www.abpsoil.com
ابنیه پایدار سبز

ISIRI
5754
1st/edition
JAN 2002

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

استاندارد ملی ایران
۵۷۵۴
چاپ اول
دی ماه ۱۳۸۰

میکروبیولوژی آب – شناسایی و شمارش کاندیدا آلبیکانس

Microbiology of water - Detection and enumeration of Candida Albicans

www.abpsoil.com
ابنیه پایدار سبز

نشانی مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران: کرج - شهر صنعتی، صندوق پستی ۱۶۳-۳۱۵۸۵

دفتر مرکزی: تهران - بالاتراز میدان ولی‌عصر، کوچهٔ شهید شهامتی، پلاک ۱۴
صندوق پستی ۶۱۳۹-۱۴۱۵۵

تلفن مؤسسه در کرج: ۸-۲۸۶۰۳۱ - ۰۲۶۱

تلفن مؤسسه در تهران: ۹-۸۹۰۹۳۰۸

دورنگار: کرج ۲۸۸۱۱۴-۰۲۶۱ تهران ۸۸۰۲۲۷۶ - ۰۲۱

بخش فروش - تلفن: ۲۸۷۰۴۵-۰۲۶۱ دورنگار: ۲۸۸۷۰۴۵-۰۲۶۱

پیام نگار: ISIRI.INFOC@NEDA.NET

بها: ۹۰۰ ریال

Headquarter: Institute of Standards and Industrial Research of IRAN

P.O.Box 31585-163 Karaj - IRAN

Central office: NO.14, Shahid Shahamati St., Valiasr Ave. Tehran

P.O.Box: 14155-6139

Tel.(Karaj): 0098 261 286031-8

Tel.(Tehran): 0098 21 8909308-9

Fax(Karaj): 0098 261 288114

Fax(Tehran): 0098 21 8802276

Email: ISIRI.INFOC@NEDA.NET

Price:900 Rls

www.abpsoil.com
ابنیه پایدار سبز

بسمه تعالی

آشنایی با مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

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

تدوین استاندارد در رشته‌های مختلف توسط کمیسیون‌های فنی مرکب از کارشناسان مؤسسه، صاحبنظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط با موضوع صورت می‌گیرد. سعی بر این است که استانداردهای ملی، در جهت مطلوبیت‌ها و مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فنی و فن‌آوری حاصل از مشارکت آگاهانه و منصفانه صاحبان حق و نفع شامل: تولیدکنندگان، مصرف‌کنندگان، بازرگانان، مراکز علمی و تخصصی و نهادها و سازمان‌های دولتی باشد.

پیش‌نویس استانداردهای ملی جهت نظرخواهی برای مراجع ذینفع و اعضای کمیسیون‌های فنی مربوط ارسال می‌شود و پس از دریافت نظرات و پیشنهادها درکمیته ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب به عنوان استاندارد ملی (رسمی) چاپ و منتشر می‌شود.

پیش‌نویس استانداردهایی که توسط مؤسسات و سازمان‌های علاقمند و ذیصلاح و با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می‌شود نیز پس از طرح و بررسی درکمیته ملی مربوط و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی چاپ و منتشر می‌گردد. بدین‌ترتیب استانداردهایی ملی تلقی می‌شود که بر اساس مفاد مندرج در استاندارد ملی شماره «۵» تدوین و درکمیته ملی مربوط که توسط مؤسسه تشکیل می‌گردد به تصویب رسیده باشد.

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران از اعضای اصلی سازمان بین‌المللی استاندارد می‌باشد که در تدوین استانداردهای ملی ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی‌های خاص کشور، از آخرین پیشرفت‌های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین‌المللی استفاده می‌نماید.

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران می‌تواند با رعایت موازین پیش‌بینی شده در قانون به منظور حمایت از مصرف‌کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست‌محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردها را با تصویب شورای عالی استاندارد اجباری نماید. مؤسسه می‌تواند به منظور حفظ بازارهای بین‌المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری نماید.

همچنین به منظور اطمینان بخشیدن به استفاده‌کنندگان از خدمات سازمان‌ها و مؤسسات فعال در زمینه مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و گواهی‌کنندگان سیستم‌های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی، آزمایشگاه‌ها و کالیبره‌کنندگان وسایل سنجش، مؤسسه استاندارد اینگونه سازمان‌ها و مؤسسات را براساس 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 می‌نماید. ترویج سیستم بین‌المللی یکاها، کالیبراسیون وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی از دیگر وظایف این مؤسسه می‌باشد.

کمیسیون استاندارد "میکروبیولوژی آب - شناسائی و شمارش کاندیدا آلبیکانس"

رئیس	سمت یانمایندگی
زینی،فریده (دکترای قارچ شناسی پزشکی)	عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی تهران دانشکده بهداشت

اعضاء

بصیری جهرمی، شهیندخت (فوق لیسانس قارچ شناسی)	عضو هیأت علمی انستیتو پاستور ایران
صدیقی، هما (لیسانس بیولوژی)	شرکت آب و فاضلاب استان تهران
قائمی، نسرین (فوق لیسانس علوم بهداشتی - تغذیه)	سازمان حفاظت از محیط زیست ایران

دبیر

زرسازی، گیتا (لیسانس صنایع -کنترل کیفیت)	مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
فبادی دانا،مریم (لیسانس میکروبیولوژی)	مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

فهرست مندرجات **صفحه**

پیش گفتار ..... الف
مقدمه ..... پ
۱ هدف و دامنه کاربرد ۱
۲ مراجع الزامی ۱
۳ اصطلاحات و تعاریف ۲
۴ نمونه برداری ۲
۵ مواد لازم ۳
۶ وسائل لازم ۶
۷ روش اجرای آزمون ۷
۸ بیان نتایج و نحوه گزارش آزمون ۹

www.abpsoil.com
ابنیه پایدار سبز

پیشگفتار

استاندارد «میکروبیولوژی آب - شناسائی و شمارش کاندیدا آلبیکانس» که توسط کمیسیون مربوطه تهیه و تدوین شده و در جلسه کمیته ملی استاندارد میکروبیولوژی مورخ مورد تصویب قرار گرفته، اینک به استناد بند ۱ ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ به عنوان استاندارد رسمی ایران منتشر می‌شود.

برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفتهای ملی و جهانی در زمینه صنایع، علوم و خدمات استانداردهای ملی ایران در مواقع لزوم تجدید نظر خواهند شد و هرگونه پیشنهادی که برای اصلاح و تکمیل این استاندارد ارائه شود در تجدیدنظر بعدی مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین برای مراجعه به استانداردهای ملی ایران باید همواره از آخرین تجدیدنظر آنها استفاده کرد. در تهیه و تجدیدنظر این استاندارد سعی شده است که ضمن توجه به شرایط موجود و نیازهای جامعه، در حد امکان بین این استاندارد و استانداردهای بین‌المللی و استاندارد ملی کشورهای صنعتی و پیشرفته هماهنگی ایجاد شود.

منابع و مآخذی که برای تهیه این استاندارد به کار رفته به شرح زیر است :

1- ASTM D4249 - 83: 1989, Standard test method for enumeration of Candida albicans in Water

2- Franson, M.a.h.Standard methods for examination of water and waste water ed.19th American Public health association 1995 Vol.2 Page (9-103) , (9-110)

3- Odds.F.G Candida and candidiosis Bailliere Tindall 1988. chapt. 6، Page 104

4- MC GininS, MR. Laboratory Hand book of medical mycology Academic Press 1980 Page 364 - 365

5- Buck j.D - and Bubacis Membrane filter procedure for Enumeration of candida

albicans in natural Waters. Applied and Environmental Microbiology 1978 Vol .35(2) Page 237-242

6-Rosenzweig W.D, Minnigh H.a. and Pipes W.o

chlorine demand and inactivation of fungal Propagules. Applied and Environmental Microbiology 1983 Vol.45 No .1 Page 182 - 186

7- Kwon - Chung Kj. Genetic Differences between type I *and* II *C.Stellatoidea. Infection Immune 1999 V.57, P:527 - 532*

8- Beneke, E.S. and Rogers A.l. Medical Mycology and Human Mycoses. Star Publishing Company 1996 Page 40, 41,154

9- Howard D.H. Fungi Pathogenic for humans and animals part B. Pathogenicity and detection: II *Marcel Dekker I.N.C. 1985 Vol,3 chap5 page 156*

10- Campbell M.C, Stewart J.L. The medical mycology hand book John Wiley and Sons 1980 Page 369 , Page 179

11-Cook W.l. and Schlitzer R.L. Isolation of Candida albicans From Fresh Water and Sewage. Applied and Environmental Microbiology 1981 Vo1 41 (3)Page 840 - 842

مقدمه

اگر چه کاندیدا آلبیکانس[1] مخمری است،که بعنوان یک همزیست، در دستگاه گوارش و مخاط پستانداران و پرندگان زندگی می‌کند، ولی می‌تواند بعنوان یک میکروارگانیزم بیماریزای فرصت طلب جدی برای انسان تلقی گشته، و عفونتهای سطحی و احشایی ایجاد کند.

کاندیدا آلبیکانس درکلیه آبهایی یافت می‌شود،که در تماس با فاضلاب انسانی و حیوانی می‌باشند. بنابراین، وجود این مخمر می‌تواند شاخص خوبی برای کنترل آلودگی آبهای بازیافت شده، بشمار آید. کاندیدا آلبیکانس ، می‌تواند بطور طبیعی در آب دریا، حداقل به مدت شش روز باقی بماند.بقای مخمر در آب مقطر و همچنین آب دریاچه، در شرایط آزمایشگاهی، به مدت طولانی به اثبات رسیده است. این روش آزمون، برای پایش کارآیی تصفیه آب در از بین بردن عوامل بیماریزا، بکار می‌رود. توجه مهندسین بهداشت و بهسازی را باید به وجود این مخمر در پساب و نیز قابلیت بیماریزایی آبهای آلوده بدان ،جلب نمود. زیرا علاوه بر اینکه این مخمر همانند سایر قارچها، با عمل کلرینه کردن در غلظت متداول از بین نمی‌رود، بلکه بعلت فعالیت آنزیمی گسترده‌ای که دارد، باعث غیرفعال کردن ترکیبات پیچیده طبیعی و مصنوعی می‌شود. درحالیکه اشرشیاکلی[2] که شاخص متداول، برای تعیین آلودگی آب به شمار می‌آید، در عرض ۵ دقیقه، با غلظت کلر آزاد ۰/۰۳ قسمت در میلیون از بین می‌رود. بدین منظور کاندیدا آلبیکانس، نیازمند به غلظت ۴قسمت در میلیون[3] به مدت ۳۰ دقیقه می‌باشد.

طبق گزارشهای اخیر کاندیدا استلاتوئیده[4] واریته‌ای از کاندیداآلبکانس می‌باشد که لوله زایا ایجاد می‌کند ظاهراً این ارگانیزم در آب بندرت یافت شده و تصور براین است که وجود آن در آب به اندازه وجود کاندیداآلبیکانس حائز اهمیت باشد.

1- Candidida Albicans

2- Escherichia coli

3- PPM

4- Candida stellatoidea

میکروبیولوژی آب - شناسائی و شمارش کاندیدا آلبیکانس

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد تعیین روشی برای شناسائی و شمارش کاندیداآلبیکانس در انواع آب و فاضلاب می‌باشد.

۲ مراجع الزامی

مدارک زیر حاوی مقرراتی است که در متن این استاندارد به آنها ارجاع داده شده است. به این 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 تجدید نظر، آخرین چاپ و / یا تجدید نظر آن مدارک الزامی ارجاع داده شده مورد نظر است.

استفاده از مراجع زیر برای کاربرد این استاندارد الزامی است :

۲-۱ استاندارد ملی ایران ۴۲۰۸: سال ۱۳۷۵ آئین کار نمونه‌برداری از آب جهت آزمونهای باکتریولوژیکی

۲-۲ استاندارد ملی ایران ۴۲۰۷: سال ۱۳۷۵ آئین کار آزمونهای باکتریولوژیکی آب

۲-۳ استاندارد ملی ایران ۲۷۴۷: تجدید نظر اول میکروبیولوژی - آئین کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی

۳ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد اصطلاحات و / یا واژه‌ها با تعاریف زیر بکار می‌رود:

۳-۱ لوله زایا[1]

ساختمان‌های لوله‌ای شکل، به عرض ۴-۳ میکرومتر و طول بیش از ۲۰ میکرومتر می‌باشد که با نگهداری سلولهای مخمری در سرم اسب، انسان، خرگوش، گوساله و خوکچه هندی، پپتون ۱٪، محیط کشت سلولی ۱۹۹[2]، سفیده تخم‌مرغ و با تریپتیکیس سوی برات به مدت ۳-۱ ساعت، در حرارت ۳۷-۳۵ درجه سلسیوس، ایجاد می‌شود.در نقطه شروع لولهٔ زایا، فشردگی وجود ندارد و همین مسئله بعنوان شاخص شناسایی کاندیدا آلبیکانس ، بشمار می‌آید. کاندیدا آلبیکانس و دیگر مخمرها، ممکن است ساختمانهای مشابه لوله زایا (جوانه‌های طویل و میسلیوم کاذب) تولیدکنند، اما همه آنها در اصل در سطح سلول، جایی که ساختمان آن شکل می‌گیرد، فشردگی مجزایی دارند.

۴ نمونه برداری

نمونه برداری باید مطابق با استاندارد ملی ایران ۴۲۰۸ «آئین کار نمونه برداری از آب جهت آزمونهای باکتریولوژیکی» انجام شود.

یادآوری - حجم نمونه بستگی به نوع آب دارد در حالیکه برای پساب خام حجم ۱۰ تا ۴۰ میلی لیتر، ممکن است کافی باشد برای نمونه‌های آب نسبتاً تمیز، حجم یک لیتر یا بیشتر از آن مورد نیاز خواهد بود. در مورد آب بازیافت شده که آزمون به روش دو پلیتی انجام می‌شود چندین لیتر آب باید نمونه برداری شود.

۵ مواد لازم

یادآوری - کلیه مواد و معرف‌ها، باید از خلوص لازم برای آزمایشهای میکروبیولوژی برخوردار

1- Germ tube

۲- این محیط با همین نام بصورت تجارتی موجود می‌باشد.

باشند و مصرف آن، باعث کاهش دقت تشخیص نگردد.

۱-۵ محیط mcA

ترکیبات محیط الف

گلیسین	۱ گرم
مانتوز	۳ گرم
سولفیت سدیم	۰/۳ گرم
بیسموت آمونیم سیترات	۰/۵ گرم
کلرامفنیکل	۵۰ میلی گرم
سیکلوهگزامید	۱۵۰ میلی گرم
آب مقطر	۹۰ میلی لیتر
آگار	۱/۵ گرم

ترکیبات محیط ب:

محیط پایه ازت مخمر	۶/۷ گرم
دکستروز	۵ گرم
آب مقطر سترون	۱۰۰ میلی لیتر
آگار	۱/۵ گرم

طرز تهیه

چون محیط mcA از ترکیب ۹۰ میلی لیتر از ترکیبات محیط الف با ۱۰ میلی لیتر از ترکیبات محیط ب تهیه می‌گردد. لذا ابتدا پس از اضافه کردن ترکیبات محیط الف به آب مقطر آن را در حمام آب گرم با دمای ۵۰ درجه سلسیوس قرار داده و همزمان با گرم کردن تکان دهید تا کدورت تا چیزی ایجاد شود. pH نهایی محیط را با اسید کلریدریک ۱ نرمال و یا هیدروکسید آمونیم ۱ نرمال، توام با هم زدن، روی ۷/۱ تنظیم کنید.

۱/۵ گرم آگار را به محیط اضافه کرده، سپس محیط را در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس سترون نمائید. آنگاه، محیط را از اتوکلاو خارج کرده، و در بن ماری ۵۰-۴۵ درجه سلسیوس قرار دهید.تا به دمای مزبور برسد.

در مرحله بعد بطور جداگانه ترکیبات محیط ب را با حل کردن محیط پایه مخمر ازت و دکستروز در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر سترون تهیه کنید.

سپس با صافی غشایی ۰/۴۵ میکرومتر، سترون کنید.

عمل اضافه کردن ۱۰ میلی لیتر محیط ب به ۹۰ میلی لیتر از محیط الف، باید در داخل بن ماری صورت گیرد.تا از جامد شدن آگار، جلوگیری به عمل آید.

pH محیط را در صورت لزوم توسط اسید کلریدریک ۱ نرمال به ۶/۵ برسانید.در حین تنظیم pH محیط را هم بزنید.

در حالیکه محیط را بطور مداوم تکان می‌دهید، آنرا در پلیت‌ها تقسیم کنید.به گونه‌ای که ضخامت محیط در پلیت ۵-۴ میلیمتر باشد (۲۰-۱۰ میلی‌لیتر بسته به اندازه پلیت مورد استفاده) و سپس، صبر کنید تا محیط بصورت جامد درآید.

پلیت‌ها را در دمای ۴ درجه سلسیوس در یخچال دور از نور قرار دهید، این عمل را می‌توان بوسیله پیچیدن پلیت‌ها در کاغذ آلومینیومی انجام داد.محیط تحت این شرایط فقط به مدت ۲ هفته مقاوم و پایدار بوده، و در صورت تشکیل کریستالهای سفید، باید آنرا دور ریخت

۲-۵ محیط BCG[1] آگار:

یادآوری - این محیط به عنوان جایگزین محیط mCA به کار می‌رود.

ترکیبات

---

1 - Bromcresol - Green Agar Medium

۱ - این محیط به همین نام به صورت تجارتی موجود می‌باشد.

محیط BCG آگار ۶/۶ گرم

آب مقطر ۱۰۰۰ میلی لیتر

نئومایسین سترون ۰/۵ گرم

طرز تهیه

۶/۶ گرم از محیط BCG آگار را به هزار میلی‌لیتر آب مقطر اضافه کنید.

محیط فوق را توام با هم‌زدن به حرارت جوش برسانید.

در حرارت ۱۲۱ درجه سلسیوس و به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو نمائید.

پس ازآنکه دمای محیط در حمام آب گرم به ۵۰ درجه سلسیوس رسید ۰/۵ گرم نئومایسین سترون را، به آن بیفزائید.

pH نهائی محیط را، به ۶/۱ برسانید.

۳-۵ سرم گاوی یا سرم اسب، انسان، خوکچه هندی، خرگوش یا هر یک از محیط‌های جایگزین زیر:

۱-۳-۵ پپتون ۱٪

۲-۳-۵ محیط کشت سلولی ۱۹۹

۳-۳-۵ سفیدهٔ تخم‌مرغ

۴-۳-۵ تریپتیکیس سوی برات

۵-۳-۵ محیط پایه ازت مخمر

طرز تهیه:

۰/۵ تا ۱ میلی لیتر از سرم گاوی را که بصورت تجارتی دردسترس می‌باشد یا هر یک از محیط‌های جایگزین آن را در لوله‌های کوچک دربیچ دار سترون تقسیم کنید. سرم گاوی را می‌توان به حالت انجماد نگهداری کرده و در موقع نیاز آن را ذوب نمود.

۶ وسایل لازم

۶-۱ علاوه بر وسایل لازم برای آزمایشهای میکروبیولوژی بر اساس استاندارد ملی ایران ۲۷۴۷ تجدید نظر، وسایل زیر مورد نیاز می‌باشد.

۶-۲ گرمخانه ۱ ± ۳۷ درجه سلسیوس

۶-۳ میکروسکوپ (ترجیحاً فازکنتراست[1])

۶-۴ میکروسکوپ تشریحی[2] مجهز به منبع نور خارجی

۶-۵ لوله‌های کشت در اندازه ۱۰×۷۵ میلیمتر

۶-۶ پلیت‌های سترون

۶-۷ وسایل مربوط به صافی غشایی

۶-۸ صافی‌های غشایی سترون به قطر ۷۵ میلیمتر دارای منافذی به قطر ۱/۲ میکرومتر

یادآوری - اگر چه بعلت کدورت و ذرات قابل توجه آبهای طبیعی و نیز با توجه به غلظت پایین مخمرها درمقایسه با باکتریها، صافی‌های غشائی با منافذ بزرگتر (۱/۲) مورد استفاده قرار می‌گیرد، تا بتوان حجم بیشتری از آب را (تا ۵۰۰ میلی لیتر) صاف نمود، ولی از صافی با منافذ ۰/۴۵ میکرومتر نیز بدلیل کارایی کافی، می‌توان استفاده کرد.

۷ روش اجرای آزمون

هشدار ایمنی- از آنجاکه کاندیدا آلبیکانس برای انسان بیماریزا است، بنابراین رعایت کلیه نکات ایمنی

1- Phase contrast

2- Dissecting microscop

به هنگام نمونه‌برداری، انتقال نمونه و آزمایش ضروری است، کار با همه مواد و وسایل مورد استفاده (مثل پلیت‌ها لام‌ها و لوله‌های حاوی سرم)، باید طبق روش‌های میکروبیولوژیکی متداول انجام شود. هر آنچه دور ریختنی است باید سترون شود.

۷-۱ آماده کردن آزمونه

نمونه را از ابتدا تا انتهای آزمایش، تکان دهید و بوسیله صافی غشایی، با منافذ به قطر ۱/۲ میکرومتر (یا ۰/۴۵ میکرومتر)مطابق با استاندارد ملی ایران ۴۲۰۷ سال ۱۳۷۵ صاف کنید. سپس، با ۳۰-۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون، قیف صافی را شستشو دهید.

۷-۲ تلقیح

تحت شرایط سترون، صافی را برداشته، و طوری روی پلیت‌های حاوی محیط mcA قرار دهید، که سطح چهارخانه‌دار صافی، رو به بالا قرار گیرد.

۷-۳ گرمخانه گذاری

پلیت‌ها را در گرمخانه با دمای ۳۷-۳۵ درجه سلسیوس، به مدت ۲ تا ۴ روز، نگهداری کنید.

۷-۴ روش شمارش

پس از پایان مدت گرمخانه گذاری به وسیله یک میکروسکوپ تشریحی، پرگنه‌ها را بررسی نموده، و شمارش کنید. در این میکروسکوپ نور خارجی باید از طرف پایه میکروسکوپ و بطور مایل به سطح صافی غشائی تابیده، و یک حالت سایه‌دار ایجاد کند.

بدین ترتیب پرگنه های کاندیدا آلبیکانس روی محیط mcA بعلت وجود بیسموت برنگ قهوه‌ای تیره یا شکلاتی به قطر تقریبی یک میلیمتر با ظاهر برجسته و گنبدی شکل مشاهده خواهد شد.

این محیط از کلرامفینکل به عنوان مهار کننده رشد باکتریها و از سیکلوهگزامید برای مهار رشد قارچهای ساپروفیت استفاده می‌شود و پرگنه‌های باکتریایی و قارچهای رشته‌ای بندرت رشد می‌کنند که به راحتی از روی شکل خود قابل تشخیص می‌باشند.

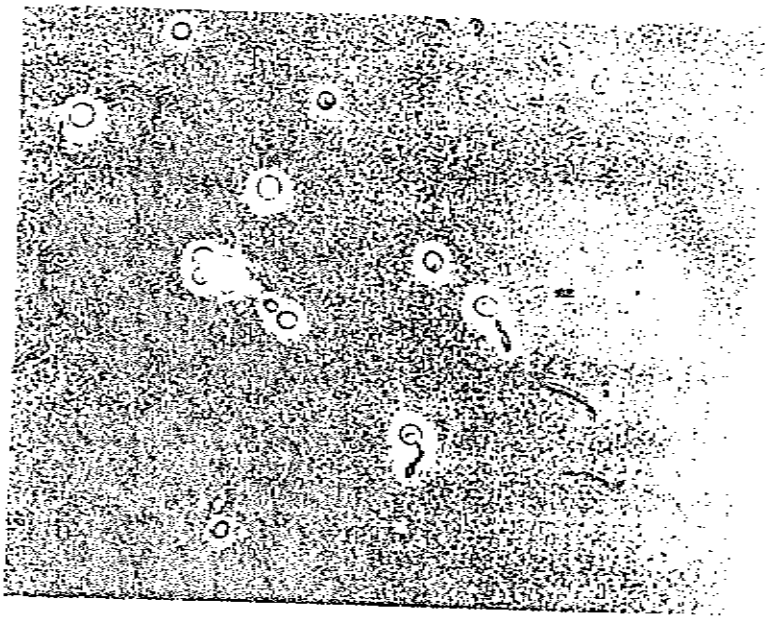
در محیط جایگزین BCG آگار پرگنه ها برنگ سفید مشاهده خواهد شد.

۷-۵ تایید پرگنه‌های کاندیدا آلبیکانس

توصیه می‌شود که حداقل در ابتدا آزمایشگاه مرجعی، پرگنه های رشد کرده بر روی محیط mcA را تایید نماید، تا از درستی آن اطمینان حاصل شود.

بعلت ریز بودن پرگنه‌های رشد یافته کاندیدا آلبیکانس در محیط mcA با کمک میکروسکوپ تشریحی، یک حلقه کشت از هر یک از پرگنه‌های مشکوک را برداشته، و به لوله‌های حاوی سرم منتقل کنید.

لوله‌های فوق را، در دمای ۳۷-۳۵ درجه سلسیوس و به مدت ۳-۲ ساعت، گرمخانه گذاری کنید. یک حلقه کشت از سرم (طبق بند ۳-۵) حاوی سلولها را روی، لام شیشه‌ای میکروسکوپ قرار داده، بر روی آن یک لامل شیشه‌ای بگذارید و با میکروسکوپ (ترجیحاً فازکنتراست)، مشاهده کنید. در صورت امکان، از بزرگنمایی حدود ۴۰۰ برابر، استفاده کنید. اگر از لاملی استفاده می‌کنید که اندازه آن ۱۸ میلیمتر مربع است، روی یک لام می‌توان سه لامل قرار داد. مشاهده لوله زایا (شکل زیر) تأییدی بر وجود کاندیدا آلبیکانس می‌باشد.



شکل ۱- لوله زایای کاندیدا آلبیکانس توسط میکروسکوپ فازکنتراست

۸ بیان نتایج و نحوه گزارش آزمون

تعداد پرگنه‌های شمارش شده روی صافی غشایی در حجم معین آب که در محیط mcA کشت داده شده و کاندیدا آلبیکانس بودن آنها توسط روش تولید لوله زایا تایید گردیده، گزارش می‌شود.

$$\text{تعداد کاندیدا آلبیکانس} = \frac{\text{تعداد پرگنه‌های تأیید شده}}{\text{حجم نمونه صاف شده}}$$

گاهی در کشت ممکن است، پرگنه‌هایی شبیه کاندیدا آلبیکانس بر روی محیط mcA رشد کرده، و جواب مثبت کاذب ایجاد کند، که معمولاً می‌توان آنها را از روی شکل، رنگ و قوام پرگنه با استفاده از میکروسکوپ تشریحی و نیز اشکال ریزبینی آنها در محیط های افتراقی و نیز تست‌های مکمل دیگر از هم تشخیص داده، و تایید نمود. اما تشخیص قطعی باید با استفاده از آزمون لوله زایا، تأیید گردد.