جمهوری اسلامی ایران

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

شمارهٔ استاندارد ایران

7067_

آب ـ جستجو و شناسايي آنتاموباهيستوليتيكا ـ روش آزمون ميكروبيولوژي

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 " الف جستجو و شناسایی آنتاموباهید پاتیکا - روش آزمون میکروبیولوژی "

رئیس	سمت یا نمایندگی
ایماندل, کرامت الله (دکتراي داروسازي - متخصص بهداشت محیط)	دانشگاه تهران - دانشکده بهداشت
اعضاء	
اصلاني, محمد مهدي (دکتراي میکروبیولوژي)	انستیتو پاستور ایران
حیئمي , پروین(دکتراي دامپزشکي)	وزارت بهداشت , درمان و آموزش پزشکي- آزمایشگاههاي کنترل غذا و دارو
دوچشمه , مهدي(لیسانس بهداشت و محیط)	موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتي ایران
زندوکیلي, فاطمه (فوق لیسانس علوم بهداشتي در تغذیه)	موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتي ایران
صدیقي , هما (لیسانس بیولوژي)	شرکت آب و فاضلاب استان تهران
قائمي , نسرین (فوق لیسانس بهداشت)	سازمان حفاظت از محیط زیست استان تهران
دبیر	
زرسازي , گیتا (لیسانس صنایع - استاندارد و	موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتي ایران

کنترل کیفیت)

مقدمه

تک یاخته آنتاموباهیستولیتیکا, عامل بیماري آمیبیاز روده اي و اسهال خوني مي باشد, که فرم فعال (تروفوزوئیت[1]) آن , در روده بزگ انسان با حمله به مخاط روده , در آن ایجاد زخم مي کند. کیست هاي این آمیب, از طریق مدفوع فرد مبتلا دفع مي گردد, و با خوردن آب, سبزي هاي خام و غذاي آلوده به کیست, آلودگي انتقال مي یابد.
کیست هاي این تک یاخته, مي توانند براي چندین روز در آب و یا پساب زنده بمانند, و از این راه به انسان منتقل مي شوند.
کامل نبودن فرایند تصفیه آب, نقص در سیستم لوله کشي و ارتباط آب با فاضلاب, مي توانند از عوامل انتقال کیست هاي این تک یاخته, به افراد باشند.
در فرآیند تصفیه آب, استفاده از صافي هاي ماسه اي با اندازه موثر[2] و ضریب یکنواختي[3] مناسب, سبب حذف کیست ها مي گردد.

پیش گفتار

استاندارد آب - جستجو و شناسایي آنتاموباهیستولیتیکا - روش آزمون میکروبیولوژي که توسط کمیسیونهاي فني مربوطه تهیه تدوین شده و در بیست و دومین جلسه کمیته ملي استاندراد میکروبیولوژي مورخ ۸۰/۰۲/۲۹ مورد تصویب قرار گرفته است, اینك به استناد ۱ ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتي ایران مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ به عنوان استاندارد ملي ایران منتشر مي شود .
براي حفظ همگامي و هماهنگي با تحولات و پیشرفتهاي ملي و جهاني در زمینه صنایع ، علوم و خدمات, استانداردهاي ملي ایران در مواقع لزوم تجدیدنظر خواهد شد و هرگونه

1- *Trophozite*
2- *Effective size*
3- *Aquiliberiom factor*

پیشنهادي که براي اصلاح يا تکميل اين استانداردها ارائه شود , در هنگام تجديدنظر در کميسيون فني , مربوط مورد توجه قرار خواهد گرفت . بنابراين براي مراجعه به استانداردهاي ايران بايد همواره از آخرين تجديدنظر آنها استفاده کرد .

درتهيه وتجديدنظر اين استاندارد سعي شده است که ضمن توجه به شرايط موجود و نيازهاي جامعه، در حد امکان بين اين استاندارد و استاندارد ملي کشورهاي صنعتي و پيشرفته هماهنگي ايجاد شود .

منبع و مآخذي که براي تهيه اين استاندارد بکار رفته به شرح زير است :

۱- W.E.F AW.W.P.H.A Standard methods for the examination of Water and Waste Water 1998. Detection and identification of Entamoba histolytica.

آب - جستجو و شناسايي آنتاموباهيستوليتيکا - روش آزمون ميکروبيولوژي

۲ هدف

هدف از تدوين اين استاندراد , تعيين روش جستجو و شناسايي آنتاموباهيستوليتيکا, در آب مي باشد.

۳ دامنه کاربرد

اين استاندراد, براي کنترل و عملکرد صافي هاي ماسه اي, در تصفيه خانه هاو همچنين کنترل بهداشتي آبهاي سطحي , آشاميدني, شناگاهها و پساب هاي حاصل از تصفيه فاضلاب خانگي , بويژه به منظور کاربرد در آبياري سبزي ها, آبزي پروري و تفريحات سالم, کاربرد دارد.

٤ مراجع الزامي

مدارك الزامي زير حاوي مقرراتي است که در متن اين استاندارد به آنها ارجاع داده شده است. به اين ترتيب آن مقررات جزيي از اين استاندارد محسوب مي شود. در مورد مراجع داراي تاريخ چاپ و/يا تجديد نظر, اصلاحيه ها و تجديد نظرهاي بعدي اين مدارك مورد نظر نيست. معهذا بهتر

است كاربران ذينفع اين استاندارد, امكان كاربرد آخرين اصلاحيه ها و تجديد نظرهاي مدارك الزامي زير را مورد بررسي قرار دهند. در مورد مراجع بدون تاريخ چاپ و/يا تجديد نظر, آخرين چاپ و/يا تجديد نظر آن مدارك الزامي ارجاع داده شده مورد نظر است .

استفاده از اين مراجع زير براي كاربرد اين استاندارد الزامي است:

۳-۱ استاندارد ملي ايران ۴۲۰۷: سال ۱۳۷۶ـ آيين كار آزمونهاي باكتريولوژيكي آب .

۳-۲ استاندارد ملي ايران ۴۲۰۸ : سال ۱۳۷۶ آئين كار نمونه برداري از آب جهت آزمونهاي باكتريولوژيكي .

۳-۳ استاندارد ملي ايران ۲۷۴۷: سال ۱۳۸۰ـ آيين كار در آزمايشگاه ميكروبيولوژي .

۵ اساس روش

اين روش بر اساس تغليظ نمونه هاي آب با عبور از صافي هايي با اندازه روزنه مشخص و آماده سازي نمونه ها, جهت انجام آزمونهاي ميكروسكوپي مي باشد .

۶ نمونه برداري

دست كم ۴ ليتر آب را مطابق استاندارد ملي ايران ۴۲۰۸ سال ۱۳۷۶ نمونه برداري كنيد.

۷ مواد لازم

۷-۱ محيط هاي كشت, محلول ها و رقيق كننده ها

۷-۱-۱ محيط كشت آبگوشت جگر اصلاح شده[1]

تركيبات	مقدار
پودر جگر	۵۰ گرم
گلوكز	۱۰ گرم
دي سديم هيدروژن فسفات	۲ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ ميلي ليتر

1- Modified livers broth

طرز تهیه :

ترکیبات فوق را با حرارت دادن در بن ماري جوش حل کنید. سپس در لوله هاي آزمایش تقسیم کرده و در اتوکلاو با دماي ۱۲۱±۳ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سترون نمائید.

۶-۱-۲ *محلول سولفات روي* [1]

بصورت تجارتي در دسترس مي باشد.

۶-۱-۳ *محلول لوگل* [2]

بصورت تجارتي در دسترس مي باشد.

۶-۱-۴ *رقیق کننده ها*

رقیق کننده ها را مطابق استاندارد ملي ایران ۴۲۰۷ سال ۱۳۷۶ تهیه کنید.

۸ *وسایل لازم*

از وسایل معمول در آزمایشگاه میکروب شناسي مطابق استاندارد ملي ایران ۲۷۴۷ و همچنین وسایل زیر استفاده کنید:

۷-۱ دستگاه پمپ خلاء .

۷-۲ صافي غشایي با اندازه روزنه هاي ۷ تا ۱۰ میکرون .

۷-۳ سانتریفوژ با شتاب ۶۰۰ دور در دقیقه .

۷-۴ گرمخانه قابل تنظیم در دماي ۱±۳۷ درجه سلسیوس .

۷-۵ حمام آب گرم .

۷-۶ اتوکلاو و آون براي سترون سازي محیط هاي کشت و وسایل مورد نیاز .

۷-۷ یخچال قابل تنظیم در دماي ۳±۵ درجه سلسیوس .

۷-۸ میکروسکوپ با بزرگنمایي ۱۰ و ۴۰ برابر .

1- Zinc sulfate(Zn So_4)
2- Iodine

۹ روش اجراي آزمون

۸-۱ آماده سازي نمونه

۸-۱-۱ نمونه تهيه شده در بند ۵ را توسط صافي غشايي با اندازه روزنه ۷ تا ۱۰ ميكرون صاف كنيد. صافي را از كناره ديواره بشر در حجمي معادل ۱۰۰ ميلي ليتر آب مقطر , غوطه ور نمائيد .

۸-۱-۲ چنانچه ادامه آزمون بلافاصله پس از نمونه برداري , امكان پذير نباشد, به نمونه فوق حجمي از فرم آلدئيد ۳۷% حجم به حجم اضافه كنيد, به گونه اي كه, غلظت نهايي فرم آلدئيد , به ميزان ۲% حجم به حجم شود. سپس محلول حاصل را تا شروع مرحله بعدي, در يخچال نگه داري كنيد.

يادآوري- مراقب باشيد, كه هنگام صاف كردن نمونه , صافي همچنان مرطوب بماند , و از خشك شدن آن پرهيز كنيد .

۸-۲ تلغيظ نمونه

۸-۲-۱ عصاره تهيه شده در بند ۸-۱ را, يك شب در يخچال نگهداري كنيد, تا ايجاد رسوب كند و يا مي توانيد توسط سانتريفوژ, با شتاب ۶۰۰ دور به مدت ۵ دقيقه مواد معلق آن را ته نشين كنيد. سپس , مايع رويي را به كمك مكش و يا كج نمودن دور ريخته, و رسوب زيرين را توسط محلول فرم آلدئيد ۲% , به نسبت يك به يك مخلوط نموده و توسط ميكروسكوپ بند ۸-۷ مورد بررسي قرار دهيد.

۸-۲-۲ چنانچه ميزان حجم رسوب , تقريباً مساوي با يك ميلي ليتر باشد, مايع رويي را دور ريخته , سپس رسوب را توسط ميكروسكوپ بند ۸-۷ بررسي كنيد.

۸-۲-۳ چنانچه ميزان حجم رسوب كمتر از يك ميلي ليتر باشد , مجدداً آن را در ۱۰ ميلي ليتر محلول فرم آلدئيد ۲%, به صورت تعليق درآورده و با شتاب ۶۰۰ دور به مدت ۵ دقيقه, سانتريفوژ نموده, سپس مايع رويي را

دور ریخته و رسوب را توسط میکروسکوپ بند ۸-۷ بررسي کنید.

۸-۲-٤ چنانچه میزان حجم رسوب بیشتر از یك میلي لیتر باشد, مجدداً آن را در مایع رویي خود مخلوط نموده و حجمي از محتویات لوله که تقریباً حاوي یك میلي لیتر از رسوب باشد, را به یك لوله آزمایش ۱۵ میلي لیتري انتقال دهید, و آن را در شتاب ٦۰۰ دور به مدت ٥ دقیقه, سانتریفوژ نمائید. سپس , مایع رویي را دور ریخته , و رسوب را توسط میکروسکوپ بند ۸-۷ بررسي کنید.

۸-۲-٥ به رسوب بدست آمده در بندهاي فوق دو تا سه قطره محلول لوگل بند ٦-۱-۳ اضافه نموده و به کمك همزن شیشه اي مخلوط کنید. سپس, حجم محلول موجود در لوله را توسط محلول سولفات روي ۰/۲% به گونه اي پرکنید, که سرریز نشود. محتویات لوله را مجدداً به مدت سه دقیقه, مخلوط نموده, سپس در شتاب ٦۰۰ دور به مدت ٥ دقیقه , سانتریفوژ نمائید.
(محلول اصلي لوگل را به نسبت یك به پنج با سولفات روي با وزن مخصوص ۱/۲ رقیق کنید)

۸-۳ بررسي میکروسکوپي

یك لام تمیز به ابعاد ۲۲×۲۲ میلي متر را , روي دهانه لوله بند ۸-۲-٥, به گونه اي قرار دهید, که لامل با مایع محتوي لوله در تماس مستقیم باشد, و در این وضعیت , دو الي سه دقیقه ساکن بماند. سپس, با دقت و به آرامي لامل را از لبه آن برداشته , و روي سطح یك لام قرار دهید و با وازپار[1] و یا ماده مشابه دیگري, آن را ثابت کنید. سپس, توسط میکروسکوپ بند ۸-۷ وجود کسیت و یا فرم فعال آنتاموباهیستولیتیکا را , بررسي نمائید.

یادآوري ۱ - براي شمارش فرم فعال و یا کیست آنتاموباهیستولیتیکا, از لام سدویك رفتر[2] استفاده کنید.

1- *Waspar*
2- *Sedgwick – Rafter(S-R)*

یادآوري ۲ - به منظور بررسي فرم فعال آنتاموباهیستولیتیکا, مي توان رسوب تهیه شده در بندهاي ۸-۲ , را به محیط کشت آبگوشت جگر اصلاح شده تلقیح نمود و پس از گرمخانه گذاري در دماي ۳۷ درجه سلسیوس, به مدت سه الي شش روز, توسط میکروسکوپ بند ۷-۸ بررسي نمود.

۱۰ بیان نتایج

نتایج را بصورت «تك یاخته آنتاموباهیستولیتیکا در حجم مشخصي از نمونه مشاهده گردید.» و یا «تك یاخته آنتاموباهیستولیتیکا در حجم مشخصي از نمونه مشاهده نگردید» بیان کنید.

۱۱ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید داراي آگاهي هاي زیر باشد:

۱۰-۱ مشخصات کامل نمونه .

۱۰-۲ نوع نمونه و تاریخ نمونه برداري .

۱۰-۳ تاریخ انجام آزمون .

۱۰-٤ بیان نتایج طبق بند ۹ این استاندارد .

۱۰-٥ روش آزمون مطابق با استاندارد ملي ایران ۷۰٦۷

۱۰-٦ سایر اطلاعات که مربوط به روش آزمون باشد .

ISLAMIC REPUBLIC OF IRAN

Institute of Standards and Industrial Research of Iran

ISIRI NUMBER

_7067

Water - Detection and identification of Entamoba histolityca - Microbiological Test method

–

1st. Revision