ISIRI
6806-3
1st.edition

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

استاندارد ملی ایران
۶۸۰۶ -۳
چاپ اول

میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام ــ روش جامع برای شمارش استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس و سایر گونه‌ها) قسمت سوم : جستجو، شناسایی و شمارش به شیوه محتمل‌ترین تعداد (MPN) برای تعداد کم میکروارگانیسم

Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the enumeration of positive *Staphylococci –coagulase* (*Staphylococcus aureus* and other species)- Part 3 :Detection and MPN technique for low numbers

« 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 سازمانهای 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 ودر صورت تصویب به عنوان استاندارد ملی (رسمی) چاپ و منتشر می شود.

پیش نویس استانداردهایی که توسط مؤسسات و سازمانهای علاقمند و ذیصلاح و با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می شود نیز پس از طرح و بـررسی 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 تـوجه به شرایط کلی ونیازمندیهای خاص کشور، از آخرین پیشرفتهای علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهـای بین المـللی استفـاده 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 آنرا اجباری نماید.

همچنین بمنظور اطمینان بخشیدن به استفاده کنندگان از خدمات سازمانها و مؤسسات فعال در زمینه مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و گواهی کنندکان سیستم های مدیریت کیفیت ومدیریت زیست محیطی، آزمایشگاهها و کالیبره کنندگان وسایل سنجش، مؤسسه استاندارد اینگونه سازمانها 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 ضلع جنوبی میدان ونک – صندوق پستی : ۶۱۳۹-۱۴۱۵۵

تلفن مؤسسه در کرج: ۸-۲۸۰۶۰۳۱-۰۲۶۱

تلفن مؤسسه در تهران: ۵-۸۸۷۹۴۶۱-۰۲۱

دورنگار: کرج ۲۸۰۸۱۱۴-۰۲۶۱ ـ تهران ۸۸۸۷۱۰۳-۸۸۸۷۰۸۰ -۰۲۱

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

پیام نگار: Standard @ isiri.or.ir

بهاء ۲۷۵۰ ریال

Headquarters: Institute Of Standards And Industrial Research Of Iran

P.O.Box : 31585-163 Karaj – IRAN

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

Fax (Karaj): 0098 (261) 2808114

Central Office: Southern corner of Vanak square, Tehran

P.O.Box : 14155-6139 Tehran-IRAN

Tel (Tehran): 0098 21 8879461-5

Fax (Tehran): 0098 21 8887080, 8887103

Email: Standard @ isiri.or.ir

Price: 2750 RLS

فهرست مندرجات **صفحه**

پیش گفتار	ب
۱ هدف و دامنه کاربرد	۱
۲ مراجع الزامی	۱
۳ اصطلاحات و تعاریف	۲
٤ اساس آزمایش	۳
۵ نمونه برداری	۵
٦ مواد لازم	۵
۷ وسایل لازم	۱۵
۸ روش اجرای آزمون	۱٦
۹ بیان نتایج	۲۱
۱۰ دقت آزمون	۲۱
۱۱ گزارش آزمون	۲۱

کمیسیون استاندارد میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – روش جامع برای شمارش استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس و سایر گونه‌ها)قسمت سوم : جستجو، شناسایی و شمارش به شیوه محتمل‌ترین تعداد (MPN) برای تعداد کم میکروارگانیسم

رئیس	نمایندگی
رحیمی‌فرد، ناهید (دکترای میکروبیولوژی- دکترای علوم آزمایشگاهی)	وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی- اداره کل آزمایشگاه‌های کنترل غذا ودارو

اعضاء	
ابراهیمی امام، غلامحسین (لیسانس صنایع غذایی)	مؤسسه استاندارد وتحقیقات صنعتی ایران
ادریسی، شادی (لیسانس زیست شناسی)	مؤسسه استاندارد وتحقیقات صنعتی ایران
پیروز، بهناز (فوق لیسانس میکروبیولوژی)	وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی – اداره کل آزمایشگاه‌های کنترل غذا و دارو
زندوکیلی، فاطمه (فوق لیسانس علوم بهداشتی در تغذیه)	مؤسسه استاندارد وتحقیقات صنعتی ایران
زوار ، مریم (لیسانس تغذیه)	وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی – اداره کل آزمایشگاه‌های کنترل غذا و دارو

فیاضی ، اکرم السادات (لیسانس تغذیه)	مؤسسه استاندارد وتحقیقات صنعتی ایران
مرتضویان، امیر (دکترای صنایع غذایی)	دانشگاه تهران- دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی
مهدیزاده، مهرانگیز (فوق لیسانس میکروبیولوژی)	وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی - اداره کل آزمایشگاه‌های کنترل غذا و دارو
نوری، زهرا (فوق لیسانس میکروبیولوژی)	وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی - اداره کل آزمایشگاه‌های کنترل غذا و دارو

دبیر

مهرپور، رامش (لیسانس صنایع)	مؤسسه استاندارد وتحقیقات صنعتی ایران

پیش گفتار

استاندارد « شمارش استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس و سایر گونه‌ها)قسمت سوم : جستجو و شمارش به شیوه محتمل‌ترین تعداد (*MPN*) برای تعداد کم میکروارگانیسم» که توسط کمیسیون‌های مربوط تهیه و تدوین شده و درنود ونهمین جلسه کمیته ملی استاندارد بیولوژی و میکروبیولوژی مورخ ۸۵/۱۱/۸ مورد تایید قرار گرفته است، اینک به استناد بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات وپیشرفتهای ملی و جهانی در زمینه صنایع،علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در مواقع لزوم تجدید نظر خواهد شد و هرگونه پیشنهادی که برای اصلاح و تکمیل این استاندارد ارائه شود در تجدید نظر بعدی مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین برای مراجعه به استانداردهای ملی ایران باید همواره از آخرین تجدید نظر 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 استانداردهای بین المللی و استاندارد ملی کشورهای صنعتی و پیشرفته هماهنگی ایجاد شود.

این استاندارد جایگزین استاندارد ٦٨٠٦ : سال ۱۳۸۲ شده است و استاندارد قبلی باطل اعلام می‌شود.

منبع و مآخذی که برای تهیه این استاندارد به کار رفته به شرح زیر است:

1- ISO 6888-3:2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive Staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species)
Part 3:Detection and MPN technique for low numbers

میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – روش جامع برای شمارش استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس و سایر گونه‌ها)

قسمت سوم : جستجو، شناسایی و شمارش به شیوه محتمل‌ترین تعداد (MPN) برای تعداد کم میکروارگانیسم

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، تعیین روش جستجو،شناسایی و شمارش استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت به شیوهٔ محتمل‌ترین تعداد، (MPN)[1] است. این استاندارد برای مواد غذایی مورد مصرف انسان، خوراک دام و سایر نمونه‌های در تماس با مواد غذایی، کاربرد دارد.

استفاده از این روش برای مواردی که استافیلوکوکوس‌ها ضعیف شده و تعداد آنها در نمونه کم باشد، از جمله فرآورده‌های خشک شده توصیه می‌شود.

۲ مراجع الزامی

مدارک الزامی زیر حاوی مقرراتی است که در متن این استاندارد به آنها ارجاع داده شده است. بدین ترتیب آن مقررات جزئی از این استاندارد محسوب می‌شود. در مورد مراجع دارای تاریخ چاپ و/یا تجدیدنظر، اصلاحیه‌ها و تجدیدنظر بعدی این مدارک مورد نظر نیست. معهذا بهتر است کاربران ذینفع این استاندارد، امکان کاربرد آخرین اصلاحیه‌ها و تجدیدنظرهای مدارک الزامی زیر را مورد بررسی قرار دهند .

در مورد مراجع بدون تاریخ چاپ و/یا تجدیدنظر، آخرین چاپ و/یا تجدیدنظر آن مدارک الزامی ارجاع داده شده مورد نظر است .

استفاده از مراجع زیر برای کاربرد این استاندارد الزامی است:

۲-۲ استاندارد ملی ایران ۲۳۲۵ : سال ۱۳۸۰ تجدید نظر اول ـ میکروبیولوژی ـ آئین کاربرد روش‌های عمومی آزمایش‌های میکروبیولوژی

۲-۳ استاندارد ملی ایران ۲۷٤۷ : سال ۱۳۸۰ تجدید نظر اول ـ میکروبیولوژی ـ آئین کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی

۲-۴ استاندارد ملی ایران ۲-۸٦٦۳ : سال ۱۳۸۵- میکروبیولوژی خوراک انسان و دام- راهنمای آماده سازی و تولید محیط‌های کشت – قسمت دوم : راه کارهای عملی برای آزمون محیط‌های کشت

---

[1]- Most Probable Number

2-5 *ISO 8261, Milk and Milk products - General guidance for the preparation of test samples, initial suspensions and decimal dilutions for microbiological examination*

2-6 *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*

۱

۲ ۳ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد اصطلاحات و/ یا واژه‌ها با تعاریف زیر به‌کار می‌رود :

۳-۱ استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت

باکتری‌هایی هستند که در سطح محیط کشت انتخابی کلنی‌های مشخص[1] و/ یا نامشخص[2] تشکیل داده و در شرایط توصیف شده در این استاندارد، واکنش کواگولاز مثبت از خود نشان دهند.

یادآوری۱ – استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت دربیشتر موارد استافیلوکوکوس اورئوس[3] می‌باشند اما استافیلوکوکوس اینترمدیوس[4] و بعضی از سویه‌های استافیلوکوکوس هاییکوس[5] نیز کواگولاز تولید می‌کنند.

یادآوری۲ – در این استاندارد استافیلوکوکوس‌هایی که واکنش کواگولاز مثبت قوی دارند بررسی می‌شوند. برخی از سویه‌های دارای واکنش کواگولاز مثبت ضعیف ممکن است با دیگر باکتری‌ها اشتباه شوند که با استفاده از آزمون‌های تکمیلی، مانند تولید نوکلئاز مقاوم به حرارت[6]، از دیگر باکتری‌ها تمیز داده می‌شوند.

۳-۲ جستجو و شناسایی استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت

تعیین وجود یا عدم وجود استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت در حجم یا وزن معینی از فرآورده، طبق روش شرح داده شده در این استاندارد است.

۳-۳ شمارش استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت

تعیین تعداد استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت موجود در هر میلی‌لیتر یا در هرگرم از فرآورده، طبق روش شرح داده شده در این استاندارد است.

۴ ۳ اساس آزمایش

۴-۱ روش جستجو و شناسایی

---

[1] - Typical colonies
[2] - Atypical colonies
[3] - Staphylococcus aureus
[4] - Staphylococcus intermedius
[5] - Staphylococcus hyicus
[6] - Thermonuclease

۴-۱-۱ مقـدار معینـی از آزمایه (برای فرآورده‌های مایع) و یا سوسپانسیون اولیه (برای فرآورده‌های غیر مایع) در محیط کشت انتخابی تلقیح می‌شود.

۴-۱-۲ محـیط تلقـیح شـده، در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس برای مدت زمان ۲٤ و ٤۸ ساعت در شرایط بـی‌هـوازی گـرمخانه‌گـذاری می‌شود. وجود استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت احتمالی با احیای تلوریت پتاسیم[1] مشخص می‌شود.

۴-۱-۳ از لـوله‌هـای مثـبت احتمالـی بـند ٤-۱-۲ پـس از مـدت زمـان ۲٤ ساعت و از همهٔ لوله‌های باقیمانده پس از مدت زمان ٤۸ ساعت در سطح محیط کشت انتخابی برد- پارکر آگار[2] کشت داده می‌شود.

۴-۱-۴ پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس به مدت زمان ۲٤ و ٤۸ ساعت گرمخانه‌گذاری می‌شوند. وجـود اسـتافیلوکوکوس‌هـای کواگـولاز مثـبت احتمالـی با احیای تلوریت پتاسیم و واکنش زردهٔ تخم مرغ مشخص می‌شوند.

۴-۱-۵ با انجام آزمون کواگولاز، کلنی‌های مشخص و/ یا نامشخص تأیید می‌شوند.

۴-۱-۶ بـه عـنوان روش جایگزین می‌توان، لوله‌های مثبت احتمالی بند ٤-۱-۲ را پس از مدت زمان ۲٤ سـاعت و همـهٔ لـوله‌های باقیمانده را پس از مدت زمان ٤۸ ساعت در سطح محیط کشت انتخابی پلاسمای خـرگوش فیبـرینوژن آگـار[3] کشـت داد. پـس از گرمخانه‌گذاری وجود کلنی‌های استافیلوکوکوس کواگولاز مثبت به وسیله واکنش با فیبرینوژن پلاسمای خرگوش مشخص می‌شوند.

۴-۱-۷ نـتایج بـه صـورت" وجـود " یا " عدم وجود " استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت در حجم (میلی لیتر) یا وزن (گرم) معینی از فرآورده بیان می‌شود.

۴-۲ روش شمارش

۲-٦ ***۴-۲-۱*** *رقت‌های متوالی ازفرآورده، به محیط کشت انتخابی مایع تلقیح می‌شود.*

۴-۲-۲ لـوله‌هـای تلقـیح شده، در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس به مدت زمان ۲٤ و ٤۸ ساعت در شرایط بـی‌هـوازی گـرمخانه‌گـذاری می‌شود. وجود استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت احتمالی با احیای تلوریت پتاسیم مشخص می‌شود.

---

[1]- Potassium tellurite (K_2TeO_3)
[2] - Baird – Parker agar
[3] - Rabbit plasma fibrinogen agar

۶-۳ **۴-۲-۳** *از لوله‌های مثبت احتمالی بند ٤-۲-۲ پس از مدت زمان ۲٤ ساعت و از همهٔ لوله‌های باقیمانده پس از مدت زمان ٤۸ ساعت درسطح محیط کشت انتخابی برد- پارکر آگار کشت داده می‌شود.*

۶-۴ **۴-۲-۴** *پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس به مدت زمان ۲٤ و ٤۸ ساعت گرمخانه‌گذاری می‌شوند. وجود استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت احتمالی با احیای تلوریت پتاسیم و واکنش زردهٔ تخم مرغ مشخص می‌شوند.*

۶-۵ **۴-۲-۵** *با انجام آزمون کواگولاز کلنی‌های مشخص و/ یا نامشخص تأیید می‌شوند.*

۶-۶ **۴-۲-۶** *به عنوان روش جایگزین می‌توان، لوله‌های مثبت احتمالی بند ٤-۲-۲ را پس از مدت زمان ۲٤ ساعت و همهٔ لوله‌های باقیمانده را پس از مدت زمان ٤۸ ساعت درسطح محیط کشت انتخابی پلاسمای خرگوش فیبرینوژن آگار کشت داد. پس از گرمخانه‌گذاری وجود کلنی‌های استافیلوکوکوس کواگولاز مثبت به وسیله واکنش با فیبرینوژن پلاسمای خرگوش مشخص می‌شوند.*

۶-۷ **۴-۲-۷** *در رقت‌های تایید شده (طبق بند ٤-۲-۵ یا ٤-۲-۶) محتمل‌ترین تعداد استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت درگرم یا در میلی‌لیتر از نمونه طبق استاندارد ملی ایران ۲۳۲۵ : سال ۱۳۸۰ محاسبه می‌شود.*

۵ نمونه برداری

نمونه‌برداری باید طبق استاندارد ملی ایران ۲۳۲۵ : سال ۱۳۸۰ انجام شود.

نمونه‌هایی که به آزمایشگاه تحویل داده می‌شود باید نماینده واقعی کل نمونه بوده و در طی حمل ، جابجایی و نگهداری صدمه 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 قابل دسترس در بازار استفاده می‌کنید، تهیهٔ محیط کشت را مطابق با دستورالعمل سازنده انجام دهید.

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

۶-۱ محلول‌های رقیق کننده

برای تهیه محلول‌های رقیق کننده به استاندارد ملی ایران ۳۵۶ : سال ۱۳۸۰ مراجعه کنید.

در مورد شیر وفراورده‌های آن برای تهیه محلول‌های رقیق کننده به استاندارد ملی ایران[3]..... مراجعه کنید.

۶-۲ محیط‌های کشت

۶-۲-۱ آبگوشت اصلاح شده جیولیتی و کانتونی [4]

۶-۲-۱-۱ محیط کشت پایه

مواد تشکیل دهنده	مقدار (غلظت دو برابر)		مقدار (غلظت معمولی)	
هضم شده آنزیمی کازئین[5]	۲۰/۰	گرم	۱۰/۰	گرم
عصارهٔ گوشت[6]	۱۰/۰	گرم	۵/۰	گرم
عصارهٔ مخمر[7]	۱۰/۰	گرم	۵/۰	گرم
کلرید لیتیم[8]	۱۰/۰	گرم	۵/۰	گرم
مانیتول[9]	۴۰/۰	گرم	۲۰/۰	گرم
کلرید سدیم[10]	۱۰/۰	گرم	۵/۰	گرم
گلیسین[11]	۲/۴۰	گرم	۱/۲۰	گرم
پیرووات سدیم[12]	۶/۰	گرم	۳/۰	گرم
پلی‌اکسی اتیلن سوربیتان مونوالئات (توئین ۸۰)[13]	۲/۰	گرم	۱/۰	گرم
آب مقطر	۱۰۰۰	میلی‌لیتر	۱۰۰۰	میلی‌لیتر

---

[1]- Performance testing

۲- تا تدوین استاندارد ملی ایران به استاندارد بین المللی ISO/TS 11133-1 :2003 مراجعه کنید.

۱- تا تدوین استاندارد ملی ایران به استاندارد بین المللی ISO 8261 مراجعه کنید.

[4] - Modified Giolitti and Cantoni broth

[5] - Enzymatic digest of casein

[6] - Meat extract

5 - Yeast extract

6 - Lithium chloride

7 - Mannitol

8 - Sodium chloride

9 - Glycine

10 - Sodium Pyruvate

11- Polyoxyethylene sorbitan mono-oleate (Tween 80)

روش تهیه

مـواد یـاد شده را با آب مقطر به حجم رسانده و حرارت دهید تا شفاف شود. سپس محیط را در دمای اتاق سـرد کنـید و pH آن را بـه گـونه‌ای تنظیم کنید که پس از سترون سازی برابر ۰/۲±۶/۹ دردمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس باشد. محیط کشت را به مقدار ۱۰ میلی‌لیتر در لوله‌های آزمایش با اندازه ۱۶۰ × ۱۶ میلی‌متر برای غلظـت معمولـی و ۲۰۰ ×۲۰ میلـی‌متـر بـرای غلظـت دو برابر تقسیم کنید و در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجهٔ سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سترون کنید.

۶-۲-۱-۲ محلول تلوریت پتاسیم

مواد تشکیل دهنده	مقدار	
تلوریت پتاسیم	۱/۰	گرم
آب مقطر	۱۰۰	میلی‌لیتر

روش تهیه

پـودر تلوریت پتاسیم را در آب مقطر به کمک حرارت ملایم کاملاً حل کنید . محلول را با استفاده از صافی غشـایی بـا اندازهٔ روزنهٔ ۰/۲۲ میکرومتر، سترون کنید. محلول تهیه شده حداکثر برای مدت زمان یک ماه در دمای ۲±۳ درجهٔ سلسیوس قابل نگهداری است. در صورت مشاهده رسوب ، آنرا دور بریزید.

یـادآوری- بـا توجه به اینکه پودرتلوریت پتاسیم رطوبت را به تندی جذب می‌کند، پس از مصرف، در پوش آن را محکم ببندید و در جای خشک و خنک نگهداری کنید.

۶-۲-۱-۳ محیط کشت کامل

ابـتدا محـیط کشـت پایـه (طبق بند ٦-۲-۱-۱) را برای مدت زمان ۱۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجهٔ سلسیوس حرارت دهید تا هوای آن خارج شود.

سـپس محـیط را در دمـای ٤٤ تا ٤٧ درجهٔ سلسیوس سرد کنید و در شرایط سترون محلول تلوریت پتاسیم (طبق بند ٦-۲-۱-۲) را برای محیط کشت پایه با غلظت معمولی به مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر و برای محیط کشت پایه با غلظت دو برابر به مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر به هر لوله اضافه کنید.

۶-۲-۱-۴ آزمون عملکرد برای تضمین کیفیت محیط کشت

جدول ۱ معیارهای آزمون عملکرد محیط کشت آبگوشت اصلاح شده جیولیتی- کانتونی را نشان می‌دهد.

جدول ۱ – معیارهای آزمون عملکرد محیط کشت آبگوشت اصلاح شده جیولیتی- کانتونی

عملکرد	گرمخانه‌گذاری (مدت زمان- دما)	سویه‌های کنترل	محیط مرجع	روش کنترل	معیار
قابلیت رشد[۲]	٤٨ ساعت ۳۷ درجهٔ سلسیوس	سویه هدف : استافیلوکوکوس اورئوس ATCC[۱] 6538 P یا ATCC 25923 سویه غیر هدف: اشریشیا کلی ATCC 8732 یا ATCC 25922 ویا سویهٔ یکسان ثبت شده در کلکسیون‌های دیگر		نیمه کمی	بیش از ۱۰ کلنی در محیط کشت انتخابی
انتخابی بودن[۳]	٤٨ ساعت ۳۷ درجهٔ سلسیوس	سویه غیر هدف: اشریشیا کلی ATCC 25922 یا ATCC 8739 ویا سویهٔ یکسان ثبت شده در کلکسیون‌های دیگر	TSA[٤]	نیمه کمی	عدم رشد درمحیط کشت غیرانتخابی

1- American Type Culture Collections
2- Productivity
3- Selectivity
4- Tryptic soy Agar

۶-۲-۲ محیط کشت سوی بین کازئین دایجست آگار[1] (TSA)

[1] - Soybean – Casein Digest Agar

مواد تشکیل دهنده	مقدار	
هضم شدهٔ پانکراتیک کازئین[1]	۱۵/۰	گرم
هضم شدهٔ پاپائینی سویا[2]	۵/۰	گرم
کلرید سدیم	۵/۰	گرم
آگار	۱۵/۰	گرم
آب مقطر	۱۰۰۰	میلی‌لیتر

روش تهیه

مـواد یـاد شـده را با آب مقطر به حجم رسانده و حرارت دهید تا شفاف شود. سپس محیط رادر دمای اتاق سـرد کنـید و pH آن را بـه گـونه‌ای تنظیم کنید که پس از سترون سازی برابر ۷/۳±۰/۲ دردمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس باشد. سپس محیط را در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجهٔ سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سترون کنید.

۶-۲-۳ محلول آگار (۲۰ گرم در لیتر)

مواد تشکیل دهنده	مقدار	
آگار	۱۵ تا ۲۰	گرم[3]
آب مقطر	۱۰۰۰	میلی‌لیتر

روش تهیه

آگـار را با آب مقطر مخلوط کنید و حرارت دهید تا شفاف شود. سپس آن را در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجهٔ سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سترون کنید.

پیش از استفاده، محلول را به دمای ٤٤ تا ٤٧ درجهٔ سلسیوس برسانید، سپس در لوله‌های آزمایش با ظرفیت مناسب بریزید و طبق استاندارد ملی ایران ۲۷٤۷ : سال ۱۳۸۰ نگهداری کنید.

۶-۲-۴ محیط کشت برد-پارکر آگار

۶-۲-۴-۱ محیط کشت پایه

مواد تشکیل دهنده	مقدار	
هضم شدهٔ پانکراتیک کازئین	۱۰/۰	گرم
عصارهٔ مخمر	۱/۰	گرم
عصارهٔ گوشت	۵/۰	گرم

[1] - Pancreatic Digest of Casein
[2] - Papaic Digest of Soybean Meal

۴- مقدار آگار بستگی به قدرت ژله ای شدن آن دارد.

پیرووات سدیم	۱۰/۰	گرم
ال ـ گلیسین	۱۲/۰	گرم
کلرید لیتیم	۵/۰	گرم
آگار	۱۲ تا ۲۲	گرم
آب مقطر	تا حجم ۱۰۰۰	میلی‌لیتر

روش تهیه

مـواد یـاد شده را با آب مقطر به حجم رسانده و حرارت دهید تا شفاف شود. سپس محیط را در دمای اتاق سـرد کنـید و pH را بـه گـونه‌ای تنظـیم کنـید که پس از سترون سازی برابر ۷/۲±۰/۲ در دمای ۲۵ درجه سلسیوس باشد.

سـپس محـیط را در حجـم‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری در ارلن‌های مناسب تقسیم کرده و در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجهٔ سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سترون کنید.

۶-۲-۴-۲ محلول تلوریت پتاسیم

برای تهیه محلول تلوریت پتاسیم، طبق بند ٦-۲-۱-۲ عمل کنید.

۶-۲-۴-۳ امولسیون زردهٔ تخم‌مرغ (با غلظت تقریبی ۲۰ درصد)

تخم‌مرغ تازه و سالم را با استفاده از مواد پاک‌کننده تمیز و آبکشی کنید. سپس آن را در الکل اتیلیک (اتانل) ۷۰ درصـد حجمـی بـه مـدت ۳۰ ثانـیه قـرار داده و خـارج کنـید. با رعایت شرایط اسپتیک از قسمت انتها (قسـمتی کـه اتاقـک هوایی وجود دارد) باپی‌پت سترون به قطر تقریبی دو سانتی‌متر سوراخ نموده، پس از کـنار زدن غشـاء لیفـی، تا حد امکان سفیده را خارج کنید. سپس سوراخ ایجاد شده را کمی بزرگتر کرده، با اسـتفاده از یـک پـی‌پـت سترون نوک گرد ۲ یا ۵ میلی‌لیتری سفیدهٔ باقیمانده در اطراف زرده را خارج کنید. پـس از انـتقال زرده بـه استوانهٔ مدرج سترون ، چهار برابر حجم آن آب‌مقطر سترون اضافه کنید وکاملاً هم بـزنید. مخلـوط را در حمـام آب با دمای ٤٧ درجهٔ سلسیوس به مدت دو ساعت قرار دهید. سپس آن را به مـدت زمـان ۱۸ تا ٢٤ ساعت در دمای ۲±۳ درجهٔ سلسیوس قرار دهید تا رسوب تشکیل شود. در شرایط اسـپتیک، لایهٔ رویی امولسیون تشکیل شده را برای اضافه کردن به محیط کشت، جمع آوری کنید. امولسیون زردهٔ تخـم مرغ حداکثر برای مدت زمان ۷۲ ساعت در دمای ۲±۳ درجهٔ سلسیوس قابل نگهداری و مصرف است.

یادآوری- در صورتی که امولسیون تجاری دردسترس است، آن را مطابق با دستور سازنده استفاده کنید.

۶-۲-۴-۴ محلول سولفامزاتین[1] (سولفامتازین[2] ، سولفادیمیدین[3])

[1] - Sulfamezathine

مواد تشکیل دهنده	مقدار	
سولفامزاتین	۰/۲	گرم
محلول هیدروکسیدسدیم(NaOH) : ۰/۱ مول درلیتر	۱۰	میلی‌لیتر
آب مقطر	۹۰	میلی‌لیتر

روش تهیه

سولفامزاتین را در محلول هیدروکسید سدیم حل کرده و با آب مقطر، حجم آن را به ۱۰۰ میلی‌لیتر برسانید. محلـول را با استفاده از صافی غشایی با اندارهٔ روزنهٔ ۰/۲۲ میکرومتر سترون کنید. محلول تهیه شده حداکثر برای مدت یک ماه در دمای ۲±۳ درجهٔ سلسیوس قابل نگهداری می‌باشد.

یـادآوری – محلـول سـولفامزاتین درمـوارد احـتمال وجـود پروتئوس در آزمایه برای جلوگیری از رشد این میکروارگانیسم استفاده می‌شود.

۶-۲-۴-۵ محیط کشت کامل

مواد تشکیل دهنده	مقدار	
محیط کشت پایه (طبق بند ٦-٢-٤-١)	۱۰۰	میلی‌لیتر
محلول تلوریت پتاسیم (طبق بند ٦-٢-٤-٢)	۱	میلی‌لیتر
امولسیون زردهٔ تخم مرغ (طبق بند٦-٢-٤-٣)	۵	میلی‌لیتر
محلول سولفامزاتین در صورت لزوم (طبق بند ٦-٢-٤-٤)	۲/۵	میلی‌لیتر

روش تهیه

محـیط کشـت پایـه را ذوب کـرده و بـا استفاده از حمام آب به دمای ٤٤ تا ٤٧ درجهٔ سلسیوس برسانید . سـپس محلـول تلـوریت پتاسیم و امولسیون زردهٔ تخم‌مرغ و درصورت لزوم محلول سولفامزاتین را که قبلاً جهـت هـم دمـا شدن با محیط کشت پایه در حمام آب قرار داده‌اید، در شرایط اسپتیک به محیط کشت پایه اضافه کنید. پس از هربار افزودن، مخلوط را کاملاً هم بزنید.

۶-۲-۴-۶ آماده کردن پلیت‌ها

مقـدار مناسـبی از محیط کشت کامل (طبق بند ٦-٢-٤-٥) را درون پلیت‌های سترون ریخته، به گونه‌ای که ضخامت محیط کشت حدود ٤ میلی‌متر باشد و بگذارید تا محیط ببندد. پلیت‌ها را می‌توان به مدت زمان ٢٤ سـاعت در دمـای۲±۳ درجهٔ سلسیوس نگهداری کرد. پیش از استفاده از پلیت‌ها، در صورت وجود رطوبت در سـطح محیط کشت، درپوش پلیت‌ها را بردارید و به صورت وارونه درگرمخانه با درجهٔ حرارت بین ۳۷ تا ۵۰ درجهٔ سلسیوس قرار دهید تا قطره‌های آب از سطح آگار حذف شود.

---

[2] - Sulfamethazine
[3] - Sulfadimidine

یادآوری ــ درصورت استفاده از پلیت‌های آماده حاوی محیط کشت ، مدت زمان نگهداری باید مطابق با دستور کارخانهٔ سازنده باشد .

۶-۲-۵ محیط کشت پلاسمای خرگوش فیبرینوژن آگار

۶-۲-۵-۱ محیط کشت پایه

برای تهیه محیط کشت پایه، طبق بند ٦-۲-٤-۱ عمل کرده و سپس در حجم ۹۰ میلی‌لیتر در ارلن مناسب تقسیم کنید.

۶-۲-۵-۲ محلول تلوریت پتاسیم

برای تهیه محلول تلوریت پتاسیم، طبق بند ٦-۲-۱-۲ عمل کنید.

۶-۲-۵-۳ محلول فیبرینوژن گاوی

مواد تشکیل دهنده	مقدار
فیبرینوژن گاوی	۵ تا ۷ گرم[1]
آب مقطر	۱۰۰ میلی‌لیتر

روش تهیه

در شرایط اسپتیک فیبرینوژن گاوی را در آب حل کنید.

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

۶-۲-۵-۴ محلول پلاسمای خرگوش و بازدارنده تریپسین[2]

مواد تشکیل دهنده	مقدار
پلاسمای خرگوش با ضد انعقاد EDTA [3]	۳۰ میلی‌لیتر
بازدارندهٔ تریپسین	۳۰/۰ میلی‌گرم

روش تهیه

در شرایط اسپتیک مواد فوق را با یکدیگر مخلوط کنید.

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

۱- مقدار فیبرینوژن گاوی بستگی به خلوص آن دارد.

[2] - Trypsin inhibitor

[3] - Ethylen diamine tetra acetic acid

۶-۲-۵-۵ محیط کشت کامل

مواد تشکیل دهنده	مقدار	
محیط کشت پایه (طبق بند ٦-٢-٥-١)	۹۰	میلی‌لیتر
محلول تلوریت پتاسیم (طبق بند ٦-٢-٥-٢)	۰/۲۵	میلی‌لیتر
محلول فیبرینوژن گاوی (طبق بند ٦-٢-٥-٣)	۷/۵	میلی‌لیتر
محلول پلاسمای خرگوش و بازدارندهٔ تریپسین (طبق بند ٦-٢-٥-٤)	۲/۵	میلی‌لیتر

روش تهیه

محیط کشت پایه را ذوب کرده و در حمام آب‌گرم به دمای ۱±٤۸ درجهٔ سلسیوس برسانید.

در شرایط اسپتیک، محلول‌های تلوریت پتاسیم، فیبرینوژن گاوی، پلاسمای خرگوش و بازدارندهٔ تریپسین را که در حمام آب‌گرم تا دمای ۱±٤۸ درجهٔ سلسیوس 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.

۶-۲-۵-۶ آماده کردن پلیت‌ها

برای آماده کردن پلیت‌ها ، طبق بند ٦-٢-٤- ٦ عمل کنید.

۶-۲-۶ آبگوشت مغز و قلب[1]

مواد تشکیل دهنده	مقدار	
هضم شده آنزیمی بافتهای حیوانی[2]	۱۰/۰	گرم
عصارهٔ آب‌گیری شده مغز گوساله[3]	۱۲/۵	گرم
عصارهٔ آب‌گیری شده قلب گوساله[1]	۵/۰	گرم

[1] - Brain –heart broth or Brain – heart infusion broth
[2] - Enzymatic digest of animal tissues
[3] - Dehydrated calf brain infusion

گلوکز[2]	۲/۰	گرم
کلرید سدیم	۵/۰	گرم
دی‌سدیم هیدروژن فسفات بدون آب(Na_2HPO_4)[3]	۲/۵	گرم
آب مقطر	۱۰۰۰	میلی‌لیتر

روش تهیه

مـواد یاد شده را در آب مقطر و در صورت لزوم با حرارت دادن حل کنید. pH را به گونه‌ای تنظیم کنید که پس از سترون سازی برابر ۰/۲± ۷/٤ در دمای ۲۵ درجه سلسیوس باشد.

محـیط کشـت را درحجم‌های ۵ تا ۱۰ میلی‌لیتری تقسیم کرده و در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجهٔ سلسیوس به مدت زمان ۱۵ دقیقه سترون کنید.

۷-۲-۶ پلاسمای خرگوش

از پلاسـمای خـرگوش کـه بـه‌صـورت تجاری در دسترس است، استفاده و طبق دستور سازنده عمل کنید. چنانچه پلاسمای تجاری در دسترس نباشد، پلاسمای تازهٔ خرگوش که در شرایط سترون تهیه شده است را بـه نسـبت یک به ۳ با آب مقطر سترون رقیق کنید (یک حجم پلاسما و ۳ حجم آب‌مقطر سترون). در تهیه پلاسـما از محلـول EDTA یـک در صد استفاده کنید. از ضد انعقادهای اکسالات یا هپارین نیز می‌توان استفاده کرد. در این آزمایش، نباید از سیترات پتاسیم یا سیترات سدیم به عنوان ضدانعقاد استفاده کرد.

در صـورت اسـتفاده از پلاسـمای آمـاده بایـد آن را بلافاصله پس از رقیق کردن استفاده کنید. پیش از انجام آزمایش، پلاسما را با سویه‌های استافیلوکوکوس کواگولاز مثبت و منفی آزمایش کنید.

۷ وسایل لازم

از وسـایل معمـول در آزمایشـگاه میکروبیولوژی مطابق با استاندارد ملی ایران ۲۷٤۷ : سال ۱۳۸۰ و به ویژه وسایل زیر استفاده کنید:

۷-۱ گرمخانه، قابل تنظیم در دمای ۱±۳۷ درجهٔ سلسیوس

۷-۲ اتاقک خشک کن یا اون[4]، قابل تنظیم در دمای ۳۷ و ۵۵ درجهٔ سلسیوس

۷-۳ پلیت‌های شیشه ای یا پلاستیکی سترون یکبارمصرف

۷-۴ حلقه[5] و سوزن کشت از جنس پلاتین- ایریدیوم[6] ، نیکل- کرومیوم[7] یا پلاستیک (یکبارمصرف سترون) با قطر تقریبی ۳ میلی متر

۷-۵ لوله‌های آزمایش با اندازه‌های ۱٦۰ × ۱٦، ۲۰۰ ×۲۰ و ۷۵ ×۱۰ میلی‌متر

---

[1] - Dehydrated beef heart infusion
[2] - Glucose
[3] - Disodium hydrogen phosphate , anhydrous
[4]- Drying cabinet or oven
[5] - Loop
[6] - Platinium - iridium
[7] - Nickel - chromium

۷-۶ پی‌پت‌های مدرج ۱ میلی‌لیتری با تقسیمات ۰/۱ میلی‌لیتری

۷-۷ حمام آب، قابل تنظیم در دمای ٤٤ تا ٤٧ درجهٔ سلسیوس و دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس

۷-۸ اسپاچول، برای بریدن آگار

۷-۹ جار بی‌هوازی

۸ روش اجرای آزمون

۸-۱ روش جستجو

۸-۱-۱ تهیه آزمونه ، سوسپانسیون اولیه و رقت‌ها

برای تهیه آزمونه ، سوسپانسیون اولیه و رقت‌های بعدی (در صورت لزوم) به استاندارد ملی ایران ۳٥٦ : سال ۱۳۸۰ مراجعه کنید.

در مورد شیر وفراورده‌های آن برای تهیه آزمونه، سوسپانسیون اولیه و رقت‌ها به استاندارد ملی ایران[1]..... مراجعه کنید.

یک میلی‌لیتر از فرآورده‌های مایع، یا یک گرم از سایر فرآورده‌ها را به ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت آبگوشت اصلاح شده جیولیتی و کانتونی با غلظت معمولی و یا با توجه به ماهیت نمونه، ۱۰ میلی لیتر از سوسپانسیون اولیه (معادل ۱ گرم نمونه)را به ۱۰ میلی لیتر از محیط کشت آبگوشت اصلاح شده جیولیتی و کانتونی با غلظت دو برابر اضافه کنید. برای حجم‌های بیشتر آزمونه، x گرم یا x میلی‌لیتر از آزمونه را به x ۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشت آبگوشت اصلاح شده جیولیتی و کانتونی با غلظت معمولی اضافه کنید. به دقت محلول آگار یا پارافین را که به دمای ٤٤ تا ٤٧ درجهٔ سلسیوس رسیده است به گونه‌ای به محیط کشت اضافه کنید تا سطح محیط کشت تلقیح شده کاملاً پوشانده شود.

یادآوری – در این استاندارد، برای ایجاد شرایط بی‌هوازی از روش ریختن محلول آگار یا پارافین به داخل لوله‌ها استفاده می‌شود. به عنوان روش جایگزین می‌توان از جار یا گرمخانه بی‌هوازی[2] نیز استفاده کرد.

۸-۱-۲ غنی سازی

لوله‌های طبق بند ۸-۱-۱ را به مدت زمان ۲±۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس گرمخانه‌گذاری کنید. اگر محیط کشت تلقیح شده، سیاه رنگ شد یا رسوب سیاه در آن ایجاد شد طبق بند ۸-۱-۳ عمل کنید و اگر هیچ رنگ سیاهی مشاهده نشد، برای مدت زمان ۲±۲٤ ساعت دیگر گرمخانه گذاری کنید و در صورت مشاهده یا عدم مشاهده رنگ سیاه یا رسوب، طبق بند ۸-۱-۳ عمل کنید.

۸-۱-۳ کشت سطحی در محیط انتخابی

۵- تا تدوین استاندارد ملی ایران به استاندارد بین المللی ISO 8261 مراجعه کنید.

[2] - Incubator under anaerobic

در شـرایط اسپتیک، آگار یا پارافین روی لوله‌ها را با استفاده از اسپاچول سترون به صورت دو خط عمود بر هم ببرید و در صورت لزوم اطراف آگار یا پارافین را از پیرامون لوله جدا کنید.
از محـیط کشـت درون لوله، با استفاده از حلقه کشت سترون بر سطح پلیت حاوی محیط کشت برد- پارکر آگـار (طبق بند ٦-٢-٤) یا پلیت حاوی محیط کشت پلاسمای خرگوش فیبرینوژن (طبق بند ٦-٢-٥) کشت خطی دهید تا کلنی‌های مجزا بدست آید. پلیت‌ها را وارونه کنید و در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس برای مدت زمان ۲±۲٤ ساعت و ۲±٤۸ ساعت گرمخانه‌گذاری کنید.

۸-۲ روش شمارش

۸-۲-۱ تهیه آزمونه ، سوسپانسیون اولیه و رقت‌ها

بـرای تهـیه آزمونه ، سوسپانسیون اولیه و رقت‌های بعدی به استاندارد ملی ایران ۳٥٦ : سال ۱۳۸۰ مراجعه کنید.

در مورد شیر و فراورده‌های آن برای تهیه آزمونه، سوسپانسیون اولیه و رقت‌ها به استاندارد ملی ایران[۱] ..... مراجعه کنید.

۸-۲-۲ تلقیح

۸-۲-۲-۱ سـه لـوله حـاوی محـیط کشـت دو برابـر را (طبق بند ٦-٢-١) انتخاب کرده و ۱۰ میلی‌لیتر از آزمایـه (برای فرآورده‌های مایع) یا ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون اولیه (معادل ۱ گرم نمونه برای فرآورده‌های غیر مایع) را به هر کدام از لوله‌ها منتقل کنید.

۸-۲-۲-۲ سـه لوله حاوی محیط کشت معمولی (طبق بند ٦-٢-١) را انتخاب کرده و ۱ میلی‌لیتر از آزمایه (بـرای فـرآورده‌های مایع) یا ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون اولیه (معادل ۰/۱ گرم نمونه برای فرآورده‌های غیر مایع) را به هر کدام از لوله‌ها منتقل کنید.

۸-۲-۲-۳ بـرای هـر کدام از رقت‌های متوالی (برای مثال $۱۰^{-۱}$ ، $۱۰^{-۲}$ و $۱۰^{-۳}$ در مورد فرآورده‌های مایع ، یا $۱۰^{-۲}$، $۱۰^{-۳}$ یا $۱۰^{-٤}$ برای فرآورده‌های غیر مایع) مطابق با بند ۸-۲-۲-۲ عمل کنید. برای هر رقت، از یک پی‌پت سترون استفاده کنید.

۸-۲-۲-۴ به دقت، لوله‌های حاوی نمونه و محیط کشت را مخلوط و از ورود هوا جلوگیری کنید.

۸-۲-۲-۵ رقیق‌سازی نمونه را تا منفی شدن هر سه لوله مربوط به رقت نهایی ادامه دهید.

۸-۲-۲-۶ روی هـر لوله کشت داده شده ۲ تا ۳ میلی‌لیتر محلول آگار یا پارافین با دمای ٤٤ تا ٤٧ درجهٔ سلسیوس بریزید و صبر کنید تا جامد شود.

۸-۲-۳ گرمخانه‌گذاری

۲- تا تدوین استاندارد ملی ایران به استاندارد بین المللی ISO 8261 مراجعه کنید.

۸-۲-۳-۱ لـوله‌های کشت داده شده(طبق بند ۸-۲-۲) را در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس به مدت زمان ۲ ±۲٤ ساعت گـرمخانه‌گـذاری کنید. پس از پایان زمان گرمخانه‌گذاری، از لوله‌های دارای رسوب سیاه یا به طور کلی هر گونه سیاهی در محیط کشت روی محیط انتخابی (طبق بند ۸-۲-٤) کشت دهید.

۸-۲-۳-۲ سـایر لـوله هـا را برای مدت زمان ۲±۲٤ ساعت دیگر گرمخانه‌گذاری کنید. پس از پایان زمان گرمخانه‌گذاری، از همه لوله‌ها (با یا بدون رسوب سیاه) روی محیط انتخابی (طبق بند ۸-۲-٤) کشت دهید.

۸-۲-۴ کشت سطحی روی محیط انتخابی

برای انجام کشت سطحی روی محیط انتخابی، مطابق بند ۸-۱-۳ عمل کنید.

۸-۳ انتخاب و تفسیر نتایج پلیت‌ها

۸-۳-۱ محیط کشت برد – پارکر آگار

۸-۳-۱-۱ انتخاب کلنی‌ها

پـس از گـرمخانه‌گذاری به مدت زمان ۲٤ ساعت ، کلنی‌های مشخص موجود را با علامت‌گذاری در پشت پلیت‌ها مشخص کنید.

پلـیت‌هـا را بـه مـدت زمـان ۲±۲٤ ساعت دیگر در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس گرمخانه‌گذاری کنید.پس از پایان زمان گرمخانه‌گذاری کلنی‌های مشخص و نامشخص رشد کرده را علامت‌گذاری کنید.

یـادآوری ۱ ــ کلنـی‌هـای مشـخص به صورت کلنی‌های سیاه یا خاکستری براق و محدب (با قطر۱ تا ۱/۵ میلی‌متر پس از مدت زمان ۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری و قطر ۱/۵ تا ۲/۵ میلی‌متر پس از مدت زمان ٤۸ ساعت گرمخانه‌گذاری) با هالهٔ شفاف که ممکن است به صورت جزیی کدر شده باشند دیده می‌شوند.

بعـد از حـداقل مـدت زمـان ۲٤ سـاعت گرمخانه‌گذاری در داخل هالهٔ روشن ممکن است یک حلقه رسوبی چسبیده به کلنی ایجاد شود.

یادآوری ۲ ـ کلنی‌های نامشخص که هم اندازه با کلنی‌های مشخص هستند، ممکن است به یکی از اشکال زیر ظاهر شوند :

– کلنـی‌های سیاه براق ، با یا بدون حاشیه باریک سفیدرنگ که در آن، هالهٔ شفاف و حلقه رسوبی کدر ممکن است وجود نداشته باشد و یا به سختی دیده شود

– کلنی‌های خاکستری بدون هاله شفاف

کلنـی‌هـای نامشخص معمولاً توسط سویه‌های استافیلوکوکوس کواگولاز مثبت آلوده کننده مواد غذایی مانند فرآورده‌های لبنی ، میگو و دل و جگرمرغ تولید می‌شوند. کلنی‌های نامشخص کمتر توسط سویه‌های جدا شده از سایر فرآورده‌ها، تشکیل می‌شوند.

یادآوری ۳ ـ **کلنی‌های دیگر، که احتمال وجود آنها می‌رود و در محدوده شرح داده شده در یادآوری‌های ۱ و ۲ جای نمی‌گیرند، به عنوان فلور زمینه[1] در نظرگرفته شده و شمارش نمی‌شوند.**

۸-۳-۱-۲ تأیید (آزمون کواگولاز)

با استفاده از حلقه کشت سترون، از هر کلنی انتخاب شده (طبق بند ۸-۳-۱-۱) بردارید و به لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت آبگوشت مغز و قلب (طبق بند ٦-۲-٦) منتقل کنید. سپس لوله‌ها را در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس به مدت زمان ۲±۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری کنید .

پس از پایان زمان گرمخانه‌گذاری در شرایط اسپتیک، ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون یاد شده را در لولهٔ سترون به اندازه ۷۵ ×۱۰ میلی‌متر ریخته و به آن ۰/۳ میلی‌لیتر پلاسمای خرگوش (طبق بند ٦-۲-۷) اضافه کنید. سپس لوله‌ها را در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس به مدت ٤ تا ٦ ساعت گرمخانه‌گذاری کنید.

پس از پایان مدت گرمخانه‌گذاری تشکیل لخته پلاسما را بررسی کنید. آزمایش کواگولاز در صورتی مثبت است که لخته تشکیل شده باشد. اگر نتیجه منفی بود، لوله‌ها را تا مدت زمان ۱۸ تا ۲٤ ساعت در دمای اتاق یا مدت زمانی که توسط تولید کنندهٔ پلاسما سفارش شده است، نگهداری کنید.

به عنوان شاهد منفی برای هربستهٔ پلاسما ، ۰/۱ میلی‌لیتر از آبگوشت مغز و قلب (طبق بند ٦-۲-٦) را به مقدار توصیه شده پلاسمای خرگوش (طبق بند ٦-۲-۷) بیافزایید و بدون اضافه کردن سوسپانسیون، گرمخانه‌گذاری کنید.

آزمایش در صورتی معتبر است که نشانه‌ای از لخته در پلاسمای شاهد دیده نشود.

۸-۳-۲ محیط کشت پلاسمای خرگوش فیبرینوژن آگار

پس از گرمخانه‌گذاری به مدت زمان ۲±۲٤ ساعت و در صورت لزوم، پس از مدت زمان ۲٤ ساعت دیگر، استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت، به صورت کلنی‌های کوچک سیاه یا خاکستری (یا حتی سفید) با هاله رسوب‌دار دیده می‌شوند.

کلنی‌های پروتئوس در مدت زمان اولیهٔ گرمخانه‌گذاری ممکن است ظاهری شبیه به کلنی‌های استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت داشته باشند ولی پس از مدت زمان ۲٤ یا ٤۸ ساعت گرمخانه‌گذاری بر سطح محیط با رنگ متمایل به قهوه‌ای گسترش می‌یابند طوری که بخوبی از کلنی‌های استافیلوکوکوس قابل تشخیص هستند.

آزمون در صورتی مثبت است که حداقل یک کلنی، واکنش مثبت کواگولاز را نشان دهد.

یادآوری – به دلیل اینکه واکنش کواگولاز در محیط کشت پلاسمای خرگوش فیبرینوژن آگار انجام می‌گیرد نیاز به انجام آزمون تأییدی کواگولاز به طور جداگانه نیست.

[1]- Background flora

۹ بیان نتایج

۹-۱ روش جستجو و شناسایی

نـتایج آزمون را براساس وجود یا عدم وجود استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت، بر حسب گرم یا میلی‌لیتر فرآورده بیان کنید.

۹-۲ روش شمارش

۹-۲-۱ انتخاب رقت‌ها

بـرای هـر رقـت محـیط کشـت انتخابـی (طـبق بـندهای ۸-۱-۲ و ۸-۲-۳)، تعـداد لـوله‌هایـی کـه اسـتافیلوکوکوس‌هـای کواگـولاز مثـبت در آنها با استفاده از محیط کشت برد-پارکر آگار و آزمون کواگولاز تأیـید شـده است و یا وجود کلنی‌های کواگولاز مثبت روی محیط کشت پلاسمای خرگوش فیبرینوژن آگار را ثبت کنید.

سـه رقـت متوالـی را مطابـق با استاندارد ملی ایران ۲۳۲۵ : سال ۱۳۸۰ انتخاب و شاخص MPN را تعیین کنید.

یـادآوری- آزمایـه (بـرای فرآورده‌های مایع) و سوسپانسیون اولیه (برای فرآورده‌های غیرمایع) به عنوان رقت اولیه محسوب می‌شوند.

۹-۲-۲ روش محاسبه

برای انجام محاسبه به استاندارد ملی ایران ۲۳۲۵ : سال ۱۳۸۰ مراجعه کنید.

۱۰ دقت آزمون

برای دقت آزمون به استاندارد ملی ایران ۲۳۲۵ : سال ۱۳۸۰ مراجعه کنید.

۱۱ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید دارای آگاهی‌های زیر باشد :

۱۱-۱ مشخصات کامل نمونه

۱۱-۲ تاریخ نمونه برداری

۱۱-۳ تاریخ انجام آزمون

۱۱-۴ روش نمونه برداری مورد استفاده در صورت لزوم

۱۱-۵ روش آزمون طبق استاندارد ملی ایران ۳- ۶۸۰۶ - سال : ۱۳۸۶

۱۱-۶ نتایج آزمون طبق بند ۹ این استاندارد

۱۱-۷ سایر مواردی که ممکن است بر نتایج آزمایش تأثیر داشته و در این استاندارد ذکر نشده است

۱۱-۸ نام، نام خانوادگی و امضای آزمایش کننده

ICS: 07.100.30

صفحه: ۲۲