



GONABAD
Food And Drug Administration

جستجو و شمارش انتروباکتریاسه

"کار در آزمایشگاه"

عباسی

کارشناس آزمایشگاه میکروبیولوژی

Workshop on detection and Counting of Enterobacteriaceae "Work in the laboratory"



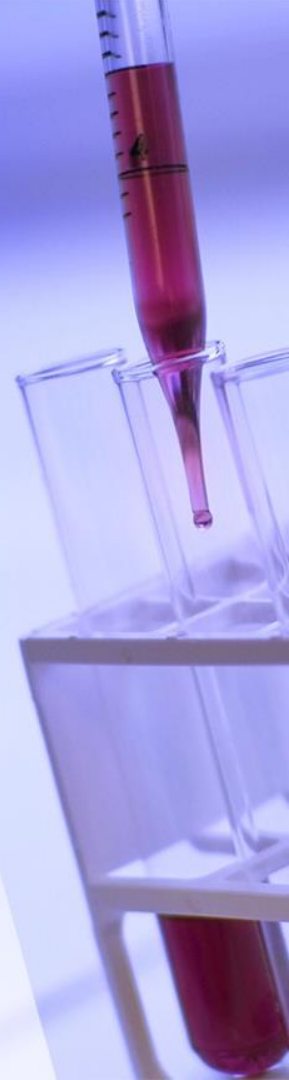
خانواده انتروباکتریاسه

- حدود ۲۰ جنس در این خانواده قرار می گیرند که از این بین می توان به جنس های مهم اشاره کرد:

Escherichia
Salmonella
Citrobacter

Enterobacter
Proteus
Yersinia

Shigella
Klebsiella
Erwinia



برخی از ویژگی های خانواده انتروباکتریاسه

میله ای گرم منفی هستند.

بی هوازی اختیاری بوده و قادر به تنفس هم از طریق اکسیداسیون و هم از طریق تخمیر هستند.

هیچ یک از آنها در برابر حرارت (دمای پاستوریزاسیون) مقاوم نیستند.

اسپور (هاگ) تولید نمی کنند.



خانواده انتروباکتریاسه

- گروهی از باکتریهای این خانواده تحت عنوان کلی فرم (Coliform) نامیده می شوند.

جنس های مهم

- E.Coli
- Klebsiella
- Citrobacter
- Enterobacter

اپتیموم دمای رشد

- ۳۲-۳۷ درجه سلسیوس
- در مدت ۲۴-۴۸ ساعت

ویژگی ها

- گرم منفی
- اکسیداز منفی
- میله ای
- فاقد اسپور
- بی هوازی اختیاری



روشهای شناسایی و شمارش انتروباکتریاسه

۱. شمارش استاندارد صفحه ای (Standard plate count) استاندارد ۲-۲۴۶۱

که به دو شکل زیر انجام می شود:

شمارش با روش کشت آمیخته دو مرحله ای (Pour plate)

*دقت داشته باشید که در روش بالا ضریب گزارش تعداد کلنی با روش شمارش صفحه ای سطحی متفاوت است.



روشهای شناسایی و شمارش انتروباکتریاسه

۰۲. شمارش بیشترین تعداد احتمالی (MPN) استاندارد ۱-۲۴۶۱

➤ اساس روش MPN براساس یافته های آماری می باشد.

➤ این روش خصوصا در مورد آن گروه مواد غذایی بکار می رود که احتمال وجود تعداد کمی میکروارگانیزم (کمتر از ۱۰ عدد در هر گرم) در آنها تخمین زده می شود.

➤ این روش در مورد مواد غذایی مایع دقت بیشتری دارد.



روشهای شناسایی و شمارش انتروباکتریاسه

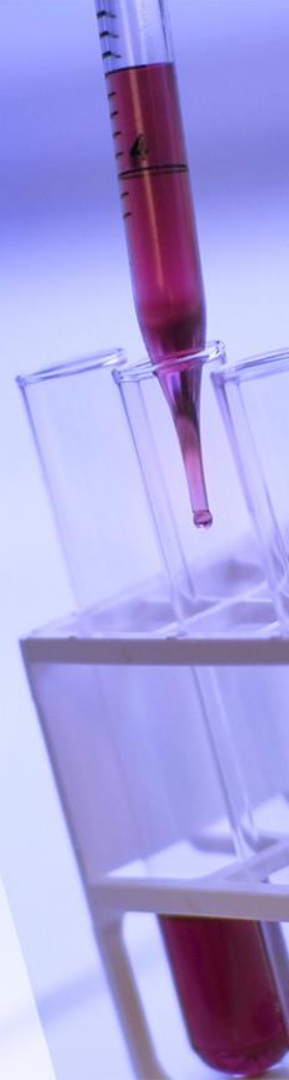
شمارش بیشترین تعداد احتمالی (MPN) استاندارد ۱-۲۴۶۱

✓ این روش به دو صورت ۳ سری ۳ لوله ای و ۳ سری ۵ لوله ای انجام می شود.

✓ تفسیر نتایج این روش با جداول MPN می باشد.

جدول الف - ۱ - MPN برای ۱×۳ گرم (میلی لیتر)، ۰/۱×۳ گرم (میلی لیتر) و ۰/۰۱×۳ گرم (میلی لیتر)

تعداد نتایج مثبت			MPN	رده مورد قبول هنگامی که تعداد آزمون برابر باشد با ^۱					حدود اطمینان			
				۱	۲	۳	۵	۱۰	۹۵٪		۹۹٪	
									حد پایین	حد بالا	حد پایین	حد بالا
۰	۰	۰	<۰/۳۰						۰/۰۰	۰/۹۴	۰/۰۰	۱/۴۰
۰	۰	۰	۰/۳۰	۳	۲	۲	۲	۱	۰/۰۱	۰/۹۵	۰/۰۰	۱/۴۰
۰	۱	۰	۰/۳۰	۲	۱	۱	۱	۱	۰/۰۱	۱/۰۰	۰/۰۰	۱/۶۰
۰	۱	۱	۰/۶۱	۰	۳	۳	۳	۳	۰/۱۲	۱/۷۰	۰/۰۵	۲/۵۰
۰	۲	۰	۰/۶۲	۳	۲	۲	۲	۱	۰/۱۲	۱/۷۰	۰/۰۵	۲/۵۰
۰	۳	۰	۰/۹۴	۰	۰	۰	۰	۳	۰/۳۵	۳/۵۰	۰/۱۸	۴/۶۰



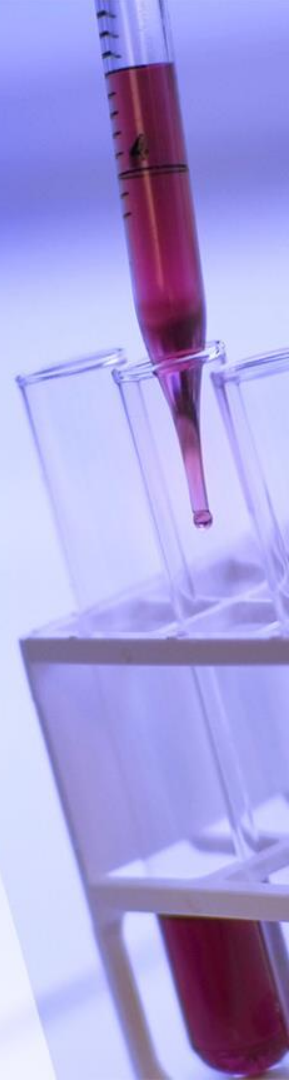
روشهای شناسایی و شمارش انتروباکتریاسه

* در هنگام استفاده از جداول MPN به ضرایب جدول دقت کنید.

جدول الف - ۱. MPN برای 1×10^3 گرم (میلی لیتر)، 10×10^3 گرم (میلی لیتر)، 100×10^3 گرم (میلی لیتر)

تعداد نتایج مثبت	MPN	رده مورد قبول هنگامی که تعداد آزمون برابر باشد با	حدود اطمینان	
			۹۵٪	۹۹٪

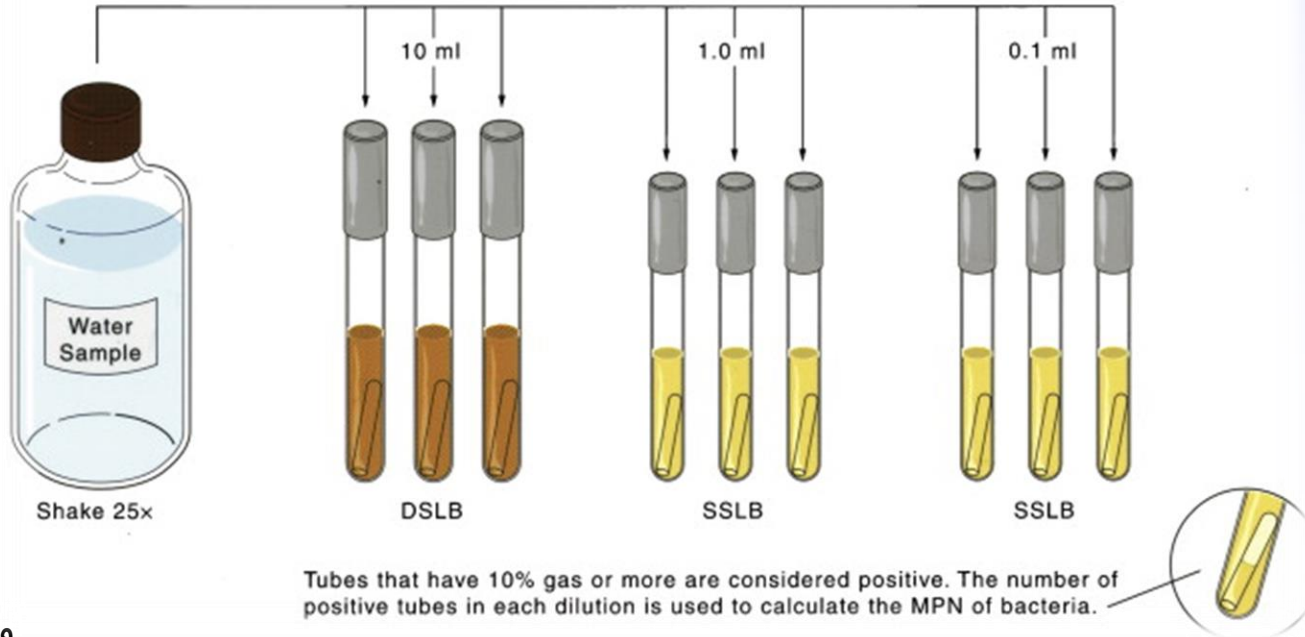
NUMBER OF TUBES GIVING POSITIVE REACTION OUT OF			MPN INDEX per 100 ml	95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS	
3 of 10 ml each	3 of 1 ml each	3 of 0.1 ml each		LOWER	UPPER



روشهای شناسایی و شمارش انتروباکتریاسه

شماتیک روش MPN

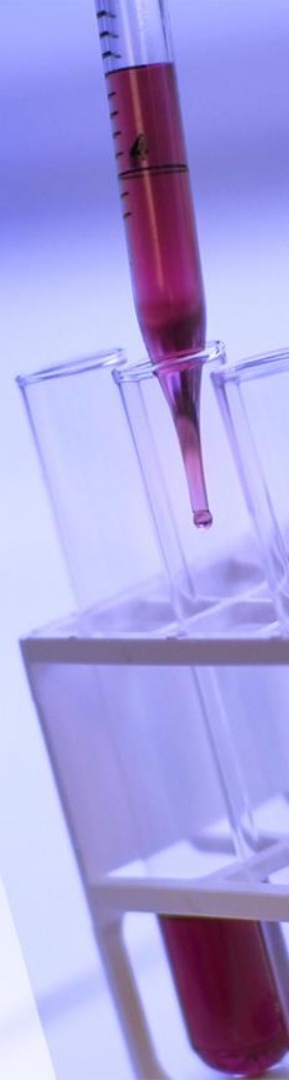
Transfer the specified volumes of sample to each tube.
Incubate 24 h at 35°C.



روشهای شناسایی و شمارش انتروباکتریاسه

۳. شناسایی انتروباکتریاسه در مواد غذایی استاندارد ۱-۲۴۶۱

- این روش غالباً با استفاده از محیط کشت مایع انجام می شود.
- در مواد غذایی مایع مستقیماً نمونه و در مواد غذایی جامد اولین رقت مورد آزمون قرار میگیرد.
- بسته به نوع آزمون از محیط کشت با غلظت ساده و مضاعف می توان استفاده کرد.
- در جستجوی باکتریها اولین قدم غنی سازی می باشد.



روشهای شناسایی و شمارش انتروباکتریاسه

اصول روشهای جستجو و شناسایی میکروارگانیزم ها در مواد غذایی

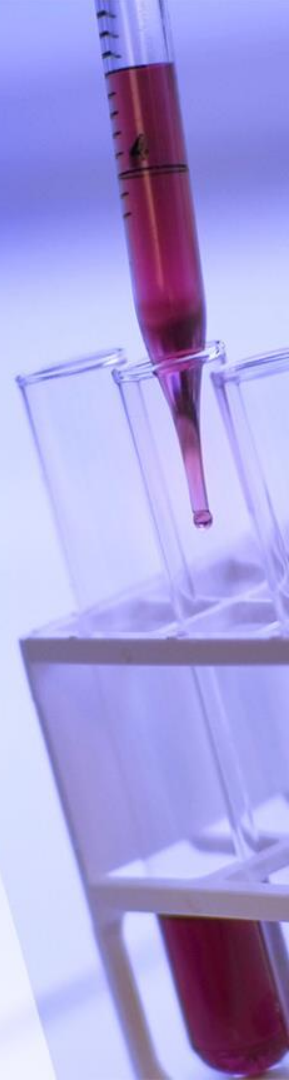
✓ غنی سازی (Enrichment) یا غنی سازی غیر انتخابی

(Non Selective Enrichment) یا پیش غنی سازی (Pre Enrichment)

✓ غنی سازی انتخابی (Selective Enrichment)

✓ کشت بر روی محیط کشت جامد انتخابی (Selective Plating)

✓ انجام آزمون های تاییدی بیوشیمیایی و سرولوژیکی



استانداردهای ملی ایران برای شناسایی و شمارش انتروباکتریاسه

1. استاندارد ۱۳۹۶-۱-۲۴۶۱

عنوان: جستجو، شناسایی و شمارش انتروباکتریاسه- قسمت ۱: جستجوی انتروباکتریاسه

✓ روش شمارش MPN

✓ جستجو شناسایی انتروباکتریاسه

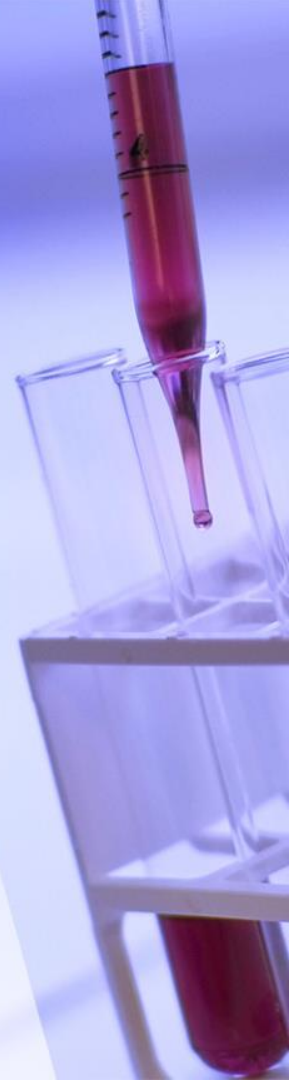
با استفاده از این استاندارد انجام می شود.

2. استاندارد ۱۳۹۶-۲-۲۴۶۱

عنوان: روش جامع برای جستجو، شناسایی و شمارش انتروباکتریاسه- قسمت ۲: روش شمارش کلنی

✓ شمارش کلنی با روش Pour Plate

با استفاده از این استاندارد انجام می شود.



محیط کشت های مورد نیاز

تهیه محیط های کشت براساس دستورالعمل تهیه آن مندرج در روی بطری محیط کشت می باشد.

رقیق کننده

- رینگر
- پتون نمکی MRD

محیط کشت غنی کننده

- پتون واتر بافری



محیط کشت های مورد نیاز

محیط کشت جامد انتخابی

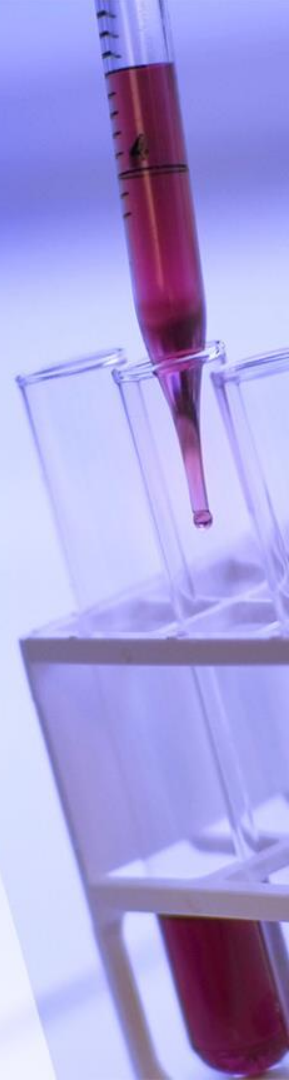
- محیط کشت (Violet Red Bile Dextrose Agar) VRBD

محیط کشت تاییدی

- محیط کشت گلوکز OF

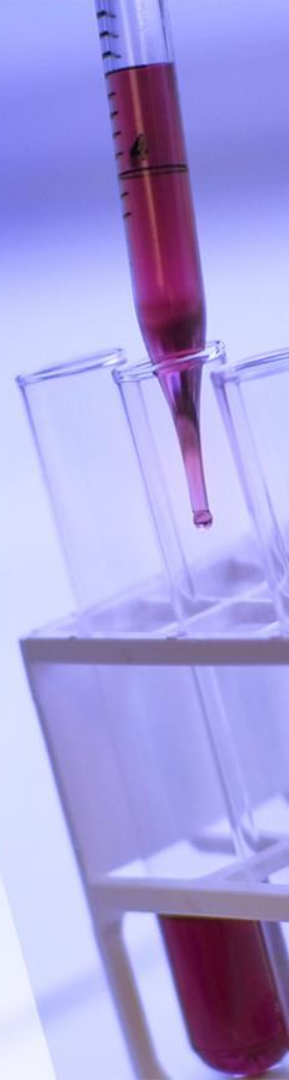
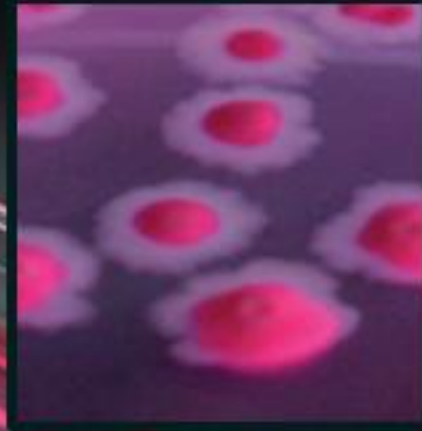
تست اکسیداز

- معرف اکسیداز



تصاویر محیط VRBD

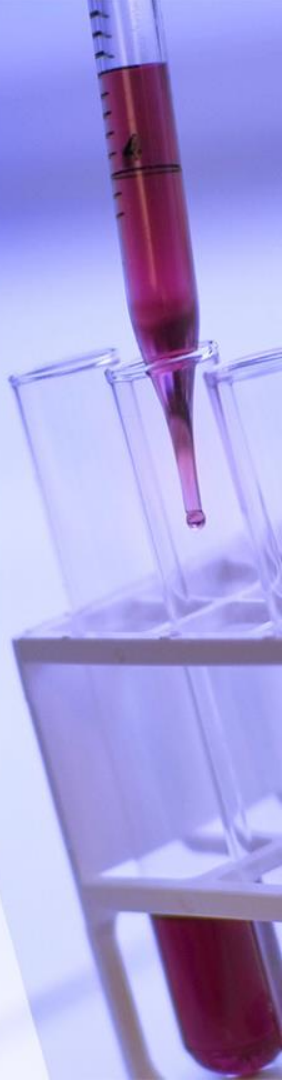
Escherichia coli
(ATCC® 25922)



نکات مهم

$$CFU/1cm^2 = \frac{5 \times N.colony}{50}$$

- کیفیت میکروبی سطوح کار
- سوآپ کشی
- کیفیت میکروبی هوای محیط کار
- رفع آلودگی های سطح و هوای محیط کار
- نکاتی در مورد لامپ UV
- اقدامات بهداشتی پیشگیرانه هنگام آزمون



شرح عملی روش آزمون



Standard Plate Count

Pour Plate

شمارش استاندارد صفحه ای

شماره استاندارد روش آزمون ۲-۲۴۶۱

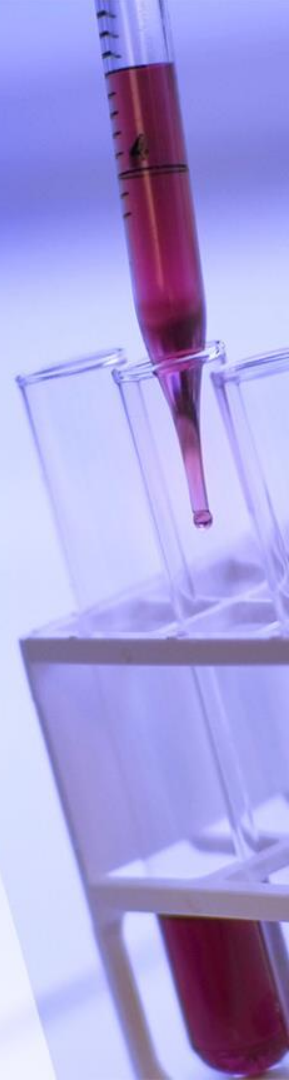
شمارش با روش کشت آمیخته

هدف

- ❑ محصولات که برای انسان و خوراک دام در نظر گرفته شده اند.
- ❑ نمونه های محیطی که در زمینه تولید اولیه، تولید غذا و مدیریت غذا هستند.

دامنه کاربرد

این روش برای زمانی که تعداد مورد انتظار کلنی ها، بیشتر از ۱۰۰ در هر میلی لیتر یا هر گرم از نمونه باشد در نظر گرفته شده است.



Pour Plate

شمارش با روش کشت آمیخته

محیط کشت مورد نیاز

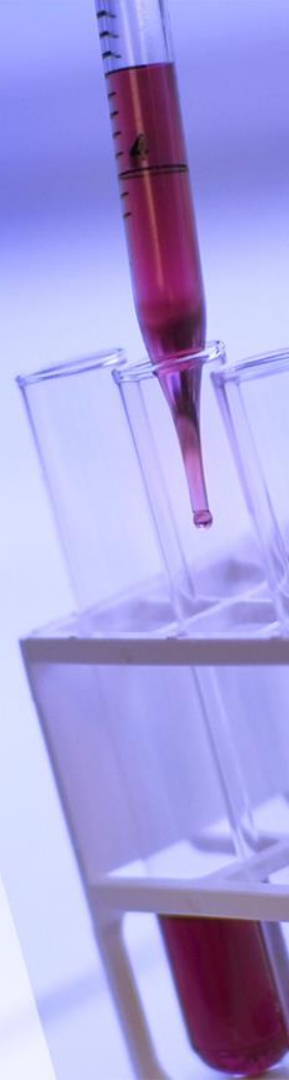
محیط کشت (Violet Red Bile Dextrose Agar) VRBD

روش کار

○ نحوه کشت

○ گرمخانه گذاری

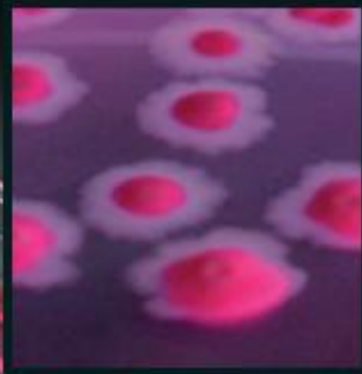
24 ساعت در دمای 37°C



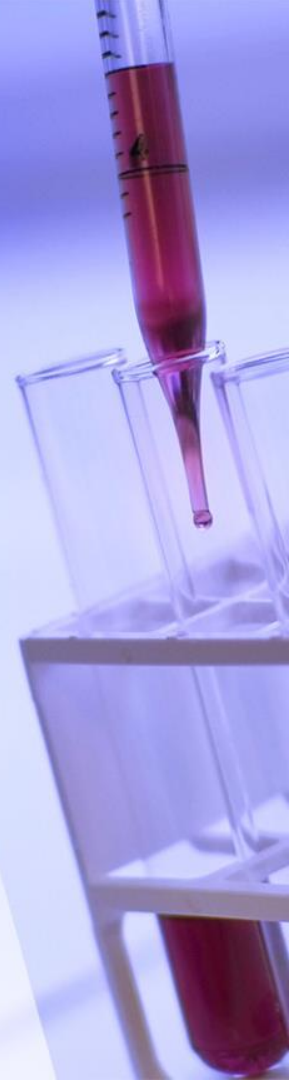
Pour Plate

شمارش با روش کشت آمیخته

Escherichia coli
(ATCC® 25922)



- تفسیر نتایج
- کشت بر روی محیط کشت غیرانتخابی
- آزمون های بیوشیمیایی
 - ✓ واکنش اکسیداز
 - ✓ تخمیر گلوکز



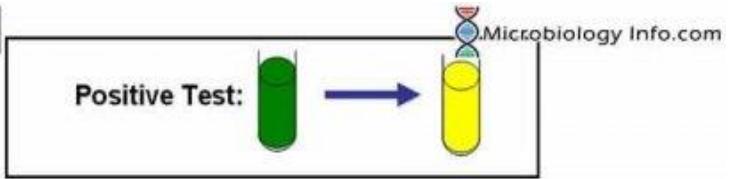


تست اکسیداز

محیط گلوکز OF



Results:



O⁻/F⁻
Non Saccharolytic

O⁺/F⁺
Fermentative
Enterobacteriaceae

O⁺/F⁻
Oxidative
Pseudomonas

Most Probable Number

شمارش بیشترین تعداد احتمالی

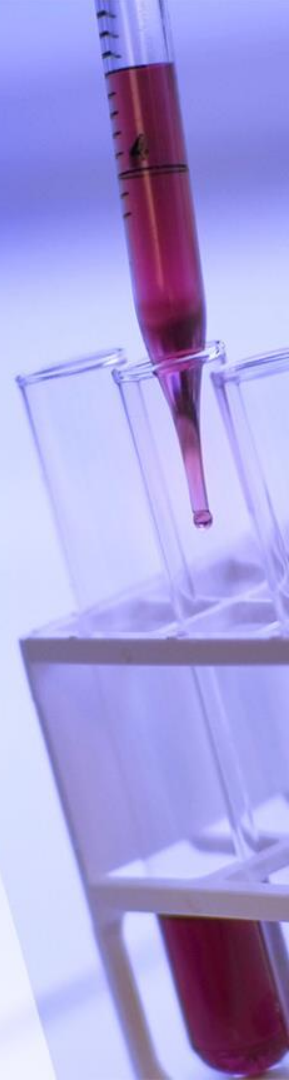
شماره استاندارد روش آزمون ۱-۲۴۶۱

هدف

- محصولاتی که برای انسان و خوراک دام در نظر گرفته شده اند.
- نمونه های محیطی که در زمینه تولید اولیه، تولید غذا و مدیریت غذا هستند.

دامنه کاربرد

- هنگامی که انتظار می رود جستجوی میکروارگانیزم ، نیاز به بازیابی به وسیله غنی سازی داشته باشد.
- هنگامی که انتظار می رود تعداد میکروارگانیزم ها ، کمتر از ۱۰۰ در هر میلی لیتر یا هر گرم از نمونه باشد.



شمارش بیشترین تعداد احتمالی Most Probable Number

محیط کشت مورد نیاز

محیط پتون واتر بافری (PWB)

محیط کشت (Violet Red Bile Dextrose Agar) VRBD

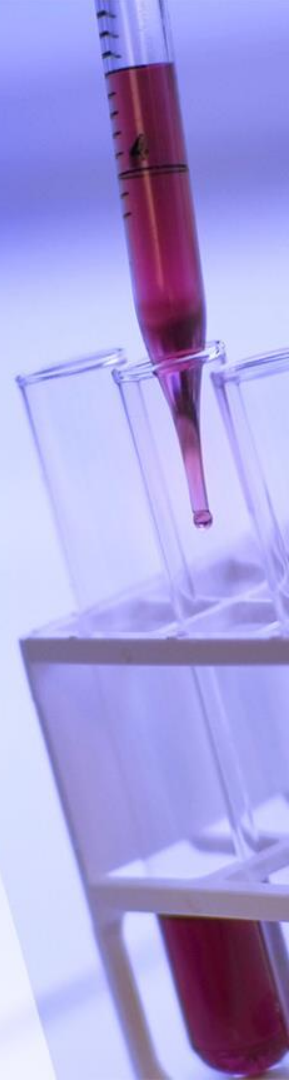
روش کار

مرحله اول: غنی سازی ← گرمخانه گذاری: 18 ساعت در 37°C

مرحله دوم: جداسازی ← گرمخانه گذاری: 24 ساعت در 37°C

○ نحوه کشت

مرحله سوم: تایید: ۱- تست اکسیداز ۲- تخمیر گلوکز



تفسیر نتیجه آزمون با روش MPN

جدول الف - ۱. MPN برای ۳×۱ گرم (میلی لیتر)، ۳×۰/۱ گرم (میلی لیتر) و ۳×۰/۰۱ گرم (میلی لیتر)

تعداد نتایج مثبت			MPN	رده مورد قبول هنگامی که تعداد آزمون برابر باشد با ^۱					حدود اطمینان			
									۹۵٪		۹۹٪	
				۱	۲	۳	۵	۱۰	حد پایین	حد بالا	حد پایین	حد بالا
۰	۰	۰	<۰/۳۰						۰/۰۰	۰/۹۴	۰/۰۰	۱/۴۰
۰	۰	۰	۰/۳۰	۳	۲	۲	۲	۱	۰/۰۱	۰/۹۵	۰/۰۰	۱/۴۰
۰	۱	۰	۰/۳۰	۲	۱	۱	۱	۱	۰/۰۱	۱/۰۰	۰/۰۰	۱/۶۰
۰	۱	۱	۰/۶۱	۰	۳	۳	۳	۳	۰/۱۲	۱/۷۰	۰/۰۵	۲/۵۰
۰	۲	۰	۰/۶۲	۳	۲	۲	۲	۱	۰/۱۲	۱/۷۰	۰/۰۵	۲/۵۰
۰	۳	۰	۰/۹۴	۰	۰	۰	۰	۳	۰/۳۵	۳/۵۰	۰/۱۸	۴/۶۰



شناسایی انتروباکتریاسه در مواد غذایی

شماره استاندارد روش آزمون ۱-۲۴۶۱

محیط کشت مورد نیاز

محیط پیتون واتر بافری (PWB)

محیط کشت VRBD (Violet Red Bile Dextrose Agar)

روش کار

مرحله اول: غنی سازی ← گرمخانه گذاری: 18 ساعت در 37°C

مرحله دوم: جداسازی ← گرمخانه گذاری: 24 ساعت در 37°C

مرحله سوم: تایید: ۱- تست اکسیداز ۲- تخمیر گلوکز

○ نحوه کشت



سپاس از توجه شما

