

- 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 سبتمبر سنة 2005.

الهاشمي جعوب

#### 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 بيوكيميائية مبينة عند إجراء التجارب وفق هذا المنهج.

#### ولاية تيزي وزو:

- السيدات والسادة : رياض عبد الحميد، رئيسا،
- بعيزي نادية، نائبة الرئيس،
- عيواز حدة، مساعدة،
- محفوظي هجيرة، مساعدة،
- بشوش السعيد، كاتب.

#### ولاية المدية :

- السادة : بوعسيلة مسعود، رئيسا،
- بوسنة علي، نائب رئيس،
- عويسي رشيد، مساعدا،
- بناشي حكيم، مساعدا،
- بن ربيعة زبير، كاتب.

#### ولاية وهران:

- السادة : بالأبيض أحمد، رئيسا،
- حجري فؤاد، نائب رئيس،
- سكة قويدر، مساعدا،
- بن حميدة عبد الرحيمي، مساعدا،
- بن ديدة بلاحة، كاتب.

**المادة 2 :** ينشر هذا القرار في الجريدة الرسمية للجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية.

حرر بالجزائر في 18 ذي الحجة عام 1426 الموافق 18 يناير سنة 2006.

الطيب بلعيز

### وزارة التجارة

قرار مؤرخ 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 والمتضمن تعيين أعضاء الحكومة،

- وبمقتضى المرسوم التنفيذي رقم 90-39 المؤرخ في 3 رجب عام 1410 الموافق 30 يناير سنة 1990 والمتعلق بمراقبة الجودة و قمع 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،

## 2.1 ليستيريا مونوسيتوجيناس :

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

## 3.1 البحث عن ليستيريا مونوسيتوجيناس :

يتم تحديد وجود أو غياب هذه الأعضاء المجهريّة 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 والعزل 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 والعزل الأولي :

بعد فترة تحضين لوسط (1.2)، تجري :

\* 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، يجري 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)، تجري :

\* من جهة، اغتناء ثانوي عن طريق الخطوط على صفيحة تحتوي على هلام أكسفورد أو بالكام، انطلاقا من مرق الاغتناء الثانوي. يجري 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 وإعادة 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 ، تجري أولا :

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

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

## 3. أوساط الزرع والكواشف

### 1.3 أوساط الزرع

### 1.1.3 مرق الاغتناء الأولي : الوسط الأساسي

التركيب :

بيبتون البروتياز ..... 5,0 غ  
تريببتون ..... 5,0 غ  
مستخلص لحم البقر ..... 5,0 غ

**3.1.3 وسط العزل ( هلام أكسفورد ) وسط أساسي:****التركيب :**

هلام كولومبيا ..... 39 غ  
إسكولين ..... 1 غ  
سيترات الحديد (3+) الأمونيومي ..... 0,5 غ  
كلورور الليثيوم ..... 15 غ  
ماء ..... 1000 ملل

**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 ..... 200 مغ  
سلفات الكولستين ..... 10 مغ  
أكريفلافين ..... 2,5 مغ  
سيفوتيتان ..... 1 مغ  
فوسفوميسين ..... 5 مغ  
الإيثانول ..... 2,5 ملل  
ماء ..... 2,5 ملل

**التحضير:**

تذوب المكونات الصلبة في خليط الإيثانول / 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 الجانسة 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.

مستخلص الخميرة ..... 5,0 غ

كلورور الصوديوم ..... 20,0 غ

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>2H<sub>2</sub>O ..... 12,0 غ

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

إسكولين ..... 1,0 غ

كلورور الليثيوم ..... 3,0 غ

ماء ..... 1000 ملل

**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 ..... 22,5 ملغ

أكريفلافين ..... 28,125 ملغ

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

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 الإينوكلوم.

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

### 5.1.3 وسط العزل ( هلام بالكامل ) 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 اليثيوم ..... 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 بالكامل 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 لفريضة 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 البروتوز ..... 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 .

**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 5 ملل  
تقريبا.

- يعقم الوسط في جهاز التعقيم (2.1.1.4) معدل  
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).....40 غ  
ماء .....1000 ملل

**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  
100 ملل.

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) .....100 ملل  
دم منزوع الألياف للحصان أو الخروف .....7 ملل

**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 10 ملل تقريبا و يترك ليتصلب.

- يوزع الوسط بكميات تقدر بـ 20 ملل تقريبا في  
علب بيتري معقمة و يترك ليتصلب.

**8.1.3 أساس :**

بروتياز بيتون .....10 غ  
مستخلص لحم البقر .....1 غ  
كلورور الصوديوم .....5 غ  
أرجواني برومو كريزول .....0,02 غ  
ماء .....1000 ملل

**1.8.1.3 التحضير :**

- تذوب المكونات في الماء و تسخن حتى الغليان.  
- يعدل العامل الهيدروجيني (pH) بحيث يبلغ  
بعد التعقيم 6,8 في 25°م، إذا اقتضى الأمر.

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

- 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).....5 غ  
ماء .....100 ملل

**التحضير :**

تذوب كل هيدرات الكربون بشكل منفصل.

**3.8.1.3 الوسط الكامل :**

يضاف بطهارة لكل هيدرات الكربون 1 ملل من  
محلول (2.8.1.3) إلى 9 ملل 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 .....20,0 غ  
بيبتون اللحم .....6,1 غ  
أغار - أغار .....3,5 غ  
ماء .....1000 ملل

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

#### 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 أو معدنية مجهزة بأغطية مقاومة لظروف التعقيم؛ أو

(ب) جهاز التجانس من النوع بيريسستالتيك (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 حلقيّة، 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  $\pm 0,1$  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 مخبر مدرج ، لتحضير الأوساط الكاملة.

- 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 أوريوس (على سبيل المثال 1803 NCTC) ضعيفة من حيث B - تحلل الدم و سلالة من رودوكوكس إيكس (على سبيل المثال 1621 NCTC) سلالات ستافيلوكوكوس أوريوس غير مهيأة كلها لاختبار كامب (CAMP).

- تحفظ مزارع ستافيلوكوكوس أوريوس، رودوكوكس إيكس، ليستيريا مونسيتوجناس، ليستيريا إينوكوا و ليستيريا إيفانوفيتي بزرعها مائلة داخل أنابيب بها وسط (6.1.3) (TSYEA) وتحضينها في 37°م لمدة 24 إلى 48 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  $\pm 3$ .

2.1.1.4 جهاز التعقيم، معدل في 121°م  $\pm 1$ .

2.1.4 مجفف، معدل في 30°م  $\pm 1$ .

3.1.4 مجفف، معدل في 37°م  $\pm 1$ .

4.1.4 مجفف، معدل في 25°م  $\pm 1$ .

5.1.4 حمام مائي، معدل في 45°م  $\pm 1$  أو في 37°م  $\pm 1$ .

**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 يتعدها.

**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 25 غ من حصة خاصة من الحليب أو منتوج الحليب وإذا كان من غير الممكن إثبات أن التجميع (تشكيل مشترك) مختلف العينات المأخوذة للتجربة) لا يؤثر على النتيجة بالنسبة للحليب أو منتجات الحليب، فإنه يمكن تجميع العينات مثلا إذا لزم الأمر فحص 10 عينات تزن 25 غ، يمكن تجميع هذه الوحدات العشر لتشكيل عينة واحدة للتجربة تزن 250 غ و تذويبها أو خلطها في 2,25 مل 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 25 ملل من العينة المأخوذة للتجربة إلى 225 ملل من وسط الاغتناء (1.1.3) ثم يخلط.

**2.1.7 الحليب الجاف، مسحوق مصلى الحليب ، مسحوق مخاض الزبدة والكازينات :**

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

**3.1.7 الكازيين :**

- توزن بطهارة 25 غ من العينة المأخوذة للتجربة في وعاء معقم خاص بجهاز المجانسة (6.1.4) ثم يضاف 225 ملل من وسط الاغتناء (1.1.3) في 45°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 25 ملل إلى قارورة تحتوي على 225 ملل من وسط الاغتناء (1.1.3) تخلط بعناية.

**4.2.4 ماصات مدرجة : سعتها 25 ملل، 10 ملل 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. المعايير :**

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

يجب اتباع التعليمات الخاصة بالمعايير 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 لا 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 مصلى 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).

#### 5.1.7 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 هيدروجيني pH منخفض القيمة، نتحقق بطهارة من قيمة العامل الهيدروجيني (pH) للمعلق بواسطة ورق كاشف ملون و يعدل إلى  $7,0 \pm 0,5$  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 علبه من هلام أكسفورد (3.1.3) و ذلك للحصول على مستعمرات معزولة جيدا .

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

3.3.7 تفحص العلبه للتحقق من وجود مستعمرات نموذجية لليسيتيريا (spp) (مستعمرات محاطة بحلقة بنية عاتمة و سوداء) .

#### 4.7 التأكد:

#### 1.4.7 انتقاء المستعمرات للتأكد:

انطلاقا من كل علبه 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 / العلبه) مهما لإضاءة جيدة لهنري (أنظر أدناه) .

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

عندما نفحص تحت هذا الضوء بالإضاءة المائلة (إضاءة هنري) بالنظر من أعلى العلبه، تكون مستعمرات ليسيتيريا (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 واتباع الطريقة المذكورة سابقا.

#### 3.4.7 تفاعل عن طريق الكايتاس :

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 ليسيتيريا (spp) ذات كايتاس 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 تحليل 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 بالجهر (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 تحليل الدم :**

- إذا كانت الخصائص المرفولوجية والفيزيولوجية و كذا تفاعل الكاपालاس تدل على وجود ليستيريا (spp) تزرع العلب المحتوية على وسط صلب بالدم (7.1.3) قصد التعرف على تفاعل تحليل 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 يلحق فضاء كل زرع بواسطة سلك الزرع (8.1.4).

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

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

- تظهر ليستيريا مونوسيتوجيناس 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 أوريوس وردوكوكيس إيكلي 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 الإينوكولوم 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 1م إلى 2م 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 أوريوس.

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

يظهر هذا بتشكيل منطقة دائرية من تحلل الدم تمتد حوالي 2م فقط انطلاقا من سلالة الاختبار و إلى داخل المنطقة ذات التحلل الدموي الضعيف الناجم من نمو بكتيريا ستافيلوكوكوس أوريوس.

يمكن ملاحظة تفاعل مماثل داخل سلالة الاختبار مع رودوكوكيس إيكسي لكن يعتبر سلبيا.

لا تظهر مناطق كبيرة لتحلل الدم حول مزرعة ستافيلوكوكوس أوريوس.

## 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 للكاطلاز 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 ليستيريا مونوسيتوجيناس و ليستيريا سليجيري (ذات تفاعل ضعيف)، تفاعل موجب لاختبار كامب مع ستافيلوكوكوس أوريوس ولكن ليس مع رودوكوكيس إيكسي.

تتفاعل ليستيريا إيفانوفي مع رودوكوكيس إيكسي لكنها لا تتفاعل مع ستافيلوكوكوس أوريوس. 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 مفسولة و بعض الأجبان المحضرة بالمعدنوس بالمقارنة مع المنتوجات الأخرى ( لذلك، تكون حساسية المنهج بالنسبة للجبن ليمبورغر أكثر ضعفا لتراكم 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

**9- تقرير التجربة :**

يجب أن يبين تقرير التجربة ، المنهج الذي أجريت من خلاله عملية المعايرة، إذا كان المنهج المستعمل معروفاً وكذلك نتيجة التجربة المتحصل عليها وإذا 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.

قارورة مراقبة وسط الاغتناء (أنظر 2.7) تضاف من 10 إلى 100 خلية ليستيريا مونوسيتوجيناس لكل قارورة.

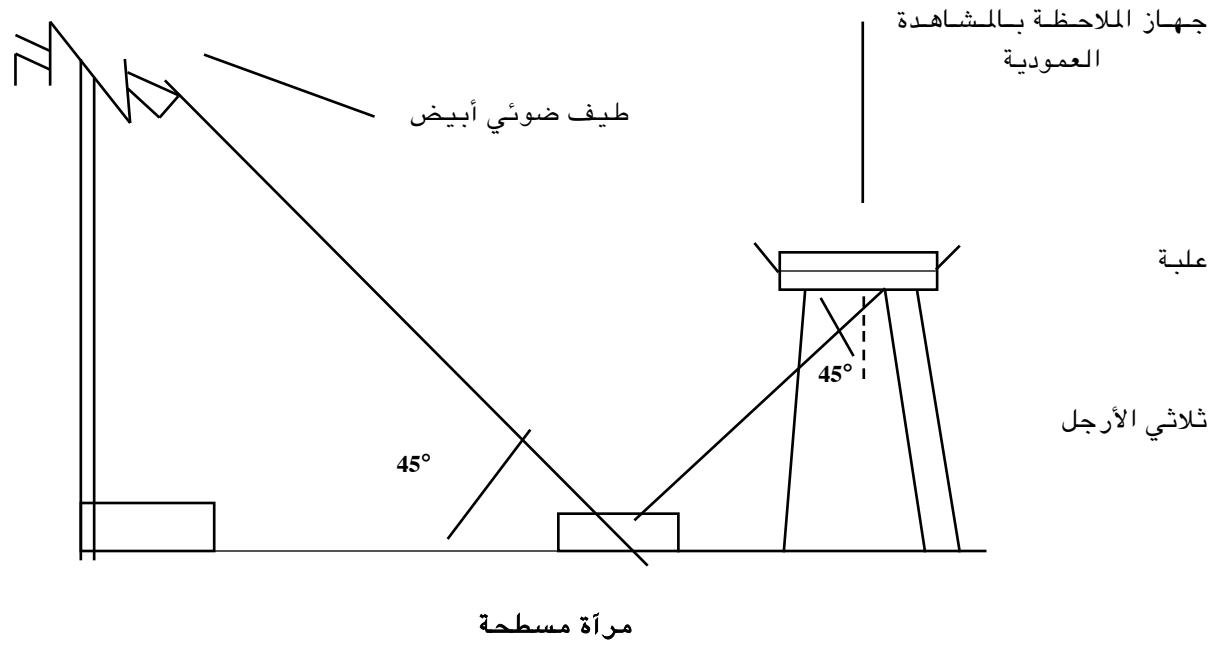
يعمل بنفس الطريقة مع قارورات مراقبة أوساط الاغتناء مثلما هو الحال بالنسبة لمزارع التجربة وذلك للبرهنة على أنه تم العثور على زرع المراقبة الموجب .

**8- التعبير عن النتائج :**

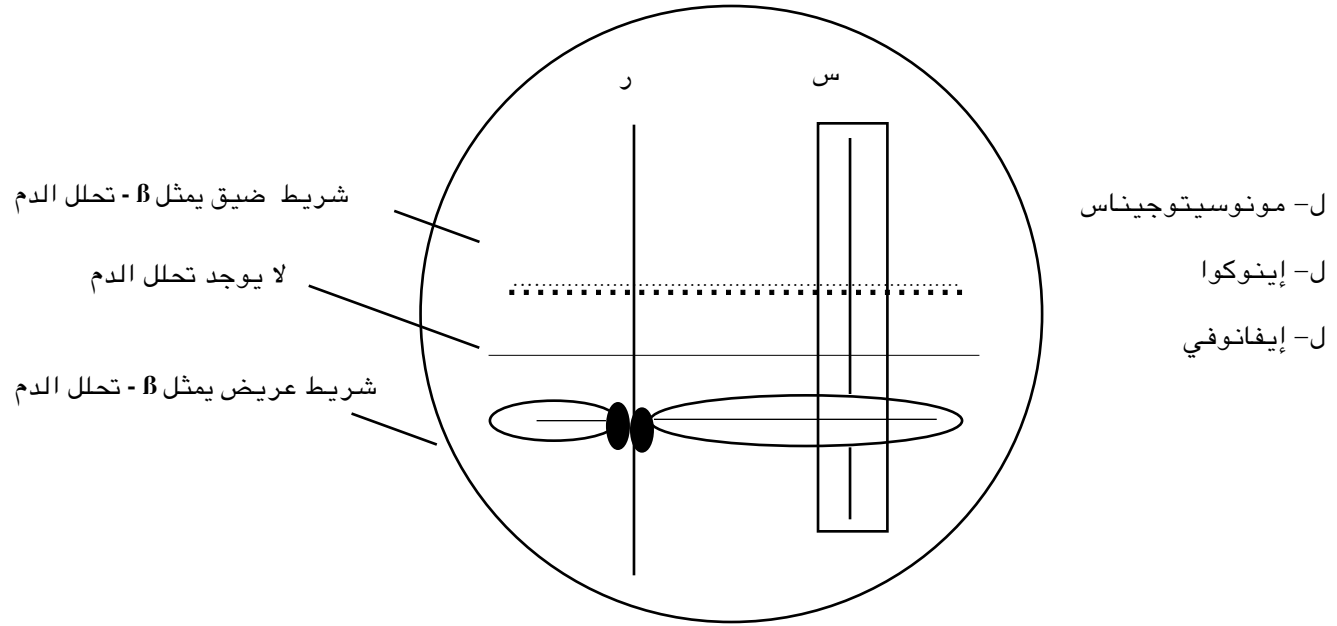
حسب تفسير النتائج التي أجريت ، يشار إلى وجود أو غياب ليستيريا مونوسيتوجيناس في العينة المأخوذة للتجربة، بتحديد الكتلة بالغرام أو الحجم بالملييلتر للعينة التي خضعت للتجربة.

جدول 1 : التفاعل لمعرفة ليستيريا (spp)

| اختبار كامب (CAMP) |                     | إنتاج الحمض |        | النوع             |
|--------------------|---------------------|-------------|--------|-------------------|
| رودوكوكيس إيكس     | ستافيلوكوكوس أوريوس | كزيلون      | رامنوز |                   |
| -                  | +                   | -           | +      | ل. مونوسيتوجيناس  |
| -                  | -                   | -           | م      | ل. إينوكوا        |
| +                  | -                   | +           | -      | ل. إيفانوفي       |
| -                  | (+)                 | +           | -      | ل. سيليجيري       |
| -                  | -                   | +           | م      | ل. ولشيميري       |
| -                  | -                   | -           | -      | ل. قرايبي         |
| -                  | -                   | -           | م      | ل. ميرايبي        |
|                    |                     |             |        | 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 أوريوس. تمثل الأسطر الأفقية خطوط نمو مستعمرات مزارع التجربة. تظهر مناطق تحليل الدم المتشكلة على شكل خطوط محيطة بالمستعمرات النامية.
- 2- يحدد الجزء ذو الخطوط المتقطعة ، منطقة تأثير ستافيلوكوس أوريوس.