



جمهوری اسلامی ایران

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

شماره استاندارد ایران

5859



آب- جستجو و شناسایی لژیونلا - 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، صاحب نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط با موضوع صورت میگیرد. سعی بر این است که



استانداردهای ملی، در جهت مطلوبیت ها و مصالح ملی و با 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 و اعضای کمیسیون های فنی مربوط ارسال میشود و پس از دریافت نظرات و پیشنهادهای در کمیته ملی مرتبط با آن رشته طرح و در 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 و منتشر می 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 و نیازمندیهای 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 و عمومی، 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 آنها اجباری نماید.



همچنین بمنظور اطمینان بخشیدن به استفاده کنندگان از خدمات سازمانها و مؤسسات فعال در زمینه مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و گواهی کنندگان سیستم های مدیریت کیفیت و مدیریت 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 لژیونلا" - روش آزمون میکروبیولوژی

رئیس	سمت یا نمایندگی
اصلائی، محمدمهدی (دکترای میکروبی شناسی)	عضو هیئت علمی انستیتو پاستور ایران
اعضاء	
حیثی، پروین (دکترای دامپزشکی)	وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی- اداره کل آزمایشگاهی کنترل غذا و دارو
زندوکیلی، فاطمه (فوق لیسانس علوم بهداشتی در تغذیه)	موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
صدیقی، هما (لیسانس زیست شناسی)	شرکت آب و فاضلاب استان تهران
غلامی، میترا (دکترای بهداشت محیط)	عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی ایران
قائمی، نسرین (فوق لیسانس علوم بهداشتی در تغذیه)	سازمان حفاظت از محیط زیست استان تهران
محبعلی، قاسمعلی (فوق لیسانس میکروبی شناسی)	پژوهشگاه صنعت نفت ایران
دبیر	
دوچشمه، مهدی (لیسانس بهداشت محیط)	موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
زرسازی، گیتا (لیسانس صنایع)	موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران



فهرست مندرجات	صفحه
پیشگفتار	الف
مقدمه	ب
هدف و دامنه کاربرد	۱
مراجع الزامی	۱
اصطلاحات و تعاریف	۲
نمونه برداری	۲
روش های آزمون	۴
بیان نتایج	۲۳
گزارش آزمون	۲۳

پیشگفتار

استاندارد آب- جستجو و شناسایی لژیونلا در آب - روش آزمون میکروبیولوژی که توسط کمیسیون های فنی مربوطه تهیه و تدوین شده و در چهل و چهارمین جلسه کمیته ملی استاندارد میکروبیولوژی مورخ ۸۲/۲/۲ مورد تصویب قرار گرفته است، 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 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 تجدید نظر خواهد شد و هر گونه پیشنهادی که برای اصلاح و تکمیل این استاندارد ارائه شود، در هنگام تجدیدنظر در کمیسیون فنی مربوط موردتوجه قرار خواهد گرفت. بنابراین برای مراجعه به استانداردهای ملی 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.

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

1. ISO 11731 :1998 Water quality - Detection and Enumeration of Legionella .
2. Isolation of legionella pneumophila from Tehran hospital water samples Mohammad mehdiaslani , mahdokhtpourmansour , motteza motavalian
Microbiology depratment , pasteur institaue of Tehran 13164.iran.
Iranin Biomedical Journal 1 (October 1997)

مقدمه

لژیونلا^۱ عامل شیوع بیماری لژیونرها در سال ۱۹۴۷ در فیلادلفیا بوده است. دو شکل بیماری توسط این ارگانیسم شناخته شده است، شکل اول پنوموتیک^۲ (ریوی) و شکل دوم غیر پنوموتیک که تحت عنوان تب پونتیاک^۳ نامیده می شود . لژیونلاها، بطور وسیعی در آبهای طبیعی انتشار داشته و برخی از گونه های آن قادر هستند به مدت طولانی در آب و خاک زنده بمانند. همچنین حضور آنها در لوله های آبرسانی بویژه در سیستم های تهویه و وسایل خنک کننده و گرم کننده ، در نتیجه استنشاق مه پاش^۴ به داخل ریه نفوذ کرده و سبب ایجاد عفونت و بیماری خصوصاً در افرادی که سیستم ایمنی بدنشان ضعیف شده است ، میگردد.

1- Legionella
2- Pneumotic
3- Pontiac Fever
4- Aerosols



آب - جستجو و شناسایی لژیونلا - روش آزمون میکروبیولوژی

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد تعیین روش جستجو و شناسایی لژیونلا و تخمین تعداد آنها در نمونه های آب می باشد. این روش برای انواع آبهای آشامیدنی، غیر آشامیدنی و مواد همراه آنها شامل، رسوبات، مواد ته نشین شده و لجن قابل استفاده می باشد.

۲ مراجع الزامی

مدارک الزامی 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 می شود. در مورد مراجع دارای تاریخ چاپ و / یا تجدیدنظر، اصلاحیه ها و تجدیدنظرهای بعدی این مدارک مورد نظر نیست. معهذا بهتر است کاربران ذینفع این استاندارد امکان کاربرد آخرین اصلاحیه ها 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 :

استاندارد ملی ایران شماره ۴۲۰۸ : سال ۱۳۷۶ - آئین کار نمونه برداری از آب جهت آزمونهای میکروبیولوژی



استاندارد ملی ایران شماره ۴۲۰۷: سال ۱۳۷۶ آئین کار
 آزمون‌های باکتریولوژیکی آب
 استاندارد ملی ایران شماره ۲۷۴۷: سال ۱۳۸۰ آئین کار در
 آزمایشگاه میکروبیولوژی

۳ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد اصطلاحات و / واژه ها با تعاریف زیر
 بکار می‌رود:

۱-۳ لژیونلا

باکتری گرم منفی هوازی میله ای شکل، بدون اسپور و
 تاژکدار است که عرض آن ۰/۳ الی ۰/۹ میکرون و طول
 ۲۰ میکرون می‌باشد و قادر است در مدت بیش از دو روز بر
 روی محیط بافری حاوی آگار، عصاره مخمر، کربن فعال، ال
 - سیستئین^۱ و آهن سه ظرفیتی کلنی‌های سفید یا ارغوانی یا
 آبی متمایل به سبز لجنی رنگ ظاهر نمایند.

یادآوری ۱ - برخی از گونه‌های لژیونلا در طول موج‌های بلند
 اشعه ماوراء بنفش تولید فلئورسانس می‌کنند. کلنی‌ها در
 زیراستریو میکروسکوپ^۲، دارای ظاهری شفاف و شیشه مانند^۳ است.

یادآوری ۲ - به استثنای مواردی چند رشد این باکتریها در غیاب
 ال - سیستئین امکان‌پذیر نمی‌باشد.

۴ نمونه برداری

نمونه برداری باید مطابق با استاندارد ملی ایران شماره
 ۴۲۰۸ سال ۱۳۷۶ - آئین کار نمونه برداری از آب
 جهت آزمونهای میکروبیولوژی انجام می‌گیرد.

۱-۴ ظروف نمونه برداری

از ظروف معمول در آزمایشگاه میکروبیولوژی استفاده کنید
 و چنانچه ظروف قبلاً استفاده شده باشد باید پس از تمیز
 کردن و آبکشی نمودن آن با آب مقطر، در دمای ۱±۱۲۱ درجه
 سلسیوس بمدت ۲۰ دقیقه توسط اتوکلاو سترون گردند. مطابق
 با استاندارد ملی ایران شماره ۲۷۴۷ ظروفی که در برابر
 اتوکلاو مقاومت ندارند را، می‌توانید با شناور کردن آن در

1- Buffered Charcoal Yeast Extract Agar Medium (BCYE)

2- Sterio microscope

3- Ground glass



آب داغ ، (دمای بیش از ۷۰ درجه سلسیوس) یا با بخار آب به مدت ۵ دقیقه پاستوریزه کنید. برای نمونه برداری لجن و رسوبات ته نشین شده از ظروف دهانه گشاد در پیچ دار سترون شده استفاده کنید.

در محل هایی که نمونه برداری مشکل می باشد، ظروف شیشه ای بعلت امکان شکستگی مناسب نیست و بهتر است که از ظروف شیشه ای که در حفاظ پلاستیکی قرار دارند استفاده گردد.

۲-۴ نمونه برداری از آبهای حاوی مواد گندزدا و زیستکش^۱

آبهایی که حاوی مواد گندزدای اکسید کننده مانند کلر می باشند، باید مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۴۲۰۸ آئین کار نمونه برداری از آب جهت آزمونهایی میکروبیولوژی، یک عامل غیرفعال کننده و یا خنثی کننده ترکیبات گندزدا را قبل از نمونه برداری یا در هنگام آن به ظرف نمونه برداری اضافه کنید.

۳-۴ انتقال نمونه

نمونه ها باید در دمای کمتر از ۱۸ درجه سلیوس و بیشتر از ۶ درجه سلسیوس نگهداری شوند و در مدت زمان حداکثر دو روز، به دور از گرما و نور خورشید به آزمایشگاه ارسال شوند.

توصیه می شود نمونه آب پس از دریافت آن ، هرچه سریعتر و ترجیحاً " همان روز نمونه برداری (به ویژه برای نمونه هایی که حاوی گندزدا می باشند) مورد آزمون قرار گیرند. فاصله زمانی بین جمع آوری نمونه و تغلیظ آن، بطور مطلوب دو روز است و نباید از ۵ روز بیشتر شود.

همچنین حداکثر فاصله زمانی بین جمع آوری نمونه تا کشت نمونه تغلیظ شده ۱۴ روز است .

یادآوری ۱ - چنانچه نمونه ها قرار است به مسافتی دور انتقال یابند، لازم است که در گزارش آزمون درج گردد تا تاثیر احتمالی آن بر روی نتایج آزمون در نظر گرفته شود .

یادآوری ۲ - بهتر است نمونه هادر طی انتقال در دمای 2 ± 6 درجه سلسیوس نگهداری شوند تا، تغییرات تعداد باکتریهای زنده (خصوصاً با توجه به رشد و تحریرک پذیری میکروارگانیسم های هتروتروفیک^۲ در دمای بیش از ۲۰ درجه سلسیوس) به حداقل برسد.

۵ مواد لازم
۵-۱ محیط کشت

1- Biocide
2- Heterotrophic



از مواد شیمیایی با درجه خلوص بالا در آماده سازی محیط‌های کشت و معرفیها استفاده نمائید. ترجیحاً از محیط‌های کشت تجارتي و معرفیهای معتبر استفاده کنید.

محیط کشت را بر طبق دستورالعمل سازنده تهیه نموده و عوامل انتخابی و سایر ملزومات رشد را در غلظت‌های پیشنهادی به آن اضافه کنید. توجه داشته باشید که آب مورد استفاده در آماده سازی محیط کشت باید از دستگاه آب مقطرگیری شیشه‌ای تهیه شده باشد.

۱-۱-۵ محیط کشت بافري حاوي آگار ، عصاره مخمر و کربن فعال (BCYE)

ترکیبات :	مقدار :
عصاره مخمر	۱۰ گرم (Yeast extract bacteriological grad)
آگار	۱۲ گرم Agar
کربن فعال	۲ گرم Activated charcoal
نمک منوپتاسیم آلفاکتو گلوتارات	۱ گرم Alpha- ketoglutarate ,monopotassium salt ACES BUFFER
دو- استامیدو- آمینواتانی سولفونیک اسید	۱۰ گرم (N-2-acetamido-2-aminoethanesulfonic acid)
هیدروکسید پتاسیم	۲/۸ گرم (Potassium hydroxide(KOH Pellets)
ال- سیستئین	۰/۴ گرم L- cysteine hydrochloride monohydrate
هیدروکلراید منوهیدراته پیرو فسفات آهن سه ظرفیتی	۰/۲۵ گرم
آب مقطر	تا ۱۰۰۰ میلی لیتر Distilled

طرز تهیه :

الف - محلولهای سیستئین و آهن

۰/۴ گرم ال- سیستئین هیدروکلراید و ۰/۲۵ گرم پیرو فسفات آهن سه ظرفیتی را ، هر يك بطور جداگانه به ۱۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه نموده تا محلول‌هایی از آن تهیه شود . آنگاه هر محلول را با عبور از صافی با اندازه روزنه ۰/۲۲ میکرون سترون نمائید. محلول‌های بدست آمده را در



ظرف تمیز و سترون شده ریخته و در دمای 3 ± 20 - درجه سلسیوس حداکثر بمدت ۳ ماه می‌توانید نگهداری کنید.

ب - بافر ACES

پودر ACES را، مطابق با دستورالعمل سازنده در ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر ریخته و با قرار دادن در حمام آب گرم در دمای ۴۵ تا ۵۰ درجه سلسیوس حل نمائید سپس هیدروکسید پتاسیم را به طور جداگانه به ۴۸۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه کرده و به آرامی تکان دهید. برای آماده کردن بافر ACES، این دو محلول بدست آمده فوق را با هم مخلوط کنید.

یادآوری - رعایت ترتیب فوق برای جلوگیری از تغییر در عصاره مخمر ضروری است.

پ - محیط نهایی

به طور متوالی به ۹۸۰ میلی لیتر از بافر ACES فوق، کربن فعال، عصاره مخمر و آلفاکتوگلو تارات (طبق بند ۵-۱-۱) اضافه کنید. ۵/۶ گرم از هیدروکسید پتاسیم را در یک لیتر آب مقطر جداگانه حل کنید تا محلول ۰/۱ مول بر لیتر بدست آید. ۵/۳ میلی لیتر از اسید سولفوریک را جداگانه به یک لیتر آب مقطر اضافه کنید. pH محیط را با استفاده از محلول ۰/۱ مول بر لیتر هیدروکسید پتاسیم یا محلول ۰/۱ مول بر لیتر اسید سولفوریک در محدوده ۰/۲۵ تا ۶/۹ تنظیم نمائید. سپس آگار را (طبق بند ۵-۱-۱) به آن اضافه کنید و در دمای 1 ± 121 درجه سلسیوس به مدت 1 ± 15 دقیقه در اتوکلاو سترون نمائید. سپس دمای آن را در حمام آب گرم تا 2 ± 50 درجه سلسیوس کاهش دهید. محلولهای ال - سیستئین و پیرو فسفات آهن سه ظرفیتی تهیه شده در بند الف را در شرایط سترون به تدریج به آن افزوده و مخلوط نمائید. pH نهایی محیط را در دمای ۲۵ درجه سلسیوس حدود 4 ± 6 تنظیم کنید. و از محیط فوق به حجم‌های ۲۰ میلی لیتری در پلیت‌های سترون تقسیم نمائید و سپس در دمای اتاق بگذارید تا رطوبت اضافی پلیت‌ها خشک شود، پلیت‌های فوق را در دمای 2 ± 4 درجه سلسیوس داخل ظروفی با درپوش محکم^۱ و در تاریکی بمدت حداکثر تا ۴ هفته می‌توانید نگهداری کنید.

1- Airtight containers



۲-۱-۵ محیط بافري حاوي عصاره مخمر و کربن فعال بدون ال - سیستئين^۱

محیط را (طبق بند ۱-۱-۵) تهیه کنید با این تفاوت که در این مرحله از اضافه کردن ال -سیستئين خودداری نمائید.

۳-۱-۵ محیط انتخابيGVPC- محیط بافري حاوي عصاره مخمر وکربن فعال با مکمل هاي انتخابي^۲

این محیط با محیط BCYE (طبق بند ۱-۱-۵) از نظر کارايي یکسان بوده و تفاوت آن در ۳ نوع آنتي بیوتیک و يك اسيد آمينه گلیسین به عنوان مکمل است، که (طبق بند ۱-۱-۵-۳-۳) به آن افزوده می شود.

۱-۳-۱-۵ مکملهاي انتخابي

غلظتهاي نهایی در محیط GVPC عبارتست از :

گلاسين عاري از	۳ گرم در لیتر Ammonium- free glycine
آمونيو م بدون گلیسین	
پلي میکسين B بصورت	۸۰۰۰۰ واحد بين المللي در لیتر
نمک سولفات	Polymyxin B Sulfate
وانکو مایسین	۰/۰۰۱ گرم در لیتر Vancomycin
هیدروکلراید	hydrochloride
سیکلو هگزیماید	۰/۰۸ گرم در لیتر Cycloheximide

۲-۳-۱-۵ طرز تهیه مکملهاي آنتي بیوتیک

الف - حدود ۲۰۰ ميلي گرم از پلي میکسين B به صورت نمک سولفات را به ۱۰۰ ميلي لیتر آبمقطر بیافزائید تا غلظتي معادل ۱۴۵۴۵ واحد بين المللي^۳ در ميلي لیتر به دست آید. سپس آنرا مخلوط نموده و توسط صافي غشايي با اندازه

1- Buffered charcoal yeast extract medium without L - cyctein (BCYE)
2- Buffered charcoal yeast extract medium with selective supplements
3- International unit



روزنه ۰/۲۲ میکرون سترون نمائید. آنگاه درحجم های ۵/۵ میلی لیتری در ظروف سترون تقسیم نموده، و در دمای 20 ± 3 - درجه سلسیوس نگهداری نمائید.

قبل از استفاده نمودن با قرار دادن در درجه حرارت اتاق آن را به حالت مایع تبدیل کنید.

ب - ۲۰ میلی گرم وانکومایسین هیدروکلراید را به ۲۰ میلی لیتر آب مقطر افزوده و مخلوط کنید و با عبور از صافی غشایی با اندازه روزنه ۰/۲۲ میکرون آن را سترون نمائید. سپس آن را در لوله های یک میلی لیتری سترون شده تقسیم نموده و در دمای 20 ± 3 - درجه سلسیوس نگهداری نمائید. قبل از استفاده نمودن با قرار دادن در درجه حرارت اتاق آنرا به حالت مایع تبدیل کنید.

پ - ۲ گرم سیکلو هگزیماید را به ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر افزوده و با عبور از صافی غشایی با اندازه روزنه ۰/۲۲ میکرون آن را سترون نمائید، آنگاه در لوله های ۴ میلی لیتری سترون شده تقسیم نموده و در دمای 20 ± 3 - درجه سلسیوس نگهداری نمائید، قبل از استفاده نمودن با قرار دادن در درجه حرارت اتاق آنرا به حالت مایع تبدیل کنید.

یادآوری ۱- مکمل های آنتی بیوتیک دار را می توان در وضعیت انجماد به مدت حداکثر تا شش ماه نگهداری نمود.

یادآوری ۲- سیکلو هگزیماید، سم کبدی^۱ محسوب می شود و در زمان کار با شکل پودری این ماده شیمیایی باید از دستکش و دهان بند^۲ استفاده شود.

1- Hepatotoxic
2- Mask



۳-۳-۱-۵ طرز تهیه محیط کشت GVPC

این محیط را (طبق بند ۱-۱-۵) تهیه کنید با این تفاوت که بعد از اضافه کردن آلفاکتوگلو تارات به محیط کشت، ۳ گرم گلیسین عاری از آمونیم (طبق بند ۱-۳-۱-۵) به آن اضافه نموده و pH را در محدوده $6/9 \pm 0/4$ تنظیم نمایید. پس از اضافه کردن ال-سیستئین و آهن، یک حجم از هر یک از سه آنتی بیوتیک (طبق بند ۲-۳-۱-۵) را به محیط نهایی افزوده و خوب مخلوط کنید.

۴-۳-۱-۵ کنترل کیفیت محیط کشت

از حرارت دادن طولانی حین سترون سازی، یا گرم کردن با دمای بسیار زیاد اجتناب کنید زیرا ممکن است بر روی کیفیت غذایی محیط کشت BCYE اثر نامطلوب بگذارد همچنین به تاریخ تولید و انقضای قابلیت مصرف آن نیز توجه کنید.

به منظور ارزیابی مناسب بودن محیط کشت GVPC برای لژیونلا توصیه می‌شود:

یک نمونه آب حاوی ارگانایسم‌های لژیونلا را به طور هم زمان در پلیتهای محیط GVPC که صحت کارایی آن تأیید شده است بعنوان شاهد، و محیط GVPC تازه تهیه شده تلقیح کنید، پس از

گرمخانه گذاری به منظور حصول اطمینان، نتایج آنها را با یکدیگر مقایسه و نتیجه را ثبت کنید.

یادآوری - سوش‌های لیوفیلیزه لژیونلا نموفیلا زیر گروه یک را می‌توان از مرکز کلکسیون میکرواورگانایسم‌های ایران^۱ تهیه نمود. سپس طبق توصیه مرکز فوق، به منظور ارزیابی و احیاء

۱- منظور مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی و عفونتی ایران - سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی است.



برای خالص کردن آن، بر روی محیط کشت BCYE (طبق بند ۵-۱-۱) کشت مجدد داد.

در صورت در دسترس نبودن این سوشها می‌توان از گونه‌های تازه جدا شده و تائید شده لژیونلا نموفیلا زیر گروه شماره یک، در صورتی که ۱۰ مرتبه کشت مجدد از آن نگذشته باشد، استفاده نمود پس از گرمخانه گذاری از پرگنه هایی که با چشم غیر مسلح قابل دیدن هستند، برای تهیه سوسپانسیون استفاده کنید. و پرگنه مشکوک را در یک میلی لیتر محیط آبگوشت گلیسیرولسترون شده (طبق بند ۵-۲-۳) حل نموده و در دمای 3 ± 20 - درجه سلسیوس نگهداری نمایید. همچنین می‌توانید آن را در محلول نمکی (طبق بند ۵-۳-۱) و یا آب مقطر سترون در دمای 5 ± 70 - درجه سلسیوس نگهداری کنید. (در هنگام استفاده در دمای اتاق قرار دهید تا از حالت انجماد خارج شود. سپس خوب تکان داده و به مدت ۵ الی ۱۰ دقیقه ساکن بماند تا بخارات حاصل کاملاً نشست نماید.)

۲-۵ معرفیها

۱-۲-۵ بافر اسیدی

محلل ۰/۲ مول بر لیتر اسید کلریدریک (الف) و محلل ۰/۲ مول بر لیتر کلرید پتاسیم (ب) را با حل کردن در یک لیتر آب مقطر تهیه کنید. برای تهیه بافر اسیدی باید ۳/۹ میلی لیتر از محلل "الف" و ۲۵ میلی لیتر از محلل "ب" را با یکدیگر مخلوط کنید. pH محلل فوق را با افزودن محلل یکمول بر لیتر هیدروکسید پتاسیم در محدوده $0.2 \pm$ تنظیم نمایید.

یادآوری ۱ - محلل فوق را می‌توانید در یک ظرف شیشه‌ای در پیچ دار، در محلی تاریک و دمای اتاق به مدت حداکثر یک ماه نگهداری کنید.

یادآوری ۲ - برای تهیه محلل ۰/۲ مول بر لیتر اسید کلریدریک باید $17/4$ میلی لیتر اسید کلریدریک غلیظ با وزن مخصوص $1/18$ گرم و درصد خلوص حداقل $35/4$ و یا ۲۰ میلی لیتر اسید کلریدریک



غلیظ یا وزن مخصوص ۱/۱۶ گرم و درصد خلوص حداقل ۳۱/۵ را به یک لیتر آبمقطر اضافه کنید.

۲-۲-۵ محیط گلیسرول مانته^۱

طرز تهیه: ۱ میلی لیتر محلول بافر نمکی فسفات پتاسیم (pH = ۸/۵) را به ۹ میلی لیتر گلیسرول اضافه کنید.

یادآوری - می‌توانید از محیط گلیسرول مانته که به صورت تجاری موجود می‌باشد استفاده نمایید.

۳-۲-۵ محیط آبگوشت گلیسرول^۲

طرز تهیه: ۵ گرم از پودر محیط کشت آبگوشت مغذی که به صورت تجاری در دسترس می‌باشد را در ۱۷۰ میلی لیتر آب مقطر حل نمائید سپس به آن ۳۰ میلی لیتر گلیسرول (طبق بند ۲-۲-۵) اضافه کنید و در لوله‌های خشک و تمیز شیشه‌ای از جنس سیلیکات در حجم‌های ۲ میلی‌لیتری تقسیم نموده و در دمای 1 ± 121 درجه سلسیوس ب مدت 1 ± 20 دقیقه در اتوکلاو، سترون نمائید.

یادآوری - قبل از استفاده نمودن از محیط کشت فوق دمای آن را به دمای اتاق برسانید.

۴-۲-۵ معرفهای سرولوژیکی

الف - آنتی سرم برای لژیونلا نموفیلا و سایر گونه‌های لژیونلا

برای شناسایی لژیونلا نموفیلا از آنتی سرم‌های منو کلونال^۱ و یا پلی کلونال^۲ که قادر به واکنش با تمام زیر گروه‌های لژیونلانموفیلا هستند استفاده می‌گردد.

یادآوری ۱ - در صورت لزوم برای شناسایی گونه‌های دیگر لژیونلا نموفیلا از آنتی سرم‌های ویژه نیز می‌توان استفاده نمود.

1- Glycerol mounting medium

2- Glycerol

1- Monoclonal

2- Polyclonal



ب - آنتی بادی کونژوگه خرگوشی نشان دار شده با ایزو تیوسیانات فلوئورسانس^۲ ، که بصورت تجاری در دسترس می باشد.

یادآوری ۲- بند های الف و ب مندرج در فوق به منظور تشخیص گونه های لژیونلا کاربرد دارد و برای هر میکروارگانیدسم باید آنتی بادی کونژوگه مخصوص به آن تهیه شود.

۳-۵ رقیق کننده ها

۱-۳-۵ محلول سالین پیچ^۱

مقدار :	ترکیبات :
Sodium chloride (Nacl) گرم ۰/۱۲	کلرید سدیم
Magnesium sulfate (MgSO4,7H20) گرم ۰/۰۰۴	سولفات منیزیم
Calcium chloride (CaCl2, 2H20) گرم ۰/۰۰۴	کلرید کلسیم
Disodium hydrogenphosphate (Na2HPO4) گرم ۰/۲۱۴	هیدروژن فسفات دی سدیک
Potassium dihydrogenphosphate (KH2HPO4) گرم ۰/۱۳۶	هیدروژن فسفات دی پتاسیک
Distilled water تا حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر	آب مقطر

ترکیبات فوق را به آب مقطر اضافه کنید و بخوبی مخلوط نمائید تا حاصل شود سپس در دمایی 1 ± 121 درجه سلسیوس به مدت 1 ± 15 دقیقه در اتوکلاو سترون نمائید.

۲-۳-۵ محلول رینگر

با استفاده از قرص هایی که به صورت تجاری و آماده در دسترس هستند رینگر یک به چهار تهیه شود و پس از تقسیم به



حجم‌های مورد نیاز در دمای 1 ± 121 درجه سلسیوس به مدت 1 ± 20 دقیقه در اتوکلاو سترون گردند.

۳-۳-۵ محلول نمک بافر فسفات^۲

مطابق با دستور سازنده، از روش تهیه تجارتي موجود استفاده نمائید.

۴-۳-۵ محلول نمکی فرمال^۳

این محلول را با افزودن ۲۰ میلی لیتر از محلول آبی ۳۷ درصد (کسر حجمی) فرمالدئید به ۹۸۰ میلی لیتر از محلول نمک بافر فسفات (طبق بند ۳-۳-۵) تهیه نمائید.

۶ وسایل لازم

از وسایل معمول در آزمایشگاه میکروبیولوژی مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۲۷۴۷ و همچنین وسایل زیر استفاده نمائید:

۱-۶ پلیتهای سترون با قطر ۹۰ یا ۱۰۰ میلی متر.

۲-۶ گرمخانه قابل تنظیم در دمای 1 ± 36 درجه سلسیوس .

۳-۶ لامپ فراء بنفش که نور آن با طول موج 20 ± 360 نانومتر منتشر گردد.

۴-۶ پمپ فشار مثبت با عبور جریانی معادل ۳ لیتر در دقیقه وبا سرعت متغیر قابل تنظیم

از یک کمپرسور یا دستگاههای مولد فشار دیگر نیز میتوان استفاده نمود.

۵-۶ پمپ خلاء

2- Phosphate – Buffered saline (pH = 7.5)

3- Formal saline



۶-۶ صافی و قیف، که برای صاف کردن آب به حجم های ۵۰۰ میلی لیتر تا ۱۰ لیتر مناسب باشد.

یادآوری - لوازم مورد استفاده در عملیات صاف کردن، باید در برابر حرارت اتوکلاو مقاوم باشد.

۷-۶ صافیهای غشایی باید از جنس پلی کربنات یا نایلونی، با قطر ۴۷ تا ۱۴۲ میلی متر و قطر روزنه ۰/۲۲ و ۰/۴۵ میکرومتر باشد.

۸-۶ لوله های مورد استفاده برای پمپ باید از جنس فولاد زنگ نزن و دارای پوشش سیلیکون باشد، که ضخامت آن کمتر از ۱/۵ میلی متر نباشد،

۹-۶ از اجاق برقی یا شعله گاز بعنوان منبع حرارتی می توانید استفاده کنید.

۱۰-۶ سانتریفوژ با قابلیت شتاب 100 ± 6000 دور و مجهز به درپوش ایمنی

۱۱-۶ لرزاننده^۱، با قابلیت حداقل 5 ± 200 دور در دقیقه

۱۲-۶ حمام آب فراء صوتی^۲، که برای استفاده نمودن نمونه های آب بیش از ۲۵ میلی لیتر مناسب باشد.

۱۳-۶ مخزن ماوراء صوت
۱۴-۶ حمام آب، با قابلیت نگهداری در دمای ۴۵ الی ۵۰ درجه سلسیوس.

۱۵-۶ لوازم شیشه ای معمول در آزمایشگاه میکروبیولوژی

یادآوری - کلیه ظروف شیشه ای را در فور یا آون^۱ با درجه حرارت 170 ± 5 درجه سلسیوس بمدتیک ساعت یا در اتوکلاو با دمای 121 ± 1 درجه سلسیوس بمدت ۲۰ دقیقه سترون نمائید.

۱۶-۶ میکروسکوپها

1- Shakare
2- Ultrasound water bath
1- Oven



۶-۱-۶ میکروسکوپ فلئورسانس^۲

میکروسکوپ از نوع دو چشمی با انتشار نور فلئورسانس، که بزرگنمایی لنزهای شیئی آن باید حداقل ۸، ۱۰ و ۴۰ برابر عدسی چشمی باشد.

۶-۱۶-۲ میکروسکوپ صفحه‌ای^۳، استریوسکوپ^۴، با انتشار غیر مستقیم نور و بزرگنمایی حداقل ۳۰ برابر

۶-۱۷ یخچال قابل تنظیم در دمای 2 ± 6 درجه سلسیوس
۶-۱۸ فریزر قابل تنظیم در دمای 3 ± 20 - درجه سلسیوس

۷ آماده سازی نمونه

چنانچه احتمال می‌دهید که تعداد لژیونلا در نمونه از (۱۰^۰) در لیتر بیشتر باشد، از قسمت مایع نمونه برداشته و مستقیماً بر روی پلیت کشت دهید.

- اگر تعداد لژیونلا در نمونه کم باشد، به منظور حصول اطمینان در شناسایی آن از روشهای تغلیظ استفاده کنید.
- از آنجائیکه معمولاً "اطلاعات قبلی و دقتی از نمونه ارسال در دسترس نیست، لذا استفاده از شیوه‌های تغلیظ (سانتریفوژ و یا صافی غشایی) ضروری است.

۷-۱ تغلیظ به روش صافی غشایی با استفاده از پمپ فشار

مثبت

اجزاء مختلف دستگاه شامل (صافی غشایی، پایه نگهدارنده صافی ولوله‌ها) را بر روی ارلن تخلیه سوار کنید. طبق استاندارد ملی ایران به شماره ۴۲۰۷ در صورتی که صافی مورد استفاده سترون‌نباشد، مجموعه فوق را در حالیکه صافی روی پایه نگهدارنده قرار گرفته است، در اتوکلاو سترون‌کنید سپس با رعایت شرایط سترونی و با استفاده از پمپ پریستالتیک، نمونه آب را صاف کنید.

یادآوری - سرعت جریان آب از صافی باید به گونه‌ای تنظیم

شود که از حداکثر مقدار پیشنهادی شرکت سازنده برای اندازه و نوع صافی تجاوز نکند.

2- Fluorescent microscope
3- Plate microscope
4- Stereoscope



۷-۱-۱ تغلیظ به روش صافی غشایی با استفاده از پمپ خلاء

برای صاف کردن حجم‌های کمتر از ۲۰۰ میلی لیتر از پمپ خلاء استفاده کنید.

طبق استاندارد ملی ایران شماره ۴۲۰۷ پس از صاف کردن نمونه، صافی را با استفاده از گره سرصاف سترون از محفظه نگهدارنده صافی جدا کنید. صافی را بدقت، به گونه‌ای بردارید که در رسوبات باقی مانده تغییری حاصل نشود. سپس مستقیماً آن را در یک ظرف سترون در پیچ دار قرار دهید. به منظور جدا سازی ارگانیسم‌ها از روی سطح غشاء صافی می‌توان از ۵ تا ۲۵ میلی لیتر رقیق‌کننده سترون طبق (بندهای ۱-۳-۵) و (۲-۳-۵) و یا آب مقطر سترون استفاده نمود، آنگاه محلول جمع آوری شده حاوی باکتری را بمدت ۲ دقیقه بشدت تکان دهید. (برای کمک به جدا سازی باکتری از صافی و سرعت عمل می‌توان به کمک یک قیچی سترون، صافی را به قطعات کوچکتر تقسیم نمود و سپس آنها را در رقیق کننده مناسب با آن غوطه ور کنید.)

روش دیگر جدا سازی باکتری از صافی این است که ظرف را همراه با صافی در یک مخزن ماوراء صوت برای مدت ۲ تا ۱۰ دقیقه قرار دهید. باید برای هر نمونه بطور جداگانه عمل شود و اطمینان حاصل کنید تا سطح میزان رقیق کننده که صافی را پوشانده است، از سطح آب مخزن ماوراء صوت پائین‌تر باشد.

یادآوری - با توجه به اینکه نمونه‌های کدر، تیره و یا رنگی در فرآیند صاف کردن ایجاد اشکال می‌کنند لازم است که این نوع نمونه‌ها قبل از صاف کردن مطابق با (بند ۷-۲) سانتریفوژ شوند.

۷-۲ تغلیظ به روش سانتریفوژ نمودن

پس از تکان دادن نمونه به منظور تعلیق مجدد رسوبات ته نشین شده آن، مقدار 200 ± 5



میلی لیتر از هر نمونه را در ظروف سترون در پیچ دار مخصوص سانتریفوژ با ظرفیت حجمی ۳۰۰ تا ۵۰۰ میلی لیتر بریزید. سپس آن را در دور ۶۰۰۰ g برای مدت ۱۰ دقیقه و یا دور ۳۰۰۰ g برای مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ نمایید. (در طی سانتریفوژ، دمای ۱۵ الی ۲۵ درجه سلسیوس در محیط حفظ گردد). سپس لایه فوقانی یا مواد شناور در سطح را در شرایط سترونی برداشته و دور بریزید و رسوب حاصل را در ۲ الی ۲۰ میلی لیتر ماده رقیق کننده (بند ۵-۳-۱) یا (۵-۳-۳) و یا آب مقطر سترون ریخته تا به حال تعلیق درآید و حجم رقیق کننده اضافه شده را ثبت نمایید.

یادآوری ۱ - توصیه می‌شود مواد شناور در سطح فوقانی نمونه به کمک خلاء تخلیه شود، زیرا استفاده از این روش از اختلاط رسوبات جلوگیری می‌کند.

یادآوری ۲ - در صورتی که حجم نمونه جهت تغلیظ کمتر از $5 \pm$ ۲۰۰ میلی لیتر باشد رسوبات باید در حجم‌های مناسب با رقیق کننده حل شود.

۳-۷ رسوبها، ته نشستها و لجنها

یادآوری ۱ - این نوع نمونه‌ها را باید به منظور کاهش تعداد ارگانیس‌های غیرلژیونلا، رقیق کنید.

رقت‌های فوق را در رقیق کننده‌های سترون (بند ۵-۳-۱) یا (۵-۳-۲) تهیه کنید و با استفاده از دستگاه تکان دهنده آن را به مدت زمان حداکثر تا ۲ دقیقه مخلوط کنید. به منظور یکنواخت سازی ذرات می‌توان از گلوله‌های شیشه‌ای سترون معمول در آزمایشگاه میکروبیولوژی به هنگام مخلوط شدن استفاده نمود.

در نمونه‌های لجن چنانچه قوام آن مناسب باشد، بخشی از آن را بدون عمل رقیق سازی و با رعایت نکات زیر به پلیت حاوی محیط کشت اضافه نمایید:

الف - بعد از عمل آوری^۱ با گرم‌مطابق با (بند ۷-۳-۱)

ب - بعد از عمل آوری با اسید مطابق با (بند ۷-۳-۲)

ج - بدون هیچ گونه عمل آوری مطابق با (بند ۷-۳-۳)



یادآوری ۲ - در صورتی که لجن مورد آزمون، به مواد خشک و یا به مواد ساختاری دیگری متصل باشد، در این صورت باید به کمک قاشق سترون آن را خراشیده و در حجم کمی از مایع رقیق کننده سترون بند (۱-۳-۵) یا (۲-۳-۵) به صورت تعلیق درآورد سپس مطابق با (بند ۲-۷) عمل کنید..

یادآوری ۳ - کلیه روشهای کار انجام شده باید درج گردد.

۱-۳-۷ عمل آوری با گرما

۰/۵ ± ۱ میلی لیتر از نمونه تغلیظ شده (بند ۲-۷) را به یک ظرف سترون انتقال دهید و آن را در حمام آب گرم، (بند ۱۲-۶) و در دمای ۵۰±۱ درجه سلسیوس به مدت ۲ ± ۳۰ دقیقه قرار دهید.

۲-۳-۷ عمل آوری با اسید

۱ الی ۱۰ میلی لیتر از نمونه تغلیظ شده (بند ۲-۷) را در لوله درپوش دار سترون ریخته و در دور ۶۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه و یا در دور ۳۰۰۰ g به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ نمائید و با یک پیپتسترون قسمت فوقانی نمونه را برداشته و دور بریزید به گونه ای که حجم اولیه آن نصف گردد سپس سوبها را با استفاده از تکان دهنده، مجدداً " به حالت تعلیق درآورید. با افزایش بافر اسیدی (بند ۱-۲-۵) حجم نمونه را به حجم اولیه اش رسانده و به آرامی مخلوط کنید و آنرا به مدت ۵ دقیقه به حالت ساکن قرار دهید.

۳-۳-۷ بدون هیچگونه عمل آوری

یادآوری ۱ - نمونه های تغلیظ شده، رسوبها، ته نشستها و لجنها حتی الامکان سریعاً مورد آزمایش قرار گیرند و چنانچه امکانپذیر

نباشد باید در دمای 2 ± 6 درجه سلسیوس حداکثر به مدت ۱۴ روز و در تاریکی نگهداری شوند.

یادآوری ۲ - با توجه به اینکه برخی از انواع گونه‌های لژیونلا می‌توانند ماهها در آب زنده بمانند درحالیکه برخی دیگر ممکن است سریعاً از بین بروند، لذا آزمایش مجدد نمونه‌های تغلیظ شده در موارد شیوع بیماری ناشی از لژیونلا حائز اهمیت است.

۸ مراحل اجرای آزمون

۱-۸ کشت

نمونه را با توجه به نوع آن (تغلیظ شده یا تغلیظ نشده) به سه قسمت تقسیم کنید. یک قسمت آن را بدون هیچگونه عمل آوری کنار بگذارید. قسمت دوم را برای عمل آوری با گرما و قسمت سوم را برای عمل آوری با اسید در نظر بگیرید. سپس ۰/۱ الی ۰/۵ میلی لیتر از نمونه عمل آوری نشده (تغلیظ شده یا تغلیظ نشده) را به پلیت حاوی محیط کشت GVPC آگار (بند ۵-۱-۳) تلقیح کنید و با یک میله شیشه‌ای سترون آن را در سطح محیط کشت پخش نمایید.

مقدار ۰/۱ الی ۰/۵ میلی لیتر از نمونه عمل آوری شده با گرما (بند ۷-۳-۱) را به پلیت حاوی محیط کشت GVPC آگار تلقیح کرده و با میله شیشه‌ای در سطح محیط کشت پخش نمایید و توجه داشته باشید نمونه باید بلافاصله پس از عمل آوری با گرما، کشت داده شود.

مقدار ۰/۱ الی ۰/۵ میلی لیتر از نمونه عمل آوری شده با اسید (بند ۷-۳-۲) را بر روی محیط کشت GVPC آگار کشت دهید و با میله شیشه‌ای سترون آن را در سطح محیط کشت پخش کنید. نمونه باید بلافاصله پس از عمل آوری با اسید کشت داده شود.



یادآوری- به منظور بررسی موارد شیوع و همه گیرشنا سی^۱، پیشنهاد می شود که پس از مراحل کشت، قسمت های استفاده نشده نمونه تخلیظ شده به همان روش برای مدت حداقل تا ۳ ماه نگهداری شود. همچنین جزئیات و تاریخ تخلیظ نمونه و حجم نمونه های تلقیح شده در روش های مختلف باید ثبت شود.

۲-۸ گرمخانه گذاری

برای اینکه مواد تلقیح شده جذب محیط کشت شود، پلیت ها را مدتی به حالت سکون قرار دهید سپس آنها را به طور وارونه در دمای 36 ± 1 درجه سلسیوس، حداکثر بمدت ۱۰ روز گرمخانه گذاری نمائید و هر چند وقت یکبار پلیت ها را بررسی کنید. به منظور اطمینان داشتن از رطوبت داخل گرمخانه، ظرفی محتوی آب مقطر در گرمخانه قرار دهید.

یادآوری - گرمخانه گذاری در هوای محتوی ۲/۵ درصد دی اکسید کربن نیز برای رشد برخی از گونه های لژیونلاها سودمند است ولی ضروری نیست.

۳-۸ بررسی پلیت ها

در طی ده روز گرمخانه گذاری، پلیت ها را با میکروسکوپ صفحه ای مجهز به جایگاه پلیت (بند ۶-۱۶) حداقل سه مرتبه در روز بررسی نمائید. از آنجائیکه رشد لژیونلا به آهستگی می باشد و ممکن است توسط میکروارگانیزم های دیگر پوشانده شوند، لذا باید در هر مرحله بررسی، شمارش شده و تعداد آنها ثبت گردد.

پرگنه های لژیونلا اغلب به رنگ سفید، آبی، خاکستری یا ارغوانی بوده اما ممکن است به رنگ های قهوه ای، صورتی زرد کهربائی تا سبز کمرنگ و یا قرمز دیده شوند. همچنین دارای لبه و سطحی صاف و یکدست با ظاهری شفاف همانند قطرات آب می باشند و برخی از گونه های آن نیز تحت تاثیر لامپ نور ماورا بنفش (بند ۶-۳) از خود فلورسانس سفید درخشان^۲ و برخی دیگر فلورسانس قرمز^۳ ایجاد می کنند. پرگنه های لژیونلانموفیلا اغلب به رنگ سبز تیره که با رنگ زرد آمیخته شده است دیده می شوند. در نمونه هایی که گونه های مختلف لژیونلا وجود دارد رنگ فلورسانس می تواند عامل کمکی در تشخیص آنها باشد.

یادآوری ۱ - پلیت ها نباید برای مدت زمان بیشتر از حد نیاز در معرض نور ماوراء بنفش قرار گیرند، زیرا باعث از بین رفتن سلول های لژیونلا می گردد.

1- Epidemiological

2- (L.Cherrii-L.ansia – L.dumoffii – L.gormanii – LbozemaniiL.parsisiensis – L.tucsonensis)

3- L.erythra – L.rubrilucens

یادآوری ۲ - امکان دارد گونه‌های جدیدی از لژیونلا دیده شوند که با بقیه گونه‌ها متفاوت باشند که نیاز به بررسی بیشتری دارد.

۴-۸ مراحل تأییدی

۱-۴-۸ کشت تأییدی بر روی BCYE و محیط‌های دیگر

حداقل ۳ پرگنه مشخص از هر پلیت حاوی GVPC (بند ۸-۳) برای کشت تأییدی انتخاب کنید و به‌طور همزمان بر روی پلیت‌های محیط کشت بافري دارای آگار، عصاره مخمر و کربن فعال (بند ۵-۱-۱) و (بند ۵-۱-۲) بدون سیستمین کشت دهید و در دمایی 36 ± 1 درجه سلسیوس برای مدت حداقل ۲ روز گرمخانه گذاری نمایید.

پرگنه‌های لژیونلا که بر روی محیط کشت BCYE سیستمین دار (بند ۵-۱-۱) رشد کرده ولی بر روی محیط BCYE بدون سیستمین (بند ۵-۱-۲) رشد نمی‌کند، را بعنوان لژیونلاي تأیید شده تلقی کنید که باید نتیجه هر دو پلیت را گزارش نمود.

یادآوری ۱ - گروه و یا زیرگروه‌های لژیونلاي رشد کرده بر روی محیط BCYE را می‌توان با استفاده از آزمون‌های سرولوژیکی تأیید و تعیین هویت نمود.

یادآوری ۲ - به جای محیط BCYE-CYS فاقد سیستمین بند (۵-۱-۲) می‌توانید از محیط‌های آگار مغذی^۱ و یا آگار خون دار^۲ استفاده کنید. چنانچه رشدی بر روی محیط‌ها مشاهده نشد، پرگنه‌های

1- Nutrient agar
2- Blood agar

بیشتری از پلیت‌های اصلی برداشت کنید و مراحل کشت تأییدی را مجدداً انجام دهید.

۸-۴-۲ شناسایی گونه‌های لژیونلا به روش ایمونو فلوئورسانس^۱ قبل از انجام آزمایش‌های اختصاصی برای شناسایی گونه‌های لژیونلا لازم است ابتدا با بررسی ریخت‌شناختی^۲ پرگنه‌ها، از خالص و یک دست بودن رشد بر روی محیط کشت BCYE مطمئن‌شوید و کلنی منفرد را مجدداً^۳ در محیط BCYE کشت دهید و مطابق زیر عمل کنید.

یادآوری - برای شناسایی گونه‌های لژیونلا یکی از روش‌های زیر را می‌توانید استفاده کنید.

- الف - روش گاز کروماتوگرافی مایع اسیدهای چرب سلولی و کینونهای ایزوپرینوزل^۴
- ب - سنجش آنتی‌بادی ایمونوفلوئورسانس غیر مستقیم و مستقیم^۵
- پ - روش انعقاد بر روی لام^۶ با آنتی‌بادی اختصاصی
- ت - روش انعقاد لاتکس^۷ با آنتی‌بادی اختصاصی
- ث - روش لکه‌گذاری پرگنه‌ها^۸
- ج - روش الیزا^۹

۹ بیان نتایج

مجموع تعداد لژیونلای تأیید شده در نمونه آب یا رسوب و یا لجن که از سه پلیت حاوی محیط کشت (مطابق با بند ۸) (GVPC) این استاندارد جدا نموده‌اید را پس از ضرب کردن آن در ضریب رقت بر حسب تعداد واحدهای تشکیل دهنده پرگنه^۹ محاسبه و گزارش نمایید.

وجود یا عدم وجود لژیونلا پنیوموفیلا را نیز گزارش نمایید. برای گزارش نتیجه منفی آزمون از عبارت "لژیونلا در حجم مورد آزمایش مشاهده نشد" استفاده کنید.

1- Immunofluorescence

2- Morphology

3- Isoprenozel

4- Direct and indirect immunofluorescent antibody assay

5- Slide agglutination

6- Latex bead

7- Colony blot assay

8- Elisa (Enzyme linked immuno assay

9- Colony forming unit (CFU)



یادآوری - باید توجه داشت میانگین حاصل از سه پلیت را نباید گزارش نمود، زیرا این پلیت‌ها تکراری از یکدیگر نمی‌باشند.

۱۰ گزارش آزمون

گزارش آزمایش باید شامل اطلاعات زیر باشد:

- ۱-۱۰ مرجع آزمایش (استاندارد ملی ایران
(.....
- ۲-۱۰ ذکر کلیه جزئیات ضروری برای تشخیص کامل نمونه شامل نوع نمونه، محل نمونه برداری، چگونگی سیستم آب (کولر - چیلر و غیره) روش نمونه برداری
- ۳-۱۰ حجم نمونه یا وزن نمونه مورد آزمون
- ۴-۱۰ تاریخ نمونه برداری، تاریخ رسیدن نمونه به آزمایشگاه و تاریخ آزمون در آزمایشگاه
- ۵-۱۰ در تمامی مراحل کار هر رخداد ویژه که ممکن است بر روی نتایج مربوطه تاثیر بگذارند، باید قید شود.
- ۶-۱۰ بیان نتایج طبق بند ۹ این استاندارد بیان گردد.



ISLAMIC REPUBLIC OF IRAN

Institute of Standards and Industrial Research of Iran

ISIRI NUMBER

_5859



–

Water microbiology- Detection and enumeration of legionella – Microbiological test method

1st. Revision