ISIRI
6806-2
1st. Edition

جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran
مؤسسه استاندارد وتحقیقات صنعتی ایران
Institute of Standards and Industrial Research of Iran

استاندارد ملی ایران
۲- ۶۸۰۶
چاپ اول

# میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - روش جامع برای شمارش استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس* و سایر گونه‌ها) قسمت دوم : روش استفاده از محیط کشت رابیت پلاسما فیبرینوژن آگار

# Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) – Part 2:Technique using rabbit plasma fibrinogen agar medium

مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
تهران - خیابان ولیعصر، ضلع جنوبی میدان ونک، پلاک ۱۲۹۴، صندوق پستی: ۶۱۳۹-۱۴۱۵۵
تلفن: ۵-۸۸۸۷۹۴۶۱
دورنگار: ۸۸۸۸۷۰۸۰ و۸۸۸۸۷۱۰۳
کرج - شهر صنعتی، صندوق پستی ۱۶۳-۳۱۵۸۵
تلفن: ۸- ۲۸۰۶۰۳۱(۰۲۶۱ )
دورنگار: ۲۸۰۸۱۱۴ (۰۲۶۱)
پیام نگار: standard@isiri.org.ir
وب‌گاه : www.isiri.org
بخش فروش، تلفن: ۲۸۱۸۹۸۹ (۰۲۶۱) ، دورنگار: ۲۸۱۸۷۸۷ (۰۲۶۱)
بها: ۱۲۵۰ ریال

Institute of Standards and Industrial Research of IRAN
Central Office: No.1294 Valiaser Ave. Vanak corner, Tehran, Iran
P. O. Box: 14155-6139, Tehran, Iran
Tel: +98 (21) 88879461-5
Fax: +98 (21) 88887080, 88887103
Headquarters: Standard Square, Karaj, Iran
P.O. Box: 31585-163
Tel: +98 (261) 2806031-8
Fax: +98 (261) 2808114
Email: standard @ isiri.org.ir
Website: www.isiri.org
Sales Dep.: Tel: +98(261) 2818989, Fax.: +98(261) 2818787
Price: 1250 Rls.

به‌نام خدا

آشنایی با مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب بند یک مادهٔ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفه تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) ایران را به عهده دارد.

تدوین استاندارد در حوزه های مختلف در کمیسیون های فنی مرکب از کارشناسان مؤسسه* صاحب نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می شود وکوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانهٔ صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف‌کنندگان، صادرکنندگان و وارد کنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان های دولتی و غیر دولتی حاصل می شود .پیش نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی نفع و اعضای کمیسیون های فنی مربوط ارسال می‌شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادها در کمیتهٔ ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب به عنوان استاندارد ملی( رسمی) ایران چاپ و منتشر می شود.

پیش نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان های علاقه مند و ذیصلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می کنند درکمیتهٔ ملی طرح و بررسی و درصورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می شود .بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می شود که بر اساس مفاد نوشته شده در استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تدوین و در کمیتهٔ ملی استاندارد مربوط که مؤسسه استاندارد تشکیل می‌دهد به تصویب رسیده باشد.

مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران از اعضای اصلی سازمان بین المللی استاندارد (ISO)[1] کمیسیون بین المللی الکتروتکنیک (IEC)[2] و سازمان بین المللی اندازه شناسی قانونی (OIML)[3] است و به عنوان تنها رابط[4] کمیسیون کدکس غذایی (CAC)[5] در کشور فعالیت می کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی های خاص کشور، از آخرین پیشرفتهای علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بینالمللی بهره‌گیری می‌شود.

مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران می تواند با رعایت موازین پیش بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشو ر و / یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری نماید. مؤسسه می تواند به منظور حفظ بازارهای بین المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری نماید. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده کنندگان از خدمات سا زمانها و مؤسسات فعال در زمینهٔ مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدورگواهی سیستم های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی، آزمایشگاه ها و مراکز کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش ، مؤسسهٔ استاندارد این گونه سازمان ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامهٔ تأیید صلاحیت به آن ها اعطا و بر عملکرد آنها نظارت می کند .ترویج دستگاه بین المللی یکاها، کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این مؤسسه است.

---

* موسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

1- International organization for Standardization
2 - International Electro technical Commission
3- International Organization for Legal Metrology (Organization International de Metrology Legal)
4 - Contact point
5 - Codex Alimentarius Commission

**کمیسیون فنی تدوین استاندارد**

**«میکروبیولوژی مواد غذایی وخوراک دام-روش جامع برای شمارش استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس* و سایر گونه‌ها)-**

**قسمت دوم:روش استفاده از محیط کشت رابیت پلاسما فیبرینوژن آگار»**

| **رئیس:** | **نمایندگی** |
|---|---|
| رحیمی فرد، ناهید<br>(دکترای میکروبیولوژی) | وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی-<br>اداره کل آزمایشگاه‌های کنترل غذا و دارو |
| **دبیر:** | |
| مهرپور، رامش<br>(لیسانس صنایع) | موسسهٔ استاندارد وتحقیقات صنعتی ایران |
| **اعضاء:** | |
| ابراهیمی امام، غلامحسین<br>(لیسانس صنایع غذایی) | موسسهٔ استاندارد وتحقیقات صنعتی ایران |
| ادریس، شادی<br>(لیسانس بیولوژی) | موسسهٔ استاندارد وتحقیقات صنعتی ایران |
| پیروز، بهناز<br>(فوق لیسانس میکروبیولوژی) | وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی-<br>اداره کل آزمایشگاه‌های کنترل غذا و دارو |
| سعادتی، شهلا<br>(لیسانس تغذیه) | وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی-<br>اداره کل آزمایشگاه‌های کنترل غذا و دارو |
| حاجی سید جوادی، نسرین<br>(دکترای علوم آزمایشگاهی) | دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی -<br>انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور |
| مرتضویان، امیر<br>( دکترای صنایع غذایی) | دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی –<br>دانشکده غلوم تغذیه و صنایع غذایی |

## فهرست مندرجات


| عنوان | صفحه |
|---|---|
| آشنایی با مؤسسهٔ استاندارد | ج |
| کمیسیون فنی تدوین استاندارد | د |
| پیش گفتار | و |
| ۱ هدف و دامنه کاربرد | ۱ |
| ۲ مراجع الزامی | ۱ |
| ۳ اصطلاحات و تعاریف | ۲ |
| ۴ اساس آزمایش | ۳ |
| ۵ نمونه برداری | ۳ |
| ۶ مواد لازم | ۳ |
| ۷ وسایل لازم | ۶ |
| ۸ آماده کردن آزمایه | ۶ |
| ۹ روش اجرای آزمون | ۶ |
| ۱۰ بیان نتایج | ۷ |
| ۱۱ دقت | ۹ |
| ۱۲ گزارش آزمون | ۹ |

پیش گفتار

استاندارد" میکروبیولوژی مواد غذایی وخوراک دام- روش جامع برای شمارش استافیلوکوکوس‌های کواگـولاز مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس* و سایر گونه‌ها) قسمت دوم: روش استفاده از محـیط کشـت رابیـت پلاسـما فیبرینوژن آگار " که پیش نویس آن درکمیسیون های مربوط توسط (مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران تهیه و تدوین شده و در یکصـد و سـی و هفتمـین اجـلاس کمیتـهٔ ملـی اسـتاندارد میکروبیولـوژی و بیولوژی مورخ ۸۶/۱۲/۴ مورد تصویب قرار گرفته است ، اینک به استناد بنـد یـک مـادهٔ ۳ قـانون اصـلاح قوانین و مقررات مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ ، به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود .

برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت های ملی و جهانی در زمینهٔ صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در مواقع لزوم تجدید نظر خواهد شد و هر پیشنهادی که بـرای اصـلاح و تکمیـل این استانداردها ارائه شود، هنگام تجدید نظر در کمیسیون فنی مربوط مورد توجـه قـرار خواهـد گرفـت . بنابراین، باید همواره از آخرین تجدیدنظر استانداردهای ملی استفاده کرد.

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

1-ISO 6888-2 : 1999 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coagulase – positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) –
Part 2:Technique using rabbit plasma fibrinogen agar medium

2-ISO 6888-2 : 2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coagulase – positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) –
Part 2:Technique using rabbit plasma fibrinogen agar medium
AMENDMENT 1: Inclusion of precision data

# میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – روش جامع برای شمارش استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس* و سایر گونه‌ها) قسمت دوم :روش استفاده از محیط کشت رابیت پلاسما فیبرینوژن آگار

## ۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، تعیین روش شمارش کلنی‌های استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت موجود در مواد غذایی مورد مصرف انسان و خوراک دام بعد از گرمخانه‌گذاری در دمای C ° ۳۷ و در شرایط هوازی با استفاده از محیط کشت رابیت پلاسما فیبرینوژن آگار[1] است.

**یادآوری**- برای مواد غذایی فرآیند شده که در آنها احتمال حضور استافیلوکوکوس‌های آسیب دیده و ضعیف شده وجود داشته و یا تعداد آنها کم باشد می‌توان از روش MPN[2] که در استاندارد ملی ایران ۳-۶۸۰۶ شرح داده شده است، استفاده نمود.

## ۲ مراجع الزامی

مدارک الزامی زیر حاوی مقرراتی است که در متن این استاندارد ملی ایران به آن‌ها ارجاع داده شده است. بدین ترتیب آن مقررات جزئی از این استاندارد ملی ایران محسوب می‌شود. در صورتی که به مدارکی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد، اصلاحیه‌ها و تجدیدنظرهای بعدی آن مورد نظر این استاندارد ملی ایران نیست. در مورد مدارکی که بدون ذکر تاریخ انتشار به آن‌ها ارجاع داده شده است، همواره آخرین تجدید نظر و اصلاحیه‌های بعدی آن‌ها مورد نظر است.

استفاده از مراجع زیر برای این استاندارد الزامی است:

**۲-۱** استاندارد ملی ایران شماره ۳۵۶ ـ میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام ـ تهیه سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری برای آزمایش‌های میکروبیولوژی

**۲-۲** استانداردملی ایران شماره ۲۳۲۵ ـ میکروبیولوژی ـ آئین کاربرد روش‌های عمومی آزمایش‌های میکروبیولوژی

**۲-۳** استاندارد ملی ایران شماره ۲۷۴۷ ـ میکروبیولوژی ـ آئین کار درآزمایشگاه‌های میکروبیولوژی

**۲-۴** استاندارد ملی ایران شماره ۲-۸۶۶۳ – میکروبیولوژی خوراک انسان و دام- راهنمای آماده سازی و تولید محیط‌های کشت – قسمت دوم : راه کارهای عملی برای آزمون محیط‌های کشت

**۲-۵** استاندارد ملی ایران شماره ۲-۸۹۲۳- میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام ـ آماده سازی آزمایه، سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری برای آزمون میکروبیولوژی – قسمت دوم : مقررات ویژه برای آماده سازی گوشت و فرآورده‌های آن

---

1- Rabbit plasma fibrinogen agar medium
2- Most probable number

**۲-۶** استاندارد ملی ایران شماره ۳-۸۹۲۳ - میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام ـ آماده سازی آزمایه، سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری برای آزمون میکروبیولوژی – قسمت سوم : مقررات ویژه برای آماده سازی ماهی و فرآورده‌های آن

**۲-۷** استاندارد ملی ایران شماره ۴-۸۹۲۳- میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام ـ آماده سازی آزمایه، سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری برای آزمون میکروبیولوژی – قسمت چهارم : مقررات ویژه برای آماده سازی محصولات به غیر از شیر،گوشت، ماهی و فرآورده‌های آن‌ها

**2-8** ISO 6888-2 : 1999/AMD 1:2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coagulase – positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species)- Part 1: Technique using rabbit plasma fibrinogen agar medium
AMENDMENT 1:Inclusion of precision data

**2-9** ISO/TS 11133-1 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines on preparation and production of culture media – Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory

## ۳ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد اصطلاحات با تعاریف زیر به‌کار می‌رود :

**۳-۱**

**استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت**

باکتری‌هایی هستند که در سطح محیط کشت انتخابی رابیت پلاسما فیبرینوژن آگار و در شرایط توصیف شده در این استاندارد کلنی‌های مشخص[1] تشکیل دهند.

**۳-۲**

**شمارش استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت**

تعیین تعداد استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت موجود در هر میلی‌لیتر یا هرگرم از نمونه (بر حسب واحد تشکیل دهنده کلنی[2]) که طبق روش شرح داده شده در این استاندارد مورد آزمایش قرار می‌گیرد.

---

1- Typical colonies
2- Colony forming unit(cfu)

## ۴ اساس آزمایش

۴-۱ مقدار معینی از آزمایه (برای فرآورده‌های مایع) و یا سوسپانسیون اولیه (برا ی سایر فرآورده‌ها) و رقت‌های تهیه شده از آنها، در پلیت سترون ریخته می‌شود (در هر مورد به صورت دوتایی[1] کار شود).

۴-۲ محیط کشت رابیت پلاسما فیبرینوژن آگار به پلیت اضافه شده و در دمای $37\ ^{\circ}C$ به مدت زمان ۱۸ h تا ۲۴ h و در صورت لزوم به مدت زمان ۲۴ h دیگرگرمخانه‌گذاری می‌شود.

۴-۳ با در نظر گرفتن رقت‌ها و حجم‌های مورد استفاده، از شمارش کلنی‌های مشخص موجود در پلیت‌ها، تعداد استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت در هر میلی‌لیتر یا هر گرم از آزمایه محاسبه می‌شود.

## ۵ نمونه برداری

نمونه‌برداری باید مطابق با استاندارد ملی ایران ۲۳۲۵ انجام شود.

نمونه‌هایی که به آزمایشگاه تحویل داده می‌شود باید نماینده واقعی محموله بوده و در طی حمل، جابجایی و نگهداری آسیب ندیده و یا تغییری در آن ایجاد نشده باشد.

## ۶ مواد لازم

به منظور بدست آوردن نتایج قابل اطمینان، از مواد شیمیایی با درجهٔ خلوص آزمایشگاهی استفاده کنید.

**یادآوری ۱**- چنانچه از محیط‌های کشت آماده مصرف قابل دسترس در بازار استفاده می‌کنید، آماده سازی محیط کشت را مطابق با دستورالعمل سازنده انجام دهید.

**یادآوری ۲**- برای آگاهی بیشتر برای انجام آزمون عملکرد[2] به منظور تضمین کیفیت محیط‌های کشت، به استاندارد ملی ایران ۲-۸۶۶۳ و استاندارد ISO/TS 11133-1 مراجعه کنید.

### ۶-۱ محلول‌های رقیق‌کننده

برای تهیه محلول‌های رقیق‌کننده مطابق با استانداردهای ملی ایران شماره‌های۳۵۶، ۲-۸۹۲۳، ۳-۸۹۲۳ و ۴-۸۹۲۳ عمل کنید. در صورت موجود بودن استاندارد خاص هر فرآورده، مطابق باآن استاندارد عمل کنید.

### ۶-۲ محیط کشت رابیت پلاسما فیبرینوژن آگار

**یادآوری**- در صورت استفاده از محلول فیبرینوژن گاو/پلاسما آماده مصرف قابل دسترس در بازار، برای اطمینان از کیفیت محلول، از کنترل‌های مثبت و منفی تولید شده توسط سازنده، آزمون انجام شود.

---

1- Duplicate
2- Performance testing

### ۶-۲-۱ محیط کشت پایه

| مواد تشکیل دهنده | مقدار |
|---|---|
| هضم شدهٔ پانکراتیک کازئین[1] | ۱۰/۰ g |
| عصارهٔ مخمر[2] | ۱/۰ g |
| عصارهٔ گوشت[3] | ۵/۰ g |
| پیرووات سدیم[4] | ۱۰/۰ g |
| *ال* ـ گلیسین[5] | ۱۲/۰ g |
| کلرید لیتیم[6] | ۵/۰ g |
| آگار | ۱۲ g[7] تا ۲۲ g |
| آب مقطر | تا حجم ۱۰۰۰ ml |

**روش تهیه**

مواد یاد شده را در آب‌مقطر حل کنید و حرارت دهید تا شفاف شود. در صورت لزوم، pH را به گونه‌ای تنظیم کنید که پس از سترون‌سازی برابر ۷/۲±۰/۲ در دمای ۲۵ °C باشد.
سپس محیط کشت را در حجم‌های ۹۰ ml در ارلن‌های مناسب تقسیم کرده و در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ °C به مدت زمان ۱۵ min سترون کنید.

### ۶-۲-۲ محلول تلوریت پتاسیم[8]

| مواد تشکیل دهنده | مقدار |
|---|---|
| تلوریت پتاسیم | ۱/۰ g |
| آب مقطر | ۱۰۰ ml |

**روش تهیه**

پودر تلوریت پتاسیم را در آب‌مقطر به کمک حرارت ملایم کاملاً حل کنید. محلول را با استفاده از صافی

---

1- Pancreatic digest of casein
2- Yeast extract
3- Meat extract
4- Sodium pyruvate
5- L-Glycine
6-Lithium chloride

۷ – مقدار آگار بستگی به قدرت ژل بندی آن دارد.

8-Potassium tellurite($K_2TeO_3$)

غشایی با اندازهٔ روزنهٔ ۰/۲۲μm، سترون کنید. محلول تهیه شده حداکثر برای مدت زمان یک ماه در دمای ۳ °C ±۲ °C قابل نگهداری است. در صورت مشاهده رسوب، آنرا دور بریزید.

**یادآوری** – با توجه به اینکه پودر تلوریت پتاسیم رطوبت را سریع جذب می‌کند، پس از مصرف درپوش آن را محکم ببندید و در جای خشک و خنک نگهداری کنید.

### ۶-۲-۳ محلول فیبرینوژن گاوی

| مواد تشکیل دهنده | مقدار |
|---|---|
| فیبرینوژن گاوی | ۷ g تا ۵ g[1] |
| آب مقطر | ۱۰۰ ml |

**روش تهیه**

در شرایط آسپتیک، فیبرینوژن گاوی را در آب حل کنید.

**یادآوری** – محلول فیبرینوژن گاوی باید بلافاصله پیش از استفاده تهیه شود.

### ۶-۲-۴ محلول پلاسمای خرگوش و بازدارنده تریپسین[2]

| مواد تشکیل دهنده | مقدار |
|---|---|
| پلاسمای خرگوش با ضد انعقاد EDTA[3] | ۳۰ ml |
| بازدارندهٔ تریپسین | ۳۰/۰ mg |

**روش تهیه**

در شرایط آسپتیک، مواد بالا را با یکدیگر مخلوط کنید.

**یادآوری** – محلول پلاسمای خرگوش و بازدارندهٔ تریپسین باید بلافاصله پیش از استفاده تهیه شود.

### ۶-۲-۵ محیط کشت کامل

| مواد تشکیل دهنده | مقدار |
|---|---|
| محیط کشت پایه (طبق بند ۶-۲-۱ ) | ۹۰ ml |

---

۱- مقدار فیبرینوژن گاوی بستگی به خلوص آن دارد.

2 - Trypsin inhibitor

3 - Ethylenediaminetetraacetic acid

| | | |
|---|---|---|
| محلول تلوریت پتاسیم (طبق بند ۶-۲-۲) | ml | ۰/۲۵ |
| محلول فیبرینوژن گاوی (طبق بند ۶-۲-۳) | ml | ۷/۵ |
| محلول پلاسمای خرگوش و بازدارندهٔ تریپسین (طبق بند ۶-۲-۴ ) | ml | ۲/۵ |

**روش تهیه**

محیط کشت پایه را ذوب کرده و در حمام آب به دمای ۱± °C ۴۸ °C برسانید.
در شرایط آسپتیک، محلول‌های تلوریت پتاسیم، فیبرینوژن گاوی، پلاسمای خرگوش و بازدارندهٔ تریپسین را که در حمام آب تا دمای ۱± °C ۴۸ °C گرم شده است، به محیط کشت پایه اضافه و مخلوط کنید. محیط کشت کامل را بلافاصله پس از آماده کردن، برای جلوگیری از رسوب پلاسما مورد استفاده قرار دهید.

**یادآوری** – در صورت استفاده از محلول آمادهٔ فیبرینوژن گاو/ پلاسمای خرگوش، به ویژه برای پیشگیری از کاهش عملکرد محیط کشت، هنگام آماده سازی، به توصیهٔ سازنده در مورد دمای محیط کشت پایه توجه کنید.

## ۷ وسایل لازم

از وسایل معمول در آزمایشگاه میکروبیولوژی مطابق با استاندارد ملی ایران ۲۷۴۷ و به ویژه وسایل زیر، استفاده کنید:

**۷-۱** تجهیزات سترون سازی خشک (آون) و مرطوب (اتوکلاو)

**۷-۲** گرمخانه، قابل تنظیم در دمای ۱± °C ۳۷ °C

**۷-۳** حمام آب، قابل تنظیم در دمای ۱± °C ۴۸ °C

**۷-۴** پلیت‌های شیشه‌ای یا پلاستیکی سترون یکبارمصرف

**۷-۵** پی‌پت‌های مدرج ۱ ml، ۲ ml و ۱۰ ml با تقسیمات ۰/۱ ml و ۰/۵ ml

## ۸ آماده کردن آزمایه

جهت آماده سازی آزمایه، آزمونه و رقت‌های بعدی مطابق با استانداردهای ملی ایران شماره‌های ۳۵۶، ۸۹۲۳-۲ ، ۸۹۲۳-۳ و ۸۹۲۳-۴ عمل کنید. در صورت موجود بودن استاندارد خاص هر فرآورده، مطابق با آن استاندارد عمل کنید.

## ۹ روش اجرای آزمون

### ۹-۱ تهیه آزمونه، سوسپانسیون اولیه و رقت‌ها

برای تهیه آزمونه، سوسپانسیون اولیه و رقت‌های بعدی مطابق با استانداردهای ملی ایران شماره‌های

۳۵۶، ۲-۸۹۲۳، ۳-۸۹۲۳ و ۴-۸۹۲۳ عمل کنید. در صورت موجود بودن استاندارد خاص هر فرآورده، مطابق باآن استاندارد عمل کنید.

## ۹-۲ تلقیح و گرمخانه‌گذاری

۹-۲-۱ با استفاده از پی‌پت سترون، یک میلی‌لیتر از آزمایه (برای فرآورده‌های مایع) یا یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون اولیه (رقت $10^{-1}$ )(برای سایر فرآورده‌ها) را به پلیت سترون بیافزایید. در صورت نیاز، این عمل را برای رقت $10^{-2}$ و رقت‌های بعدی تکرار کنید. در هر مورد بصورت دوتایی کار کنید.

۹-۲-۲ بلافاصله به هر پلیت (طبق بند ۹-۲-۱) محیط کشت کامل (طبق بند ۶-۲-۵) که سترون شده و به دمای $45\ ^{\circ}C$ رسیده است بیافزایید، تا عمق آن تقریباً ۳ mm شود. سپس با دقت، مایع تلقیح را با محیط کشت ترکیب کنید و اجازه دهید تا ببندد.

۹-۲-۳ بعد از بستن کامل پلیت‌ها، آنها را بصورت وارونه به مدت زمان ۱۸ h تا ۲۴ h در دمای $37\ ^{\circ}C$ گرمخانه‌گذاری کنید. در صورت نیاز، گرمخانه‌گذاری را به مدت زمان ۱۸ h تا ۲۴ h دیگر ادامه دهید.

## ۹-۳ شمارش کلنی‌ها

بعد از پایان مدت زمان گرمخانه‌گذاری، کلنی‌های *استافیلوکوکوس* به رنگ سیاه یا خاکستری یا حتی سفید و کلنی‌های کوچک احاطه شده با یک هالهٔ رسوبی دیده می‌شوند که نشان دهنده فعالیت کواگولاز است. کلنی‌های *پروتئوس* ممکن است در ابتدای گرمخانه‌گذاری ظاهر شوند که ظاهری شبیه به کلنی‌های استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت دارند، اگرچه بعد ازمدت زمان ۲۴ h یا ۴۸ h گرمخانه‌گذاری، آنها در محیط کشت پخش می‌شوند و کم و بیش متمایل به رنگ قهوه‌ای می‌شوند و بدین صورت، از کلنی‌های *استافیلوکوکوس* قابل تمایز هستند.

در هر پلیت، کلنی‌های مشخص *استافیلوکوکوس* را شمارش کنید.

**یادآوری** — به دلیل اینکه واکنش کواگولاز در محیط کشت رابیت پلاسما فیبرینوژن آگار انجام می‌گیرد، نیاز به انجام آزمون تأییدی کواگولاز به طور جداگانه نیست.

# ۱۰ بیان نتایج

## ۱۰-۱ موارد کلی

پلیت‌های که بین ۱۵ تا ۳۰۰ کلنی دارند را انتخاب کنید. تعداد $N$ از استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت موجود در میلی‌لیتر یا در گرم از فرآورده را بعنوان میانگین حسابی از دو رقت متوالی با استفاده از فرمول شماره (۱) محاسبه کنید :

فرمول شماره (۱)

$$N = \frac{\sum C}{V\,(n_1 + 0.1\,n_2)\ \times d}$$

که در آن:

$\sum C$ مجموع کلنی‌های *استافیلوکوکوس* مشخص شمارش شده در همهٔ پلیت‌های انتخاب شده

$V$ حجم تلقیح شده در هر پلیت به میلی‌لیتر

$n_1$ تعداد پلیت‌های انتخاب شده در اولین رقت

$n_2$ تعداد پلیت‌های انتخاب شده در دومین رقت

$d$ ضریب رقت مربوط به اولین رقت انتخاب شده (سوسپانسیون اولیه نیز بعنوان رقت درنظر گرفته می‌شود )

نتیجه را تا دو رقم معنی‌دار گرد کنید .

نتیجه را به صورت تعداد استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت درمیلی‌لیتر (برای فرآورده‌های مایع ) یا در گرم (برای سایر فرآورده‌ها) بیان کنید. تعداد را بصورت دو رقم معنی‌دار، عددی بین ۹/۹-۱/۰ ضرب در توانی از ۱۰ بر حسب cfu/g یا cfu/ml گزارش کنید.

مثال:

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

- برای اولین رقت انتخاب شده ($۱۰^{-۲}$ ) : ۶۶ و ۵۴ کلنی‌های مشخص
- برای دومین رقت انتخاب شده ($۱۰^{-۳}$) : ۴ و ۷ کلنی‌های مشخص

$$N = \frac{۶۶ + ۵۴ + ۴ + ۷}{۲/۲ \times ۱۰^{-۲}} = ۵۹۵۵$$

نتیجه بعد از گرد کردن $۶/۰ \times ۱۰^{۳}$ بر حسب cfu/g یا cfu/ml می باشد.

**۱۰-۲ تخمین تعداد کم**

**۱۰-۲-۱** اگر دو پلیت حاوی آزمایه (در فرآورده‌های مایع) یا رقت اولیه (برای سایر فرآورده‌ها) هریک دارای کمتر از ۱۵ کلنی باشد، نتیجه بصورت زیر گزارش می شود:

**الف** – برای فرآورده‌های مایع، $Ne$، تخمین تعداد استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت در میلی‌لیتر با

استفاده از فرمول شماره (۲) محاسبه می شود:

فرمول شماره (۲)

$$N_e = \frac{C}{2}$$

که در آن:

$C$ مجموع کلنی‌های استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت شمارش شده (طبق بند ۹-۳ )در دو پلیت انتخاب شده

**ب ــ** برای سایر فرآورده‌ها، $Ne$، تخمین تعداد استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت در گرم با استفاده از فرمول شماره (۳)محاسبه می‌شود:

فرمول شماره (۳)

$$N_e = \frac{C}{2 \times d}$$

که در آن:

$C$ مجموع کلنی‌های استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت شمارش شده (طبق بند ۹-۳) در دو پلیت انتخاب شده

$d$ ضریب رقت سوسپانسیون اولیه

**۱۰-۲-۲** اگر در دو پلیت حاوی آزمایه (برای فرآورده‌های مایع) یا سوسپانسیون اولیه (برای سایر فرآورده‌ها) هیچ کلنی *استافیلوکوکوس* کواگولاز مثبت مشاهد نشود، نتیجه بصورت زیر گزارش می شود :

- کمتر از ۱ *استافیلوکوکوس* کواگولاز مثبت در میلی‌لیتر (برای فرآورده‌های مایع)
- کمتراز ۱/$d$ *استافیلوکوکوس* کواگولاز مثبت درگرم (برای سایر فرآورده‌ها)، که $d$ ضریب رقت سوسپانسیون اولیه است.

## ۱۱ دقت

برای اندازه گیری دقت آزمون، به اصلاحیه استاندارد بین المللی ISO 6888-2:1999/Amd.1:2003 مراجعه کنید.

## ۱۲ گزارش آزمون

گزارش آزمایش باید دارای آگاهی‌های زیر باشد :

**۱-۱۲** مشخصات کامل نمونه

**۲-۱۲** تاریخ نمونه‌برداری

**۳-۱۲** تاریخ انجام آزمون

**۴-۱۲** روش نمونه برداری مورد استفاده در صورت لزوم

**۵-۱۲** روش آزمون طبق استاندارد ملی ایران شماره ۲-۶۸۰۶ سال ۱۳۸۷

**۶-۱۲** نتایج آزمون طبق بند ۹ این استاندارد

**۷-۱۲** سایر مواردی که ممکن است بر نتایج آزمایش تأثیر داشته باشد و در این استاندارد ذکر نشده است.

**۸-۱۲** نام و نام خانوادگی و امضای آزمایش کننده

**ICS: 07.100.30**