

وزارة التجارة

قرار مؤرخ في 4 شوال عام 1435 الموافق 31 يوليو سنة 2014، يجعل المنهج الذي يستعمل الوسط الهلامي ببلازما الأرنب والفيبرينوجين لإحصاء الستافيلوكوك ذات أنزيم تخثر موجب إجباريا.

إن وزير التجارة،

- بمقتضى المرسوم الرئاسي رقم 14-154 المؤرخ في 5 رجب عام 1435 الموافق 5 مايو سنة 2014 والمتضمن تعيين أعضاء الحكومة،

- وبمقتضى المرسوم التنفيذي رقم 90-39 المؤرخ في 3 رجب عام 1410 الموافق 30 يناير سنة 1990 والمتعلق برقابة 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 المرسوم التنفيذي رقم 05-465 المؤرخ في 4 ذي القعدة عام 1426 الموافق 6 ديسمبر سنة 2005 والمتعلق بتقييم المطابقة،

- 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 والمتمم والمذكور أعلاه، يهدف هذا القرار إلى جعل المنهج الذي يستعمل الوسط الهلامي ببلازما الأرنب والفيبرينوجين لإحصاء الستافيلوكوك ذات أنزيم تخثر موجب إجباريا.

المادة 2 : من أجل إحصاء الستافيلوكوك ذات أنزيم تخثر موجب، فإن مخابر مراقبة الجودة وقمع الغش والمخابر المعتمدة لهذا الغرض، ملزمة باستعمال المنهج المبين في الملحق المرفق.

يجب أن يستعمل هذا المنهج من طرف المخبر عند الأمر بإجراء خبرة.

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

حرر بالجزائر في 4 شوال عام 1435 الموافق 31 يوليو سنة 2014.

عمار بن يونس

الملحق

المنهج الذي يستعمل الوسط الهلامي ببلازما الأرنب والفيبرينوجين لإحصاء الستافيلوكوك ذات أنزيم تخثر موجب

يحدد هذا المنهج تقنية لإحصاء الستافيلوكوك ذات أنزيم تخثر موجب (ستافيلوكوكوس أوريوس وأصناف أخرى) في المواد الموجهة للاستهلاك البشري أو التغذية الحيوانية، بإحصاء المستعمرات المتحصل عليها في وسط صلب (وسط يحتوي على بلازما الأرنب والفيبرينوجين) بعد التحضين في الشروط الهوائية في 35° م أو 37° م.

1. مصطلحات و تعاريف

لاحتياجات هذا المنهج، تطبق المصطلحات والتعاريف الآتية.

1.1 ستافيلوكوك ذات أنزيم تخثر موجب

تشكل هذه البكتيريا مستعمرات مميزة في وسط هلامي انتقائي يحتوي على بلازما الأرنب والفيبرينوجين، عندما تنجز التجربة حسب التقنية المحددة في هذا المنهج.

2.1 إحصاء الستافيلوكوك ذات أنزيم تخثر موجب

تحديد عدد الستافيلوكوك ذات أنزيم تخثر موجب الموجود في المليلتر أو الغرام من العينة، عندما تنجز التجربة حسب التقنية المحددة في هذا المنهج.

2. المبدأ

1.2 تزرع في عمق وسط هلامي يحتوي على بلازما الأرنب والفيبرينوجين، مسكوب في علبتي بتري، كمية محددة من عينة التجربة إذا كانت المادة سائلة أو كمية محددة من المحلول الأم في حالة المواد الأخرى.

في نفس الشروط، تزرع التخفيفات العشرية المتحصل عليها انطلاقا من عينة التجربة أو من المحلول الأم، بمعدل علبتين لكل تخفيف.

2.2 تحضن هذه العلب في 35° م أو 37° م لمدة 18 إلى 24 ساعة وإذا اقتضى الأمر، لمدة 24 ساعة إضافية.

3.2 يحسب عدد الستافيلوكوك ذات أنزيم تخثر موجب انطلاقا من عدد المستعمرات المميزة لكل علبة بتري في مليلتر أو في غرام من عينة التجربة.

3. المخفف و أوساط الزرع

1.3 المخفف

يستند إلى القواعد العامة لتحضير المحلول الأم والتخفيفات العشرية قصد الفحص الميكروبيولوجي.

2.3 وسط هلامي يحتوي على بلازما الأرنب والفيبرينوجين.

ملاحظة - يمكن استعمال أوساط متوفرة في السوق مطابقة لمواصفات هذا المنهج. غير أنه و نظرا للتنوع الملاحظ في حصص المضاف المصنعة، ينصح بفحص كل حصة من محلول فيبرينوجين البقر وبلازما الأرنب، قبل الاستعمال وذلك بالقيام بمراقبات إيجابية وسلبية.

1.2.3 الوسط الأساسي

أنظر منهج إحصاء الستافيلوكوك ذات أنزيم تخثر موجب (ستافيلوكوكوس اوريوس وأصناف أخرى) وهي تقنية يستعمل فيها الوسط الهلامي لبارد-باركر (Baird-Parker) باستثناء توزيع الوسط الأساسي، بكمية 90 ملل في كل قارورة.

2.2.3 المحاليل

1.2.2.3 محلول تلوريت البوتاسيوم

يحضر محلول تلوريت البوتاسيوم كما هو مبين في المنهج الأفقي لإحصاء الستافيلوكوك ذات أنزيم تخثر موجب (ستافيلوكوكوس اوريوس وأصناف أخرى) وهي تقنية يستعمل فيها الوسط الهلامي لبارد-باركر (Baird-Parker).

2.2.2.3 محلول فيبرينوجين البقر

1.2.2.2.3 التركيب

فيبرينوجين البقر.....5غ إلى 7غ
(حسب نقاوة فيبرينوجين البقر)

ماء معقم..... 100 ملل

2.2.2.2.3 التحضير

يذوب فيبرينوجين البقر بنقاوة في الماء مباشرة قبل الاستعمال.

3.2.2.3 محلول بلازما الأرنب و مانع التريبسين

1.3.2.2.3 التركيب

بلازما الأرنب مع EDTA للتخثر (بلازما التخثر EDTA)

..... 30 ملل

مانع التريبسين..... 30 ملغ

2.3.2.2.3 التحضير

تذوب المكونات بنقاوة في الماء مباشرة قبل الاستعمال.

3.2.3 الوسط الكامل

1.3.2.3 التركيب

الوسط الأساسي (1.2.3).....90 ملل

محلول تلوريت البوتاسيوم (1.2.2.3).....0,25 ملل

محلول فيبرينوجين البقر (2.2.2.3).....7,5 ملل

محلول بلازما الأرنب ومانع التريبسين (3.2.2.3).....2,5 ملل.

2.3.2.3 التحضير

يذوب الوسط الأساسي، ثم يتترك ليبرد في 48 ± 1 °م في حمام مائي (3.4).

تضاف بطريقة معقمة المحاليل الثلاثة، المسخنة مسبقا في 48 ± 1 °م في حمام مائي، وبعد كل إضافة يخلط بعناية بالدوران، للتقليل من تشكل رغوة.

يستعمل الوسط الكامل مباشرة بعد تحضيره، لتجنب ترسب البلازما.

ملاحظة - في حالة استعمال محلول متوفر في

السوق من فيبرينوجين البقر وبلازما الأرنب، تحترم تعليمات المصنّع بدقة لتحضير هذا المحلول والوسط الكامل (لاسيما درجة حرارة وسط الأساس) وإلا، يمكن للوسط أن يفقد نشاطه كليا.

3.3 تحضير علب الوسط الصلب (الهلامي)

أنظر المنهج الأفقي لإحصاء الستافيلوكوك ذات أنزيم تخثر موجب (ستافيلوكوكوس اوريوس وأصناف أخرى) وهي تقنية يستعمل فيها الوسط الهلامي لبارد-باركر (Baird-Parker).

4. التجهيزات و الأدوات الزجاجية

ملاحظة - يسمح باستخدام أدوات ذات استعمال

وحيد على غرار الأدوات الزجاجية التي تستعمل لعدة مرات بشرط أن تكون مواصفاتها مناسبة.

الأدوات المستعملة في مخبر الميكروبيولوجيا

ولا سيما ما يأتي :

يخلط التطعيم في وسط الزرع بعناية و يترك ليتجمد بوضع علب بتري فوق سطح بارد وأفقي.

3.2.7 بعد التجمد الكامل للوسط، تقلب العلب المحضرة وتحضن في جهاز التجفيف (2.4) مضبوط في درجة حرارة 35°م أو 37°م لمدة 18 سا إلى 24 سا وإذا استلزم الأمر يعاد تحضينها لمدة 18 سا إلى 24 سا إضافية.

3.7 حساب المستعمرات

بعد مدة من التحضين (3.2.7) تشكل الستافيلوكوك مستعمرات صغيرة سوداء أو رمادية أو حتى بيضاء، محاطة بهالة من الترسيب تدل على نشاط التخثر. يمكن لمستعمرات البروتايوس أن تشكل في بداية التحضين مظهرا مماثلا لمستعمرات الستافيلوكوك ذات أنزيم تخثر موجب. غير أنه بعد التحضين لمدة 24 سا أو 48 سا تؤخذ المستعمرات مظهر بساط أسمر نوعا ما واجتياحي مما يسمح بتمييزها عن الستافيلوكوك.

يتم إحصاء المستعمرات المميزة لكل علبة.

ملاحظة - بما أن الوسط الهلامي ببلازما الأرنب والفيبرينوجين مبني على تفاعل التخثر فليس من الضروري تأكيد هذا النشاط.

8. التعبير عن النتائج

1.8 حالة مامة

تؤخذ بعين الاعتبار العلب التي تحتوي على 300 مستعمرة على الأكثر، حيث تكون فيها 100 مستعمرة مميزة في تخفيفين متتاليين. يجب أن تحتوي العلبة على 15 مستعمرة مميزة على الأقل.

يحسب العدد N للستافيلوكوك ذات أنزيم تخثر موجب الموجود في ميليلتر أو غرام من المادة كمعدل الوزن انطلاقا من تخفيفين متتاليين باستعمال المعادلة الآتية :

$$N = \frac{\sum c}{V(n1+0,1n2)d}$$

حيث :

$\sum c$: مجموع مستعمرات الستافيلوكوك المميزة في جميع العلب المأخوذة بعين الاعتبار ،

V : حجم التطعيم الموضوع في كل علبة بالميليلتر،

n1 : عدد العلب المأخوذة بعين الاعتبار في التخفيف الأول،

n2 : عدد العلب المأخوذة بعين الاعتبار في التخفيف الثاني،

1.4 جهاز للتعقيم بالحرارة الجافة (فرن) وبالحرارة الرطبة (جهاز التعقيم)،

2.4 جهاز التجفيف، يسمح بحفظ الأوساط المزروعة، العلب والقارورات في درجة حرارة من 35°م ± 1°م أو 37°م ± 1°م.

3.4 حمام مائي أو جهاز مشابه يمكن ضبطه في 48°م ± 1°م.

4.4 علب بتري معقمة من الزجاج أو من مادة بلاستيكية.

5.4 ماصات مدرجة ذات تدفق كلي، سعتها 1ملل، 2 ملل و 10 ملل، مدرجة على الترتيب في 0,1 ملل و 0,1 ملل و 0,5 ملل.

5. اقتطاع العينات

من الضروري أن يحصل المخبر على عينة ممثلة، غير متلفة ولم تتغير أثناء النقل والتخزين.

6. تحضير العينة للتجربة

تحضر العينة للتجربة طبقا المنهج تحضير العينات، والمحلول الأم والتخفيفات العشرية قصد الفحص الميكروبيولوجي.

7. طريقة العمل

1.7 العينة المأخوذة للتجربة، المحلول الأم والتخفيف

أنظر منهج تحضير العينات، المحلول الأم والتخفيفات العشرية قصد الفحص الميكروبيولوجي.

2.7 الزرع و التحضين

1.2.7 تؤخذ علبتي بتري معقمتين (4.4). يوضع في كل واحدة منهما باستعمال ماصة معقمة (5.4) 1 ملل من العينة المأخوذة للتجربة إذا كانت المادة سائلة أو 1ملل من المحلول الأم بالنسبة للمواد الأخرى.

تؤخذ علبتا بتري أخريان معقمتان، يوضع في كل منهما 1 ملل من التخفيف العشري الأول.

تعاد هذه العمليات مع تخفيفات متتالية باستعمال ماصة معقمة جديدة لكل تخفيف عشري.

2.2.7 يسكب في الحين الوسط الكامل (3.2.3) المستعمل في كلتا علبتي بتري (1.2.7) (يجب ألا يحفظ متبلورا)، بحيث نتحصل على سملك يقدر بحوالي 3 ملم.

d : هو نسبة التخفيف للمحلول الأم.

2.2.8 إذا لم تحتو العلبتان على مستوى عينة التجربة (مواد سائلة) أو المحلول الأم (مواد أخرى) على أي مستعمرة للستافيلوكوك ذات أنزيم التخثر موجب يعبر عن النتيجة كالآتي :

- أقل من 1 ستافيلوكوك ذات أنزيم التخثر موجب في الميليلتر (مواد سائلة)،

- أقل من $1/d$ ستافيلوكوك ذات أنزيم التخثر موجب في الغرام (مواد أخرى) حيث d هو نسبة التخفيف للمحلول الأم.

9. الدقة

1.9 التكرارية

لا يتجاوز الفرق المطلق بين نتيجتين منفردتين، ومنفصلتين (عدد ستافيلوكوك ذات أنزيم تخثر موجب في الغرام أو في الميليلتر، محولة إلى لغ 10) أو النسبة على سلم عادي، بين أعلى وأدنى نتيجتي التجربتين متحصل عليهما بواسطة نفس المنهج على نفس المادة الخاضعة للتجربة في نفس المخبر منجز من طرف نفس المحلل الذي يستعمل نفس التجهيزات في أقصر مجال زمني، إلا في 5% من الحالات على الأكثر لمجال التكرارية.

2.9 قابلية إعادة التجربة

لا يتجاوز الفرق المطلق بين نتيجتين منفردتين (عدد ستافيلوكوك ذات أنزيم تخثر موجب في الغرام أو في الميليلتر، محولة إلى لغ 10) أو النسبة على سلم عادي، بين أعلى وأدنى نتيجتين متحصل عليهما بواسطة نفس المنهج على نفس المادة الخاضعة للتجربة في مخابر مختلفة منجز من طرف عدة محللين يستعملون تجهيزات مختلفة، إلا في 5% من الحالات على الأكثر لمجال قابلية إعادة التجربة.



d : هو نسبة التخفيف الموافقة للتخفيف الأول المأخوذ بعين الاعتبار (المحلول الأم هو عبارة عن تخفيف).

تقرب النتائج المتحصل عليها باعتبار عددين.

تعطى النتيجة بعدد الستافيلوكوك ذات أنزيم تخثر موجب في الميليلتر (مادة سائلة) أو في الغرام (مواد أخرى) معبر عنها بعدد محصور بين 1 و 9,9 مضروب في 10^x ، حيث x هو القوة المناسبة لـ 10.

مثال

يعطي إحصاء المستعمرات بعد زرع 0,1 ملل من المادة النتائج الآتية :

- عند التخفيف الأول المأخوذ بعين الاعتبار (10^{-2}) : 66 مستعمرة مميزة و 54 مستعمرة مميزة،

- عند التخفيف الثاني المأخوذ بعين الاعتبار (10^{-3}) : 4 مستعمرات مميزة و 7 مستعمرات مميزة،

$$N = \frac{66 + 54 + 4 + 7}{2,2 \times 10^{-2}} = 5955$$

النتيجة، بعد التقريب هي 6×10^3 .

2.8 تقييم الأعداد الصغيرة

1.2.8 إذا احتوت كل علبة من العلبتين على مستوى العينة المأخوذة للتجربة (مواد سائلة) أو من المحلول الأم (مواد أخرى)، أقل من 15 مستعمرة، يعبر عن النتيجة كالآتي :

(أ) بالنسبة للمواد السائلة، عدد الستافيلوكوك ذات أنزيم تخثر موجب المحصاة في الميليلتر :

$$Ne = \frac{C}{2}$$

حيث :

C : مجموع مستعمرات الستافيلوكوك ذات أنزيم تخثر موجب المحصاة (3.7) على مستوى العلبتين المأخوذتين بعين الاعتبار .

(ب) بالنسبة للمواد الأخرى، عدد الستافيلوكوك ذات أنزيم تخثر موجب في الغرام :

$$Ne = \frac{C}{2Xd}$$

حيث :

C : مجموع مستعمرات الستافيلوكوك ذات أنزيم تخثر موجب المحصاة (3.7) على مستوى العلبتين المأخوذتين بعين الاعتبار،