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

شامل روش های آزمون روتین

دکتر ناهید رحیمی فرد
دکترای تخصصی میکروبشناسی
عضو هیئت علمی وزارت بهداشت ، درمان و آموزش پزشکی
اداره کل آزمایشگاه های کنترل غذا و دارو
بهار1387

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 شماره9899 جایگزین استاندارد ملی2747 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 وسعی 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 ها ی 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 فراورده 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 بیشترو یا مقایسه ذکر شده است .

3) محیط های کشت در تمام روشها، باید طبق دستورالعمل سازنده ساخته و اتوکلاوشوند، سپس مورداستفاده قرار گیرند.در روش پورپلیت، محیط های جامد استریل را بایستی قبل از استفاده با قرار دادن در حمام آب گرم (بن ماری) به دمای 45 درجه سلسیوس رساند.

4) درروشهای شمارش، رقت سازی نمونه و استفاده از رقت های اعشاری ، باید براساس حد مجاز میکروارگانیسم مورد نظر در نمونه ساخته شود و آخرین رقت نمونه بایستی مقدار حدمجازرا دربرگیرد.

مثال:اگر حدمجاز باسیلوس سرئوس در دو نوع فراورده به ترتیب 10و 10^2 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 دوپلیکیت (دوتایی) انجام داد.

5) بطور كلي رقت ها بايد بلافاصله قبل از انجام آزمون تهيه و به محيط هاي كشت تلقيح شوند.

6) در برخي موارد خاص ، بخصوص نمونه هايي كه رقت اوليه (رقت1/10) آنها بيش از حد، غليظ مي شود، لازمست كه مقدار رقيق كننده را افزايش داد. در اين صورت در محاسبه نتايج اين مقدار بايستي در نظر گرفته شود.

7) برای اطمینان از پاسخ آزمون و دقت بیشتر، کلیه آزمون ها ي شمارش بايستي حداقل بصورت دوپليكيت (دو تايي) كار شود .

8) به منظور كنترل استريليتي بايستي شاهد هاي منفي براي محيط كشت ، هوا ، تجهيزات در طي آزمون استفاده شود.

9) به منظور كنترل عملكرد محيط هاي كشت و محلول هاي مورد استفاده (Performance test) بايستي از تست هاي لازم بر اساس استاندارد ملی ایران سال 1385 به شماره 8663-2 (ISO/TS 11133-1,2:2003) در اين زمينه استفاده شود.

10) براي شمارش اسپورها ، رقت اوليه را بلافاصله پس از آماده شده بمدت 10 دقيقه در دماي 65 درجه سلسيوس گذاشته و سپس به سرعت خنك كنيد.

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 درمقدار معینی (گرم یا میلی لیتر) ازفراورده باید **منفی** باشد.

12) اساس کلیه روش های **شمارش** ،انتقال مقدار معینی (گرم یا میلی لیتر) ازفراورده 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 براي يك ميكروارگانيسم خاص باشد بايستي 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 میکروارگانیسم موردنظر ،درمقدار معینی (گرم یا میلی لیتر) ازفراورده، بصورت عددی غیر از صفر(منفی) ،می تواند مجاز باشد.

13) پلیت ها را برای گرمخانه گذاری، در دسته هاي كمتر از 6 عدد با فاصله معين از يكديگر و همچنين سقف و ديواره ها در گرمخانه قرار دهيد.

14) كليه دستگاه هاي مورد استفاده بايستي داراي گواهي كاليبراسيون معتبر باشند و آزمايش كننده از صحت كارآيي آنها اطمينان 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 درلوله ها استفاده کرد،حتی اگر از رقت رقیق به غلیظ عملیات انتقال انجام شود.

17) قضاوت در باره قابليت مصرف ميكروبيولوژي يك نمونه در صورتي امكان پذير است كه برداشت نمونه مورد آزمون از تعداد مشخص نمونه، طبق استاندارد ملي ايران شماره 6597 انجام شده باشد. مثال :در صورتيكه طبق محاسبه، 5 نمونه براي انجام آزمون ضروري باشد بايستي

پس از مخلوط و يكنواخت نمودن كامل محتويات 5 نمونه، مقدار معين(ميلي گرم يا ميلي ليتر) از آن مخلوط را براي انجام آزمون استفاده كرد.

18) با توجه به اینکه بسیاری از خصوصیات بیوشیمیایی باکتری ها صد در صد نمی باشد ویا 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 درتعداد 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 15تا20 میلی لیتر محیط کشت آگار دار انتخابی برای باکتری مورد وکشت به صورت پورپلیت
- گرمخانه گذاری دردمای 35 تا 37 درجه سلسیوس به مدت 24- 48 ساعت (با توجه به زمان و دمای مناسب برای باکتری مورد نظر)
- شمارش كل كلني 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 وکاملا 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) x c تعداد باکتری مورد نظر را در هر پلیت (a) را حساب کنید.
- برای بدست آوردن تعداد باکتری مورد نظر درهر گرم یا میلی لیتر نمونه ابتدا از فرمول زیر برای هر پلیت مقدار را حساب کنید:
- X a عکس رقت x عکس حجم= ml یاcfu/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 (از1 تا 100 cfu در mlیا g از نمونه) به روش MPN (Most Probable Number) :

استفاده از این روش برای شمارش یک نوع باکتری در تعداد کم (از1 تا 100 cfu در ml یا g از نمونه) توصیه می شود.

- افزودن 10 میلی لیتر ازنمونه مورد آزمون (چنانچه مایع باشد) ویا 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 ویا 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 ازرقت 0/1 نمونه مایع ویا رقت 0/01 نمونه جامد به 3 لوله حاوی10 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

- درصورت مشاهده آثار رشد(ایجادگاز،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 کاملا 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 ميلي ليتر (در فراورده هاي مايع)یا در هر گرم (در سایرفراورده ها) با ضرب کردن شاخص MPN در عکس پائین ترین رقتي که انتخاب شده (یعني رقتي که بیشترین مقدار نمونه را داراست) محاسبه کنید.

اساس آزمون شناسایی یک نوع میکروارگانیسم

اصولا 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 پپتونه بافره
- گرمخانه گذاری در دمای مناسب رشد میکروارگانیسم موردنظر به مدت معمولا یک شب
- افزودن 1 میلی لیتر از سوسپانسیون فوق به لوله حاوی10 میلی لیتر محیط مایع غنی کننده انتخابی دوم برای میکروارگانیسم موردنظر
- گرمخانه گذاری در دمای مناسب رشد میکروارگانیسم موردنظر به مدت معمولا یک شب
- پس از گرمخانه گذاری ، کشت خطی از لوله ها روی محیط جامد انتخابی برای میکروارگانیسم موردنظر

- گرمخانه گذاری در دمای مناسب رشد میکروارگانیسم موردنظر به مدت معمولا یک شب
- انجام آزمون های تاییدی بیوشیمیایی برای کلنی های رشد کرده و کاملا ایزوله
- انجام آزمون های تاییدی سرولوژیکی برای تشخیص نهایی

آماده سازی نمونه:

- ☐ یکنواخت نمودن کامل نمونه تحت شرایط استریل
- ☐ در نمونه هاي مايع قبل از برداشت بايستي نمونه كاملا مخلوط و يكنواخت شود.
- ☐ در نمونه هاي نيمه جامد دو فاز جامد و مايع توسط استومكر ، پالسيفاير و يا هاون استريل تحت شرايط استريل كاملا مخلوط و يكنواخت شود.
- ☐ در نمونه هاي جامد توسط استومكر ، پالسيفاير و يا هاون استريل تحت شرايط استريل نمونه كاملا مخلوط و يكنواخت شود.
- ☐ برخی نمونه ها نیاز به گرمخانه گذاری قبل از انجام آزمون دارند، بطور مثال:

شیر و خامه استریل: بطور همزمان 10روز در دمای30 درجه سلسیوس و 7روز در دمای 55 درجه سلسیوس

مواد غذایی کم اسید در ظروف نفوذ ناپذیر: بطور همزمان10 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 همزمان10 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 سال 1386 (جایگزین استاندارد ملی شماره 356)، 2836 و 6597 سال .1382

تهيه رقت :

بطور كلي تمام رقت ها بايد بلافاصله قبل از انجام آزمون تهيه ودر زمان كوتاهی به محيط هاي كشت تلقيح شوند.

محلول رقیق کننده اغلب مواد غذایی، محلول رینگراست ولی برای بعضی فراورده 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، سیترات سدیم 2% ،برای قند و شکر، آب مقطر استریل ، برای کره رینگر 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 شماره6597) 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 شیکربه مدت زمان کافی تا ایجاد یک محلول کاملا یکنواخت).

در برخي موارد خاص ، بخصوص نمونه هايي كه رقت اوليه (رقت1/10) آنها بيش از حد، غليظ مي شود، لازمست كه مقدار رقيق كننده را افزايش داد. در اين صورت در محاسبه نتايج اين مقدار بايستي در نظر گرفته شود.

در صورتیکه نمونه بعلل مختلف براحتی در محلول رقیق کننده حل و یکنواخت نشود بایستی تحت شرایط خاص مثل افزودن آنزیم های معین برای بعضی نمونه ها و توبین80 در نمونه های با پایه چربی، مشکل را برطرف کرد تا محلول کاملا یکنواخت حاصل شود.

در صورتیکه نمونه بعلل مختلف پس ازافزودن 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 كلي رقت ها بايد بلافاصله قبل از انجام آزمون تهيه و به محيط هاي كشت تلقيح شوند.

درروشهای شمارش، رقت سازی نمونه و استفاده از رقت های اعشاری ، باید براساس حد مجاز میکروارگانیسم مورد نظر در نمونه ساخته شود و آخرین رقت نمونه بایستی مقدار حدمجازرا دربرگیرد. برای تهیه رقت های متوالی معمولا از نسبت های ده دهی یا اعشاری استفاده می شودبه 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 سال 1386 (جایگزین استاندارد ملی شماره 356)، 2836 و 6597 سال .1382

شمارش کلی میکروارگانیسم 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 وچرخاندن پلیت به صورت 8 در سطح افقي بطوري كه محتويات آن با در پليت تماس پيدا نكند.
- پس از بسته شدن آگار, گذاردن پلیت ها به صورت وارونه در دمای 30 درجه سلسیوس به مدت 72 ساعت

- شمارش کل کلنی ها ی رشد یافته اعم از باکتری ،کپک و مخمر روی هر پلیت با استفاده از فرمول زیر:
- تعداد کل کلنی ها xعکس رقت x عکس حجم استفاده شده= تعداد کلنی در یک گرم یا یک میلی لیتراز 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 هاي شیر و فراورده هاي آن بعلت افزودن شیرخشك بدون چربي به میزان 0/01% در محیط کشت (طبق استاندارد ملي5484) ،شمارش کلني ها بایستي در نور ملایم انجام گیرد.تا کلني هاي سرسوزني 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 وچرخاندن پلیت به صورت 8 در سطح افقي بطوري 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 باکتري ها ی رشد یافته روی هر پلیت با استفاده از فرمول زیر:

تعداد کلنی باکتری ها xعکس رقت x عکس حجم استفاده شده= تعداد کلنی در یک گرم

گرم یا یک میلی لیتراز 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 1374شماره 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 x عکس رقت x 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 پپتونه 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 حاوی10 میلی لیتر EE Broth دارای لوله دورهام (Enterobacteriacea Enrichment Broth)

یا BGBG Broth (Brilliant Green Bile Glucose Broth) ، با غلظت معمولی و دارای‌لوله 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 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 کاملا ایزوله شامل اکسیدازتست وتخمیر گلوکز در محیط گلوکزآگار
- انتروباکتریاسه اکسیداز منفی و قادر به تخمیر گلوکز هستند.
- استاندارد ملی ایران سال 1386 شماره 2461

شمارش انتروباکتریاسه :

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 15تا20 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 طورهمزمان, افزودن 10 میلی لیتر از رقت 0/1 نمونه جامد به لوله حاوی 10 میلی لیتر Brilliant Green Bile Glucose Broth(BGBG) یا Enterobacteriacea Enrichment Broth (EEB)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 37درجه سلسیوس به مدت 24-48 ساعت

درصورت مشاهده گاز در لوله ها

- شمارش کل کلني 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 آنتروباکتریاسه برای کلنی های رشد کرده وکاملا ایزوله شامل اکسیدازتست وتخمیر گلوکز در محیط گلوکزآگار
- انتروباکتریاسه اکسیداز منفی و قادر به تخمیر گلوکز هستند.
- تعداد کلنی هایی که در تست های تاییدی به عنوان انتروباکتریاسه شناخته شدند را یادداشت کنید=(b)
- سپس با استفاده از فرمول a=(b/A) x c تعداد انتروباکتریاسه را در هر پلیت (a) را حساب کنید.
- برای بدست آوردن تعداد انتروباکتریاسه درهر گرم یا میلی لیتر نمونه ابتدا از فرمول زیر برای هر پلیت مقدار را حساب کنید:

- X a عکس رقت x عکس حجم= ml یاcfu/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 از1 تا 100 cfu در ml یا g از نمونه :

- افزودن 10 میلی لیتر ازنمونه مورد آزمون (چنانچه مایع باشد) ویا 10 میلی لیتر از رقت 0/1 نمونه جامد به 3 لوله حاوی 10 میلی لیتر Brilliant Green Bile Glucose Broth ، با غلظت دو برابرو دارای لوله دورهام
- افزودن 1 میلی لیتر از نمونه مایع ویا 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 ازرقت 0/1 نمونه مایع ویا رقت 0/01 نمونه جامد به 3 لوله حاوی10 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
- درصورت 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 دردمای 35 تا 37 درجه سلسیوس به مدت 24 ساعت
- انجام آزمون های تاییدی آنتروباکتریاسه برای کلنی های رشد کرده کاملا مجزا شامل اکسیدازتست وتخمیر گلوکز در محیط گلوکزآگار
- تعداد لوله های تایید شده از نظر انتروباکتریاسه را یادداشت کنید.
- محتملترین تعداد انتروباکتریاسه را از جدول MPN محاسبه کنید.
- استاندارد ملی ایران سال 1386 شماره 2461

شناسایی انتروباکترساکازاکی:

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

- افزودن 67 گرم نمونه شیرخشك به 603 میلی لیتر آب پپتونه بافره با دماي 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 حاوی10 میلی لیتر EE Broth دارای لوله دورهام (Enterobacteriacea Enrichment Broth)

یا BGBG Broth (Brilliant Green Bile Glucose Broth) ، با غلظت معمولی و دارای‌لوله 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

- كشت 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 کاملا ایزوله شامل اکسیدازتست وتخمیر گلوکز در محیط گلوکزآگار
- انتروباکتریاسه اکسیداز منفی و قادر به تخمیر گلوکز هستند.
- انجام آزمون های تاییدی *انتروباکترساکازاکي* برای کلنی های تایید شده در آزمون تایید انتروباکتریاسه به شرح زیر:
- D-Sorbitol منفي ، ايجاد پيگمان زرد روي محيط تريپتي كيز سوي آگار ،سيمون سيترات مثبت ،آرژنين دهيدرولاز منفي ، متيل رد منفي،وژژپروسكاورVP مثبت ،دولسيتول منفي ، x متيل D گلوكوزايد منفي
- استاندارد ملی ایران سال 1386شماره ---

شناسايی كلي فرم ها:

- افزودن 1 میلی لیتر از نمونه مایع به لوله حاوی 10 میلی لیتر Lauryl sulfate tryptose broth با غلظت معمولی یا10 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 درهام
- گرمخانه گذاری دردمای 35 تا 37 درجه سلسیوس به مدت48- 24 ساعت
- درصورت عدم مشاهده گاز در لوله پس از 48 ساعت ، نمونه از نظر وجود کلی فرم منفی است .
- درصورت مشاهده گاز در لوله پس از 48ساعت ، انتقال 1تا2 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 مدت48- 24 ساعت
- درصورت 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 .
- درصورت 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 1386شماره 437

شمارش كلي 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 1میلی لیتر از نمونه مایع به پلیت خالی استریل
- افزودن 15-20میلی 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 مدت48- 24 ساعت برای لبنیات دمای 30 درجه سلسیوس به مدت24 ساعت
- به طورهمزمان 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 مدت48- 24 ساعت برای لبنیات دمای 30 درجه سلسیوس به مدت24 ساعت
- درصورت مشاهده گاز در لوله BGBL broth ,شمارش کلني های قرمز ارغوانی در پلیت های مرحله اول (کشت پورپلیت دولایه ای)
- درصورت ایجاد کدورت بدون گاز در لوله BGBL broth کشت خطی از لوله فوق روی محیط آگارMc- Conkey برای مشاهده وجود کلنی های قرمز ارغوانی پس از گرمخانه گذاری ودر صورت وجود ،شمارش کلني 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 قرمزشمارش شده x عکس رقت x عکس حجم= cfu/g
- استاندارد ملی ایران سال 1386 شماره 437

2-(روش MPN) تعداد باکتریها از1 تا 100 cfu در ml یا g از نمونه :

براساس 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 1386شماره 437

شناسایی *اشریشیا کلي* :

☐ 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 24تا 48 ساعت در دمای 37 درجه سلسیوس

- درصورت مشاهده گازيا كدورت در لوله فوق , 1-2 قطره از آن را به 10 ميلی ليتر EC broth با غلظت معمولی و حاوی لوله درهام بيفزاييد.دربرخي از فراورده هاي شيري (مانند كازئين) لوله درهام ممكن است به ته لوله محيط كشت فرو رود در اين صورت اگر پس از 48 ساعت دوره گرمخانه گذاري ،كدورت مشاهده شد،اما گاز توليد نگرديد نيز،1-2 قطره از آن را به 10 ميلی ليتر EC broth با غلظت معمولی و حاوی لوله درهام بيفزاييد.
- گرمخانه گذاری به مدت 24تا 48 ساعت دربن ماری با دمای 44 تا 45 درجه سلسيوس
- درصورت مشاهده گاز يا كدورت در لوله EC broth:

1) 1-2 قطره از آن را به آب پپتونه بدون اندول Peptone water,indol free افزوده وبه مدت 24تا 48 ساعت دربن ماری با دمای 44 تا 45 درجه سلسيوس گرمخانه گذاری كنيد. سپس 0/5 ميلي ليتر معرف كواكس به لوله افزوده و پس از يك دقيقه ايجاد رنگ قرمز در سطح محيط كشت (واكنش اندول مثبت) را بررسي كنيد.

2) كشت خطی از EC broth بر روی محيط كشت Mc-Conkey agar براي ديدن كلني هاي ارغواني لاكتوز مثبت وسپس كشت خطي ازكلني هاي فوق بر روي نوترينت آگارجهت ايجاد كلنی ايزوله براي انجام تست هاي تاييدي

تست های تاييدی شامل كشت در محيط كشت افتراقی TSI ، اندول ، متيل رد،سيمون سيترات، (IMViC) برای كلني های ايزوله شده جهت مشاهده واكنش های زير:

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

IMViC: - - + + (اندول و متيل رد مثبت ،وی پی و سيترات منفی)

- استاندارد ملی ايران سال 1385شماره 2946

شمارش *اشريشيا كلي*:

1- تعداد باكتريها بيش از 100 cfu در ml يا g از نمونه :

- انتقال 1 ميلی ليتر از رقت 0/1 يا رقت مورد نيازبه پليت 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) ،درنظر گرفتن تعداد مشخص از این کلنی ها برای انجام تست های تاییدی=(A)
- انجام آزمون های تائیدی شناسایی *اشریشیا کلی* برای کلنی های فوق شامل :
- تست TSI و IMViC بر روی كلوني های مشكوك 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) x c تعداد اشریشیا کلی را در هر پلیت یا همان a را حساب کنید.
- برای بدست آوردن تعداد اشریشیاکلی درهر گرم یا میلی لیتر نمونه ابتدا از فرمول زیر برای هر پلیت مقدار را حساب کنید:
- X a عکس رقت x عکس حجم= ml یاcfu/g
- سپس میانگین مقادیر بدست آمده در کل پلیت ها را به عنوان تعداد اشریشیاکلی در هر گرم یا میلی لیتر از نمونه بیان کنید.
- استاندارد ملی ایران سال 1385 شماره 2946

2-(روش MPN) تعداد باکتریها از1 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 اولیهLauryl 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

شناسايي *استافيلوكوكوس 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 براث فوق با غلظت دو برابر افزوده شود.)
- افزودن واز- پار به سطح براث برای ایجاد شرایط بی هوازی
- گرمخانه گذاری در دمای 35 تا 37 درجه سلسیوس به مدت48- 24 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 مدت48- 24 ساعت
- برای کلني های مشکوك(گرد, محدب, مشکی براق با هاله باريك شفاف نفتی) آزمونهای تاییدی ، مانند تست کواگولاز با ایجاد لخته درپلاسمای خرگوش , تخمیر هوازی و بی هوازی مانیتول درمحیط کشت افتراقیMannitol Salt Agar باید انجام شود.
- استاندارد ملی ایران سال 1386 شماره 3-6806

شمارش *استافيلوكوكوس 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 مدت48- 24 ساعت
- شمارش کلني های مشکوك(گرد, محدب, مشکی براق با هاله باريك شفاف نفتی)= (c)
- انتخاب تعداد معینی از کلنی های فوق برای انجام تست های تاییدی = (A)
- آزمونهای تاییدی ، مانند تست کواگولاز با ایجاد لخته درپلاسمای خرگوش , تخمیر هوازی و بی هوازی مانیتول درمحیط کشت افتراقیMannitol 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) x c حساب کنید.
- برای بدست آوردن تعداد استافیلوکوکوس اورئوس درهر گرم یا میلی لیتر نمونه ابتدا از فرمول زیر برای هر پلیت مقدار را حساب کنید:
- a X عکس رقت x عکس حجم= ml یاcfu/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 از1 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 اولیهModified Giolitti– Cantoni broth حاوی تلوریت پتاسیم در 9 لوله استفاده می شود و پس از تلقیح به لوله ها 3-2 میلی لیتر آگار یا پارافین با دمای 47-44 درجه سلسیوس ریخته ،پس ازجامد شدن آگاریا پارافین در سطح لوله ها،آنها را دردمای 37 درجه سلسیوس بمدت 24 ساعت گرمخانه گذاری و لوله هایی که سیاهی یا رسوب سیاه در آنها مشاهده شود را پس ازانجام تست های تاییدی (کشت سطحی روی بردپارکر آگارو انجام تست کواگولاز) ولوله های دیگر را تا 48 ساعت گرمخانه گذاری و تمامی آنها با یا بدون سیاهی یا رسوب سیاه در آنها را پس ازانجام تست های تاییدی (کشت سطحی روی بردپارکر آگارو کواگولاز) بررسی می کنید.
- استانداردهای ملی ایران سالهای 1384 و 1386 شماره 6806-1 , 6806-3

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 (Mannitol egg Yolk Polymyxin) یا *Bacillus Cereus* Selective Agar 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 دیسك آنتی بیوتیك)
- 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) x c حساب کنید.
- برای بدست آوردن تعداد *باسیلوس سرئوس* درهر گرم یا میلی لیتر نمونه ابتدا از فرمول زیر برای هر پلیت مقدار را حساب کنید:
- X a عکس رقت x عکس حجم= ml یاcfu/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 از1 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 *Bacillus Cereus* Selective Broth در 9 لوله استفاده می شود.
استاندارد ملی ایران سال 1386 شماره ----

شناسایی *انتروکوکوس* ها :

- افزودن 10 میلی لیتر ازرقت 0/1نمونه به 10 میلی لیتر گلوکز آزاید براث با غلظت دو برابر (معرف pH: بروموکرزول ارغوانی, آزاید: مهارکننده)
- گرمخانه گذاری در دمای 35 تا 37 درجه سلسیوس به مدت48- 24 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 مدت48- 24 ساعت
- انجام تست های تاییدی برای کلني 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 % نمك, توانایی رشد در دمای 45 درجه سلسیوس

- استاندارد ملی ایران سال 1386 شماره 2198

شمارش *انتروکوکوس* ها:

- انتقال1میلی 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 مدت48- 24 ساعت
- شمارش کلني های صورتی ارغوانی تا قرمز رنگ ،انتخاب تعدادمعینی 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 x عکس رقت x عکس حجم= ml یاcfu/g ، که درآن 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 حاوی100میکروگرم 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 لیترباشند.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 حاوی100میکروگرم 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 وکشت مستقیم
- کشت با غنی سازی:

- انتقال 1 تا 2 میلی لیتر یا 1 تا 2 گرم ازمحتویات 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 ازمحتویات 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 دردمای30 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 وشرایط 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 ازمحتویات 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 30تا 35 درجه سلسیوس تحت شرایط بی هوازی برای محیط کشت LVA وشرایط 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
- ضدعفونی کردن ظرف با محلول حاوی100میکروگرم 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 ترکشت طی دو مرحله بطور همزمان انجام می شود : کشت باغنی سازی وکشت مستقیم
- کشت با غنی سازی:
- انتقال 1 تا 2 میلی لیتر یا 1 تا 2 گرم ازمحتویات 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 ازمحتویات 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 دردمای55 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 55 درجه سلسیوس تحت شرایط بی هوازی برای محیط کشت LVA وشرایط 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 ازمحتویات 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 وشرایط 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 کمترهستند:

این مواد غذایی باید از نظر باکتری های مزوفیل هوازی ، باکتری های گرمادوست هوازی و همچنین کپک و مخمر ، منفی در گرم یا میلی لیترباشند.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
- ضدعفونی کردن ظرف با محلول حاوی100میکروگرم 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 وکشت مستقیم
- کشت با غنی سازی:
- انتقال 1 تا 2 میلی لیتر یا 1 تا 2 گرم ازمحتویات ظرف پس از مخلوط و یکنواخت شدن کامل محتویات ، به 2 لوله حاوی محیط کشت آبگوشت اسیدی(AB(Acid Broth ویا DTB(Dextrose Tryptone Broth)
- گرمخانه گذاری به مدت 2 تا 5 روز دردمای25 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)ازمحتویات 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
- ضدعفونی کردن ظرف با محلول حاوی100میکروگرم 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 وکشت مستقیم
- کشت با غنی سازی:
- انتقال 1 تا 2 میلی لیتر یا 1 تا 2 گرم ازمحتویات ظرف پس از مخلوط و یکنواخت شدن کامل محتویات ، به 2 لوله حاوی محیط کشت آبگوشت اسیدی(AB(Acid Broth ویا DTB(Dextrose Tryptone Broth)
- گرمخانه گذاری تمامی لوله های فوق به مدت 5 روز دردمای55 درجه سلسیوس در شرایط هوازی
- بررسی لوله ها از نظر کدورت،بوی تعفن و تولید اسیدوگاز
- ازهر لوله مشکوک بصورت دوپلیکیت مقدار 1 میلی لیتر درپلیت انتقال داده و کشت پورپلیت 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)ازمحتویات 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
- ضدعفونی کردن ظرف با محلول حاوی100میکروگرم 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 وکشت مستقیم
- کشت با غنی سازی:
- انتقال 1 تا 2 میلی لیتر یا 1 تا 2 گرم ازمحتویات ظرف پس از مخلوط و یکنواخت شدن کامل محتویات ، به 2 لوله حاوی محیط کشت آبگوشت اسیدی(AB(Acid Broth ویا DTB(Dextrose Tryptone Broth)
- گرمخانه گذاری به مدت 5 روز دردمای25 تا 30 درجه سلسیوس در شرایط هوازی
- بررسی لوله ها از نظر کدورت،بوی تعفن و تولید اسیدوگاز
- ازهر لوله مشکوک بصورت دوپلیکیت مقدار1 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 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)ازمحتویات 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 هوازی
- 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 1میلی 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 هوازی

- گرمخانه گذاری لوله ها در دمای 35 تا 37 درجه سلسیوس به مدت48ساعت
- کشت خطی از لوله های Cooked Meat بر روی SPS Agar (Sulfite Polymyxin Sulfadiazine)

یا TSC Agar (Tryptose Sulfite Cycloserine)

- گذاردن پلیت ها در جار بی هوازی
- گرمخانه گذاری در دمای 35 تا 37 درجه سلسیوس به مدت48 ساعت
- بررسی وجود کلنی های سیاه رنگ
- استاندارد ملی ایران سال 1385شماره 2197

شمارش *کلستریدیوم* های احیا کننده سولفیت:

الف)شمارش *کلستریدیوم* های احیا کننده سولفیت:

- افزودن1میلی لیتر از رقت مورد نیازنمونه مستقیما 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) وسپس افزودن1میلی 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 پورپلیت
- گذاردن پلیت ها در جار بی هوازی
- گرمخانه گذاری در دمای 35 تا 37 درجه سلسیوس به مدت48 ساعت
- شمارش کلنی های سیاه رنگ x عکس رقت xعکس حجم استفاده شده
- استاندارد ملی ایران سال 1385شماره 2197

شناسایی *کلستریدیوم پرفرنژنس* :

- برای تایید *کلستریدیوم پرفرنژنس* از کلنی های سیاه رنگ در انتهای آزمون شناسایی و یا شمارش کلستریدیوم های احیاکننده 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، گلوکزو مالتوز: مثبت ، مانیتول: منفی،آزمایش شیر لیتموس: ایجاد لخته طوفانی،اندول :منفی،اوره آز: منفی،حرکت :منفی،احیا نیترات:مثبت،هیدرولیز ژلاتین : مثبت، لستیناز : مثبت ،نگلر تست :مثبت،لیپاز :منفی
- استاندارد ملی ایران سال 1385شماره 2197

شناسایی سم *کلستریدیوم بوتولینوم* به روش بیولوژیکي (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.

ضدعفونی کردن قوطی های کنسرو یا ظرف با محلول حاوی100میکروگرم 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 آزمونه)

1 تا 3 میلی لیتر از محلول آزمونه 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 ومحلول 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 دقیقا و عینا روی سوسپانسیون کشت کلنی های باکتری بجای نمونه غذایی مجدد انجام دهید.

- ضدعفونی کردن ظرف با محلول حاوی100میکروگرم 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 بخارآب یا آب چوش 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 کاملا 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 ازمحتویات 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 ازمحتویات 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 دردمای30 تا 35 درجه سلسیوس برای محیط کشت کوکد میت ودر دمای 26 تا 28 درجه سلسیوس برای محیط کشت TPGY یا PE2
- بررسی لوله ها از نظر کدورت،بوی تعفن ، تولید گازو 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 وشواهد 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.(بااستفاده 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 ا تا 2 حلقه کشت(1 تا 2 لوپ) در دوسری روی محیط کشت Anaerobic egg yolk agar یا Liver Veal Egg Yolk agar (LVEY) یا آگار تقویت شده کلستریدیوم(Reinforced Clostridial Agar =RCA)) کشت خطی انجام دهید.
- یک سری ازپلیت ها به مدت 2 تا 5 روز دردمای 35 درجه سلسیوس تحت شرایط بی هوازی و یک سری از آن ها را درشرایط 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 معمولا در اثر فعالیت لسیتیناز دارای هاله رسوبی زرد رنگ بزرگ تری نسبت به انواع A و B هستند.)
- از حداقل 5 کلنی مشخص انتخاب شده توسط سیم کشت(آنس) 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 یاPE2 را در دمای 26 درجه سلسیوس به مدت 5 روز در شرایط بی هوازی گرمخانه گذاری کنید.
- از لوله های مشکوک ا تا 2 حلقه کشت(1 تا 2 لوپ) در دوسری روی پلیت حاوی محیط کشت Anaerobic egg yolk agar یا Liver Veal Egg Yolk agar (LVEY) یا آگار تقویت شده کلستریدیوم(Reinforced Clostridial Agar =RCA)) کشت خطی انجام دهید.
- یک سری ازپلیت ها به مدت 48 ساعت دردمای 35 درجه سلسیوس تحت شرایط بی هوازی و یک سری از آن ها رادرشرایط هوازی گرمخانه گذاری کنید.
- در صورتیکه در پلیت های گرمخانه گذاری شده در شرایط هوازی و بی هوازی کلنی یکسان رشد کرد نمونه از نظروجود 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 یاPE2 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 هوازی رشدی مشاهده نشود ودر شرایط بی هوازی کلنی رشد کرده باشد ،لوله های کوکد میت و TPGY یاPE2 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.
- استانداردهای ملی ایران سال 1385 شماره های 2323 و2326 و 2197

شناسایی سودوموناس آئروژینوزا:

- در مورد نمونه های جامد، غنی سازی نمونه در مالاشیت گرین براث غلیظ یا آبگوشت آسپاراژین 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 براث، کشت خطی برروی 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 سیتریماید آگارحاوی شیر خشک)،واکنش آلکالن/آلکالن فاقد H_2S 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

شناسايي *سالمونلا:*

- 25گرم نمونه در225 میلی لیتر Buffered Peptone Water
- گرمخانه گذاری به مدت 18تا 24 ساعت در 35 تا 37 درجه سلسیوس
- افزودن 1 میلی لیتر از محلول فوق در 10 میلی لیتراز 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 مي شود محیط کشت Rappaport vassiliadis broth حتما استفاده شود.
- گرمخانه گذاری به مدت 18تا 24 ساعت دردمای 35 تا 37 درجه سلسیوس برای محیط کشت اول ودمای 41 تا 43 درجه سلسیوس برای دو محیط کشت بعدی در صورتیکه از محیط کشت تتراتیونات با کریستال ویوله استفاده مي کنید گرمخانه گذاری به مدت 18تا 24 ساعت دردمای 35 تا 37 درجه سلسیوس باید باشد.
- کشت خطي 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 18تا 24 ساعت در 35 تا 37 درجه سلسیوس
- مشاهده و بررسی کلنی های رشد کرده روی محیط ها ی 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 همرنك محيط, شفاف, با يا بدون مركز مشكی
- در SS Agar (*Salmonella Shigella* agar): کلنی بيرنگ, كرم, زرد و شفاف, با يا بدون مركز مشكی
- در BG Agar(Brilliant Green agar): کلنی صورتی

تستهای تاييدی بيوشيميايی *سالمونلا*:

- کشت در ONPG broth

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

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

نتيجه: عدم تجزيه ONPG در *سالمونلا* ها و عدم تغيير رنگ محيط به رنگ زرد

- کشت در TSI (Triple Sugar Iron Agar) :

کشت به صورت عمقی و سطحی

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

نتيجه: رنگ قرمز در سطح و رنگ زرد درعمق (اسيد / آلكالن) با يا بدون رنگ مشكی در بخش تحتانی

- کشت در LIA (Lysine Iron Agar) :

کشت به صورت عمقی و سطحی

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

نتيجه در مورد اغلب *سالمونلا* ها: تمام آگار بنفش رنگ با يا بدون رنگ مشكی در بخش تحتانی (*سالمونلا پاراتايفی* A در عمق زرد رنگ)

- کشت در SIM (Sulfite Indole Motility) :

کشت به صورت عمقی با حداقل حركت سوزن كشت

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

نتیجه: اندول منفي, حركت معمولا مثبت, H_2Sمعمولا مثبت

(*سالمونلا پاراتایفی* A: H_2S منفی)

■ کشت درSimmon Citrate Agar:

کشت به صورت سطحی

گرمخانه گذاری دردمای 37 درجه سلسیوس به مدت 16تا 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 براث یا urea آگار :

انتقال کلنی مشکوك به urea براث یا کشت در urea آگار

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

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

■ کشت در متیل رد براث(MR):

گرمخانه گذاری دردمای 37 درجه سلسیوس به مدت 16تا 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 مشکوك 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 مشکوك در لوله آزمایش حاوی سرم فیزیولوژی
- قرار دادن لوله در بن ماری جوش به مدت 10 دقیقه جهت حذف کپسول
- تکرار آزمون با يك قطره از سوسپانسیون حرارت دیده
- استاندارد ملی ایران سال 1381 شماره 1810

شمارش مخمرهای اسموفیلیک:

بعنوان رقیق کننده توصیه مي شود از بافرفسفات حاوي 40% گلوکز استفاده مي شود.

- انتقال 1 میلی لیتر از رقت مورد نیاز به پلیت خالی استریل
- افزودن 15 تا 20 میلی لیتر آگارعصاره 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 x عکس رقت x عکس حجم =cfu/g

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

- استاندارد ملی ایران سال 1370شماره 3196