www.abpsoil.com
ابنیه پایدار سبز

ISIRI
7024-3
1st. edition

جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran
مؤسسه استاندارد وتحقیقات صنعتی ایران
Institute of Standards and Industrial Research of Iran

استاندارد ملی ایران
۷۰۲۴-۳
چاپ اول

کیفیت آب – جستجو و شمارش باکتریوفاژها- قسمت سوم : اعتبار بخشی روش های تغلیظ باکتریوفاژ ها از آب

Water quality-Detection and enumeration of bacteriophages- Part 3: Validation of methods for concentration of bacteriophages from water

ICS:07.100.20

به‌نام خدا

آشنایی با مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب بند یک مادهٔ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفه تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) ایران را به عهده دارد.

تدوین استاندارد در حوزه های مختلف در کمیسیون های فنی مرکب از کارشناسان مؤسسه* صاحب نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می شود وکوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانهٔ صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف‌کنندگان، صادرکنندگان و وارد کنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان های دولتی و غیر دولتی حاصل می شود .پیش نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی نفع و اعضای کمیسیون های فنی مربوط ارسال می‌شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادها در کمیتهٔ ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب به عنوان استاندارد ملی(رسمی) ایران چاپ و منتشر می شود.

پیش نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان های علاقه مند و ذیصلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می کنند درکمیتهٔ ملی طرح و بررسی و درصورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می شود .بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می شود که بر اساس مفاد نوشته شده در استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تدوین و در کمیتهٔ ملی استاندارد مربوط که مؤسسه استاندارد تشکیل می‌دهد به تصویب رسیده باشد.

مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران از اعضای اصلی سازمان بین المللی استاندارد (ISO)[1] کمیسیون بین المللی الکتروتکنیک (IEC)[2] و سازمان بین المللی اندازه شناسی قانونی (OIML)[3] است و به عنوان تنها رابط[4] کمیسیون کدکس غذایی (CAC)[5] در کشور فعالیت می کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی های خاص کشور، از آخرین پیشرفتهای علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بینالمللی بهره‌گیری می‌شود.

مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران می تواند با رعایت موازین پیش بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشو ر و / یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری نماید. مؤسسه می تواند به منظور حفظ بازارهای بین المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری نماید. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده کنندگان از خدمات سا زمانها و مؤسسات فعال در زمینهٔ مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدورگواهی سیستم های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست-محیطی، آزمایشگاه ها و مراکز کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش ، مؤسسهٔ استاندارد این گونه سازمان ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامهٔ تأیید صلاحیت به آن ها اعطا و بر عملکرد آنها نظارت می کند .ترویج دستگاه بین المللی یکاها، کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این مؤسسه است.

---

* موسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

1- International Organization for Standardization
2 - International Electro technical Commission
3- International Organization for Legal Metrology (Organization International de Metrology Legal)
4 - Contact point
5 - Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

کیفیت آب – جستجو و شمارش باکتریوفاژها- قسمت سوم : اعتبار بخشی روش های تغلیظ باکتریوفاژ ها از آب

رئیس:	**سمت و/ یا مایندگی**
رحیمی فرد، ناهید (دکتری تخصصی میکروب شناسی)	وزارت بهداشت ، درمان و آموزش پزشکی- اداره کل آزمایشگاههای کنترل و مرکز تحقیقات غذا و دارو
دبیر:	
زرسازی ،گیتا (لیسانس صنایع)	موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
اعضاء: (اسامی به ترتیب حروف الفباء)	
اسکندری ، صغری (فوق لیسانس زیست شناسی)	سازمان حفاظت محیط زیست
زند وکیلی ، فاطمه (فوق لیسانس علوم بهداشتی در تغذیه)	موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
سرگزی ، مریم (لیسانس میکروب شناسی)	شرکت آبفای شهرها و شهرک های غرب تهران
صمیعی، بیتا (لیسانس میکروبیولوژی)	اداره کل استاندارد و تحقیقات صنعتی استان تهران
ضرغا مپور ، زهره (فوق لیسانس میکروب شناسی)	شرکت آب و فاضلاب شهر تهران
سعادتی ، شهلا (لیسانس تغذیه)	وزارت بهداشت ، درمان و آموزش پزشکی- اداره کل آزمایشگاههای کنترل و مرکز تحقیقات غذا و دارو
نوری ، زهرا (لیسانس میکروب شناسی)	وزارت بهداشت ، درمان و آموزش پزشکی- اداره کل آزمایشگاههای کنترل و مرکز تحقیقات غذا و دارو

فهرست مندرجات

عنوان	صفحه
آشنایی با مؤسسه استاندارد	ج
کمیسیون فنی تدوین استاندارد	د
پیش گفتار	و
۱ هدف و دامنه کاربرد	۱
۲ مراجع الزامی	۱
۳ اصطلاح و تعریف	۲
۴ اصول آزمون	۲
۵ مواد و/ یا واکنشگر ها	۲
۶ وسایل	۳
۷ نمونه برداری	۳
۸ مراحل انجام آزمون	۶
۹ بیان نتایج	۹
۱۰ گزارش نتایج	۹
۱۱ پیوست (ا لف)	۱۱
۱۲ پیوست (ب)	۱۴

پیش‌گفتار

استاندارد " کیفیت آب – جستجو و شمارش باکتریوفاژها - قسمت سوم : اعتبار بخشی روش های تغلیظ باکتریوفاژ ها از آب" که پیش‌نویس آن درکمیسیون‌های مربوط توسط مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران تهیه و تدوین شده و دردویست و بیست و ششمین اجلاس کمیتهٔ ملی میکروبیو لوژی و بیولوژی مورخ ۸۷/۱۱/۲۶ مورد تصویب قرار گرفته است ، اینک به استناد بند یک مادهٔ ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱، به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

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

منبع و مأخذی که برای تهیهٔ این استاندارد مورد استفاده قرار گرفته به شرح زیر است:

ISO 10705-3, 2003 : Water quality-Detection and enumeration of bacteriophages- Part 3: Validation of methods for concentration of bacteriophages from water .

کیفیت آب - جستجو و شمارش باکتریوفاژها- قسمت سوم : اعتبار بخشی روش های تغلیظ باکتریوفاژ ها از آب

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، تعیین اصول کلی برای ارزیابی کارایی روش های تغلیظ باکتریو فاژ ها از آب ، می باشد.

تغلیظ برای نمونه های کمتر از ۳pfp باکتریوفاژ در ۱ ml آب ،کاربرد دارد.

روش های تغلیظ برای آب هایی که مواد معلق یا محلول در آن ها درعملیات تغلیظ تداخل ایجاد نمی کنند ، کاربرد دارد .

یادآوری ۱ – در این استاندارد به جزئیات و ویژگی های روش های تغلیظ اشاره نشده است .

یادآوری ۲ – برای کسب آگاهی بیشتر در خصوص روش های تغلیظ باکتریو فاژ ها از آب ، با توجه به حجم ، کدورت و ذرات آب به پیوست اطلاعاتی الف مراجعه شود .

۲ مراجع الزامی

مدارک الزامی زیر حاوی مقرراتی است که در متن این استاندارد ملی ایران به آن ها ارجاع داده شده است. بدین ترتیب آن مقررات ، جزئی از این استاندارد ملی ایران محسوب می شود.

در صورتی که به مدرکی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد ، اصلاحیه ها و تجدیدنظرهای بعدی آن مورد نظر این استاندارد ملی ایران نیست. در مورد مدارکی که بدون ذکر تاریخ انتشاربه آن ها ارجاع داده شده است ، همواره آخرین تجدیدنظر و اصلاحیه های بعدی آن ها مورد نظر است .

استفاده از مراجع زیر برای این استاندارد الزامی است :

۲-۱ استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹ ، میکروبیولوژی موادغذایی وخوراک دام - راهنمای الزامات کلی برای آزمون

۲-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۱-۸۹۲۳ ، میکروبیولوژی موادغذایی وخوراک دام – آماده سازی آزمایه - سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری برای آزمون های میکروبیولوژی – قسمت اول : مقررات کلی برای آماده سازی سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری

۲-۳ استاندارد ملی ایران شماره ۲-۸۹۲۳ ، موادغذایی وخوراک دام – آماده سازی آزمایه - سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری برای آزمون میکروبیولوژی های میکروبیولوژی – قسمت دوم : مقررات ویژه برای آماده سازی گوشت و فراورده های آن

۲-۴ استاندارد ملی ایران شماره ۱-۸۶۶۳ ، میکروبیولوژی خوراک انسان و دام – قسمت اول – راهنمای عمومی تضمین کیفیت برای آماده سازی محیط های کشت در آزمایشگاه

۲-۵ استاندارد ملی ایران شماره ۲-۸۶۶۳ ، میکروبیولوژی خوراک انسان و دام- راهنمای آماده سازی و تولید محیط های کشت – قسمت دوم – راهنمای عملی برای آزمون محیط های کشت

۲-۶ استاندارد ملی ایران شماره ۴۲۰۸ ، آئین کار نمونه برداری از آب جهت آزمون های باکتریولوژیکی

۲-۷ استاندارد ملی ایران شماره ۴۲۰۷ ، آیین کار آزمون های باکتریولوژیکی آب

۲-۸ استاندارد ملی ایران شماره ۱۷۲۸، آب مورد مصرف در آزمایشگاه تجزیه – ویژگی ها و روش های آزمون

۲-۹ استاندارد ملی ایران شماره ۱- ۷۰۲۴، کیفیت آب- جستجو و شمارش باکتریوفاژها- قسمت اول - شمارش باکتریوفاژهای ریبونوکلئیک اسید(RNA) اختصاصی F

۲-۱۰ استاندارد ملی ایران شماره ۷۰۲۴، کیفیت آب- جستجو و شمارش باکتریوفاژها- قسمت دوم - شمارش کلی فاژ های سوماتیک – روش آزمون

۳ اصطلاح و تعریف

در این استاندارد اصطلاح و تعریف زیر به کار می رود :

۳-۱

باکتریوفاژ

منظور ، ویروس های باکتریایی هستند که توانایی آلوده سازی سوش میزبان انتخابی را دارند .

یادآوری- باکتریوفاژها در شرایط مناسب، پلاک های قابل مشاهده (هاله های شفاف) در لایه های کشت سوش میزبان ، ایجاد می کنند .

۴ اصول روش آزمون

این روش بر مبنای روش انتخابی برای تغلیظ باکتریوفاژها ، از یک حجم نسبتا زیاد نمونه (۱۰۰ m/l) به یک حجم کمتر نمونه (تا ۲۰ m/l) می باشند .

نمونه تغلیظ شده مطابق با استاندارد ملی ایران شماره های (۱- ۷۰۲۴ و۷۰۲۴) برای شناسایی باکتریوفاژها آزمون می شوند .

۵ مواد و/ یا واکنشگر ها

برای تهیه محیط های کشت از مواد شیمیایی با کیفیت یکسان و دارای درجه ی خلوص آزمایشگاهی استفاده کنید .

برای محیط های کشت باید از آب مقطر و یا آب یون زدایی شده و فاقد مواد ممانعت کننده از رشد میکروارگانیسم ها استفاده شود. آب مورد استفاده باید دارای درجه۳ مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۱۷۲۸ باشد .

۵-۱ محلول رقیق کننده

از محلول پپتون نمکی و یا دیگر رقیق کننده های مناسب مطابق با استاندارد های ملی ایران شماره ۱- ۸۹۲۳ و۲-۸۹۲۳ استفاده کنید .

۵-۲ محیط های کشت

از محیط های کشت مطابق با استاندارد های ملی ایران شماره های ۱- ۷۰۲۴ و۷۰۲۴ استفاده کنید.

۵-۳ گلیسرول

گلیسرول با جرم حجمی $^{g}/_{lit}$ ۸۷۰ را در ظروف مناسب بریزید و آن را در دمای ^{oC}(۳ ± ۱۲۱) به مدت زمان ۱۵ دقیقه اتوکلاو کنید . گلیسرول فوق را در تاریکی و دمای اتاق تا مدت زمان ۱ سال می توانید نگهداری کنید.

۶ وسایل

از وسایل معمول در آزمایشگاه میکروب شناسی مطابق با استاندارد های ملی ایران شماره های ۹۸۹۹ و ۱- ۷۰۲۴ و۷۰۲۴ استفاده کنید .

وسایل شیشه ای باید پیش از استفاده ، ضد عفونی شوند. همچنین توصیه های ایمنی مناسب را در خصوص محلول های ضد عفونی کننده به کار برید .

برخی از مراحل فرایند تغلیظ ممکن است سبب فشار پنو ماتیک [۱] یا هیدرو استاتیک [۲] شوندکه ممکن است چندین ساعت به طول انجامد .

۷ نمونه برداری

نمونه برداری باید مطابق با استاندارد های ملی ایران شماره های ۴۲۰۷ و ۴۲۰۸ و ۸۱۹۹ انجام گیرد .

۷-۱ نمونه های تا حجم L ۱۰ به طور معمول به آزمایشگاه انتقال داده می شوند .برای حجم های بیشتر باید اولین مرحله تغلیظ در محل انجام شود .

۱ - Pneumatic
2 -Hydrostatic

۷-۲ چنانچه آزمون های موازی برای باکتری های شاخص یا دیگر میکرو ارگانیسم ها انجام می شود ، برای این آزمون نمونه را به صورت منقطع و ترجیحا بوسیله پرکردن بطری توسط دستگاه تغلیظ با جریان یک طرفه انجام دهید . مواد صاف شده ها ، رسوبات یا مشتقات دیگر از اولین مرحله تغلیظ به عملیات بهسازی کمک می کند .

۷-۳ روش اعتبار بخشی باید شامل شرایط نگهداری نمونه و انتقال مرحله میانی فرایند تغلیظ باشد .
اعتبار بخشی روش طبق اصول آزمون در این استاندارد انجام می گیرد . مراحل اعتبار بخشی شامل تعیین احیای باکتریو فاژ ها از یک سری نمونه ها می باشد که در آب های آلوده طبیعی کشت داده شده اند (آ ب خام یا فاضلاب تصفیه شده) .

۷-۴ احیای باکتریو فاژ ها در محدوده معینی از حجم ارزیابی می شود که به تجدید پذیری آن باید توجه خاص شود .

۷-۵ در اعتبار دهی روش های تغلیظ باکتریوفاژها باید از کارکنان دارای تجربه و مهارت کافی استفاده شود.

یادآوری ۱ – در نگهداری نمونه ، حمل و نقل ، شرایط ذخیره سازی و حفظ نمونه باید دقت کافی شود .

۸ آماده سازی نمونه های فاضلاب برای اسپایکینگ [۱] (شاهد مثبت)

۸-۱ تغلیظ نمونه

۸-۱-۱ نمونه های فاضلاب اولیه و یا ثانویه (تصفیه بیولوژیکی شده) را با ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت زمان ۲۰ دقیقه سانتریفوژ کنید یا آن را از صافی غشایی µm (۱۲تا ۸) صاف کنید . مایع رویی یا صاف شده را روی یخ نگهداری کنید .

۸-۱-۲ باکتریوفاژهای هدف را طبق روش انتخاب شده استاندارد های ۱- ۷۰۲۴ و۷۰۲۴ در ۱ ml از حجم نمونه شمارش کنید .چنانچه لازم باشد نمونه ها را برای به دست آوردن pfρ/ml (۶۰ تا ۲۰۰) رقیق کنید .

۸-۱-۳ گلیسرول را به مقدار ٪ ۵ به محلول فوق اضافه و به خوبی مخلوط کنید . سپس ۱۰ml از آن را در ویال های پلاستیکی یا لوله های سترون توزیع کنید و در دمای °C (۵ ± ۲۰-) یا °C (۱۰ ± ۷۰-) منجمد کنید .

1- Spiking

۸-۱-۴ برای هر نمونه دو ویال از فریزر خارج نموده در دمای آزمایشگاه قرار دهید تا ذوب شود . از هر ویال ، دو نمونه ی ۰/۵ ml برای تعیین باکتریوفاژهای هدف مورد آزمون قرار دهید . میانگین حدود شمارش باکتریوفاژها باید بین $^{\rho f\rho}/_{ml}$ (۳۰ تا ۱۰۰) در هر پلیت باشد .

آزمون یکنواختی شمارش بین و در لوله ها مطابق با فرمول (۱) .

$$T_1 = \sum_{i=1}^{I}\sum_{j=1}^{J}\left[\left(Z_{ij} - \frac{Z_{i+}}{J}\right)^2 \Big/ \left(\frac{Z_{i+}}{J}\right)\right]$$

که در آن :

T_1 آزمون توزیع آماری کوچران [1] برای تعیین اختلاف در ρfρ در یک ویال با ویال مرجع است ؛

Z_{i+} شمارش کل پلاک ها از دو نمونه برداشتی از یک ویال به صورت کشت دو پلیتی ؛ $Zi+ = \sum_{j=1}^{I} = ij$

I تعداد ویال یا لوله ها (در این مورد ۲ است) ؛

J تعداد دوپلیکیت ها [1](در این مورد ۲ است) ؛

درجه آزادی برای T_1 معادل است با $Df_{T1} = I(J-1)$ ؛

که در این حالت ، ۲=(۱ - ۲) ۲ = Df .

$$T_2 = \sum_{j=1}^{J}\left[\left(Z_{i+} - \frac{Z_{++}}{I}\right)^2 \Big/ \left(\frac{Z_{++}}{I}\right)\right]$$

که در آن :

T_2 آزمون توزیع آماری کوچران برای تعیین اختلاف در ρfρ ویال های مختلف با ویال مرجع ؛

Z_{tt} شمارش کل پلاک ها برای تمام ویال ها و دوپلیکیت ها [2] است ؛

درجه آزادی برای T_2 معادل است با $Df_{t2} = I- 1(Df_{t2} =2-1=1)$.

چنانچه فاژها به صورت تصادفی (اتفاقی) در بین دو ویال یا داخل یک ویال توزیع شده باشند ، T_1 و T_2 تقریبا از یک توزیع χ^2 به ترتیب با درجه آزادی ۱ و ۲ پیروی می کنند . نمونه ها یی از ویال ها قابل قبول هستند که ، $T_2<3.84,0.01<T_1<5.99$ باشند. (به پیوست ب مراجعه شود)

1- cochran

2- *Duplicate*

یادآوری – کلی فاژهای سوماتیک ، باکتریوفاژهای RNA اختصاصی F و باکتریوفاژهای آلوده کننده ی *باکتروئیدس فراژیلیس* به طور طبیعی در فاضلاب های تصفیه نشده (خام) وجود دارند و چنانچه با گلیسرول ٪ ۵ ترکیب شوند ، در دمای $^{\circ}C$(۵ ± ۲۰-) و یا ترجیحا $^{\circ}C$(۱۰ ± ۷۰-) تا مدت یک سال می توانند، بدون تغییری در تعداد آن ها، فعال باقی بمانند .

۹ مراحل انجام آزمون

۹-۱ آماده سازی نمونه ی اسپایک شده (شاهد مثبت)

۹-۱-۱ نمونه ها را از انواع آب طبق دامنه ی کار برد و بر اساس بند ۷ این استاندارد آماده کنید .

۹-۱-۲ برای هر نوع نمونه آب حداقل ۵ نمونه انتخاب کرده آن ها را بررسی کنید .

۹-۱-۳ از بیشترین حجم غلظتی (V_{MAX}) استفاده کنید که توسط روش تغلیظ ارزیابی شده باشد .

۹-۱-۴ برای اعتبار دهی روش ، حجم نمونه باید حد اقل سه برابر حجم 3×VMAX باشد . همچنین نمونه هایی با حجم های زیر تهیه کنید :

- $0.125\times V_{MAX}$
- $0.250\times V_{MAX}$
- $0.500\times V_{MAX}$
- V_{MAX}

۹-۱-۵ به هر یک از حجم های تهیه شده فوق مقدار ml ۱از اسپایک ماده مرجع بند ۸ که به دمای آزمایشگاه رسیده است اضافه کنید . سپس باقیمانده ماده مرجع را روی یخ ذوب شده نگهداری کنید .

۹-۲ روشهای تغلیظ همزمان

۹-۲-۱ نمونه ها را از انواع آب طبق دامنه ی کار برد و بر اساس بند ۷ این استاندارد آماده کنید

۹-۲-۲ نمونه ها را در روزها ، فصل ها ، و شرایط آب و هوایی مختلف بررسی کنید .

۹-۲-۳ حداقل ۵ نمونه برای هر نوع نمونه آب انتخاب کرده آن ها را بررسی کنید .

۹-۲-۴ از بیشترین حجم غلظتی (V_{MAX}) استفاده کنید که توسط روش تغلیظ ارزیابی شده باشند .

۹-۲-۵ نمونه هایی با حجم های زیر تهیه کنید :

- $0.125\times V_{MAX}$
- $0.250\times V_{MAX}$
- $0.500\times V_{MAX}$
- V_{MAX}

۹-۲-۶ هر یک از حجم ها ی فوق را مطابق با بند ۸-۱ تغلیط کنید .

۹-۲-۷ ۱ml از نمونه اسپایک ماده مرجع بند ۸ که به دمای آزمایشگاه رسیده است را تا حجم ۱۰ ml رقیق کنید .سپس بگذارید تا به شرایط پایدار برسد .

۹-۲-۸ کل حجم رقیق شده فوق را با مقدار ۰/۱ اسپایک در دستگاه تغلیظ بریزید.

۹-۲-۹ کل حجم فوق را به ۴ قسمت یکسان تقسیم کنید .سپس بـه هـر کـدام از آن هـا مقـادیر $(1/5)$ از نمونه را اضافه کنید .

۹-۳ ارزیابی مجدد (میزان احیا)[1]

۹-۳-۱ نمونه های اسپایک را مطابق با روش تغلیظ نمونه انجام دهید . سپس کل حجم های تغلیظ شده نهایی را به قسمت های ۱ml تقسیم کنید .

یادآوری – بهتراست هرگونه باکتریوفاژ اضافی (باقیمانده روی صافی) در سطح نمونه تغلیظ شده تا جایی که ممکن است بررسی شوند .

۹-۳-۲ همزمان با روش فوق دو قسمت ۰/۵ ml از اسپایک را ارزیابی کنید . مقادیر به دست آمده باید برای محاسبه کارآیی تغلیظ محاسبه شوند که به تعیین تعداد فاژهایی که در حجم های مختلف تغلیظ شده است و همچنین به محاسبه T_1 و T_2 از هر ویال و یا ویال هایی مختلف کمک می کند .

۹-۳-۳ چنانچه بیشتر از ٪ ۲۰ $(1/5)$ نمونه های اسپایک به طور کامل با مقادیر قابل قبول T_1 و T_2 نتایج ارزیابی مطابقت نداشته باشند ، و ماده اسپایک را دور بریزید .

۹-۳-۴ چنانچه کمتر از ٪۲۰ $(1/5)$ نمونه های اسپایک به طور کامل با مقادیر قابل قبول T_1 و T_2 نتایج ارزیابی مطابقت نداشته باشند ، نتایج ارزیابی صحیح نمی باشد و ارزیابی را مجدداً انجام دهید .

یادآوری - نتایج غیر عادی بدست آمده ، مشخصه اندازه گیری میکروبیولوژی است ، بنابراین ترجیحا برای صرفنظر کردن از این نوع مقادیر از آزمون آماری دیکسان [2] استفاده کنید .

.۹-۳-۵ حداقل ۵ آزمون متوالی (اسپایک) پیش از آزمون نمونه اصلی باید تایید شده باشد .

۹-۳-۶ چنانچه نمونه آب ، مشکوک به باکتری های میزبان فاژها باشند ، تعداد فاژهای زمینه را شناسایی و شمارش کنید .

۹-۳-۷ چنانچه تعداد فاژها بیشتر از ٪۲۰ از فاژهای اسپایک باشند ، ابتدا آب مورد آزمون را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای $۸۰^{o}C$ حرارت دهید و پیش از استفاده آن را سرد کنید .

۹-۳-۸ چنانچه تعداد باکتریوفاژهای موجود در آب طبیعی کمتر از ٪۲۰ از فاژهای اسپایک باشند آن ها را شمارش و در تجزیه و تحلیل داده ها منظور کنید .

1- Recovery
2- Dixan

۱۰ محاسبه

۱۰-۱ میزان احیا η را بر حسب درصد مطابق با فرمول (۲) محاسبه کنید :

فرمول (۲)

$$\eta = N_C / N_S \times 100\ \%$$

۱۰-۲ چنانچه نمونه بطور طبیعی با باکتریوفاژ ها آلوده شده باشند ، از فرمول (۳) استفاده کنید :

فرمول (۳)

$$\eta = (N_C - N_{NO}) / N_S \times 100\ \%$$

که در آن :

N_C تعداد کل پلاک های به دست آمده از یک غلظت .

N_S تعداد پلاک ها از یک ۱ ml ماده اسپایک .

N_{NO} تعداد طبیعی باکتریو فاژ ها در نمونه آب .

۱۰-۳ برای کل حجم های آزمایش شده ، میانگین آماری احیا ($\bar{x}$) را محاسبه کنید .

۱۰-۴ انحراف استاندارد (s) و حدود اطمینان را محاسبه کنید .

۱۰-۵ شواهد تجربی نشان می دهد که میزان احیا از یک توزیع نرمال پیروی می کند.

برای به دست آوردن تخمین بهتر از حدود اطمینان از فرمول ۴ استفاده کنید :

فرمول (۴)

$$\left\{ \bar{x} - \frac{ts}{\sqrt{n}} ; \bar{x} + \frac{t\chi}{\sqrt{n}} \right\}$$

که در آن :

$\bar{x}$ میانگین حسابی احیا .

S انحراف معیار.η

n تعداد مقادیرη .

t فاصله میزان توزیع t (مقادیر t برای ترکیبات مختلف از حدود اطمینان و درجه آزادی که از جداول توزیع T حاصل می شود).

چنانچه n=۵ و درجه آزادی برابر ۴ و ضریب اطمینان ٪۹۵ باشد ، t = ۲۷۷۶ است .
منحنی η را به اضافه ضریب اطمینان در مقابل حجم نمونه رسم کنید.
چنانچه ضریب اطمینان η برای حجم های مختلف همپوشانی داشته باشد، نمودار به صورت خطی رسم می شود و حجم نمونه در آن تاثیری نخواهد داشت .
چنانچه حجم نمونه مورد آزمون در محاسبه موثر باشد ، حداکثر حجم نمونه را که باید تغلیظ شود تعیین کنید .

یادآوری – بهتر است روی ترکیبی از نتایج به دست آمده از حجم های مختلف ، محاسبات آماری مانند میانگین[1] η- انحراف معیار ($\overline{X}$) و انحراف معیارنسبی ($S / \overline{X}$) را انجام دهید . میانگین μ با تمام داده ها ، تخمینی بهتر برای ارزیابی بهبود روش می باشد .

انحراف معیار نسبی ($S / \overline{X}$) قابلیت اطمینان روش را مشخص می کند . چنانچه روش قابل اطمینان است که $S / \overline{X}$ کمتر از ۰/۵ باشد . برای مثال در مورد مراحل صحه گذاری که در بند ۹ شرح داده شده است و بیان نتایج به پیوست اطلاعاتی ب مراجعه کنید.

توصیه می شود : استفاده کنندگان از این روش ، منحنی را به صورت نمودار راهنما داشته باشند

۱۱ تجزیه و تحلیل کیفی آزمون

چنانچه آزمون به صورت مداوم انجام می شود ، ارزیابی را مطابق با بند ۹ این استاندارد ، به طور منظم تکرار کنید . نتایج آزمون را در V_{MAX} ۰/۵ تجزیه و تحلیل کنید .

یادآوری – حداقل پیش از استفاده از هر سری جدید از مواد اساسی(بحرانی) ، صافی ها و آزمون ، ارزیابی را تکرار کنید .

۱۲ بیان نتایج

نتایج را به صورت " تعداد باکتریو فاژ ها در نمونه یافت شد ، یا یافت نشد " بیان کنید .

۱۳ گزارش نتایج

گزارش آزمون باید دارای آگاهی های زیر باشد :
۱۳- ۱ مشخصات کامل نمونه شامل نوع و حجم نمونه.
۱۳ - ۲ تاریخ نمونه برداری و تاریخ ارسال نمونه به آزمایشگاه .
۱۳- ۳ تاریخ انجام آزمون .

---

[1]- *mean*

۱۲- ۴ روش آزمون طبق این استاندارد ملی ایران.

۱۳- ۵ بیان نتایج طبق بند ۱۰ این استاندارد .

۱۳- ۶ نام و نام خانوادگی و امضاء آزمایش کننده .

۱۳- ۷ سایر اطلاعات مربوط به روش آزمون .

۱۳- ۸ روش مرجع برای ارزیابی باکتریوفاژ.

۱۳ -۹ روش مرجع برای روش تغلیظ .

۳-۱۰ سایر اطلاعات و جزئیات غیر معمول ممکن است در میزان احیا موثر باشد (کدورت ، رشد جلبک های تشکیل شده در سطح ، رنگ وغیره).

پیوست الف

روش های پیشنهاد شده برای تغلیظ سازی باکتریوفاژ ها از آب (بسته به حجم ، کدورت و ذرات داخل آب)

الف – ۱ روش جذب پاکیزه سازی با استفاده از صافی های یون مثبت [1](روش Logan)

این روش برای انواع و حجم های مختلفی از نمونه (بین L ۱۰ تا ۱۰۰) پیشنهاد شده است که در آن از فرایند بچ یا صاف سازی داخلی استفاده می شود .
چنانچه کدورت نمونه زیاد باشد به گونه ای که منجر به گرفتگی منافذ صافی در حجم های توصیه شده برای صاف سازی گردد، عملیات پیش صاف سازی را با استفاده از صافی هایی با منافذ : بطور مثال µ (۱و ۵ و۱۰) انجام دهید .

۱-۱ شستن پیش صافی ها برای پاکیزه سازی صافی های یون مثبت

PH آب را در محدوده (۵/۵ تا ۶) با افزودن (Hcl ۱ mol /L) و یا (NaoH ۱ mol /L) با همزدن بطور مداوم و تزریق آن تنظیم کنید .
فاژها را به وسیله ی گذراندن از صافی های یون مثبت جذب کنید (صافی های یون مثبت از قبیل AMF-CUNO Zeta plus series) می باشد.
فاژهای باند شده را با حجمی از محلول شستشودهنده بشوئید. روش وحجم بستگی به صافی های مورد استفاده دارد. برای مثال : سطح صافی با اندازه ۵۰mm را با ml (۱۵ تا۱۰) یا صافی های کارتریجی با ml(۱۰۰تا۵۰۰) محلول شستشودهنده با مکش کم پس از ۱۰ دقیقه شستشو انجام می شوند.
یکی از محلول های زیر را برای شستشو انتخاب کنید :

– ۵ mmol /L آرژینین ، ٪ ۱-۳ عصاره ی گوشت، PH محیط در محدوده ی ۹ تنظیم شود؛

–Nacl ۰/۵ mol /L ، ٪۴ عصاره ی گوشت ، محیط PH در محدوده ی ۹ تنظیم شود؛

– ٪ ۱/۵ عصاره ی گوشت ، ٪۱ پلی اکسیتیلن سوربیتان مونولئات[2]، PH محیط در محدوده ۹ تنظیم شود؛

PH نهایی محیط فوق را در محدوده ی ۷ تنظیم کنید؛
برای حجم های زیاد شستشو، از دوباره تغلیظ سازی با استفاده از صافی اولترافیلتراسیون[3] با توده ی مولکولی نسبی ۱۰۰۰۰ استفاده کنید.

۱- *Electropositive filters*

۲- *Polyoxyethylene Sorbitan monooleate (Tween ۸۰)*
۳- *Ultrafiltration*

الف – ۲ صافی غشایی (روش Sobsey)

این روش برای تغلیظ سازی شمارش کلی فاژهای اختصاصی RNA[1] و با اصلاحات برای بهبود بخشیدن بازیافت حجم های بیشتر از ۱۰۰ ml می باشد.
توصیه می شود این روش را برای حجم های (۱۰۰ ml تا ۱۰۰۰) با کدورت کمتر از NTU ۰/۲ [2] بکار برید .

۲-۱ تغلیظ سازی باکتریوفاژ ها از ۱L آب

۱-۲-۱ کلرید منیزیم[1] را به نمونه آب تا رسیدن غلظت ۰/۵ ml /L اضافه کنید .
۱-۲-۲ نمونه را از صافی غشایی که با استر های سلولزی ترکیب شده (از جنس سلولز نیترات و سلولز استات) با منافذ ۰/۲۲ µ و قطر ۴۷ mm صاف کنید. صاف سازی ۱ L آب در مدت زمان ۳۰ دقیقه انجام شود .
۱-۲-۳ غشای صافی را به ۸ قسمت ببرید و آن ها را در یک محفظه ی شیشه ای حاوی ۵ m L محلول شستشو (۱٪ عصاره گوشت ، ۰/۵ mol /L Nacl و ۳٪ توین ۸۰) قرار دهید. سپس محفظه ی شیشه ای را داخل حمام شستشو دهنده اولتراسوند به مدت زمان ۴ دقیقه قرار دهید .
۱-۲-۴ باکتریوفاژ های شسته شده را توسط روش آگار لایه ای دوتایی شمارش کنید.
۱-۲-۵ باکتریوفاژ های باقی مانده در قطعه های غشایی را با قرار دادن در یک تک لایه ای میزبان شمارش کنید .

الف – ۳ شناور سازی بر اساس هیروکسید منیزیوم (روش Schulze δ Lenk)

این روش شامل تغلیظ سازی کلی فاژ ها از آب آشامیدنی با استفاده از شناور سازی $Mg(OH)_2$ با اصلاحات کم برای تغلیظ سازی فاژ های حساس به PH بالا (براي مثال فاژهای اختصاصی F - RNA) می باشد .
توصیه می شود این روش را برای حجم های ml (۱۰۰ تا ۱۰۰۰) با کدورت بیشتر از NTU ۰/۲ بکار برید.

۳-۱ تغلیظ سازی فاژ ها از ۱L آب با کدورت بیشتر از NTU ۲

۳-۱-۱ ۱۰ ml محلول کلرید منیزیم (۱ mol /L) را به ۱ L نمونه اب اضافه کنید.
۳-۱-۲ ۳/۵ ml از محلول هیدرژن فسفات پتاسیم (۱ mol /L) را قطره قطره به نمونه ، با همزدن اضافه کنید .
۳-۱-۳ محلول هیدروکسید سدیم ۲ مولار را قطره قطره تا ظاهر شدن کدورت (حداکثر PH ۸/۶) اضافه کنید .

۱ - *male-specific RNA coliphages*

۲- *Nephelometric Turbidity Unit (NTU)*

۳-۱-۴ محلول فوق را به مدت زمان ۱۵ دقیقه برای یکنواخت شدن لخته ها ، هم بزنید و به مدت زمان ۳۰ دقیقه محلول را در وضعیت ساکن قرار دهید تا لخته ها ته نشین شده و فاژ ها ، داخل لخته ها شوند .

۳-۱-۵ محلول رویی را دور بریزید و رسوب های ته نشین شده را با (۱۰۰۰ تا ۱۵۰۰) دور در دقیقه سانتریفوژ کنید .سپس با دقت و به آرامی محلول رویی را دور بریزید و دوباره رسوب را با ۳۰ ml محلول شستشو یکنواخت کنید . به منظور یکنواخت سازی دوباره ، آن را به گونه ای تکان دهید تا لخته ها کاملا ناپدید شوند .سپس مراحل آزمون را انجام دهید یا در دمای $^{\circ}C$ ۴ به مدت زمان تا ۴۸ h می توانید نگهداری کنید .

۲

پیو ست ب

روش های پیشنهاد شده برای تغلیظ سازی باکتریوفاژ ها از آب (بسته به حجم ، کدورت و ذرات داخل آب)

ب-۱ جدول (۱) شمارش فاژ ها بر اساس مواد مرجع

مجموع شمارش	متوسط ویال ها	شماره (۲)	شماره (۱)	شماره ویال
۱۵۳	۷۶/۵	۷۷	۷۶	ویال ۱
۱۴۲	۷۱	۷۰	۷۲	ویال ۲
۲۹۵	-	-	-	ویال ۱+ ویال ۲

محاسبه T_1 :

T_1 ویال۱ = ۰/۰۰۶ = ۷۶/۵ / (۷۷- ۷۶/۵)^{۲} + ۷۶/۵ /(۷۶ – ۷۶/۵)^{۲}

T_1 ویال۲ = ۰/۰۲۸ = ۷۱ / (۷۱- ۷۲)^{۲} + ۷۱ /(۷۲ – ۷۱)^{۲}

T_1 (ویال۱) + T_1 (ویال۲) = ۰/۰۰۶ + ۰/۰۲۸ = ۰/۰۳۴که کمتر از ۵/۹۹ می باشد.

بنابراین یکنواخت سازی داخل ویال ها قابل قبول است .

محاسبه $T_۲$

$T_۲$ = ۰/۴۱ = ۲۹۵/۲ /(۲۹۵/۲ -۱۴۲)^{۲} + ۲۹۵/۲ /(۲۹۵/۲ – ۱۵۳)^{۲} که کمتر از ۳/۸۴ می باشد.

بنابراین یکنواخت سازی بین ویال ها قابل قبول است .

ب-۲ آماده سازی نمونه های مرجع اسپایک

حجم های (ml ۱۲۵ ، ۲۵۰ ، ۵۰۰ و ۱۰۰۰) نمونه آب را که قبلا اسپایک شده ، با ml ۱ یکی از ویال های مواد مرجع طبق (بند ۹) این استاندارد تهیه کنید .

ب-۳ تغلیظ سازی

نمونه فوق را با ml ۱۰۰۰ آب اسپایک نشده ی تغلیظ شده مخلوط کنید.

ب-۴ ارزیابی بازیافت

در کل حجم تغلیظ شده فاژها را شمارش کنید. همزمان ، ۲ ویال ml ۰/۵ از مواد مرجع اسپایک شده را ارزیابی کنید . سپس طبق جدول (۲) نتایج را بررسی کنید .

جدول (۲) نتایج شمارش فاژ ها

شمارش فاژ ها در غلظت حجم های اسپایک نشده	**شمارش فاژ ها** در غلظت حجم های اسپایک شده				فاژ های اضافه شده			
۱۰۰۰ml	۱۰۰۰ml	۵۰۰ ml	۲۵۰ ml	۱۲۵ ml	۱ ml	۲×۰/۵		آزمایش
۰	۱۲۵	۱۴۰	۱۱۰	۹۶	۱۷۳	۸۷	۸۶	۱
۰	۱۲۷	۱۲۰	۱۰۴	۱۱۴	۱۵۴	۸۰	۷۴	۲
۰	۱۲۱	۱۰۰	۸۲	۷۸	۲۴۱	۱۱۵	۱۲۶	۳
۰	۹۰	۱۲۵	۱۲۶	۱۲۰	۱۶۵	۸۰	۸۵	۴
۰	۱۰۷	۱۱۴	۹۶	۱۰۵	۱۶۱	۸۲	۷۹	۵

مواد اسپایک استفاده شده در آزمایش شماره ۳ با مقادیر T_1 و T_2 مطابقت ندارد . بنا براین نمونه ها ی مورد آزمون باید با مواد اسپایک دیگری مقایسه شوند .

ب- ۵ تجزیه و تحلیل داده ها

از آنجا که نمونه آب مورد استفاده برای تغلیظ ، بازیافت باکتریوفاژ ها را در بر نمی گیرد ، مقادیر η به عنوان درصدی برای هر یک از ارزشیابی های کسب شده طبق $\eta = N_C / N_S \times 100$ می باشد که میانگین بازیافت ، انحراف معیار و حدود اطمینان برای هر یک از حجم های مورد ارزیابی محاسبه می شود .

نتایج را طبق جدول (۳) بررسی کنید

جدول (۳) نتایج بازیافت

شماره آزمون	η ٪ بعد از تغلیظ سازی			
	۱۲۵ ml	۲۵۰ ml	۵۰۰ ml	۱۰۰۰ ml
۱	۵۵/۵	۶۳/۶	۸۱/۰	۷۲/۰
۲	۷۴/۰	۶۷/۵	۷۷/۷	۸۲/۵
۳	۳۲/۸	۳۴/۲	۴۱/۶	۵۰/۱
۴	۷۲/۵	۷۶/۴	۷۵/۶	۵۴/۷
۵	۶۵/۰	۵۹/۶	۷۱/۰	۶۷/۱
$\overline{X}$	۶۰/۰	۶۰/۲	۶۹/۴	۶۵/۳
S	۱۶/۹	۱۵/۸	۱۵/۹	۱۳/۱
بازه‌ی اطمینان	۸۰،۹،۳۹،۱	۷۹،۹،۴۰،۶	۸۹،۲،۴۹،۶	۸۱،۶،۴۹،۰

یادآوری – ازرش های نهایی بدست آمده ، آزمون Dixon را شامل نمی شود .

اگر چه مواد اسپایک شده در آزمون شماره ۳ با نتایج T_1 و T_2 تبعیت نمی کند ، ولی در تجزیه وتحلیل داده ها بکار می رود .

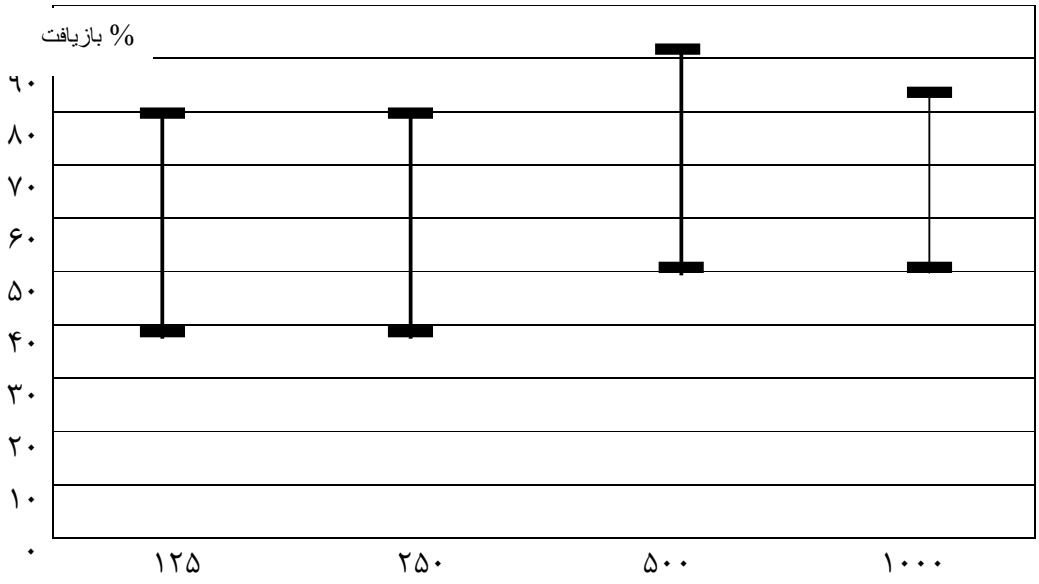
میانگین عددی η همراه با اختلاف حدود اطمینان و تاثیرات حجم مشاهده نشده به دلیل اختلافات ناشی از هم پوشانی حجم های مختلف می باشد .

ب - ۶ کنترل کیفی ارزیابی

ارزیابی بازیافت ۱۰۰۰ ml نمونه و میانگین عددی η برای چند مین بار تکرار شود.

نتایج را طبق جدول (۴) بررسی کنید

جدول (۴) نتایج ارزیابی بازیافت

η ٪					
۶۰.۵	۶۶.۹۵	۴۰.۸	۵۹.۸	۷۲.۴	۷۴.۴

باستثناء ازرش ۴۰/۸ ٪ تمام ارزش ها بین حدود اطمینان برای ۱۰۰۰ ml نمونه اعتبار دهی شده است .
پس از محاسبه ی T_1 و T_2 برای مواد اسپایک استفاده شده در این آزمایشات ، فقط مواد اسپایک که η ارزش ۴۰/۸ ٪ را شامل شود، از T_1 و T_2 تبعیت نمی کند .