۱۰ استفاده نموده ایم و قادر به شمارش باسیلوس سرئوس تا حد۱۰ واحد تشکیل دهنده کلنی[1] (cfu) در هر گرم یا میلی لیتر خواهیم بود. در هر دو حالت به صورت دوتایی[2] کشت داده شود یعنی از دو پلیت بزرگ یا ٦ پلیت کوچک استفاده کنید.

۹-۲-۳ با دقت و تا حد امکان به سرعت، مایع تلقیح شده را به کمک پخش کننده (طبق بند ۷-۸) به طوری که با جدار پلیت تماس نداشته باشد در سطح محیط کشت پخش نمایید. برای هر پلیت از یک پخش کننده سترون جداگانه استفاده شود. پلیت ها را حدود ۱۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده تا مایع کشت داده شده ، جذب محیط کشت شود.

۹-۲-۴ پلیت های فوق را به صورت وارونه به مدت ۱۸ تا ۲٤ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری کنید. در صورت عدم مشاهده کلنی واضح ، گرمخانه گذاری را قبل از شمارش به مدت ۲٤ ساعت دیگر ادامه دهید.

1- Colony forming unit (cfu)
2- Duplicate

۹-۳ شمارش کلنی ها

بعد از گرمخانه گذاری (طبق بند ۹-۲-٤) ، پلیت های دو رقت متوالی را که دارای کمتر از ۱۵۰ کلنی باشند، انتخاب نمایید. کلنی های بزرگ و صورتی (عدم تخمیر مانیتول با توجه به یادآوری ۱) با هاله رسوب دار (نشان دهنده تولید لستیناز با توجه به یادآوری ۲) را به عنوان باسیلوس سرئوس احتمالی شمارش کنید. در صورتی که تعداد کلنی های مشخص در پلیت های کشت داده شده ، بدون تهیه رقت (فرآورده های مایع) یا پائین ترین رقت (سایر فرآورده ها) کمتر از ۱۵ عدد باشد ، امکان شمارش تخمینی[1] طبق بند (۱۰-۲) وجود دارد.

یادآوری ۱ : در صورتی که تعداد باکتری‌های تخمیرکننده مانیتول که منجر به تولید اسید می‌شود، زیاد باشد، ممکن است رنگ صورتی مشخص کلنی‌های باسیلوس سرئوس کمرنگ‌تر شده و یا کاملاً از بین برود.

یادآوری ۲ : بعضی از سویه های باسیلوس سرئوس به علت تولید کم و یا عدم تولید لستیناز ، کلنی های بدون رسوب ایجاد می کنند. برای این کلنی ها نیز باید آزمون تأییدی انجام شود.

در صورتی که یک میلی لیتر از آزمایه یا سوسپانسیون اولیه را در سطح سه پلیت پخش نموده اید (طبق بند ۹-۲-۲) در شمارش و آزمایشهای تأییدی بعدی ، هر سه پلیت را به عنوان یک پلیت محسوب نمایید.

۹-۴ تأیید

۹-۴-۱ انتخاب و خالص سازی[1] کلنی ها برای تأیید

1- Estimated count
1- Purification

۵ کلنی احتمالی از هر یک از پلیت های انتخاب شده (طبق بند ۹-۳) را برداشت نمایید . اگر تعداد کلنی ها کمتر از ۵ بود ، همه کلنی های موجود را بـردارید. روی این کلنی ها طبق بندهای ۹-٤-۲ و ۹-٤-۳ آزمون های تأییدی را انجام دهید.

اگر امکان انتخاب کلنی های کاملاً جدا شده مقدور نباشد ، ۵ کلنی احتمالی از هر پلیت را روی محیط کشت MYP آگار کشت خطی دهید. سپس آنها را در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۸تا۲٤ ساعت گرمخانه گذاری کنید. سپس از هر یک از پلیت ها ، حداقل یک کلنی صورتی که به خوبی جدا شده است را جهت آزمون های تأییدی انتخاب نمایید.

۹-۴-۲ آزمون همولیز

کلنی های انتخاب شده (طبق بند ۹-٤-۱) را روی سطح آگار خوندار (طبق بند ٦-۳) به طریق خطی[۲] یا عمقی[۳] و یا نقطه ای[٤] کشت داده به گونه ای که امکان بررسی و اکنش همولیز به خوبی میسر باشد. پلیت ها را در ۳۰درجه سلسیوس به مدت ۲ ± ۲٤ ساعت گرمخانه گذاری کرده و سپس واکنش همولیز را بررسی کنید.

۹-۴-۳ تفسیر واکنش های بیوشیمیایی

جهت تفسیـر واکنش های بیوشیمیایی به جدول یک مراجعه کنید.

جدول۱- نتایج آزمون ها

آزمون	نتایج تأیید باسیلوس سرئوس احتمالی
MYP آگار(طبق بند۹-٤-۱)	تشکیل کلنی های صورتی با هاله رسوب دار[۱]

2- Streak
3- Stab
4- Spot

همولیز(طبق بند ۹-٤-۲)	مثبت[۲] (هاله کاملاً شفاف در اطراف کلنی روی محیط آگار خوندار)
زیرنویس ۱ : به یادآوری های ۱ و ۲ بند ۹-۳ توجه کنید. زیرنویس ۲ : قطر هاله همولیز ممکن است متفاوت باشد.	

۱۰ بیـان نتایج

۱-۱۰ شمارش باسیلوس سرئوس احتمالی

۱-۱-۱۰ شمارش تعداد باسیلوس سرئوس احتمالی در هر پلیت

پس از تأیید کلنی های انتخاب شده ، تعداد باسیلوس سرئوس احتمالی در هر پلیت (a) را با استفاده از فرمول شماره ۱ محاسبه کنید :

$$a = \frac{b}{A} \times C$$ فرمول شماره ۱

که در آن :

A = تعداد کلنی های انتخاب شده برای تأیید

b = تعداد کلنی های مشخص که بعد از آزمونهای تأییدی مثبت است

C = تعداد کل کلنی های شمارش شده در هر پلیت

۲-۱-۱۰ شمارش باسیلوس سرئوس احتمالی در آزمونه

۱-۲-۱-۱۰ شمارش با تلقیح ۰/۱ میلی لیتر

تعداد باسیلوس سرئوس احتمالی موجود در آزمونه (N) برحسب میانگین تعداد کلنی های شمارش شده از دو رقت متوالی را طبق فرمول شماره ۲ محاسبه کنید:

$$N = \frac{\Sigma a}{V\,(n_1 + 0/1 n_2)\,d}$$ فرمول شماره ۲

که در آن :

Σa = مجموع کلنی های باسیلوس سرئوس شمارش شده در همه پلیت های انتخاب شده

V = حجم تلقیح شده در هر پلیت برحسب میلی لیتر

n_1 = تعداد پلیت های شمارش شده در اولین رقت انتخاب شده (یعنی رقتی که حاوی مقدار بیشتری از نمونه می باشد)

n_2 = تعداد پلیت های شمارش شده در دومین رقت انتخاب شده (یعنی رقتی که حاوی مقدار کمتری از نمونه می باشد)

d = ضریب رقت برحسب اولین رقت انتخاب شده

عدد بدست آمده را تا دو رقم معنی دار گرد کنید و نتیجه را به صورت تعداد باسیلوس سرئوس در میلی لیتر (برای فرآورده های مایع) یا در گرم (برای سایر فرآورده ها) بیان نمایید. تعداد را به صورت دو رقم معنی دار ، عددی بین ۱/۱ تا ۹/۹ ضرب در توان مناسبی از ۱۰ گزارش کنید.

مثال :

از شمارش یک نمونه بعد از کشت دادن ۰/۱ میلی لیتر نتایج زیر به دست آمده است :

- برای اولین رقت انتخاب شده ($۱۰^{-۲}$) : ٦٥ ، ٥١ کلنی باسیلوس سرئوس
- برای دومین رقت انتخاب شده ($۱۰^{-۳}$) : ۳ و ۷ کلنی باسیلوس سرئوس

$$N = \frac{\Sigma a}{V\,(n_1 + ۰/۱ n_2)\,d} = \frac{٦٥+٥١+٣+٧}{۰/۱\ (۲ + ۰/۱\times۲)\ ۱۰^{-۲}} = ٥٧٢٧٢$$

نتیجه بعد از گرد کردن به صورت $۵/۷ \times ۱۰^{٤}$ گزارش می گردد.

۱۰-۱-۲-۲ شمارش با تلقیح ۱ میلی لیتر

در صورتی که یک میلی لیتر از آزمایه(فرآورده های مایع) یا سوسپانسیون اولیه(سایر فرآورده ها) را در سطح یک پلیت ۱۴۰ میلی متری یا سه پلیت ۹۰ تا ۱۰۰ میلی متری پخش نموده اید باید مجموع کلنی های ۳ پلیت را به عنوان یک پلیت در نظر بگیرید و تعداد باسیلوس سرئوس احتمالی موجود در آزمونه (N) را از فرمول شماره ۳ محاسبه کنید :

$$N = \frac{\Sigma a}{Vd}$$

فرمول شماره ۳

که در آن :

Σa = مجموع کلنی های باسیلوس سرئوس شمارش شده در یک پلیت ۱۴۰ میلی لیتری یا ۳ پلیت ۹۰ تا ۱۰۰ میلی لیتری

d = ضریب رقت

v = حجم تلقیح شده در مجموع سه پلیت

عدد بدست آمده را به صورت تعداد باسیلوس سرئوس احتمالی در میلی لیتر (برای فرآورده های مایع) و یا در گرم (سایر فرآورده ها) بیان نمایید.

مثال :

از شمارش یک نمونه بعد از کشت دادن ۱ میلی لیتر از آزمایه (فرآورده های مایع) یا سوسپانسیون اولیه (سایر فرآورده ها) در ۳ پلیت دوتایی طبق بند (۱۰-۱-۲-۲) نتایج زیر به دست آمده است :

- میانگین تعداد باسیلوس سرئوس احتمالی در پلیت شماره ۱ : ٤ عدد
- میانگین تعداد باسیلوس سرئوس احتمالی در پلیت شماره ۲ : ٦ عدد
- میانگین تعداد باسیلوس سرئوس احتمالی در پلیت شماره ۳ : ٥ عدد

$$N = \frac{٥ + ٦ + ٤}{١ \times} = ١٥٠$$

$$١٠^{٢}$$

نتیجه به صورت $١٠^{٢} \times ١/٥$ گزارش می گردد.

۱۰-۲ شمارش تخمینی

اگر هر دو پلیت اولیه از آزمونه (در مورد فرآورده های مایع) یا از سوسپانسیون اولیه (در مورد سایر فرآورده ها) ، حاوی کمتر از ۱۵ کلنی باشند ، تعداد باسیلوس سرئوس احتمالی تخمینی (N_E) موجود در میلی لیتر یا گرم آزمونه را به صورت زیر محاسبه و بیان کنید :

الف – برای فرآورده های مایع $N_E = a$

ب– برای سایر فرآورده ها $N_E = \frac{a}{d}$

که در آن :

d = ضریب رقت سوسپانسیون اولیه

a = میانگین تعداد کلنی های باسیلوس سرئوس احتمالی

برای مشاهده حدوده اطمینان از شمارش تخمینی انجام شده به پیوست الزامی (الف) مراجعه کنید.

۱۰-۳ عدم وجود کلنی در پلیت ها

اگر در هیچ یک از پلیت های اولیه از آزمونه (فرآورده های مایع) یا سوسپانسیون اولیه (سایر فرآورده ها) کلنی ای مشاهده نشود. نتایج را به صورت زیر گزارش کنید :

الف– کمتر از یک میکروارگانیسم در میلی لیتر (فرآورده های مایع)

ب– کمتر از $\frac{1}{d}$ میکروارگانیسم در گرم(سایر فرآورده ها)کهd ضریب رقت سوسپانسیون اولیه می باشد.

۱۰-۴ دقت[1]

برای اندازه گیری دقت آزمایش به استاندارد ملی .... [2] مراجعه نمائید.

۱۱ گزارش آزمون

1- Precision

۲– تا تدوین استاندارد ملی ایران به بند ۱۰-۳ استاندارد بین المللی ISO 7932 : 2004 مراجعه کنید.

گزارش آزمون باید دارای آگاهی های زیر باشد :

- اطلاعات لازم برای شناسایی نمونه
- روش نمونه برداری مورد استفاده (در صورت آگاهی)
- روش آزمون با ارجاع به این استاندارد ملی
- سایر مواردی که بر نتایج آزمون تأثیر داشته و در این استاندارد ذکر نشده است
- نتایج بدست آمده
- نام و امضاء آزمایش کننده
- تاریخ انجام آزمون
- دمای گرمخانه گذاری

پیوست الف

حدود اطمینان برای شمارش تخمینی کلنی ها

(الزامی)

برای شمارش کلنی های کمتر از ۱۵ در هر پلیت با حدود اطمینان ۹۵٪ به جدول الف ۱ مراجعه کنید.

جدول الف ۱

تعداد کلنی ها (a)	حدود تخمینی با سطح اطمینان ۹۵٪	
	حد پایین	حد بالا
۱	< ۱	۲
۲	< ۱	٤
۳	< ۱	٥
٤	۱	٦
٥	۲	۹
٦	۲	۱۰
۷	۲	۱۲
۸	۳	۱۳
۹	٤	۱٤
۱۰	٤	۱٦
۱۱	٥	۱۸
۱۲	٦	۱۹
۱۳	۷	۲۰
۱٤	۷	۲۱
۱٥	۸	۲۳

ICS:07.100.30