www.abpsoil.com
ابنیه پایدار سبز

جمهوری اسلامی ایران

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

شمارهٔ استاندارد ایران

_6822

آب ـ جداسازي آنتروويروسها 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 آب ـ جداسازی انترو ویروسها ـ روش آزمون میکروبیولوژی

رئیس	سمت یا نمایندگی
قاضی ، فریده(دکترای ویروس شناسی ملکولی)	دانشگاه علوم پزشکی ایران
اعضاء	
جهانتاب، سهیلا(فوق لیسانس میکروبیولوژی)	شرکت آب و فاضلاب استان تهران
قبادی دانا، مریم(لیسانس میکروبیولوژی)	موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
کرمی ، منیژه(دکترای فیزیولوژی جانوری)	دانشگاه شاهد
گزرین، علی اکبر(فوق لیسانس ویروس شناسی)	دانشگاه علوم پزشکی ایران
ملکی ،فاطمه(دکترای انگل شناسی)	دانشگاه علوم پزشکی ایران
دبیر	
یاسائی، شکوه(فوق لیسانس انگل شناسی پزشکی)	موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

فهرست مندرجات — **صفحه**

پیشگفتار الف
مقدمه ب
۱- هدف ۱
۲- دامنه کاربرد ۱
۳- اصطلاحات و تعاریف ۱
٤- اساس روش ۳
٥- مواد لازم ۳

٦- وسایل لازم ٦
٧- روش اجرای آزمون ٧

مقدمه

انتروویروسها از جهت سلامت عمومی حائز اهمیت می باشند و در محیطهای آبی وجود دارند. این ویروسها در آبهای تصفیه شده[1] یافت می شوند و عوامل بیماریهای مختلفی از هپاتیت تا گاستروآنتریت می باشند. این ویروسها فاقد غشاء لیپیدی بوده، در محیطهای اسیدی از جمله اسید معده پایدار هستند. عفونت انتروویروسی در جوامعی با سطح اقتصادی، اجتماعی پائین خصوصاً در شرایطی که تراکم جمعیت وجود داشته باشد و در مناطق گرمسیری که بهداشت ضعیفی دارند شایع می باشد. شیوع این ویروسها در فصل گرم تابستان و در آب و هوای معتدل می باشد و انتقال آنها از راه دهانی ـ مدفوعی است. انتروویروسها در شرایط عادی به ویژه در بین کودکان شایع می باشند. عفونتهای انتروویروسی بیمارستانی نیز گزارش گردیده است. بیشترین شیوع عفونت مربوط به بخشهای نوزادان و شیر خوارگاهها می باشد.

پیشگفتار

استاندارد آب ـ جداسازی آنتروویروسها ـ روش آزمون میکروبیولوژی که توسط کمیسیونهای مربوط تهیه و تدوین شده و در چهل و هشتمین جلسه کمیته ملی استاندارد میکروبیولوژی و بیولوژی مورخ ۸۲/۵/۲۵ مورد تصویب قرار گرفته، اینک به استناد بند ۱ ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ بعنوان استاندارد ملی ایران منتشر میگردد.

برای حفظ همگامی و هماهنگی بار پیشرفتهای ملی و جهانی در زمینه صنایع و علوم و خدمات استانداردهای ملی ایران در موقع لزوم تجدید نظر خواهد شد و هر گونه پیشنهادی که برای اصلاح یا تکمیل این استاندارد برسد در تجدید نظر بعدی مورد توجه قرار خواهد شد. بنابراین برای مراجعه به استاندارد ایران باید همواره از آخرین چاپ و تجدید نظر آنها استفاده کرد.

1- Treated Water

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. لذا با بررسی امکانات و مهارتهای موجود و اجرای آزمایشهای لازم این استاندارد با استفاده از منابع زیر تهیه گردیده است.

1- ASTM D5244-92 1992 Standard practice for recovery of Enteroviruses from Waters.
2- Cann. A. J. Virus Culture(1999). Published in the united states.

آب ـ جداسازی انتروویروسها ـ روش آزمون میکروبیولوژی

۲ هدف

هدف از تدوین این استاندارد تعیین روش آزمون جهت جداسازی انتروویروسها در آب می باشد .

۳ دامنه کاربرد

این روش برای جداسازی انتروویروسها در آبهای مختلف(آبهای تصفیه شده،فاضلابها، نهرها و آبهای سطحی) به کار میرود.

۴ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد اصطلاحات و یا واژه ها با تعاریف زیر بکار می رود:

۳-۱ کشت سلولی تک لایه[1]

یک لایه سلولی که روی سطح درونی فلاسک پلاستیکی یا شیشه ای رشد کرده و به آن متصل شده است.

۳-۲ قطبیت مثبت

عبارتست ازیک رشتهRNAکه هم جهت با mRNA بوده،مستقیماً به پروتئین قابل ترجمه می باشد.

1- *Cell monolayer*

۳-۳ انترو ویروس[1]

یک جنس از خانواده پیکورناویریده با قطری حدود ۲۲ تا ۳۰ نانومتر و حاوی یک رشته RNA با قطبیت مثبت است که در شرایط اسیدی پایدار و نسبت به اتر مقاومند. انترووویروسها شامل پولیو[2] ویروسها، کوکساکی[3] ویروسها واکوویروسها[4] می باشند.

۳-۴ انتریک ویروس[5]

به ویروسهایی اطلاق می شود که از طریق دهان وارد بدن میزبان شده، در سلولهای دستگاه گوارش تکثیر یافته و در نمونه های مدفوع مشاهده می شوند. آدِنوویروسها[6]، روتاویروسها[7]، نورواک ویروسها[8]، استرو ویروسها[9] و کالسی ویروسها نیز در این گروه قرار دارند.

۳-۵ پلاک[10]

ناحیه شفافی که دراثر صدمات حاصل ازرشد ویروس بر روی کشت سلولی تک لایه، ایجاد می شود.

۳-۶ کولوئید

یک سیستم شیمیایی متشکل از ماده زمینه ای همراه با ذرات کوچک با اندازه های ۱۰۰۰-۱ نانومتر است که قدرت جاذبه در آنها بی تاثیر بوده به صورت امولسیون یا سوسپانسیون می باشند.

۳-۷ فلوکولاسیون[11]

یک پدیده کولوئیدی است که به طور کامل در محیط پخش شده و قابل مشاهده می باشد.

1- Enterovirus
2- Poliovirus
3- Coxackievirus
4- Echovirus
5- Enteric virus
6- Adenovirus
7- Rotavirus
8- Astrovirus
9- Calcivirus
10- Plaque
11- Flucculation

۵ اساس روش

این روش بر اساس فیلتراسیون نمونه های آب می باشد. بدین منظور حداقل ٤٠٠ لیتر آب یا بیشتر مورد نیاز است.فیلتر کارتریج دارای شارژ منفی است و برای تشخیص مقادیر کم ویروس در آب استفاده می شود. ویروس جذب شده به فیلتر بوسیله عصاره گلیسینی گوشت گوساله با pH برابر ۹ جدا گردیده و از آن عبور می کند. سپس به روش فلوکولاسیون آلی تغلیظ می شود. این عمل با کاهش pH عصاره گوشت گوساله تا میزان ۳/۵ انجام می گیرد و به صورت توده در می آید. برای آزادسازی ویروسها از این توده متراکم از محلول فسفات استفاده می شود.

۶ مواد لازم

۵-۱ محلول کلرید آلومینیوم

ترکیبات	مقدار
کلرید آلومینیوم با ٦ مولکول آب[1]	۱۰۰ گرم
آب مقطر	۱ لیتر

طرز تهیه : کلرید آلومینیوم را در آب حل نموده و به حجم یک لیتر می رسانیم .

۵-۲ پودر عصاره گوشت گاو

***یادآوری :** این ترکیب بصورت آماده تجاری در دسترس است و در pH برابر ۳/۵ قابل انعقاد می باشد.*

۵-۳ محلول فسفات سدیم

ترکیبات	مقدار
فسفات هیدروژن دی سدیم با ۷ مولکول آب[2]	٤٠/٢١ گرم
آب مقطر	کمتر از ۱ لیتر

طرز تهیه : فسفات هیدروژن دی سدیم را در آب حل نموده و به حجم یک لیتر می رسانیم .

1- $ALCL_3.6H_2O$
1- $Na_2HPO_4 . 7H_2O$

۵-۴ گلیسین

۵-۵ اسید کلریدریک ۱ به ۹

ترکیبات	مقدار
اسید کلریدریک	۱ حجم
آب مقطر	۹ حجم

طرز تهیه : اسید کلریدریک با وزن مخصوص ۱/۱۹ گرم را با آب مخلوط می نمائیم .

۵-۶ محلول هیدروکسید سدیم

ترکیبات	مقدار
هیدروکسید سدیم	٤٠ گرم
آب مقطر	۱ لیتر

طرز تهیه : سود را در آب حل نموده و به حجم یک لیتر می رسانیم .

۵-۷ محلول تیوسولفات سدیم

ترکیبات	مقدار
تیوسولفات سدیم با ۵ مولکول آب[1]	۱۰۰ گرم
آب مقطر	۱ لیتر

طرز تهیه : تیوسولفات سدیم را در آب حل نموده و به حجم یک لیتر می رسانیم .

۵-۸ عصاره ۳ ٪ گوشت گاو بافر شده

ترکیبات	مقدار
پودر عصاره گوشت گاو (طبق بند ٥-٢)	٦٠ گرم
گلیسین(طبق بند ٥-٤)	۷/۵ گرم
محلول سود(طبق بند ٥-٦)	٤٠ گرم در لیتر

1- $Na_2S_2O_3.5H_2O$

آب مقطر	۲ لیتر

طرز تهیه : پودر عصاره گوشت گاو(طبق بند ۵-۲) را با گلیسین مخلوط کرده و در آب حل می نمائیم سپس محلول عصاره گوشت گوساله را در ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو می کنیم و پس از آن pH را توسط هیدروکسید سدیم به ۹ می رسانیم.

۵-۹ محیط Overlay

بخش اول محیط دی ام ای [1]

ترکیبات	مقدار
گلوکز	٤/٥ گرم
L ـ گلوتامین	۰/۳ گرم
پیروات سدیم	۰/۱ گرم
بی کربنات سدیم	۲/۵ گرم
آب مقطر	۱ لیتر
استرپتومایسین	۰/۵ میلی لیتر
پنی سیلین	۰/۵ میلی لیتر

طرز تهیه : ترکیبات فوق(به جز دو انتی بیوتیک) را در یک لیتر آب مقطر استریل حل نموده و سپس استرپتومایسین و پنی سیلین را به آن افزوده و ترکیب حاصل را با فیلتر ۰/٤٥ میکرون فیلتر می نمائیم.

بخش دوم آگار دو درصد

ترکیبات	مقدار
آگار	۲ گرم
آب مقطر	۱۰۰ میلی لیتر

آگار را در آب مقطر حل می نمائیم.

طرز تهیه محیط کامل : حجم های مساوی از محیط DME با غلظت مضاعف را با آگار دو درصد مخلوط می نمائیم.

1- Dulbecc' s Modified Eagl' s Media(DME)

۷ وسایل لازم

۶-۱ پلیت چاهکدار

۶-۲ نگهدارنده ۱۰ اینچی برای کاتریج فیلتر به طول ۲۵/٤ سانتی متر

۶-۳ کاتریج فیلتر از جنس فایبرگلاس که به طور منفی شارژ شده و قطر آن ۲۵/٤ سانتی متر و سوراخها و منافذ آن ۰/٤۵ میکرون است .

۶-۴ pH متری که به طور دقیق میزان pH تا ۰/۱ را اندازه گیری می نماید.

۶-۵ همزن مغناطیسی

۶-۶ پمپ هوا که به نگهدارنده فیلتر فشار وارد می کند و این فشار نباید بیشتر از ۵/۳ کیلوگرم بر سانتی متر مربع (به توصیه کارخانه) باشد.

یادآوری : زمانیکه ویروس را جدا می نمائیم فشار نباید بیش از ۰/٤ کیلوگرم بر سانتی متر مربع باشد، در نتیجه بافر محلول ۳ ٪ عصاره گوشت گاو در اثر فشار به کندی از فیلتر کاتریج عبور کرده و بدین ترتیب زمان خالص سازی به حداکثر می رسد.

۶-۷ لوله های باریک پخش کننده فشار .

۶-۸ سانتریفوژ یخچال دار با دور g × ۲۵۰۰

۸ روش اجرای آزمون

۷-۱ آماده سازی نمونه

نمونه آب باید بدون کلر باشد در صورتیکه احتمال می دهید که آب حاوی کلر است به ازای هر لیتر از نمونه ۰/۸ میلی لیتر محلول تیوسولفات سدیم بیفزائید و سپس pH نمونه را با استفاده از اسیدکلریدریک ۱ به ۹ (یک حجم اسید و نه حجم آب) تا میزان ۳/۵ کاهش دهید. نمونه را با سرعت با اسید مخلوط نمائید تا از کاهش زیاد pH آب مورد آزمایش که منجر به غیرفعال شدن ویروس می گردد ممانعت گردد. هر لیتر

از نمونه اسیدی شده را با ۰/۵ میلی لیتر از محلول کلرید آلومینیوم (طبق بند ۵-۱) مخلوط نمائید(غلظت نهائی کلرید آلومینیوم ۰/۰۰۰۵ مول می باشد).

۷-۲ جذب ویروس

نمونه آماده شده در بند ۷-۱ را که pH آن تنظیم شده از فیلتر فایبرگلاس با منافذ ۰/٤٥ میکرون که در پلیت قرار داده شده عبور داده و سپس فیلتر را خشک نمائید .

۷-۳ جداسازی ویروس

۱٦۰۰ میلی لیتر از بافر ۳٪ عصاره گوشت گوساله را با فشار از فیلتر عبور داده و در بشر جمع آوری نمائید. بقیه عصاره گوشت گوساله راکه درکاتریج فیلتر باقی مانده در همان بشر جمع آوری می کنید.

۷-۴ تغلیظ ویروسها

ابتدا عصاره گوشت جمع آوری شده در بشر را روی همزن مغناطیسی بهم زده و سپس با همزن گردابی آنرا مخلوط نمائید(اینکار نباید به سرعت انجام گیرد که ایجاد کف نماید). در حین مخلوط کردن نمونه آنقدر اسید کلریدریک (۱به۹) اضافه کنید تا pH آن به ۳/۵ برسد. مایع تشکیل شده را به مدت ۳۰ دقیقه مخلوط نمائید. سوسپانسیون حاصل را در سانتریفوژ یخچال دار ٤ درجه سلسیوس در دور g × ۲۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ کنید.مایع روئی را در استوانه مدرج ریخته و حجم آنرا یادداشت نمائید. سپس مایع روئی را دور ریخته به ازای هر ۱۰ میلی لیتر رسوب جمع آوری شده ۰/۵ میلی لیتر از محلول فسفات سدیم بیافزائید.

توده جمع آوری شده در ته لوله (رسوب ته لوله) را روی همزن مغناطیسی به هم زنید تا توده کاملا حل شود. بلافاصله محلول تغلیظ شده را در یخچال ٤ درجه سلسیوس قرار دهید. اگر بخواهید با این مخلوط در عرض ۸ ساعت کار کنید آنرا در یخچال ٤ درجه با دمای سلسیوس قرار دهید در غیر اینصورت مخلوط در دمای ۷۰- درجه سلسیوس نگهداری کنید.

۷-۵ سنجش ویروس

برای تعیین مقدار ویروس از روش تعیین پلاک[1] استفاده نمائید.

۷-۵-۱ روش تعیین پلاک

۷-۵-۱-۱ رقت های ۱۰ تایی را از سوسپانسیون ویروس تهیه نمائید. در ضمن تهیه هر رقت پیپت را تعویض کنید.

۷-۵-۱-۲ ۰/۱ میلی لیتر از هر رقت سوسپانسیون ویروس را به هر دو چاهک[2] افزوده و پلیت را در ۳۷ درجه سانتی گراد در محیط ۵٪ دی اکسید کربن به مدت۲-۱ساعت انکوبه نمائید تا ویروس جذب گردد.

۷-۵-۱-۳ سپس ۱-۲ میلی لیتر از محیط Overlay (طبق بند ۵-۹) را به هر چاهک بیافزائید. سپس به مدت ۵ روز در انکوباتور تنظیم شده در ۳۷ درجه سلسیوس قرار دهید.

۷-۵-۱-۴ محیط Overlay را خارج کرده و سلولها را در متانل به مدت۱۰ دقیقه تثبیت نمائید.

۷-۵-۱-۵ متانول را از داخل چاهکها خارج کرده وسلولها را با کریستال ویوله ۰/۵ درصد تهیه شده در متانول و آب (۲۰ حجم از متانول و ۸۰ حجم از آب) به مدت ۲۰ دقیقه رنگ آمیزی نمائید.

۷-۵-۱-۶ رنگ را خارج نموده ، سلولها را با آب شهری شستشو داده و در هوای آزمایشگاه خشک نمائید.

۷-۵-۱-۷ تعداد پلاکهای هر رقت را شمرده و(تعداد واحدهای تشکیل دهنده پلاک)[3] رادر ۰/۱ میلی لیتر با استفاده از فرمول ۱ محاسبه نمایید.

$$\text{PFU/ml} = \text{میانگین پلاکهای دو چاهک} \times \frac{۱}{\text{رقت}}$$

1- *Plaque assay*
2- *Wells*
1- *Plaque forming units(PFU)*

www.abpsoil.com

ISLAMIC REPUBLIC OF IRAN

Institute of Standards and Industrial Research of Iran

ISIRI NUMBER

_6822

Water - Recovery of Enteroviruses - Microbiological test method

1st. Revision