وزارة التجارة

قرار مؤرخ في 13 ذي الحجة عام 1425 الموافق 23 يناير سنة 2005، يجعل منهج البحث عن السالمونيلا في الحليب ومنتجات الحليب إجباريا.

إن وزير التجارة ،

– بمقتضى المرسوم الرئاسي رقم 04–138 المؤرخ في 6 ربيع الأول عام 1425 الموافق26 أبريل سنة 2004 و المتضمن تعيين أعضاء الحكومة،

– وبمقتضى المرسوم التنفيذي رقم 90–39 المؤرخ في 3 رجب عام 1410 الموافق 30 يناير سنة 1990 و المتعلق بمراقبة الجودة و قمع الغش، المعدّل و المتمم،

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

– و بمقتضى القرار الوزاري المشترك المؤرخ في 29 صفر عام 1414 الموافق 18 غشت سنة 1993 والمتعلق بمواصفات بعض أنواع الحليب المعد للاستهلاك و عرضه،

– و بمقتضى القرار المؤرخ في 14 صفر عام 1415 الموافق 23 يوليو سنة 1994 و المتعلق بالمواصفات الميكروبيولوجية لبعض المواد الغذائية، المعدّل والمتمّم،

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 السالمونيلا في الحليب ومنتجات الحليب إجباريا.

المادة 2 : من أجل البحث عن السالمونيلا في الحليب ومنتجات الحليب، فإن مخابر مراقبة الجودة و قمع الغش والمخابر 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 13 ذي الحجة عام 1425 الموافق 23 يناير سنة 2005.

نور الدين بوكروح

الملحق
منهج البحث عن السالمونيلا
في الحليب و منتجات الحليب

1– تعاريف

ضمن إطار هذه الطريقة تطبق التعاريف التالية:

1.1 السالمونيلا :

عضو مجهري دقيق، يشكل مستعمرات نموذجية فوق أوساط انتقائية، صلبة لها مميزات بيوكميائية ومصلية مبينة عند إجراء التجارب وفق هذه الطريقة.

2.1 البحث عن السالمونيلا :

يتم الكشف عن وجود أو غياب هذه الأعضاء المجهرية الدقيقة في كتلة أو حجم محدد في المنتوج، عند إجراء التجربة وفق هذه الطريقة.

2 - المبدأ :

على العموم ، البحث عن السالمونيلا يتطلب أربعة مراحل متتالية كما هو مبين في 1.2 إلى 4.2 (لاحظ كذلك كيفية العمل المبينة في الملحق)

1.2 الاغتناء المسبق في وسط سائل :

تزرع العينة المأخوذة للتجربة داخل الوسط، ثم تحضن في37°م لمدة 16 إلى 20 ساعة.

2.2 الاغتناء في أوساط سائلة انتقائية :

– يزرع وسط لرباعي التيونات و وسط سيلينيت السيستين مع الزرع المتحصل عليه في (1.2).

– يحضن الوسط لرباعي التيونات في43°م و يحضن وسط السيلينيت السيستين في37°م على مرحلتين من 18 إلى 24 ساعة.

3.2 العزل والتعريف :

انطلاقا من الزرع المتحصل عليه(2.2)، يزرع الوسطين الانتقائيين الصلبين من هلام الأحمر الفينول و الأخضراللامع و هلام السلفيت البسميث.

يحضنان في37°م ثم يختبران بعد 20 إلى24 ساعة وإن اقتضى الأمر، يختبران بعد 40 إلى48 ساعة، من أجل مراقبة وجود مستعمرات، المفترض أنها السالمونيلا بسبب خصائصها.

4.2 الإثبات :

يعاد زرع المستعمرات ، المفترض أنها السالمونيلا (3.2) والتأكد بواسطة اختبارات بيوكيميائية ومصلية مناسبة.

3- أوساط الزرع، الكواشف و الأمصال :

1.3 المكونات الأساسية :

لتحسين نسخ النتائج، ينصح باستعمال، من أجل تحضير أوساط الزرع ، مكونات منزوعة الماء في الأصل أوأوساط كاملة منزوعة الماء.

المواد الكيميائية المستعملة لتحضير أوساط الزرع و الكواشف يجب أن تكون ذات نوعية تحليلية معترف بها.

الماء المستعمل يجب أن يكون ماءا مقطرا أو خال من الأملاح المعدنية ، و خال من المواد التي بإمكانها أن تعيق نمو الأعضاء المجهرية الدقيقة في الظروف التجريبية.

عندما يحدد الهلام ، المقدار المستعمل يجب أن يتغير وفق المعلومات المذكورة لإعطاء أوساط ذات ثبات مناسب.

يجب أن تجرى قياسات العامل الهيدروجيني بواسطة جهاز خاص به يدعى جهاز العامل الهيدروجيني (pH متر). هذه القياسات ترجع إلى درجة 25°م. التعديلات الملائمة تنجز بإضافة ، إما محلول حامض الكلور يدريك لـ 1مول /لتر، و إما محلول هيدروكسيد الصوديوم لـ 1مول/ لتر.

لا تستعمل أوساط الزرع و الكواشف فورا بل يجب أن تحفظ في الظلام ، في درجة حرارة 4 ± 1° م لمدة شهر على الأكثر، في ظروف تمنع كل تغيير في تركيبها إلا في حالة وجود تعليمات مخالفة.

2.3 أوساط الزرع

1.2.3 وسط ذو اغتناء مسبق

ماء بيبتوني مثبت .

التركيب:

بيبتون..... 10,0 غ

كلورور الصوديوم ..... 5,0 غ

هيدروجينو- أورتو- فوسفات، ثنائي الصوديوم

ثنائي عشاري مميه ($Na_2HPO_4,12H_2O$.).....9,0 غ

ثنائي هيدروجينو- اورتو - فوسفات البوتاسيوم..... (KH2PO4).....1,5 غ

الماء 1000ملل

التحضير:

- تذوب المكونات في الماء حتى الغليان.

- يعدل العامل الهيدروجين (PH) بحيث بعد التعقيم يكون7،0 ± 0،1.

- يوزع الوسط بمقادير225 ملل، داخل قارورات سعتها 500 ملل(أو مضاعفات 225ملل داخل قارورات سعتها مناسبة).

- يعقم الوسط لمدة 15 دقيقة في121 ± 1°م

2.2.3 وسط للاغتناء انتقائي: مرق لرباعي التيونات (موليير- كوفمان)

الأخضر اللامع 0,5غ

الماء 100ملل

1.2.2.3 الوسط الأساسي

التركيب :

مستخلص اللحم.....5,0غ

بيبتون..... 10,0 غ

كلورور الصوديوم..... 3,0 غ

كربونات الكالسيوم 45,0غ

الماء..... 1000ملل

التحضير:

- تضاف المكونات الأساسية منزوعة الماء أو الوسط الأساسي الكامل و المنزوع الماء إلى الماء، ليصل إلى الغليان حتى الذوبان الكامل للمكونات المنحلة.

- يعدل العامل الهيدروجيني (PH) بحيث بعد التعقيم يكون7،0 ± 0،1.

- يعقم الوسط الأساسي لمدة 15 دقيقة في 121 ± 1°م

2.2.2.3 محلول تيوسلفات الصوديوم

التركيب :

تيوسلفات الصوديوم خماسي الإماهة

($Na_2S_2o_3$ $5H_2o$).....50,0غ

الماء كمية كافية لـ..... 100ملل

التحضير:

- يذوب تيوسلفات الصوديوم داخل جزء من الماء.

- يكمل إلى الحجم النهائي.

- يعقم المحلول لمدة 15 دقيقة في 121 ± 1°م

3.2.2.3 محلول اليود

التركيب :

اليود 20,0غ

إيودور البوتاسيوم 25,0غ

الماء ، كمية كافية لـ..... 100ملل

التحضير:

– يذوب إيودور البوتاسيوم داخل حجم قليل من الماء، ثم يضاف اليود.

– نرج إلى غاية الذوبان الكامل.

– يكمل إلى الحجم النهائي.

– يحفظ المحلول داخل إناء داكن مغلق بصفة كاملة.

4.2.2.3 محلول الأخضر اللامع

التركيب:

الأخضر اللامع 0,5غ

الماء 100ملل

التحضير:

– يضاف الأخضر اللامع إلى الماء .

–يحفظ المحلول على الأقل يوم واحد في الظلام للحصول على التعقيم الذاتي .

5.2.2.3 محلول مرارة البقرة

التركيب :

مرارة البقرة المجففة..... 10,0غ

الماء..... 100ملل

التحضير :

– تذوب مرارة البقرة المجففة داخل الماء حتى الغليان.

– يعقم المحلول لمدة 15 دقيقة في 121 ± 1°م

6.2.2.3 الوسط الكامل

التركيب:

الوسط الأساسي (1.2.2.3) 900ملل

محلول تيوسلفات الصوديوم (2.2.2.3) 100ملل

محلول اليود(3.2.2.3).....20 ملل

محلول الأخضر اللامع(4.2.2.3).....2 ملل

محلول مرارة البقرة (5.2.2.3).....50ملل

التحضير :

– يضاف بطهارة إلى الوسط الأساسي المكونات الأخرى بالترتيب المعطى أعلاه . نخلط بعناية المحاليل بعد كل إضافة .

– يوزع بطهارة الوسط الكامل بمقادير 100ملل ، داخل قارورات معقمة سعتها 500ملل.

– يحفظ في 0,5°م في الظلام مع استعماله في الأسبوع الموالي للتحضير.

3.2.3 أول وسط للتعريف :

هلام بالأحمر الفينول و الأخضر اللامع (إدال وكامبلماشر)

1.3.2.3 الوسط الأساسي

التركيب :

مستخلص مسحوق اللحم 5,0غ

بيبتون..... 10,0غ

مستخلص مسحوق الخميرة.....3,0غ

هيدروجينو– اورتو– فوسفات ثنائي الصوديوم (Na_2HPO_4) 1,0غ

ثنائي هيدروجينو– اورتو– فوسفات الصوديوم(NaH_2PO_4).....0,6غ

أغار– أغار ..... 12,0 إلى 18,00غ

الماء..... 900 ملل

التحضير:

– تذوب المكونات الأساسية منزوعة الماء أو الوسط الأساسي الكامل المنزوع الماء داخل الماء حتى الغليان.

– يعدل العامل الهيدر وجيني بحيث بعد التعقيم يكون 7،0 ± 0،1.

– يوزع الوسط الأساسي داخل أنابيب أو في قارورات معقمة سعتها القصوى 500 ملل.

2.3.2.3 محلول السكر بأحمر الفينول

التركيب :

لاكتوز.....10,0غ

سكاروز 10,0غ

أحمر الفينول..... 0,09غ

الماء، كمية كافية لـ..... 100ملل

التحضير:

– تذوب المكونات في الماء.

– تسخن داخل الحمام المائي لمدة 20 دقيقة في70°م.

– تبرد في 55°م مع استعمالها مباشرة .

3.3.2.3 الوسط الكامل

التركيب :

الوسط الأساسي (1.3.2.3).....900 ملل

محلول سكر الأحمر الفينول(2.3.2.3).....100ملل

محلول الأخضر اللامع(4.2.2.3).....1ملل

التحضير:

– يضاف بطهارة محلول الأخضر اللامع إلى محلول سكر الأحمر الفينول المبرد في55°م.

– يضاف إلى الوسط الأساسي المذوب و المثبت في50°م إلى 55°م ويخلط.

4.3.2.3 تحضيرالعلب :

– يوزع الوسط الكامل المبرد في45°م، بكميات حوالي15ملل داخل علب بيتري المعقمة قطرها 90 مم ويترك ليتجمد.

– قبل الاستعمال، تجفف و بعناية علب الوسط الهلامي من الأفضل بعد سحب الأغلفة و تقليب العلب داخل محضن أو مجفف معدل في50 ± 5°م لمدة30 دقيقة.

– يجب عدم الاحتفاظ بعلب الوسط الهلامي غير الجافة، أكثر من 4 ساعات في درجة حرارة المخبر أو أكثر من 24 ساعة في 0°م إلى5°م.

4.2.3 ثاني وسط للتعريف : هلام لسلفيت البسميث

التركيب :

بيبتون 10,0غ

مستخلص البقرة 5,0غ

غلوكوز 5,0غ

هيدروجينو- اورتو- فوسفات ثنائي الصوديوم.....4,0غ

سولفات الحديد.....(II).....0,3غ

سيترات البسميث أمونياكال..... 1,85غ

سلفيت الصوديوم 6,15غ

أغار- أغار 20,0غ

الأخضر اللامع..... 0,025غ

الماء 1000ملل

التحضير :

– تذوب المكونات في الماء حتى الغليان لمدة حوالي دقيقة واحدة.

– يعدل العامل الهيدروجيني(PH) إلى 7،7 ± 0،1.

- يبرد بين 45°م و50°م مع الخلط ببطء الراسب المعلق.

– لا يعقم الوسط.

– يوزع الوسط، بكميات 20 ملل داخل علب بيتري معقمة قطرها (90 مم) و يترك ليتجمد.

– مباشرة قبل الاستعمال، تجفف و بعناية علب الوسط الهلامي و من الأفضل بعد أن تسحب الأغلفة وتقلب العلب، داخل محضن أو مجفف معدل في 50 ± 5°م. لمدة30 دقيقة.

– تستعمل العلب الجافة بين 24 و48 ساعة بعد تحضيرها. تحفظ في الظلام.

5.2.3 الهلام المغذي

التركيب :

مستخلص اللحم..... 3,0غ

بيبتون 5,0غ

أغار-أغار 12,0غ

الماء..... 1000ملل

التحضير:

– تذوب المكونات منزوعة الماء للوسط أو الوسط الكامل المنزوع الماء داخل الماء، حتى الغليان.

– يعدل العامل الهدروجيني (PH) بحيث بعد التعقيم يكون7،0 ± 0،1.

– يوزع وسط الزرع داخل أنابيب أو قارورات معقمة سعتها القصوى500 ملل.

– يعقم الوسط لمدة 20 دقيقة في 121± 1°م

تحضير علب الهلام المغذي

تسكب حوالي 15 ملل من الوسط الذائب داخل علب بيتري المعقمة (قطرها 90 مم) و تنجز مثل ما هو مذكور في (4.3.2.3).

6.2.3 الهلام بسترات الحديد و بثلاثة أنواع من السكر(هلامTSI)

التركيب:

مستخلص اللحم.....3,0غ

مستخلص الخميرة..... 3,0غ

بيبتون 20,0غ
كلورور الصوديوم..... 5,0غ
لاكتوز..... 10,0غ
سكاروز 10,0غ
غلوكوز 1,0غ
سيترات الحديد(III) 0,3غ
تيوسلفات الصوديوم..... 0,3غ
أحمر الفينول 0,024غ
أغار- أغار..... 12,0غ
الماء 1000ملل

التحضير:

- تذوب مكونات الوسط منزوعة الماء أو الوسط الكامل المنزوع الماء داخل الماء حتى الغليان.
- يعدل العامل الهيدروجيني (PH) بحيث يكون بعد التعقيم 7،4 ± 0،1.
- يوزع الوسط بمقادير10 ملل داخل أنابيب قطرها بين 17و18مم.
- يعقم الوسط لمدة 10 دقائق في 121 ± 1°م
- يترك للراحة في وضعية مائلة من خلالها نتحصل على راسب عمقه 2,5 سم و بميل مقدر بين 4 و 5 سم.

7.2.3 هلام من أجل البحث على إنزيم اليورياز (كليريستينسان).

1.7.2.3 الوسط الأساسي

التركيب :

بيبتون..... 1,0غ
غلوكوز 1,0غ
كلورور الصوديوم 5,0غ
ثنائي هيدروجينو- اورتو- فوسفات البوتاسيوم (KH_2PO_4).....2,0غ
احمر الفينول 0.012غ
أغار- أغار..... 15,0غ
ماء..... 1000ملل

التحضير:

- تذوب المكونات الأساسية منزوعة الماء أو الوسط الكامل المنزوع الماء في الماء حتى الغليان .
- يعدل العامل الهيدروجيني PH إذا اقتضى الأمر بحيث بعد التعقيم يكون 6،8 ± 0،1.

- يعقم الوسط الأساسي لمدة 15 دقيقة في121 ± 1°م

2.7.2.3 محلول اليوريا :

التركيب :

اليوريا..... 400غ
الماء، كمية كافية لـ 1000ملل

التحضير:

- تذوب اليوريا في الماء.
- يعقم بالترشيح و يراقب التعقيم. (حسب تقنية التعقيم بالترشيح).

3.7.2.3 الوسط الكامل :

التركيب :

الوسط الأساسي (1.7.2.3) ..... 950 ملل
محلول اليوريا (2.7.2.3) 50ملل

التحضير:

- يضاف بطهارة محلول اليوريا إلى الوسط الأساسي المذوب مسبقا، ثم يبرد في 45°م.
- يوزع الوسط الكامل بمقادير10ملل داخل أنابيب معقمة .
- يترك للراحة في وضعية مائلة.

3.2.8 وسط لاختزال الكربون لليزين

التركيب :

أحادي هيدروكلورور- ل- لين 5,0غ
مستخلص الخميرة 3,0غ
غلوكوز 1,0غ
أرجواني بروموكريزول..... 0,015غ
الماء 1000ملل

التحضير:

- تذوب المكونات في الماء حتى الغليان.

يعدل العامل الهيدروجيني(PH) بحيث بعد التعقيم يكون7،0 ± 0،1.

- يوزع الوسط بكميات 5 ملل داخل أنابيب الزرع قطرها حوالي 8 مم و طولها حوالي 160مم
- يعقم الوسط لمدة 10 دقائق في 121 ± 1°م.

3.3 الكواشف :

1.3.3 محلول مالح :

التركيب :

كلورور الصوديوم 8,5غ
الماء 1000ملل

التحضير :

– يذوب كلورور الصوديوم داخل الماء حتى الغليان.

– يعدل العامل الهيدروجيني (pH) بحيث يكون بعد التعقيم 7,0±0,1.

– يوزع المحلول داخل قارورات أو أنابيب، بحيث بعد التعقيم، تكون تحتوي على90 إلى 100ملل من المحلول.

– يعقم المحلول لمدة 15 دقيقة في 121 ± 1°م.

2.3.3 كواشف للبحث علىB – غلاكتوزيداز :

1.2.3.3 التوليان :

2.2.3.3 محلول مثبت :

التركيب :

ثنائي هيدرو– اورتو– فوسفات الصوديوم (NaH_2PO_4).....6,9غ

هيدروكسيد الصوديوم، محلول لحوالي0.1 مول/لتر ..... 3 ملل

الماء، كمية كافية لـ 50ملل

التحضير :

– يذوب ثنائي هيدروجينو – اورتو– فوسفات الصوديوم داخل حوالي 45 ملل من الماء.

– يعدل العامل الهيدروجيني (pH) في 7,0±0,1 بواسطة حوالي 3 ملل من محلول هيدروكسيد الصوديوم.

– يكمل إلى 50 ملل بالماء .

3.2.3.3 محلول اورتو نيتروفينول-B-D- غلكتوبير انوزيد (ONPG)

التركيب :

(ONPG).....0,08غ

الماء 15ملل

التحضير :

– تذوب (ONPG) داخل الماء في 50°م

– يبرد المحلول.

4.2.3.3 الكاشف الكامل :

التركيب :

محلول مثبت (2.2.3.3) .....5 ملل

محلول (ONPG) (3. 2.3.3.) .....15 ملل

التحضير :

يضاف محلول مثبت إلى محلول(ONPG)

3.3.3 كواشف من أجل تفاعل فوجس – بروسكاور (V.P)

(طريقة سريعة لباري و فني)

1.3.3.3 وسط V.P :

التركيب :

بيبتون ..... 7,0 غ

غلوكوز.....5,0غ

هيدروجينو– اورتو– فوسفات ثنائي البوتاسيوم ..... K_2HPO_4.....5,0غ

الماء 1000ملل

التحضير :

– تذوب المكونات داخل الماء.

– يعدل العامل الهيدروجيني(pH) بحيث بعد التعقيم يكون 7,0±0,1.

– توزع 3 ملل من الوسط داخل كل أنبوب.

– يعقم الوسط لمدة 15 دقيقة على الأكثر في121 ±1°م

2.3.3.3 محلول الكرياتين :

التركيب :

كرياتين أحادي الإماهة (ن– اميدينوساركوزين).....0,5غ

الماء 100ملل

التحضير:

يذوب الكرياتين أحادي الإماهة داخل الماء.

3.3.3.3 محلول إيتانوليك نافتول –1

التركيب :

نافتول -1.....6غ

إيتانول (96% (ح/ح) 100ملل

التحضير :

يذوب النافتول -1 داخل الإيتانول.

4.3.3.3 محلول هيدروكسيد البوتاسيوم :

التركيب :

هيدروكسيد البوتاسيوم 40غ

الماء..... 100ملل

التحضير :

يذوب هيدروكسيد البوتاسيوم داخل الماء .

4.3.3 كواشف من أجل تفاعل الإندول :

1.4.3.3 وسط تريبتون- تريبتوفان (ل- جيتوف) :

التركيب :

تريبتون 10غ

كلورور الصوديوم 5غ

د- ل تريبتوفان 1غ

الماء 1000ملل

التحضير :

- تذوب المكونات داخل الماء حتى الغليان، يرشح.

- يعدل العامل الهدروجيني (pH) بحيث بعد التعقيم يكون 7,5±0,1.

- توزع 5 ملل من الوسط في كل أنبوب .

- يعقم الوسط لمدة 15 دقيقة في121 ± 1°م

2.4.3.3 كاشف الكوفاكس :

التركيب :

ثنائي ميتيل لارنينو -4 بنزا الدهيد 5غ

حمض كلوريدريك، 1,18 إلى 1,19غ/ملل 25ملل

مثيل – 2 بوتانول- 2..... 75 ملل

التحضير :

تخلط المكونات.

5.3.3 الهلام المغذي النصف صلب :

التركيب :

مستخلص اللحم 3,0غ

بيبتون 5,0غ

أغار- أغار 4إلى 9غ

الماء..... 1000ملل

التحضير:

- تذوب المكونات الأساسية منزوعة الماء داخل الماء حتى الغليان .

- يعدل العامل الهدروجيني(pH) بحيث بعد التعقيم يكون 7,0±0,1.

- يوزع الوسط داخل قارورات سعتها القصوى 500ملل.

- يعقم الوسط لمدة 15 دقيقة في121 ± 1°م.

تحضير علب الهلام :

- يوزع الوسط الكامل ، حديث التحضير، داخل علب بيتري بكميات 15ملل، يجب أن لا تجفف العلب.

4.3 أمصال :

يمكن أن توجد عدة أمصال ضد السالمونيلا تحتوي على واحد أو عدة مجموعات صنف"0" (تسمى مضادات المصل "0" أحادي الاختصاص أو متعدد الاختصاص) . مضادات المصل VI ومضادات المصل المحتواة على مضادات حيوية لواحد أو عدة عوامل "H" (تسمى مضادات المصل "H " أحادي الاختصاص) تتبع إرشادات الاستعمال لكل مصل.

4 - الأجهزة و الأواني :

التجهيزات العادية للمخبر الميكروبيولوجي، لا سيما :

1.4 الأجهزة :

1.1.4 أجهزة التعقيم بالحرارة الجافة (مثل الفرن أو بواسطة الحرارة الرطبة (جهاز التعقيم) :

يجب أن تكون الأجهزة الملامسة لأوساط الزرع ، المخفف و العينة، معقمة ما عدا المعقمة مسبقا خاصة التي تكون من البلاستيك :

- سواء بالفرن المثبت في درجة حرارة تتراوح بين 170°م و175°م لمدة ساعة على الأقل.

- أو بواسطة جهاز التعقيم المثبت في 121 ±1° لمدة 20 دقيقة على الأقل .

جهاز التعقيم ضروري أيضا لتعقيم أوساط الزرع و كذلك الكواشف. يجب أ ن يكون معدل في 121 ±1°م

2.1.4 جهاز للتجفيف: محضن أو مجفف ، مهوي (يسمح بتجفيف سطح الأوساط الهلامية المسكوبة داخل العلب) ، معدلة في50 ±5°م.

3.1.4 محضن معدل في 37 ± 1°م .

4.1.4 حضن معدل في 43 ± 0.5°م.

5.1.4 حمام مائي معدل في 45 ±1°م وفي37 ±1°م

6.1.4 أجهزة المجانسة :

يجب استعمال إحدى التجهيزات التالية :

أ) جهاز تجانس دوراني ، يعمل بتواتر دوراني يقدر ما بين 8000 و 45000 دورة/ دقيقة بواسطة إناء زجاجي أومعدني, مزود من الأحسن بأغلفة مقاومة لظروف التعقيم.

ب) جهاز تجانس من نوع البيريستالتيكي (péristaltique) مع أكياس بلاستيكية معقمة .

يجب أن تكون سعة الأواني أو الأكياس البلاستيكية، كافية لإجراء الخلط الصحيح للعينة المأخوذة للتجربة مع المخفف. على العموم ، حجم الإناء يجب أن يعادل مرتين حجم العينة و كذا المخفف.

7.1.4 أسلاك الزرع الحلقية : من البلاتين غير مجعدة أو من النيكل- كروم قطرها حوالي 3 مم .

8.1.4 جهاز لقياس العامل الهيدروجيني: (يسمح بقياس العامل الهيدروجيني (PH) للأوساط والكواشف المحضرة) بتدقيق مثبت لـ± 0,1 وحدة (PH) في 25°م.

9.1.4 ثلاجة : تستعمل لحفظ الأوساط والكواشف المحضرة معدلة بين 0°م – 5°م.

2.4 الأواني الزجاجية :

يجب أن تكون الأواني الزجاجية لها قابلية المقاومة ضد التعقيم المتكرر.

1.2.4 قارورات الزرع : من أجل التعقيم و حفظ أوساط الزرع وكذا تحضين الأوساط السائلة .

2.2.4 أنابيب الزرع : قطرها 8 مم و طولها 160مم، من أجل وسط منزوع الكربون لليزين.

3.2.4 قنينة مدرجة : من أجل تحضير الأوساط الكاملة

4.2.4 ماصات مدرجة : سعتها 10,25 و 1ملل، مدرجة بالتسلسل 0,5 و0,1 ملل .

5.2.4 علب بيتري.

5 - المعايرة :

تتم المعايرة وفق شروط مناسبة.

6 - تحضير العينات للتجربة :

1.6 الحليب :

– رج بقوة العينة المأخوذة للتجربة لتحقيق توزيع عادل للأعضاء المجهرية ، بحيث تقلب و بسرعة 25مرة الإناء و بداخله العينة، يجب تجنب تشكل الرغوة أو تترك لتتحلل.

– يجب أن لا تتعدى المدة بين الخلط و اقتطاع العينة المأخوذة للتجربة 3 دقائق.

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

– يخلط بعناية محتوى الوعاء المغلق بالرج اليدوي مع التقليب بطريقة متكررة ، إذا كان الوعاء جد مملوء، وللوصول إلى رج مقبول، يؤخذ وعاء أكبر منه يسمح بالخلط.

3.6 الزبدة :

– تذوّب العينة داخل إناء معقم داخل حمام مائي مثبت في 45° ±1°م (5.1.4).

- يرج عند التذويب ثم يسحب الإناء مباشرة من الحمام المائي عندما تكون العينة كاملة الذوبان

4.6 الجبن :

عادة ما تمثل عينة واحدة (1) للمخبر ، العينة المأخوذة للتجربة مكونة لعينة التجربة.نجري التجربة مثل ما هو مبين في (5.1.7)

5.6 مثلجات للاستهلاك :

نعمل بنفس الإجراءات المعمول بها في حالة الزبدة (3.6) لكن مع استعمال حمام مائي مثبت في 37°م (5.1.4) بحيث أن العينة لا تتجاوز درجة الحرارة هذه .

6.6 الحليب المخمر، الياهورت، القشدة المحلية :

يخلط محتوى الوعاء المغلق ، مع التحريك باليد و قلب الوعاء بطريقة متكررة ، ثم يفتح الوعاء و يخلط المحتوى بطهارة بواسطة ملعقة معقمة.

7 – طريقة العمل :

1.7 العينة المأخوذة للتجربة والاغتناء المسبق :

– ندخل العينة المأخوذة للتجربة داخل الوسط المغتني مسبقا وننجز العملية مثل ما هو مبين في (1.1.7)إلى (7.1.7).

- من أجل اختصار طرق العمل للاغتناء و الاغتناء المسبق، يرجع إلى الجدول1.

1.1.7 الحليب :

الاغتناء المسبق غير ضروري، يرجع إلى(2.7) باستعمال على التوالي 25 ملل من العينة المأخوذة للتجربة و 225 ملل من الوسط المغذي.

2.1.7 الحليب الجاف :

تحضر قارورة مسدودة محتواة على 225 ملل من الماء المقطر معقم و 1ملل من محلول الأخضراللامع (4.2.2.3) توزن بطهارة 25غ من العينة المأخوذة للتجربة و تسكب على سطح السائل الموجود داخل القارورة.

تسد القارورة ، مع عدم الخلط ، يترك للراحة في درجة حرارية عادية لمدة 60 ± 10دقيقة ، هذا قبل التحضين. تعديل العامل الهيدروجيني (PH) غير ضروري .

إذا كان الحليب الجاف لم ينحل بعد 3 ساعات من التحضين ، يخلط محتوى القارورة بالرج .

3.1.7 الحليب الجاف، مخاض زبدة الحليب الجاف:

– يوزن بطهارة، 25غ من العينة المأخوذة للتجربة داخل قارورة مسدودة محتواة على 225 ملل من الماء المقطر المعقم.

– يرج إلى غاية الانحلال و يضاف 1ملل من الأخضر اللامع (4.2.2.3)

4.1.7 لاكتوز :

يوزن بطهارة 25غ من العينة المأخوذة للتجربة داخل قارورة مسدودة محتواة على 225 ملل من الوسط المغتني مسبقا (1.2.3) مع الرج إلى غاية الانحلال.

5.1.7 كازيين الجبن :

– توزن وبصفة نظيفة 25غ من العينة المأخوذة للتجربة داخل وعاء معقم مرفق بجهاز المجانسة ذ و سرعة كبيرة أومن النوع بيريستالتيك (Péristaltique).

(6.1.4) مع إضافة 225 ملل من الوسط المغتني مسبقا (1.2.3) في45°م.

– تخلط إلى غاية أن تكون العينة كاملة التوزيع (من 1 إلى 3 دقائق)

– التأكد من أن درجة حرارة التوزيع لا تتعدى 45°م.

6.1. 7 الزبدة :

ترج العينة المأخوذة للتجربة المذوبة وبواسطة ماصة مع إيصالها إلى درجة حرارية قدرها 45°م، مع إدخال 25 ملل داخل قارورة محتواة على225 ملل من الوسط المغذي مسبقا (1.2.3)مع الخلط.

7.1.7 منتجات الحليب المجمدة

(بما في ذلك مثلجات الاستهلاك):

تدخل بواسطة ماصة 25 ملل من العينة للتجربة و المذوبة داخل قارورة محتواة على 225 ملل من الوسط المغذي مسبقا (1.2.3) مع الخلط.

8.1.7 الحليب المخمر، ياهورت، قشدة محلية :

– توزن بطهارة 25 غرام من العينة للتجربة داخل قارورة مسدودة محتواة على كريات زجاجية و على225 ملل من الوسط المغذي مسبقا (1.2.3) مع الرج من أجل الانحلال.

– يراقب العامل الهيدروجيني (PH) ويعدل إذا اقتضى الأمر إلى7،0 ما لم توجد تعليمات مخالفة لذلك

9.1.7 التحضين :

تحضن القارورات المحضرة وفق (2.1.7)إلى (8.1.7) في37°م لمدة 16- 20 ساعة.

2.7 الاغتناء :

1.2.7 : ننقل بواسطة ماصة 10ملل من الوسط المغذي مسبقا المحضن (1.7) في قارورة محتواة على100ملل من الوسط المغذي الانتقائي برباعي التيونات(2.2.3).

في حالة الحليب، ننقل وبطهارة 25 ملل من العينة المأخوذة للتجربة في 225 ملل من الوسط برباعي تيونات (2.2.3)

2.2.7 : يحضن الوسط بالرباعي التيونات المزروع لمدة 18 إلى 24 ساعة في 43° ± 0.5°م.

3.7 الزرع و التعريف :

1.3.7 : انطلاقا من الزرع للوسط المغذي، يزرع بواسطة سلك الزرع سطح العلبة المعبأة بالهلام المكون من الأخضراللامع و الأحمر الفينول(3.2.3) وعلبة أخرى معبأة بهلام سلفيت البيسميث (4.2.3) بطريقة تسمح بنمو مستعمرات جد منفصلة.

يعاد وضع وسط الاغتناء للتحضين (لاحظ 3.3.7)

2.3.7 : تحضن العلب (مقلوبة) في37 ± 1° م. لمدة 24-20 ساعة.

3.3.7 : بعد تحضين القارورات لمدة 18-24 ساعة تعاد عمليات الزرع و كذلك التحضين المذكورة في (1.3.7و 2.3.7)

4.3.7 بعد التحضين تختبر العلب (2.3.7 و3.3.7) للبحث على وجود مستعمرات مطابقة للسالمونيلا. إذا كان النمو ضعيفا ولا توجد مستعمرات مطابقة للسالمونيلا، تحضن من جديد العلب في 37 ± 1° م.لمدة 18-24 ساعة ويعاد اختبار العلب من أجل البحث عن المستعمرات المطابقة للسالمونيلا.

5.3.7 : المستعمرات المطابقة للسالمونيلا يمكن أن تتميز على النحو الآتي :

– تكون المستعمرات المطابقة للسالمونيلا على الهلام بالأخضر اللامع /أحمر الفينول (3.2.3) وردية محاطة بالأحمر.

– تكون المستعمرات المطابقة للسالمونيلا على الهلام بالسلفيت البسيميث (4.2.3) بنية أو سوداء مع بريق معدني، بعض السلالات تعطى مستعمرات خضراء.

جدول 1- الموجز لطرق العمل

للاغتناء المسبق والاغتناء

المادة	كمية العينة	الوسط المغذي مسبقا *	طريقة التحضير	الوسط المغذي
الحليب	50 ملل 2 x 25 ملل	لايوجد	تخلط	225 ملل من رباعي التيونات
حليب جاف	25غ	ماء مقطر + محلول الأخضر اللامع	يبلل لمدة 60 ± 10 دقائق لا يخلط**	100 ملل من رباعي التيونات
مصل الحليب الجاف مخاض زبدة جافة	25غ	ماء مقطر + محلول الأخضر اللامع	تخلط	100 ملل من رباعي التيونات
لاكتوز	25غ	225 ملل ماء بيتوني مثبت	يخلط	100 ملل من رباعي التيونات
كازيين، الجبن	25غ	225 ملل ماء بيتوني مثبت	يخلط في 45°م على الأكثر	100 ملل من رباعي التيونات
الزبدة	25غ	225 ملل ماء بيتوني مثبت	يخلط	100 ملل من رباعي التيونات
منتوجات حليبية مجمدة	25ملل	225 ملل ماء بيتوني مثبت	يخلط	100 ملل من رباعي التيونات
حليب مخمر ياهورت قشدة محلية	25غ	225 ملل ماء بيتوني مثبت	يخلط	100 ملل من رباعي التيونات

* إذا كان الوسط المغذي مسبقا قد أستعمل بعد التحضين لمدة 20 ساعة في37°م، نعيد زرع 10ملل من العينة المحضنة و تخلط مع الوسط المغذي مسبقا داخل الوسط المغذي .

** إذا لم يذوب الحليب الجاف بعد 3 ساعات من التحضين، يخلط محتوى القارورات عن طريق الرج.

4.7 الإثبات :

1.4.7 اختيار المستعمرات من أجل الإثبات :

انطلاقا من كل علبة لكل الأوساط الاختيارية (5.3.7)، تقتطع 5 مستعمرات نموذجية أو مشبوهة أو لو وجدت أقل من5 مستعمرات نموذجية أو مشبوهة. تقتطع كلها للإثبات.

2.4.7 التحضين :

تزرع المستعمرات المختارة على سطح علب الهلام المغذي (5.2.3) بطريقة تسمح بنمو المستعمرات جد منفصلة و تحضن العلب في37 ± 1°م لمدة 18-24 ساعة.

بعد التحضين، يحتفظ بالمستعمرات النقية الجد منفصلة من أجل الإثبات البيوكميائي و المصلي.

3.4.7 الإثبات الببوكيميائي :

بواسطة خيط للزرع، تزرع الأوساط الآتية بواسطة المستعمرات الخالصة.

1.3.4.7 هلام بسترات الحديد و بثلات أنواع من السكر(TSI) (6.2.3) :

يزرع ميل الهلام بطريقة الخطوط ويزرع في القعر بالوخز.

يحضن لمدة 24 ساعة في37 ± 1°م.

تفسر تغييرات الوسط بالطريقة الآتية :

القعر :

لون أصفر.....غلوكوز إيجابي(تخمر الغلوكوز)

لون أحمر أو عدم تبدله .....غلوكوز سلبي(عدم تخمر الغلوكوز)

اللون الأسود.....تشكيل كبريت الهيدروجين.

فقاعات أو تشققات..... تكوين غازات انطلاقا من الغلوكوز

الميل :

لون أصفر.....لاكتوز و/أو سكاروز موجب (تخمر اللاكتوز و/ أو السكاروز).

لون أحمر أو عدم تبدله ..... لاكتوز و سكاروزسالب (عدم تخمر اللاكتوز ولاالسكاروز).

2.3.4.7 هلام للبحث عن إنزيم اليوريا (7.2.3) :

يزرع بطريقة الخطوط ميل الهلام. يحضن لمدة 24 ساعة في37 ± 1°م. عندما يكون التفاعل موجبا، ينتج إنزيم اليوريا تسرب الأمونياك و يعمل على تحويل الأحمر الفينول إلى اللون الوردي ثم إلى اللون الأحمر العاتم.

3.3.4.7 وسط اختزال كربون الليزين (8.2.3) :

– يزرع الوسط مباشرة تحت سطح السائل.

– يحضن لمدة 24ساعة في 37 ± 1°م.

لون بنفسجي بعد التحضين يدل على تفاعل موجب.

لون أصفر يدل على تفاعل سلبي.

4.3.4.7 كاشف للبحث على B - غلاكتوزيداز (2.3.3) :

- يوضع على شكل معلق قبضة من المستعمرة المشبوهة داخل أنبوب يحتوي على 0.25 ملل من المحلول الملحي (1.3.3).

– ثم تضاف قطرة من التوليان، ثم يرج الأنبوب.

– يوضع الأنبوب داخل حمام مائي في37 ± 1°م. لعدة دقائق.

– يضاف 0,25 ملل من الكاشف للبحث عن

B - غلاكتوزيداز ، ثم يخلط.

– يعاد وضع الأنبوب داخل الحمام المائي في37 ± 1°م. لمدة 24 ساعة .

– لون أصفر يدل على تفاعل موجب.

– التفاعل عادة مرئي في حدود20 دقيقة.

5.3.4.7 وسط لتفاعل فوكس بروسكاور (V.P) (3.3.3) :

– يزرع أنبوبان بواسطة معلق لقبضة من المستعمرة المشبوهة داخل 0.2 ملل من وسط(V.P) (1.3.3.3) داخل كل أنبوب.

– يحضن أنبوب في درجة حرارة عادية والآخر في37 ± 1°م. لمدة24 ساعة.

– بعد التحضين يضاف إلى كل أنبوب قطرتين من محلول الكرياتين (2.3.3.3)، 3 قطرات من محلول إيتانوليك النافتول– 1 (3.3.3.3) ، ثم قطرتان من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم (4.3.3.3)، يخلط الأنبوبان بعد إضافة كل كاشف .

تغير اللون الوردي إلى اللون الأحمر الفاتح خلال 15 دقائق يدل على تفاعل موجب.

6.3.4.7 وسط من أجل تفاعل الأندول (4.3.3) :

- يزرع بواسطة جزء من المستعمرة أنبوب يحتوي على 5 ملل من وسط تريبتون- تريبتوفان (1.4.3.3)

– يحضن لمدة24 ساعة في37 ± 1°م.

– بعد التحضين ، تضاف قطرتين أو ثلاث قطرات من كاشف الكوفاكس (2.4.3.3).

و تشكل حلقة حمراء تدل على تفاعل موجب.

وتشكل حلقة صفراء بنية تدل على تفاعل سالب.

الجدول 2 تفسير النتائج

تجارب الإثبات	تفاعل موجب أو سالب	النسبة المئوية لسلالة السالمونيلا الممثلة للتفاعل
غلوكوز TSI (تكوين حمض) (1.3.4.7)	+	100
غلوكوز TSI(تشكل غاز) (1.3.4.7)	+	91,9
لاكتوز TSI (1.3.4.7)	(1)-	99,2
سكاروز TSI (1.3.4.7)	-	99,5
كبريتات الهيدروجين TSI (2.3.4.7)	+	91,6
تفكيك اليوريا (2.3.4.7)	-	100
اختزال كربون الليزين (3.3.4.7)	+	94,6
تفاعل B -غلاكتوزيداز (4.3.4.7)	(2)-	98,5
تفاعل فوكس بروسكاور (VP) (5.3.4.7)	-	100
تفاعل الاندول (6.3.4.7)	-	98,9

تفسير التجارب البيوكيميائية :

تفسير النتائج وفق الجدول2 :

الجدول 2 تفسيرالنتائج (أنظر جدول2)

(1) السالمونيلا متفرعة من النوع الثالث (أريزونا) تعطي تفاعل موجب أو سالب باللاكتوز ولكن دائما تفاعل موجب لـ B – غلاكتوزيداز .

(2) لسالمونيلا من النوع الثاني ، تعطي تفاعل سلبي للاكتوز، و لكنها يمكن أن تعطي تفاعل موجب لـ B– غلاكتوزيداز.

4.4.7 منهج التشخيص السريع :

إن مناهج التشخيص السريع أنظر إلى التنبيه في (1.3) يمكن أن تستعمل في مكان العمليات المبينة في (3.4.7) من أجل الإثبات البيوكيميائي للمستعمرات النموذجية أو المشكوك فيها .

في هذه الحالة، فإن تعليمات الاستعمال يجب أن تتبع بدقة .

5.4.7 الإثبات المصلي :

يجرى الكشف عن وجود مولدات الضد O، H،Vi للسالمونيلا بواسطة تخثر على سطح صفيحة بواسطة أمصال مناسبة ، فوق مستعمرات نقية (1.4.7) بعد التخلص من السلالات ذات التخثر الذاتي.

1.5.4.7 التخلص من السلالات ذات التخثر الذاتي:

– توضع على سطح صفيحة جد نظيفة قطرة من محلول مالح (1.3.3).

– يوزع داخل هذه القطرة جزء من المستعمرة (2.4.7) لمحاولة الحصول على معلق متجانس ومعكر .

– تخضع الصفيحة إلى تذبذب لمدة 30 إلى 60 ثانية.

– ملاحظة النتائج على قعر أسود و من المستحسن بواسطة عدسة مكبرة .

– تعتبر السلالات ذاتية التخثر إذا تجلطت الجراثيم إلى أكداس على الأقل متشابهة. يعتبر الإثبات المصلي لهذه السلالات ذاتية التخثر مستحيل من خلال طريقة العمل المبينة في (2.5.4.7)،(3.5.4.7) و(4.5.4.7).

2.5.4.7 إظهار لمولد الضدO :

- تستعمل سلالات خالصة (2.4.7) غير ذاتية التخثر (1.5.4.7).

– تجرى العملية كما هو مبين في (1.5.4.7) لكن باستعمال قطرة من المضاد المصلي O. (4.3) عوض المحلول المملح .

– تستعمل الأمصال أحادية أو متعددة الخدمات الواحدة تلوى الأخرى .

3.5.4.7 إظهار لمولد الضد Vi :

تنجز العملية كما هو مذكور في (2.5.4.7) لكن باستعمال قطرة من المضاد المصلي Vi (4.3) عوض المحلول المملح .

4.5.4.7 إظهار لمولد الضد H :

– يزرع الهلام المغذي النصف صلب (5.3.3)بواسطة سلالة خالصة غير ذاتية التخثر (1.5.4.7)

– يحضن الوسط لمدة 18 إلى 24 ساعة في 37 ± 1°م

يُستعمل هذا الزرع لاختبار مولد الضد H كما هو مذكور في (2.5.4.7)، باستعمال قطرة من المضاد المصلي H (4.3) عوض المحلول المملح .

5.5.4.7 تفسير التفاعلات المصلية :

إذا وجد تخثر ، اعتبرت التفاعلات إيجابية .

6.4.7 تفسير التفاعلات البيوكيميائية والمصلية

1.6.4.7 تعتبر السلالات سالمونيلا إذا قدمت تفاعلات بيوكيميائية نموذجية (3.4.7) وتعطي تفاعلات مصلية موجبة كما هو مبين في (5.4.7).

2.6.4.7 السلالات التي تظهر تفاعلات بيوكيميائية نموذجية (3.4.7) ولكن لا تعطي تفاعلات مصلية موجبة وفق (5.4.7.)، السلالات التي لا تقدم تفاعلات بيوكيميائية نموذجية (3.4.7) و لكن تعطي تفاعلات مصلية موجبة وفق (5.4.7.). و السلالات ذاتية التخثر و التي تظهرتفاعلات بيوكيميائية نموذجية (3.4.7)يمكن أن تكون سالمونيلا .

3.6.4.7 إذا لم تظهر السلالات تفاعلات بيوكيميائية نموذجية (3.4.7) ولا تعطي تفاعلات مصلية موجبة وفق (5.4.7.) لا تعتبر سالمونيلا.

7.4.7 الاثبات النهائي

بالنسبة للسلالات التي تعتبر سالمونيلا(1.6.4.7) أو التي يمكن اعتبارها كذلك (2.6.4.7) يجب اجراء تعريف للسالمونيلا من أجل إثبات التبيان النهائي من التفاعل المصلي .

8 – زرع المراقبة

من أجل التحقق من قدرة الأوساط الاغتناء والتأكد من تحمل نمو السالمونيلا، يجب استعمال سلالة مرجعية لسالمونيلا حديثة العزل من أجل مراقبة أوساط الاغتناء (لاحظ 2.7)

يجب أن تتبع عمليات المراقبة، تلك الخاصة بالزرع و أجهزة التجريب، ليظهر لنا زرع المراقبة إيجابي.

9. تفسير النتائج

وفق نتائج التفسير، يصرح بوجود أو غياب السالمونيلا في العينة المأخوذة للتجربة، مع تحديد الكتلة بالغرام أو الحجم بالميليلتر، من المنتوج المجرب.