وزارة التجارة

قرار مؤرّخ في 21 شعبان عام 1426 الموافق 25 سبتمبر سنة 2005، يجعل منهج البحث عن ليستيريا مونوسيتوجيناس في الحليب ومنتجات الحليب إجباريا.

إن وزير التجارة،

– بمقتضى المرسوم الرئاسي رقم **05-161** المؤرخ في **22** ربيع الأول عام **1426** الموافق أول مايو سنة **2005** والمتضمّن تعيين أعضاء الحكومة،

– وبمقتضى المرسوم التنفيذي رقم **90-39** المؤرخ في **3** رجب عام **1410** الموافق **30** يناير سنة **1990** والمتعلق بمراقبة الجودة وقمع الغش، المعدل والمتمم،

– وبمقتضى المرسوم التنفيذي رقم **02-453** المؤرخ في **17** شوال عام **1423** الموافق **21** ديسمبر سنة **2002** الذي يحدد صلاحيات وزير التجارة،

– وبمقتضى القرار الوزاري المشترك المؤرخ في **29** صفر عام **1414** الموافق **18** غشت سنة **1993** والمتعلق بمواصفات بعض أنواع الحليب المعد للاستهلاك وعرضه،

– وبمقتضى القرار المؤرخ في **14** صفر عام **1415** الموافق **23** يوليو سنة **1994** والمتعلق بالمواصفات الميكروبيولوجية لبعض المواد الغذائية، المعدل والمتمم،

يقرر ما يأتي :

المادة الأولى : تطبيقا لأحكام المادة **19** من المرسوم التنفيذي رقم **90-39** المؤرخ في **3** رجب عام **1410** الموافق **30** يناير سنة **1990**، المعدل و المتمم والمذكور أعلاه، يهدف هذا القرار إلى جعل منهج البحث عن ليستيريا مونوسيتوجيناس في الحليب و منتجات الحليب إجباريا.

المادة 2 : من أجل البحث عن ليستيريا مونوسيتوجيناس في الحليب و منتجات الحليب، فإن مخابر رقابة الجودة و قمع الغش وتلك المعتمدة لهذا الغرض ملزمة باستعمال منهج التحليل الميكروبيولوجي المبين في الملحق.

كما يجب أن يستعمل المخبر هذا المنهج عند الأمر بإجراء خبرة.

المادة 3 : ينشر هذا القرار في الجريدة الرسمية للجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية.

حرر بالجزائر في **21** شعبان عام **1426** الموافق **25** سبتمبرسنة **2005**.

الهاشمي جعبوب

الملحق

منهج البحث عن ليستيريا مونوسيتوجيناس في الحليب و منتجات الحليب

1. التعاريف :

تطبق التعاريف التالية، لمقتضيات هذه الطريقة.

1.1 ليستيريا : (spp) :

هي أعضاء مجهرية دقيقة تشكل مستعمرات نموذجية فوق وسط انتقائي صلب ولها خواص مرفولوجية ، فيزيولوجية و بيوكميائية مبينة عند إجراء التجارب وفق هذا المنهج.

2.1 ليستيريا مونوسيتوجيناس :

هي نوع من ليستيريا المرضة التي يمكن تمييزها عن الأنواع الأخرى كونها تتميز بخصائص بيوكيميائية خاصة..

3.1 البحث عن ليستيريا مونوسيتوجيناس :

يتم تحديد وجود أو غياب هذه الأعضاء المجهرية الدقيقة في كتلة أو حجم معين، عند إجراء التجارب وفقا لهذا المنهج.

2. المبدأ :

على العموم، يتطلب البحث عن ليستيريا مونوسيتوجيناس، أربع مراحل متتالية على الأقل مثلما هو مبين في (**1.2**) إلى (**4.2**) و كما هو موضح أيضا في مخطط طريقة العمل التالي:

شكل 1 : مخطط ممثل لطريقة العمل

الاغتناء الأولي (**25**غ أو **25**ملل في **225**ملل من وسط فرازر عند النصف) التحضين في **30°**م لمدة **18** إلى **24** ساعة

زرع ثانوي ، **0,1** ملل من وسط فرازر في أنبوب سعته **10**ملل والعزل عن طريق الخطوط في هلام أكسفورد أو بالكام.

التحضين في **37°**م لمدة **24** ساعة إلى **48** ساعة

انتقاء من **3** إلى **5** مستعمرات مميزة و العزل عن طريق الخطوط في صفيحة أخرى تحتوي على هلام أكسفورد أو بالكام.

التحضين في **37°**م لمدة **24** ساعة إلى **48** ساعة

التنقية في هلام **(TSYEA)**

التحضين في **37°**م لمدة **24** ساعة
(أو أكثر، إذا اقتضى الأمر)

فحوصات تكميلية

1.2 الاغتناء الأولي في وسط انتقائي سائل :

زرع **25**غ أو **25** ملل من العينة في الوسط الانتقائي فرازر عند النصف و تحضن في **30°**م لمدة **18** إلى **24** ساعة.

2.2 الاغتناء الثانوي و العزل الأولي :

بعد فترة تحضين لوسط (**1.2**)، نجري :

* من جهة، اغتناء ثانوي في أنابيب تحتوي على مرق فرازر بمقدار **0,1**ملل من المحلول المتحصل عليه في(**1.2**) و يحضن في **37°**م لمدة **24** ساعة .

* و من جهة أخرى، يجرى العزل الأولي عن طريق الخطوط على صفيحة تحتوي على هلام أكسفورد أو بالكام . يحضن في **37°**م لمدة **24** إلى **48** ساعة .

3.2 الإثبات :

بعد فترة تحضين الأوساط (**2.2**)، نجري :

* من جهة، اغتناء ثانوي عن طريق الخطوط على صفيحة تحتوي على هلام أكسفورد أو بالكام، انطلاقا من مرق الاغتناء الثانوي. يجرى التحضين لمدة **24** إلى **48** ساعة في **37°** م.

* و من جهة أخرى، بعد قراءة الصفائح التي تحتوي على هلام أكسفورد أو بالكام نقوم بملاحظة المستعمرات المميزة و إعادة زرع ثلاث أو خمس منها في وسط **(TSYEA)** بغرض التنقية. يجري تحضين الصفائح المحتوية على هلام (**TSYEA**) في **37°**م لمدة **24** إلى **48** ساعة.

4.2 التعريف البيوكيميائي :

بعد فترة التحضين ، نجري أولا :

* التعريف بنوع ليستيريا على أساس المظهر المرفولوجي للمستعمرات ، تلوين غرام و على تفاعل الكاطلاس،

* ثم التعريف بجنس ليستيريا مونوسيتوجيناس ، القائم أساسا على هيدروليز الإسكولين ، الحركية في **22 -25°**م ، تفاعلات **Vauges Prauskawer)** و أحمر الميتيل، تحلل الدم أو اختبار كامب **(Camp)** تخمر الغلوكوز بدون غاز ، طريقة التنفس...

3. أوساط الزرع و الكواشف

1.3 أوساط الزرع

1.1.3 مرق الاغتناء الأولي : الوسط الأساسي

التركيب :

بيبتون البروتياز **5,0**غ

تريبتون **5,0**غ

مستخلص لحم البقر **5,0**غ

مستخلص الخميرة.....5,0غ

كلورور االصوديوم.....20,0غ

$Na_2HPO_4 2H_2O$ ..... 12,0 غ

ثنائي-هيدروجينو-أورتو-فوسفات البوتاسيوم.....1,35غ

إسكولين.....1,0غ

كلورور الليثيوم.....3,0غ

ماء..... 1000ملل

التحضير:

تذوب المكونات في الماء ثم تسخن بلطف حتى الذوبان الكامل.

يعدل العامل الهيدروجيني (pH) إلى **7,2.**

يوزع الوسط بعد ذلك بكميات تقدر بـ :

- **225**ملل في كل قارورة تستعمل في الاغتناءات الأولية.
- **10**ملل لكل أنبوب يستعمل في الاغتناءات الثانوية .
- يعقم بعد ذلك الوسط في **121**°م لمدة **15** دقيقة.

2.1.3 المضاف الانتقائي لمرق فرازر :

أثناء استعمال مرق فرازر عند النصف ونفس الشيء بالنسبة لمرق فرازر، يتعين إضافة لكل منهما مضاف صيغته كما يلي :

حمض ناليدكسيك 22,5ملغ

أكريفلافين..... 28,125ملغ

سيترات الحديد (III) الامونيومي..... 1,125ملغ

إعادة تشكيل بصفة معقمة قارورة المضاف بـ **22,5**ملل من الخليط **1/1** ماء / إيثانول معقم (أي **11,25** ملل من ماء مقطر و معقم و **11,25**ملل من الإيثانول) يخلط بلطف للتحلل.

إضافة، بطهارة بعد ذلك :

- **2,25**ملل من المحلول المحضر إلى **225**ملل من مرق فرازر عند النصف.
- **0,10**ملل من المحلول المحضر ، إلى **10**ملل من مرق فرازر.

يخلط جيدا قبل إدخال الإينوكيلوم.

يجب أن يثبت المضاف بعد إعادة تشكيله، في + **4**° م بعيدا عن الضوء و أن لا تتعدى المدة **8** أيام.

3.1.3 وسط العزل (هلام أكسفورد) وسط أساسي:

التركيب :

هلام كولومبيا 39غ

إسكولين 1غ

سيترات الحديد (+3) الأمونيومي 0,5غ

كلورور الليتيوم..... 15غ

ماء..... 1000ملل

التحضير:

تذوب المكونات في الماء ثم تسخن بلطف حتى الذوبان الكامل. ويعدل العامل الهيدروجيني (pH) إلى **7,2** في **25**°م. ويوزع الوسط بعد ذلك بمقدار **225**ملل لكل قارورة ثم يعقم في **121**°م لمدة **15** دقيقة.

4.1.3 المضاف الانتقائي لهلام أكسفورد :

التركيب :

سيكلوهيكسيميد 200مغ

سلفات الكولستين 10مغ

أكريفلافين 2,5مغ

سيفوتيتان..... 1مغ

فوسفوميسين 5مغ

الإيثانول..... 2,5ملل

ماء 2,5ملل

التحضير:

تذوب المكونات الصلبة في خليط الإيتانول / ماء .

يعقم عن طريق الترشيح.

أثناء الاستعمال، يذوب الوسط ثم يبرد تحت درجة حرارة **48**°م ويضاف بعد ذلك **2,25**ملل من المضاف الانتقائي أكسفورد المعاد تشكيله.

نقوم بعملية المجانسة و يصب في علب بيتري معقمة .

يترك ليتجمد فوق البلاط ثم يجفف في جهاز التجفيف.

كما يمكن حفظ العلب المحضرة في +**4**°م لمدة **4** إلى **5** أيام.

5.1.3 وسط العزل (هلام بالكام) وسط أساسي :

التركيب :

بيبتون ..... **23,0** غ
النشاء..... **1,0** غ
أغار –أغار..... **20,0** غ
كلورور الصوديوم..... **5,0** غ
D (–) مانيتول..... **10,0** غ
أمونيوم الحديد (سيترات) ..... **0,5** غ
إسكولين ..... **0,8** غ
غلوكوز..... **0,5** غ
كلورور الليثيوم..... **15,0** غ
أحمر الفينول..... **0,08** غ
ماء..... **1000** ملل

تذوب المكونات في الماء ثم تسخن بلطف إلى غاية الذوبان الكلي .

يعدل العامل الهيدروجيني (pH) إلى **7,2** في **25°م**.

يوزع الوسط بمقدار **225** ملل في كل قارورة ثم يعقم في **121°م** لمدة **15** دقيقة.

التحضير:

عند الاستعمال، يذوب الوسط ثم يبرد تحت درجة حرارة **48°م**.

يضاف بعد ذلك **2,25** ملل من المضاف بالكام المعاد تشكيله .

نقوم بعملية المجانسة ثم يصب في علب بيتري معقمة .

يترك يتجمد فوق البلاط ثم يجفف في جهاز التجفيف.

كما يمكن حفظ العلب المحضرة في **+4°م** لمدة **4** إلى **5** أيام.

6.1.3 وسط الزرع الهلامي: تريبتون الصوجا – مستخلص الخميرة (TSYEA) :

التركيب :

مرق تريبتون الصوجا ..... **30,0** غ
مستخلص الخميرة ..... **6,0** غ
أغار – أغار(1)..... **9** إلى **18,0** غ
ماء ..... **1000** ملل
الهضم الانزيمي للكزيين ..... **17,0** غ
الهضم الانزيمي لفرينة الصوجا ..... **3,0** غ

(1) حسب قدرة التجمد لأغار– أغار.

كلورور الصوديوم ..... **5,0** غ
هيدروجينو الفوسفات – ثنائي البوتاسيوم..... **2,5** غ
غلوكوز..... **2,5** غ

تذوب المكونات في الماء و تسخن بلطف حتى الذوبان الكلي.

يعدل العامل الهيدروجيني (pH) إلى **7,3** في **25°م**.

– يوزع بعد ذلك وسط بمقدار **225** ملل في كل قارورة ثم يعقم في **121°م** لمدة **15** دقيقة.

عند الاستعمال، يذوب الوسط ثم يبرد تحت درجة حرارة **48°م**. ثم يصب في علب بيتري. يترك ليتجمد فوق البلاط ثم يجفف في جهاز التجفيف.

كما يمكن حفظ العلب المحضرة في **+4°م** لمدة **4** إلى **5** أيام.

7.1.3 هلام بالدم :

أساس الهلام بالدم رقم **2** (1) .....**40** غ
ماء ..... **1000** ملل

التركيب :

بيبتون البروتيوز ..... **15** غ
ناتج هضم الكبد ..... **2,5** غ
مستخلص الخميرة..... **5** غ
كلورور الصوديوم..... **5** غ
أغار– أغار (حسب قدرة التجمد للأغار)..... **12** إلى **18** غ

التحضير :

– يذوب أساس الهلام بالدم منزوع الماء في الماء ويسخن حتى الغليان.

– يعدل العامل الهيدروجيني (**pH**) بحيث يكون بعد التعقيم **7,0** في **25°م** إذا اقتضى الأمر.

– يوزع الأساس في قارورات تقدر سعتها القصوى بـ **500** ملل .

– يعقم في جهاز التعقيم **(2.1.1.4)** معدل في **121°م** لمدة **15** دقيقة.

– يبرد الوسط في **45°م**. يضاف الدم منزوع الألياف و يخلط جيدا.

(**1**) تركيبة أساس الهلام بالدم رقم **2** .

– يوزع الوسط بكميات تقدر بـ 20ملل تقريبا في علب بيتري معقمة ويترك ليتصلب.

8.1.3 أساس :

بروتيوز بيبتون 10غ

مستخلص لحم البقر. 1غ

كلورور الصوديوم..... 5غ

أرجواني برومو كريزول 0,02غ

ماء 1000ملل

1.8.1.3 التحضير :

– تذوب المكونات في الماء و تسخن حتى الغليان.

– يعدل العامل الهيدروجيني (pH) بحيث يبلغ بعد التعقيم 6,8 في25°م ، إذا اقتضى الأمر.

– يوزع الوسط داخل أنابيب بكميات بحيث يكون الحجم الباقي يساوي 9ملل.

– يعقم الوسط في جهاز التعقيم (2.1.1.4) معدل في 121°م لمدة 20 دقيقة.

2.8.1.3 محاليل هيدرات الكربون :

التركيب :

هيدرات الكربون (2).....5غ

ماء 100ملل

التحضير :

تذوب كل هيدرات الكربون بشكل منفصل.

3.8.1.3 الوسط الكامل :

يضاف بطهارة لكل هيدرات الكربون 1ملل من محلول (2.8.1.3) إلى 9ملل من الأساس(.1.8.1.3).

إذا تم تحضير أحجام صغيرة للوسط الأساسي، تضاف حينئذ أحجام صغيرة من محلول هيدرات الكربون.

9.1.3 وسط الحركية :

التركيب :

بيبتون الكازيين..... 20,0غ

بيبتون اللحم..... 6,1غ

أغار – أغار 3,5غ

ماء..... 1000ملل

(2) يعتبر 100 ملل من محلول L- رامنوز و 100ملل من محلول D- كزيلوز ضروريا.

التحضير :

– تذوب المكونات في الماء و تسخن حتى الغليان.

– يعدل العامل الهيدروجيني(pH) بحيث يكون بعد التعقيم 7,3 في 25°م، إذا اقتضى الأمر.

يوزع الوسط في أنابيب بكميات تقدر بـ 5ملل تقريبا.

– يعقم الوسط في جهاز التعقيم (2.1.1.4) معدّل في 121°م لمدة 15 دقيقة.

10.1.3 اختبار كامب (كرستي، أتكينس، مانش–بترسن) :

تعتبر العلب المحتوية على الهلام بالدم (7.1.3) ملائمة لهذا الاختبار ولكن من الأفضل استعمال علب بيتري تحتوي على طبقات رقيقة جدا من الهلام بدم الخروف(3.10.1.3) .

1.10.1.3 الأساس :

التركيب :

أساس الهلام بالدم رقم 2 (أنظر 7.1.3).....40غ

ماء 1000ملل

التحضير :

– يذوب الأساس منزوع الماء في الماء و يسخن حتى الغليان.

– يعدل العامل الهيدروجيني(pH) بحيث يكون بعد التعقيم 7,0 في 25°م، إذا اقتضى الأمر.

– يوزع الوسط في أنابيب أو قارورات سعتها 100ملل.

يعقم الوسط داخل جهاز التعقيم (2.1.1.4)معدل في 121°م لمدة 15 دقيقة. يترك ليبرد في 45°م.

2.10.1.3 وسط بالدم :

التركيب :

طبقة الأساس (1.10.1.3) 100ملل

دم منزوع الألياف للحصان أو الخروف 7ملل

التحضير :

يضاف الدم منزوع الألياف إلى الأساس الذائب و المعقم (.1.10.1.3).

3.10.1.3 الوسط الكامل:

– يوزع الأساس (1.8.1.3) داخل علب بيتري معقمة بكميات تقدر بـ 10ملل تقريبا و يترك ليتصلب.

– تسكب طبقة رقيقة جدا من وسط الدم (2.10.1.3) باستعمال كميات لا تتعدى 3ملل لكل علبة.

– يترك ليتصلب على شكل طبقة رقيقة منتظمة.

– إذا أضيف الدم إلى العلب التي تحتوي على الأساس المحضر مسبقا قد يستوجب الأمر تسخين العلب لمدة 20 دقيقة بوضعها داخل مجفف معدل في 37°م قبل سكب طبقة الدم الرقيقة.

– تجفف العلب قبل استعمالها.

4.10.1.3 مزارع تفاعل كامب (CAMP) :

لإنجاز تفاعل كامب، يتطلب سلالة من ستافيلوكوكوس أوروس(على سبيل المثال NCTC 1803) ضعيفة من حيث ß – تحلل الدم و سلالة من رودوكوكس إيكي (على سبيل المثال NCTC 1621) سلالات ستافيلوكوكوس أوروس غير مهيأة كلها لاختبار كامب (CAMP).

– تحفظ مزارع ستافيلوكوكوس أوروس، رودوكوكس أيكي، ليستيريا مونوسيتوجناس، ليستيريا إينوكوا و ليستيريا إيفانوفيي بزرعها مائلة داخل أنابيب بها وسط(6.1.3)(TSYEA)وتحضينها في 37°م لمدة 24 إلى48 ساعة أو إلى غاية حدوث نمو وتحفظ في الثلاجة (10.1.4) في 4°م.

– يعاد زرع هذه المزارع مرة واحدة على الأقل كل شهر.

2.3 الكاشف : محلول بيروكسيد الهيدروجين، 3 % (ح/ح) :

4 – التجهيزات و الأدوات الزجاجية :

تعقم كل الأجهزة التي تتصل مباشرة مع أوساط الزرع، سائل التخفيف أو العينة إلا في حالة ما إذا كانت معقمة مسبقا (خاصة الأجهزة المصنوعة من مادة بلاستيكية).

1.4 الأجهزة :

الوسائل العادية لمخبر ميكروبيولوجي و خاصة مايلي :

1.1.4 أجهزة التعقيم بالحرارة الجافة (فرن) أو بالحرارة الرطبة (جهاز التعقيم)

1.1.1.4 فرن، معدل في 173°م ± 3 .

2.1.1.4 جهاز التعقيم، معدل في 121°م ± 1 .

2.1.4 مجفف، معدل في 30°م ± 1 .

3.1.4 مجفف، معدل في 37°م ± 1 .

4.1.4 مجفف، معدل في 25°م ± 1 .

5.1.4 حمام مائي، معدل في 45°م ± 1 أو في 37°م ± 1 .

6.1.4 تجهيزات لعملية المجانسة

يستعمل أحد الجهازين التاليين :

أ) جهاز التجانس الدوراني، تبلغ عدد الدورات فيه ما بين 8000 دورة/ دقيقة و 45000 دورة /دقيقة ، يحتوي على كؤوس زجاجية أومعدنية مجهزة بأغطية مقاومة لظروف التعقيم؛ أو

ب) جهاز التجانس من النوع بيريستالتيك (stomacher péristaltique) به أكياس معقمة من مادة البلاستيك .

يجب أن يكون للكؤوس أو الأكياس البلاستيكية سعة كافية تسمح بالخلط الجيد للعينة مع الكمية المناسبة للمخفف. وعلى العموم، يجب أن يكون حجم الوعاء يساوي تقريبا ضعف حجم العينة المضاف إليها المخفف.

7.1.4 أسلاك حلقية، من البلاتين المشع أو النيكل كروم أو من مادة بلاستيكية، قطر الحلقة 3 مم تقريبا.

8.1.4 سلك الزرع ، من البلاتين المشع و النيكل– الكروم أو من مادة بلاستيكية.

9.1.4 جهاز قياس العامل الهيدروجيني (pH) مجهز بمقياس الحرارة لقياس العامل الهيدروجيني (pH) للأوساط المحضرة والكواشف بتدقيق ± 0,1 وحدة عامل هيدروجيني في 25°م.

10.1.4 ثلاجة، لحفظ الأوساط المحضرة و الكواشف والتي بإمكانها الاشتغال في درجة حرارية تتراوح بين +2°م إلى +5°م.

11.1.4 طيف ضوئي أبيض

12.1.4 مرآة، مسطحة أو مقعرة.

13.1.4 ثلاثي الأرجل، لإضاءة علب بيتري.

14.1.4 مجهر، متباين الأطوار مجهز بعدسة عينية تغمس في الزيت.

2.4 الأدوات الزجاجية :

يجب أن تكون الأدوات الزجاجية مقاومة لعمليات التعقيم المتكررة.

1.2.4 قارورات الزرع، لتعقيم و حفظ أوساط الزرع و تحضين الأوساط السائلة.

2.2.4 أنابيب الزرع : يبلغ قطرها 16مم و طولها 125مم.

(بإمكان استعمال أنابيب ذات أغطية معدنية).

3.2.4 مخبار مدرج ، لتحضير الأوساط الكاملة.

4.2.4 ماصات مدرجة : سعتها 25 ملل، 10ملل و 1 ملل مدرجة على الترتيب بتدرجات 0,5 ملل، 0,5 ملل و 0,1 ملل.

5.2.4 علب بيتري معقمة.

6.2.4 شرائح زجاجية للمجهر.

7.2.4 كريات زجاجية.

5. المعايرة :

من المهم أن يستلم المخبر عينة ذات تمثيل حقيقي، غير فاسدة و لم تتغير أثناء النقل و التخزين.

يجب اتباع التعليمات الخاصة بالمعايرة لأغراض ميكروبيولوجية.

6. تحضير العينة :

1.6 الحليب :

ترج العينة بعناية للحصول على توزيع منتظم للأعضاء المجهرية الدقيقة و ذلك بقلب بطريقة سريعة الوعاء الذي يحتوي على العينة، 25 مرة. يجب تفادي تشكل الرغوة و إلا تترك لتتوزع في حالة تشكلها. يجب أن لا تتعدى المدة الفاصلة بين الخلط واقتطاع العينة المأخوذة للتجربة الثلاث (3) دقائق.

2.6 الحليب الجاف، مسحوق مصل الحليب، مسحوق مخاض الزبدة، لاكتوز، كازيين، كازينات :

يخلط بعناية محتوى الوعاء المغلق عن طريق رجه و قلبه يدويا وبشكل تكراري.

إذا كان الوعاء مملوءا جدا ، يحول إلى وعاء أكبر منه للسماح بإجراء رج جيد ثم يخلط.

3.6 الزبدة :

تذوب العينة في وعاء معقم داخل حمام مائي (4.1.5) مثبت في 45°م . ترج العينة أثناء الذوبان ثم يخرج الوعاء مباشرة من الحمام المائي عند ذوبان العينة .

4.6 الجبن :

من الممكن أن تكون العينة الموجهة للمخبر متكونة من عجينة وقشرة. يجب أن تكون أجزاء الجبن المكونة للعينة المأخوذة للتجربة محل موافقة بين الأطراف المعنية.

تجرى العملية كما هو مبين في النقطة(5.1.7).

5.6 مثلجات الاستهلاك :

تجرى العملية مثلما هو الحال في الزبدة (3.6) ولكن يستعمل حمام مائي (5.1.4) مثبت في درجة حرارة أقل من 37 °م و يجب أن لا يتعداها.

6.6 الحليب المخمر، ياهورت، القشدة و التحليات :

يخلط محتوى الوعاء مغلق برجه و قلبه بتكرار بطريقة يدوية أو يفتح الوعاء و يخلط المحتوى بطهارة باستعمال ملعقة مخبر أو ملعقة معقمة.

7 - طريقة العمل :

1.7 زرع وسط الاغتناء :

لفحص أكثر من عينة مأخوذة للتجربة تزن 25غ من حصة خاصة من الحليب أو منتوج الحليب وإذا كان من غير الممكن إثبات أن التجميع (تشكيل مشترك لمختلف العينات المأخوذة للتجربة) لا يؤثر على النتيجة بالنسبة للحليب أو منتجات الحليب، فإنه يمكن تجميع العينات مثلا إذا لزم الأمر فحص 10عينات تزن 25غ، يمكن تجميع هذه الوحدات العشر لتشكيل عينة واحدة للتجربة تزن 250غ و تذويبها أو خلطها في 2,25ل من وسط الاغتناء .

تضاف العينة المأخوذة للتجربة إلى وسط الاغتناء (1.1.3) كما هو مبين في (1.1.7) إلى(7.1.7).

1.1.7 الحليب :

تضاف 25ملل من العينة المأخوذة للتجربة إلى 225ملل من وسط الاغتناء (1.1.3) ثم يخلط.

2.1.7 الحليب الجاف، مسحوق مصل الحليب ، مسحوق مخاض الزبدة والكازينات :

وزن بطهارة 25غ من العينة المأخوذة للتجربة وتدخل في قارورة مسدودة تحتوى على 225ملل من وسط الاغتناء(1.1.3) تذوب العينة عن طريق الرج.

3.1.7 الكازيين :

– توزن بطهارة 25غ من العينة المأخوذة للتجربة في وعاء معقم خاص بجهاز المجانسة (6.1.4)ثم يضاف 225ملل من وسط الاغتناء (1.1.3) في45° م .

– تذوب العينة بعناية عن طريق عملية المجانسة (من دقيقة واحدة إلى 3 دقائق).

4.1.7 الزبدة :

ترج العينة المأخوذة للتجربة المذوبة و بواسطة ماصة مسخنة في 45°م، تنقل 25ملل إلى قارورة تحتوي على 225 ملل من وسط الاغتناء (1.1.3) تخلط بعناية.

5.1.7 الجبن :

– توزن **25**غ من العينة المأخوذة للتجربة في وعاء معقم خاص بجهاز المجانسة(**6.1.4**)،

– يضاف **225** ملل من وسط الاغتناء(**1.1.3**) مسخن مسبقا في **37°**م تقريبا. تخلط العينة المأخوذة للتجربة بعناية عن طريق عملية المجانسة.

6.1.7 منتجات الحليب المجمدة (بما فيها مثلجات الاستهلاك) :

تنقل **25** غ من العينة المأخوذة للتجربة المذوبة بواسطة ماصة إلى قارورة تحتوي على **225**ملل من وسط الاغتناء (**1.2**) ثم يخلط .

7.1.7 الحليب المخمر، ياهورت ، القشدة والتحليات:

– توزن بطهارة **25**غ من العينة المأخوذة للتجربة في قارورة مسدودة تحتوي على كريات زجاجية (**7.2.4**) و **225**ملل من وسط الاغتناء (**1.1.3**)،

– يخلط بالرج .

إذا قمنا بفحص عينات ذات عامل هيدروجينيpH منخفض القيمة، نتحقق بطهارة من قيمة العامل الهيدروجيني (**pH**) للمعلق بواسطة ورق كاشف ملون و يعدل إلى **7,0 ± 0,5** في **25°**م، إذا اقتضى الأمر.

2.7 التحضين :

يحضن وسط الاغتناء المزروع لمدة **48** ساعة في المجفف (**2.1.4**) معدل في **30°**م .

3.7 العزل و التعريف المفترض:

1.3.7 انطلاقا من وسط الاغتناء و بواسطة سلك الزرع (**7.1. 4**) يزرع بطريقة الخطوط سطح علبة من هلام أكسفورد (**3.1.3**) و ذلك للحصول على مستعمرات معزولة جيدا .

2.3.7 تقلب العلبة و توضع في المجفف (**3.1.4**) معدل في **37°**م لمدة **48** ساعة .

3.3.7 تفحص العلبة للتحقق من وجود مستعمرات نموذجية لليستيريا (**spp**) (مستعمرات محاطة بحلقة بنية عاتمة و سوداء) .

4.7 التأكد:

1.4.7 انتقاء المستعمرات للتأكد:

انطلاقا من كل علبة بها وسط العزل(هلام أوكسفورد (**3.1.3**) يتم انتقاء خمس (**5**) مستعمرات نموذجية أو مشكوك فيها أو إذا كان هناك أقل من خمس (**5**) مستعمرات، فيتم انتقاؤها كلها من أجل التأكد .

2.4.7 التحضين :

تزرع المستعمرات المنتقاة على سطح العلب (**TSYEA**) (**2.3.7**) بطريقة الخطوط بصورة تسمح للمستعمرات المعزولة جيدا بالنمو. توضع العلب في المجفف(**3.1.4**) معدل في **37°**م لمدة **24** ساعة أو إلى غاية ظهور نمو مرضي.

يعتبر سمك وسط الهلام (**15**ملل / العلبة) مهما لإضاءة جيدة لهنري (أنظر أدناه) .

تفحص العلب بواسطة طيف ضوئي أبيض (**11.1.4**) قوي بما فيه الكفاية لإضاءة جيدة للعلب وموجه بشكل يسمح بإضاءة عمق العلبة من زاوية **45°**م (أنظر الشكل **2**).

عندما نفحص تحت هذا الضوء بالإضاءة المائلة (إضاءة هنري) بالنظر من أعلى العلبة، تكون مستعمرات ليستيريا (**spp**) زرقاء اللون و ذات سطح حبيبي .

إذا كانت علب (**TSYEA**) لا تشتمل على مستعمرات نموذجية كبيرة معزولة جيدا، يتعين إعادة زرع مستعمرة من جديد بطريقة الخطوط وباتباع الطريقة المذكورة سابقا.

3.4.7 تفاعل عن طريق الكاطلاس :

تقتطع مستعمرة نموذجية و توضع على شريحة زجاجية على شكل معلق في قطرة من محلول بيروكسيد الهيدروجين ذو تركيز **3%** **(2.3).**

يعبر عن وجود ليستيريا (**spp**) ذات كاطلاس موجب عن طريق تشكل فقاعات غازية.

4.4.7 المظهر المرفولوجي و مميزات التلوين :

1.4.4.7 يحضر زرع في وسط (**TSYEA**) (**6.1.3**) يمثل مستعمرة نموذجية مستعملة في تفاعل تحلل الدم (**5.4.7**).

تختار مستعمرة نموذجية و توضع على شكل معلق داخل أنبوب يحتوي على وسط (**TSYEA**) يحضن في المجفف (**4.1.4**) معدل في **20°**م و**25°**م إلى غاية ظهور تعكر هام (بين **8** و **24** ساعة).

فحص العلب للكشف عن المستعمرات المشكوك فيها :

ينجز تحضير رطب باستعمال سلك الزرع مملوء بزرع محضن و يفحص بالمجهر (**4.1.4**). تظهر بكتيريا ليستيريا (**spp**) على شكل عصيات قصيرة لديها حركة بطيئة ومستديرة.

بعض المزارع النامية في درجة حرارية أكبر من **25°م** قد لا تتمتع بهذه الحركة. يجب المقارنة دائما مع زرع معروف. لا تعتبر ليستيريا (**spp**) البكتيريا التي لها شكل كروي ، عصيات كبيرة و عصيات والتي تظهر حركة سريعة.

يمكن إجراء اختبار تكميلي لمراقبة الحركة عن طريق زرع وسط الحركة (**9.1.3**) بالوخز بواسطة سلك الزرع (**8.1.4**) مع زرع مقتطع انطلاقا من مستعمرات نموذجية لوسط (**TSYEA**) (**2.4.7**) و تحضن في مجفف (**4.1.4**) معدل في**25°م** لمدة **48** ساعة.

– يفحص النمو في محيط الوخز.

تكون ليستيريا (**spp**) متحركة و يبدو مظهر النمو فيها مشابها للظل.

في حالة النتيجة السلبية، يحضن الوسط المزروع لمدة **5** أيام إضافية و يلاحظ من جديد محيط الوخز.

2.4.4.7 يجرى اختبار لمستعمرة نموذجية على وسط(**TSYEA**) (**2.4.7**) من أجل تفاعل غرام. تكون ليستيريا (**spp**) ، بكتيريا غرام موجب.

5.4.7 تحلل الدم :

– إذا كانت الخصائص المرفولوجية والفيزيولوجية و كذا تفاعل الكاطالاس تدل على وجود ليستيريا (**spp**) تزرع العلب المحتوية على وسط صلب بالدم (**7.1.3**) قصد التعرف على تفاعل تحلل الدم.

– يجفف سطح الهلام جيدا قبل الاستعمال. يسطر قعر الطبقة بخطوط متعامدة لتشكيل تشابك من **20** إلى **25** فضاء لكل علبة .

– تؤخذ مستعمرة نموذجية انطلاقا من علبة وسط (**TSYEA**) و يلقح فضاء كل زرع بواسطة سلك الزرع (**8.1.4**).

– في نفس الوقت، نقوم بوخز مزارع المراقبة الموجبة و السالبة (ليستيريا مونوسيتوجيناس– ليستيريا إيفانوفي وليستيريا إينوكوا).

بعد التحضين في **37°م** لمدة **48** ساعة في المجفف (**3.1.4**) تفحص سلالات الاختبار و مزارع المراقبة.

– تظهر ليستيريا مونو سيتوتوجيناس مناطق فاتحة ضيقة و خفيفة محللة للدم (**a-hémolyse**) أما ليستيريا إينوكوا، فلا يجب أن تظهر مناطق فاتحة حول نقطة الوخز.

ليستيريا إيفانوفي، فهي تظهر عادة مناطق واسعة وواضحة الحدود من محللة للدم.

تحفظ العلب تحت منبع ضوئي قوي لمقارنة مزارع الاختبار مع مزارع المراقبة.

6.4.7 التأكد البيوكيميائي :

لإجراء هذه الاختبارات، يستعمل زرع في وسط (**TSYEA**) (**1.4.4.7**) .

1.6.4.7 استعمال هيدرات الكربون:

– يزرع كل من مرق تخمير هيدرات الكربون (**2.8.1.3**) مع محتوى سلك الزرع أو **0,1** ملل من الزرع (**TSYEA**) (**6.4.7**).

– يحضن في **37°م** في مجفف (**3.1.4**) لمدة **7** أيام.

في حين، يتم التعرف على التفاعلات الموجبة (تكوين الحمض) بظهور لون أصفر الذي يتشكل عموما خلال **24** إلى **48** ساعة.

2.6.4.7 اختبار كامب (CAMP) :

تزرع بطريق الخطوط، مزارع ستافيلوكوكوس أوروس وردوكوكيس إيكي على شكل خطوط بسيطة بطريقة عرضية لعلبة الهلام بالدم (**7.1.3**) أو (**10.1.3**) بحيث تكون المزرعتان متوازيتين و متقابلة القطرين (أنظر الشكل **3**).

من الضروري أن يكون الإينوكلوم رقيقا ومتساويا.

يمكن الحصول عليه باستعمال إبرة للزرع (**8.1.4**) أو سلك للزرع (**7.1.4**) موضوع على شكل زاوية قائمة بالنسبة للهلام.

تزرع سلالة الاختبار بطريق الخطوط المماثلة للزاوية القائمة بالنسبة لهذه المزارع بحيث لا تلامس مزرعة الاختبار مزارع التفاعل و تكون بعيدة عنها بحوالي **1**مم إلى **2** مم في أقرب نقطة بينهما.

يمكن زرع عدة سلالات اختبار عن طريق خطوط على نفس العلبة.

– في نفس الوقت، تزرع بطريقة الخطوط مزارع المراقبة من ليستيريا مونوسيتوجيناس، ليستيريا إينوكوا و ليستيريا إيفانوفي. في حالة استعمال الهلام بالدم (**7.1.3**) تحضن العلب في **37°** م لمدة **18** ساعة إلى **24** ساعة في المجفف(**3.1.4**) إذا تم استعمال علب ذات سلالات مضاعفة، تحضن لمدة **12** ساعة إلى **18** ساعة في **37°**م في المجفف (**3.1.4**).

يعتبر التفاعل موجب، إذا تشكلت منطقة محللة للدم (**hémolyse**) عند التقاء سلالة الاختبار و مزارع ستافيلوكوكوس أوروس.

يعرف التفاعل موجب مع رودوكوكيس إيكي من خلال وجود رأس عريض على شكل سهم (من **5** إلى**10**مم) من تحلل الدم.

يظهر هذا بتشكل منطقة دائرية من تحلل الدم تمتد حوالي **2** مم فقط انطلاقا من سلالة الاختبار و إلى داخل المنطقة ذات التحلل الدموي الضعيف الناجم من نمو بكتيريا ستافيلوكوكوس أوروس.

يمكن ملاحظة تفاعل مماثل داخل سلالة الاختبار مع رودوكوكيس إيكي لكن يعتبر سلبي.

لا تظهر مناطق كبيرة لتحلل الدم حول مزرعة ستافيلوكوكوس أوروس.

5.7 تفسير المميزات المرفولوجية والفيزيولوجية و كذا التفاعل البيوكيميائي (أنظر جدول 1) :

– تظهر جميع أنواع ليستيريا (**spp**) على شكل عصيات غرام موجب (مع مزارع **24** ساعة فقط) والتي تبدي حركة في طور النمو و في الوسط الحركي.

– تكون إيجابية للكاطلاس باستعمال ليستيريا مونوسيتوجيناس سكر الرامنوز و لا تستعمل سكر الكزيلوز.

– بالنسبة ليستيريا مونوسيتوجيناس، ليستيريا إيفانوفي، ليستيريا سليجيري (ذات تفاعل ضعيف) فهي تشكل تحلل الدم عند زرعها في الهلام بالدم.

تنزع المستعمرة لفحص تحلل الدم من تحتها . من بين ثلاثة أنواع من ليستيريا (**spp**) المتصفة بتحليلها للدم، نجد فقط ليستيريا مونوتوجينيس لا يستعمل فيها سكر الكزيلوز لكن سكر الرامنوز.

تبدي ليستريا مونوسيتوجناس و ليستيريا سليجيري (ذات تفاعل ضعيف)، تفاعل موجب لاختبار كامب مع ستافيلوكوكوس أوروس ولكن ليس مع رودوكيكيس إيكي.

تتفاعل ليستيريا إيفانوفي مع رودوكوكيس إيكي لكنها لا تتفاعل مع ستافيلوكوكوس أوروس.
تظهر باقي أنواع ليستيريا (**spp**) تفاعل سلبي لاختبار كامب مع مزرعتي التفاعل.

6.7 التأكد النهائي :

السلالات التي تعتبر ليستيريا (**spp**) (**5.7**) يمكن تأكيدها عن طريق التعرف النهائي.

– لوحظ مع الحليب الطازج أنه أحيانا عند إعادة زرع مرق الاغتناء بعد تحضينه لمدة **24** و**48** ساعة، بأنه قد يمس من حساسية المنهج.

– لوحظ بأن المنهج أقل حساسية بالنسبة لبعض الأجبان ذات قشرة مغسولة و بعض الأجبان المحضرة بالمعدنوس بالمقارنة مع المنتوجات الأخرى (لذلك، تكون حساسية المنهج بالنسبة للجبن ليمبورغر أكثر ضعفا لتراكيز ليستيريا مونوسيتوجيناس التي تكون أقل من **2** لكل غرام تقريبا)

بالنسبة لبعض أنواع الأجبان، يجب أن يمدد التحضين لمرق الاغتناء إلى **7** أيام.

عندما يتم تحضين مرق الاغتناء لمدة **48** ساعة ثم لمدة **7** أيام، يتعين زرع العلب المحتوية على وسط العزل.

– بالإمكان استعمال المنهج للكشف عن ليستيريا مونوسيتوجيناس في العينات المقتطعة في أماكن الإنتاج إلا أنه لم يتم إجراء أي اختبار مشترك لمعرفة وجود هذه البكتيريا في هذه العينات.

7.7 مزارع المراقبة :

من أجل التأكد من أن أوساط الاغتناء و الكشف تسمح بنمو ليستيريا مونوسيتوجيناس، ندخل تخفيفا لزرع مرجعي لسلالات معزولة حديثا في

قارورة مراقبة وسط الاغتناء (أنظر2.7) تضاف من 10 إلى 100 خلية ليستيريا مونوسيتوجيناس لكل قارورة.

يعمل بنفس الطريقة مع قارورات مراقبة أوساط الاغتناء مثلما هو الحال بالنسبة لمزارع التجربة وذلك للبرهنة على أنه تم العثور على زرع المراقبة الموجب .

8- التعبير عن النتائج :

حسب تفسير النتائج التي أجريت ، يشار إلى وجود أو غياب ليستيريا مونوسيتوجيناس في العينة المأخوذة للتجربة، بتحديد الكتلة بالغرام أو الحجم بالميليلتر للعينة التي خضعت للتجربة.

9- تقرير التجربة :

يجب أن يبين تقرير التجربة ، المنهج الذي أجريت من خلاله عملية المعايرة، إذا كان المنهج المستعمل معروفا و كذلك نتيجة التجربة المتحصل عليها و إذا تم التحقق من تكرار العملية و النتيجة النهائية المذكورة المتحصل عليها.

كما يجب أن تدون في التقرير كل تفاصيل العمليات غير المقررة في هذا المنهج أو الاختيارية وكذا أي طارئ محتمل بإمكانه التأثير على نتيجة التجربة.

يجب أن يعطي التقرير كل المعلومات اللازمة للتعريف الكامل للعينة.

جدول 1 : التفاعل لمعرفة ليستيريا (spp)

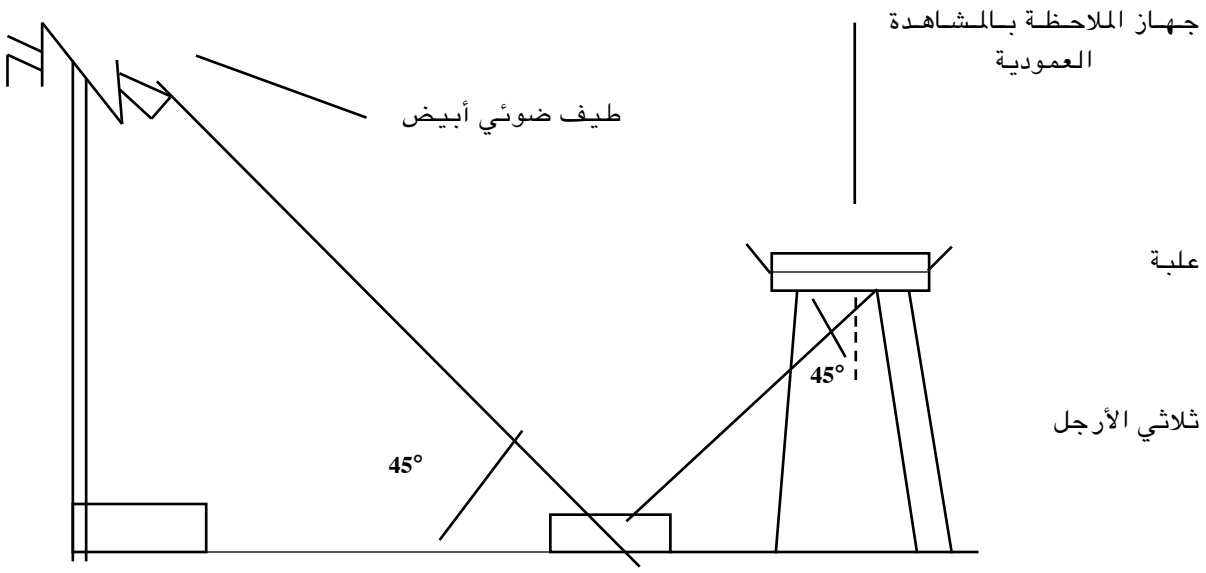
النوع	إنتاج الحمض		اختبار كامب (CAMP)	
	رامنوز	كزيلوز	ستافيلوكوكوس أوروس	رودوكوكيس إيكي
ل. مونوسيتوجيناس	+	–	+	–
ل. إينوكوا	م	–	–	–
ل. إيفانوفي	–	+	–	+
ل. سيليجيري	–	+	(+)	–
ل. ولشيميري	م	+	–	–
ل. قرايي	–	–	–	–
ل. ميرايي	م	–	–	–

م : تفاعل متغير

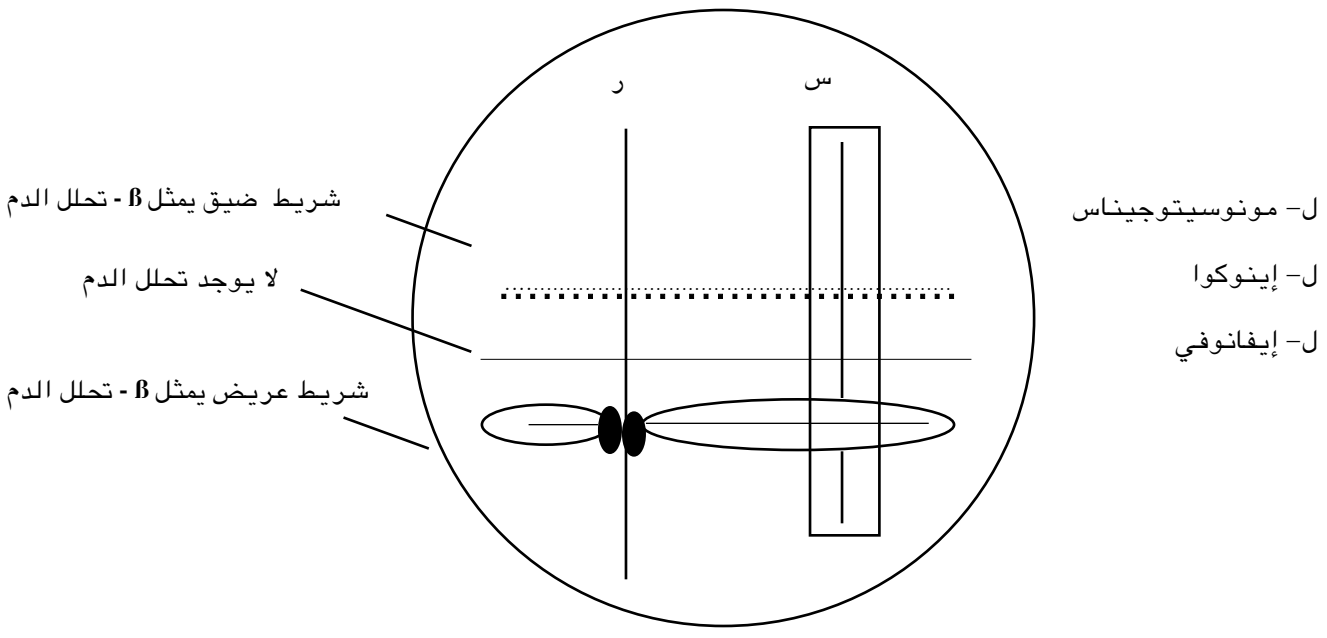
(+) : تفاعل ضعيف

+ : تفاعل إيجابي

– : لا يوجد تفاعل



شكل 2 : فحص العلب للكشف عن المستعمرات المشكوك فيها



شكل 3 : زرع العلب لإجراء اختبار كامب (**CAMP**).

ملاحظات :

1- زرع علب بتري تحتوي على طبقة رقيقة من وسط الهلام بالدم كما هو مبين على المخطط.
تمثل الأسطر العمودية خطوط نمو مستعمرات ستافيلوكوس أوروس.
تمثل الأسطر الأفقية خطوط نمو مستعمرات مزارع التجربة.
تظهر مناطق تحلل الدم المتشكلة على شكل خطوط محيطة بالمستعمرات النامية.

2- يحدد الجزء ذو الخطوط المتقطعة ، منطقة تأثير ستافيلوكوس أوروس.