جمهوری اسلامی ایران

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

شمارهٔ استاندارد ایران

۷۲۲۳

آب – جستجو و شناسایی ویبریوکلرا –

روش آزمون میکروبیولوژی

چاپ اول

آشنایی با مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب قانون، تنها مرجع رسمی کشور است که عهده دار وظیفه تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) میباشد.

تدوین استاندارد در رشته های مختلف توسط کمیسیون های فنی مرکب از کارشناسان مؤسسه، صاحبنظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی واقتصادی آگاه ومرتبط با موضوع صورت میگیرد. سعی بر این است که

استانداردهای ملی، در جهت مطلوبیت ها و مصالح ملی وبا توجه به شرایط تولیدی، فنی و فن آوری حاصل از مشارکت آگاهانه و منصفانه صاحبان حق و نفع شامل: تولیدکنندگان ،مصرف کنندگان، بازرگانان، مراکز علمی و تخصصی و نهادها و سازمانهای دولتی باشد.پیش نویس استانداردهای ملی جهت نظرخواهی برای مراجع ذینفع واعضای کمیسیون های فنی مربوط ارسال میشود و پس از دریافت نظرات وپیشنهادها در کمیته ملی مرتبط با آن رشته طرح ودر صورت تصویب به عنوان استاندارد ملی (رسمی) چاپ و منتشر می شود.

پیش نویس استانداردهایی که توسط مؤسسات و سازمانهای علاقمند و ذیصلاح و با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می شود نیز پس از طرح و بررسی در کمیته ملی مربوط و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی چاپ ومنتشرمی گردد. بدین ترتیب استانداردهایی ملی تلقی می شود که بر اساس مفاد مندرج در استاندارد ملی شماره ((۵)) تدوین و در کمیته ملی مربوط که توسط مؤسسه تشکیل میگردد به تصویب رسیده باشد.

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران از اعضای اصلی سازمان بین المللی استاندارد میباشد که در تدوین استانداردهای ملی ضمن توجه به شرایط کلی ونیازمندیهای خاص کشور، از آخرین پیشرفتهای علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین المللی استفاده می نماید.

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران می تواند با رعایت موازین پیش بینی شده در قانون به منظور حمایت از مصرف کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی وعمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردها را با تصویب شورای عالی استاندارد اجباری نماید. مؤسسه می تواند به منظور حفظ بازارهای بین المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه بندی آنرا اجباری نماید.

همچنین بمنظور اطمینان بخشیدن به استفاده کنندگان از خدمات سازمانها و مؤسسات فعال در زمینه مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و گواهی کنندکان سیستم های مدیریت کیفیت ومدیریت زیست محیطی، آزمایشگاهها و کالیبره کنندگان

وسایل سنجش، مؤسسه استاندارد اینگونه سازمانها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران مورد ارزیابی قرار داده و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامه تأیید صلاحیت به آنها اعطا نموده و بر عملکرد آنها نظارت می نماید. ترویج سیستم بین المللی یکاها ، کالیبراسیون وسایل سنجش تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی از دیگر وظایف این مؤسسه می باشد.

کمیسیون استاندارد آب – جستجو و شناسایی ویبریوکلرا

روش آزمون میکروبیولوژی

رئیس	سمت یا نمایندگي
مهوش ، اسکوئی(دکترای میکروب شناسی)	انستیتو پاستور ایران
اعضاء	
اصلاني ، محمد مهدي(دکترای میکروبشناسی)	انستیتو پاستور ایران
زندوکیلی ، فاطمه(فوق لیسانس علوم بهداشتی در تغذیه)	موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
سرگزی ، مریم(لیسانس میکروب شناسی)	شرکت آبهای شهرها و شرکهای استان تهران
شقاقی ، غلامرضا(فوق لیسانس بهداشت محیط وحرفه ای)	وزارت بهداشت ، درمان و آموزش پزشکی-اداره سلامت
صدیقی ، هما(لیسانس بیولوژی)	شرکت آب و فاضلاب استان تهران
ضرغامپور ، زهره(فوق لیسانس میکروب شناسی)	شرکت آب و فاضلاب استان تهران
عابدی ، زهرا(فوق لیسانس میکروب شناسی)	انستیتو پاستور ایران
غلامی ، میترا(دکترای بهداشت محیط)	دانشگاه علوم پزشکی ایران
دبیر	
زرسازي ، گیتا(لیسانس صنایع- استاندارد وکنترل کیفیت)	موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتي ایران

پیشگفتار

آب – جستجو و شناسایی ویبریوکلرا – روش آزمون میکروبیولوژی کـــه توسط کمیسیون های فنی مربوطه تهیه و تدوین شده و درپنجاه و سومین جلسه کمیته ملی استاندارد میکروبیولوژی مورخ ۸۲/۱۲/۱۷ مورد تصویب قرار گرفته است ، اینک به استناد بند ۱ ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می شود .

برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفتهای ملی و جهانی در زمینه صنایع ، علوم و خدمات ، استانداردهای ملی ایران در مواقع لزوم تجدیدنظر خواهد شد و هرگونه پیشنهادی که برای اصلاح یا تکمیل این استانداردها ارائه شود ، در هنگام تجدیدنظر در کمیسیون فنی ، مربوط مورد توجه قرار خواهد گرفت . بنابراین برای مراجعه به استانداردهای ایران باید همواره از آخرین تجدیدنظر آنها استفاده کرد .

در تهیه و تدوین این استاندارد سعی شده است که ضمن توجه به شرایط موجود و نیازهای جامعه ، در حد امکان بین این استاندارد و استاندارد ملی کشورهای صنعتی و پیشرفته هماهنگی ایجاد شود .

منبع و مآخذی که برای تهیه این استاندارد بکار رفته به شرح زیر است :

W.E.F. A.W.W.A A.P.H.A Standard methods for the examination of water and waste water . 1998 water-Detection and identification of vibrio cholera .

مقدمه

ویبریوکلرا[1] گروهی از میکروارگانیسم های میله ای شکل ، خمیده ،گرم منفی ، بدون اسپور و متحرک هستند که تا کنون بیش از ۸۰ گروه سرولوژیکی آن شناخته شده است و به دو گروه عمده ویبریوکلرا 01 [2] و ویبریوکلرا غیر 01 [3]طبقه بندی می شوند .

ویبریوکلرا 01 دارای دو زیر گروه[4] التور[5] و کلاسیک[6] می باشد که نوع التور آن عامل بیماری وبا بوده و با آنتی سرم های اینابا[7] ، اگاوا[8] و هیکوچیما[9] سروتایپ[10] می شوند برخی از سویه های ویبریوکلرا 01

1-Vibrio cholera
2-Vibrio Cholera-01
3-Vibrio Cholera-Non 01
4-Biotype
5-Eltor
6-Clasical
7-Inaba
8-Ogawa
9-Hikojima

آنتروتوکسین[11] ایجاد نموده که با حمله به سلولهای پوششی روده موجب دفع شدید آب و کاهش الکترولیت های بدن می شود وچنانچه جایگزین سازی مایعات و الکترولیت ها در بدن به سرعت انجام نپذیرد ، خطر مرگ همراه دارد .

یکی از مهمترین راههای انتقال بیماری وبا به انسان ، آب آلوده به آن می باشد که با توجه به اهمیت این میکروارگانیسم در سلامت جامعه ، تدوین روشهای آزمون استاندارد و کنترل آن بویژه در تصفیه خانه ها ضرورت دارد .

آب – جستجو و شناسایی ویبریوکلرا- روش آزمون میکروبیولوژی

۱ هدف

هدف از تدوین این استاندارد ، تعیین روش جستجو و شناسایی ویبریوکلرا در آب می باشد .

۲ دامنه کاربرد

این استاندارد برای انواع مختلف آب مانند آب آشامیدنی ،آب سطحی ، آب شور و شیرین ، آبهای زیرزمینی و آب شناگاهها کاربرد دارد .

۳ مراجع الزامی

مدارک الزامی زیر حاوی مقرراتی است که در متن این استاندارد به آنها ارجاع داده شده است. بدین ترتیب آن مقررات جزئی از این استاندارد محسوب می‌شود. در مورد مراجع دارای تاریخ چاپ و / یا تجدیدنظر، اصلاحیه‌ها و تجدیدنظرهای بعدی این مدارک مورد نظر نیست. معهذا بهتر است کاربران ذینفع این استاندارد، امکان کاربرد آخرین اصلاحیه‌ها و تجدیدنظرهای مدارک الزامی زیر را مورد بررسی قرار دهند. در مورد مراجع بدون تاریخ چاپ و / یا تجدیدنظر، آخرین چاپ و / یا تجدیدنظر آن مدارک الزامی ارجاع داده شده مورد نظر است.

استفاده از مراجع زیر برای کاربرد این استاندارد الزامی است :

10-Serotype
11-Enterotoxin

۳-۱ استاندارد ملی ایران ٤٢٠٨ : سال ١٣٧٦ آئین کار نمونه برداری از آب جهت آزمونهای باکتریولوژیکی

۳-۲ استاندارد ملی ایران ٤٢٠٧ : سال ١٣٧٦ آئین کار آزمونهای باکتریولوژیکی آب

۳-۳ استاندارد ملی ایران ٢٧٤٧ : سال ١٣٨٠ آئین کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی

۴ اساس روش

این روش بر اساس تغلیظ نمونه های آب با استفاده از صافی غشایی ، غنی سازی نمونه ، کشت برروی محیط انتخابی و آزمونهای تائیدی آن می باشد .

۵ نمونه برداری

دست کم ۳ تا ۵ لیتر آب را طبق استاندارد ملی ٤٢٠٨ سال ۱۳۷۶ آئین کار نمونه برداری از آب جهت آزمونهای باکتریولوژی نمونه برداری کنید .

۶ مواد لازم

۶-۱ محیط های کشت ، معرف ها و رقیق کننده ها

۶-۱-۱ محیط کشت تیوسولفات - سیترات - نمک صفراوی - ساکارز آگار [1] (TCBS)

ترکیبات	مقدار
پپتون	۱۰ گرم
عصاره مخمر	۵ گرم
تیوسولفات سدیم	۱۰ گرم
سیترات سدیم	۱۰ گرم
پودر صفرای گاوی	۸ گرم
ساکارز	۲۰ گرم
سدیم کلراید	۱۰ گرم
سیترات آهن (۳ ظرفیتی)	۱ گرم
بروموتیمول آبی	۰/۰٤ گرم
آگار	١٤ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

1 – Thiosulfate-Citrate-Bile salt-Sucrose Agar (TCBS) .

طرز تهیه :

ترکیـــبات فوق را با جوشاندن در آب مقطر حل کنید. pH نهایی محـــیط باید برابر ۰/۱ ± ۸/۸ در دمای ۲۵ درجه سلسیوس باشد سپس در پلیت های سترون تقسیم نموده ،پس از خشک نمودن رطوبت اضافی پلیت ها ، در دمای ۴ درجه سلسیوس به صورت وارونه نگه داری کنید . این محیط باید به رنگ آبی متمایل به سبز شفاف باشد .

یاد آوری :

محیط کشت تیوسولفات – سیترات – نمک صفراوی – ساکارز آگار را نباید اتوکلاو کنید .

۶-۱-۲ آب پپتونه نمکدار قلیایی [1]

ترکیبات	مقدار
عصاره مخمر	۳ گرم
پپتون	۱۰ گرم
سدیم کلراید	۱۰ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

طرز تهیه :

ترکیبات فوق را با جوشاندن در آب مقطر حل کنید . pH نهایی محیط باید برابر۰/۲ ± ۸/٦ در دمای ۲۵ درجه سلسیوس باشد . سپس در ظروف با گنجایش ۲۵۰ میلی لیتری ، تقسیم نموده و در اتوکلاو با دمای ۱ ± ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سترون کنید .

۶-۱-۳ تریپتیک سوی آگار نمکدار [1]

1 - Alkaline Salted Peptone water .

ترکیبات	مقدار
تریپتون	۱۵ گرم
پپتون	۵ گرم
سدیم کلراید	۱۰ گرم
آگار	۱۵ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

طرز تهیه :

ترکیبات فوق را با جوشاندن در آب مقطر حل کنید. پس از تقسیم در لوله های مناسب کشت ، در ا توکلاو با دمای ۱ ± ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سترون نمائید. سپس بر روی سطح شیبدار قراردهید تا جامد شوند pH نهایی محیط پس از سترون شدن باید برابر ۰/۲ ± ۷/۳ در دمای ۲۵ درجه سلسیوس باشد .

۶-۱-۴ محیط کشت آزمون حرکت [2]

ترکیبات	مقدار
پودر عصاره گوشت	۳ گرم
پپتون	۱۰ گرم
کلرید سدیم	۵ گرم
آگار	٤ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

1 – Triptic Soy Salted Agar .
2 - Motility test .

طرز تهیه :

ترکیبات فوق را با جوشاندن در آب مقطر حل کنید. سپس در لوله های مناسب کشت به حجم های ۸ میلی لیتری تقسیم نموده و در اتوکلاو با دمای ۱ ± ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سترون کنید . pH محیط پس از سترون شدن باید برابر ۰/۱ ± ۷/٤ در دمای ۲۵ درجه سلسیوس باشد .

۶-۱-۵ معرف کواکس[1]

ترکیبات	مقدار
پارادی متیل آمینوبنز آلدئید	۵ گرم
اسید هیدروکلریدریک	۲۵ میلی لیتر
آمیل الکل	۷۵ میلی لیتر

طرز تهیه :

بنز آلدئید را در آمیل الکل حل نموده ، سپس اسید را با احتیاط به آن اضافه کنید. این محلول باید در دمای ٤ درجه سلسیوس و دور از نور نگه داری شود .

۶-۱-۶ معرف اکسیداز[2]

ترکیب	مقدار
تترامتیل پارافنیل دی آمین - هیدروکلراید	۰/۱ گرم
آب مقطر	۱۰ میلی لیتر

طرز تهیه :

ترکیب فوق را در آب مقطر حل کنید . محلول بدست آمده را می توانید تا یک هفته در دمای ٤ درجه سلسیوس نگه داری نمائید .

1- Kovacs reagent .
2- Oxidase reagent

۶-۱-۷ آبگوشت تریپتون – تریپتوفان [1]

ترکیبات	مقدار
تریپتون	۱۰ گرم
کلرید سدیم	۵ گرم
تریپتوفان	۱ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

طرز تهیه :

ترکیبات فوق را با جوشاندن در آب مقطر حل کنید. سپس در لوله های مناسب کشت به حجم های ۵ میلی لیتری تقسیم نموده و در اتوکلاو با دمای ۱ ± ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سترون کنید . pH محیط باید پس از سترون شدن برابر ۰/۱ ± ۷/۵ در دمای ۲۵ درجه سلسیوس باشد .

یاد آوری :

چنانچه محیط های کشت مورد استفاده به صورت تجارتی در دسترس باشد ، طبق دستورالعمل سازنده انجام دهید .

۷ وسایل لازم

از وسایل معمول درآزمایشگاه میکروب شناسی طبق استاندارد ملی ۲۷۴۷ سال ۱۳۸۰ آئین کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی استفاده کنید .

۸ روش اجرای آزمون

۸-۱ تغلیظ به روش صافی غشایی

۳ تا ۵ لیتر نمونه بند ۵ آب را توسط صافی غشایی با اندازه روزنه ۰/۴۵ میکرون طبق استاندارد ملی ۴۲۰۷ صاف کنید .

1- Tryptone-Tryptophane broth .

۸-۲ غنی سازی نمونه

صافی غشایی بند ۸-۱ را با رعایت شرایط سترونی ، در محیط آب پپتونه نمکدار قلیایی بند ٦-۱-۲ ، غوطه ور کنید ، سپس در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ٦ تا ۱۸ ساعت گرمخانه گذاری نمائید .

۸-۳ کشت بر روی محیط انتخابی

با استفاده از حلقه کشت سترون ، از محیط کشت بند ۸-۲ برداشت نموده و بر روی محیط کشت تیوسولفات – سیترات – نمک صفراوی – ساکارز – آگار بند ٦-۱-۱ به صورت خطی کشت دهید . سپس پلیت ها را در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۸ تا ۲٤ ساعت گرمخانه گذاری نمائید .

۸-۴ بررسی پلیت ها

پس از پایان مدت گرمخانه گذاری ، پلیت ها را بررسی کنید . ایجاد کلنی های زرد رنگ نشانگر تخمیر ساکارز و وجود ویبریوکلرای فرضی می باشد که برای تائید آن باید آزمون های تائیدی انجام شود .

۸-۵ آزمون های تائیدی

۸-۵-۱ جهت انجام آزمون های تائیدی لازم است ابتدا کشت جوان (تازه) تهیه نمائید . برای این منظور پنج کلنی زرد رنگ از بند ۸-٤ انتخاب کنید. اندازه کلنی ها بهتر است بین یک تا سه میلی متر باشد. سپس توسط حلقه کشت سترون بر روی محیط کشت غیر انتخابی مانند تریپتک سوی آگار نمکدار بند ٦-۱-۳ بصورت خطی کشت دهید . پس از گرمخانه گذاری در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ٢٤ ساعت ، آزمون های تأییدی را انجام دهید.

۸-۵-۱-۱ آزمون حرکت

توسط حلقه کشت سترون از کلنی بند ۸-۵-۱ برداشت نموده و بصورت مستقیم تا عمق ۵ میلی متری آگار محیط کشت آزمون حرکت بند ٦-۱-٤ وارد کنید. سپس در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ٢٤ ساعت گرمخانه گذاری نمائید . پس از پایان این مدت ، چنانچه واکنش مثبت باشد علائم رشد را در اطراف سوزن کشت می توانید مشاهده کنید.

آزمون حرکت ویبریوکلرا 01 مثبت است .

یادآوری :

چنانچه در مدت فوق رشدی مشاهده نگردید ، گرمخانه گذاری را تا پنج روز دیگر در دمای ۲۲ تا ۲۵ درجه سلسیوس ادامه دهید .

۸-۵-۱-۲ آزمون ایندول [1]

توسط حلقه کشت سترون از کلنی بند ۸-۵-۱ برداشت نموده و به لوله حاوی آبگوشت تریپتون- تریپتوفان بند ٦-۱-۷ تلقیح کنید . سپس لوله ها را در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ٢٤ ساعت گرمخانه گذاری نمائید .

پس از پایان مدت گرمخانه گذاری ، به لوله های فوق مقدار ۰/۲ تا ۰/۳ میلی لیتر از معرف کواکس بند ٦-۱-۵ فزوده و مخلوط کنید.تشکیل حلقه قرمزرنگ نشان دهنده واکنش مثبت می باشد .

آزمون ایندول ویبریوکلرا 01 مثبت است .

۸-۵-۱-۳ آزمون اکسید از

۲تا ۳ قطره معرف اکسیداز بند ٦-۱-٦ بر روی کاغذ صافی بریزید . سپس توسط حلقه کشت سترون از کلنی بند ۸-۵-۱ برداشت نموده و به کاغذ آغشته به معرف اکسیداز اضافه کنید. ظهور رنگ ارغوانی مایل به آبی تیره در مدت ۱۰ ثانیه را ، به عنوان واکنش مثبت در نظر بگیرید .

1- indol Test .

آزمون اکسیداز ویبریوکلرا 01 مثبت است .

۸-۵-۱- ۴ آزمون میکروسکوپی

توسط حلقه کشت از کلنی بند ۸-۵-۱ برداشت نموده و بر روی یک لام تمیز گستره تهیه کنید . پس از ثابت نمودن لام ، به روش گرم[1] رنگ آمیزی نموده و توسط میکروسکوپ با بزرگنمایی ۱۰۰ برابر و استفاده از روغن سدر بررسی کنید .

ویبریوکلرا 01 باسیل های گرم منفی خمیده شکل هستند .

یادآوری :

توصیه می شود برای شناسایی زیر گروه های ویبریوکلرا 01 از روشهای سرولوژیکی معتبر استفاده کنید.

۹ بیان نتایج

با توجه به آزمون های تأییدی (طبق بند ۸-۵) این استاندارد نتایج را به صورت "ویبریوکلرا 01 در ۳ تا ۵ میلی لیتر نمونه آب مشاهده گردید" و یا "ویبریوکلرا 01 در ۳ تا ۵ میلی لیتر نمونه آب مشاهده نگردید" بیان کنید.

۱۰ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید دارای آگاهی های زیر باشد :

۱-۱۰ مشخصات کامل نمونه مانند نوع نمونه ، تاریخ و محل نمونه برداری ، تاریخ ارسال نمونه به آزمایشگاه

۲-۱۰ روش آزمون طبق استاندارد ملی..... .

۳-۱۰ بیان نتایج طبق بند ۹ این استاندارد

۴-۱۰ سایر اطلاعات که مرتبط با روش آزمون باشد .

1- Gram .

Institute of Standards and Industrial Research of Iran

ISIRI NUMBER

7223

Water –Detection and identification of vibrio cholera- Microbiological test method

1st. Revision