www.abpsoil.com
ابنیه پایدار سبز

جمهوری اسلامی ایران

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

شمارهٔ استاندارد ایران

_6987

_

آب - شناسايي و شمارش ژيارديا و كريپتوسپوريديوم به روش ايمونوفلورسانس- 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 شناسایی و شمارش کریپتوسپوریدیوم و ژیاردیا به روش ایمونوفلورسانس»

رئیس	سمت یا نمایندگی
کاظمی، بهرام(دکترای پارازیتولوژی)	دانشیار دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
اعضاء	
سرگزی، مریم(لیسانس میکروبیولوژی)	شرکت آب و فاضلاب شهرها و شهرکهای غرب تهران
کرمی، منیژه(دکترای فیزیولوژی جانوری)	دانشگاه شاهد
ملکی، فاطمه(دکترای پارازیتولوژی)	دانشگاه علوم‌پزشکی ایران
موسوی، ناهید (لیسانس بیولوژی)	شرکت آب و فاضلاب استان تهران
نکودری، حمیده (فوق‌لیسانس محیط زیست)	شرکت آب و فاضلاب استان تهران
دبیر	
یاسائی، شکوه فوق‌لیسانس انگل‌شناسی‌پزشکی)	مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

فهرست مندرجات

عنوان **صفحه**

پیشگفتار ..... الف
مقدمه ..... ب
۱. هدف ۱
۲. دامنه کاربرد ۱
۳. اصطلاحات و تعاریف ۱
٤. اساس روش ۳
۵. نمونه‌برداری ۳
٦. مواد لازم ۵
۷. وسایل لازم ۹
۸. روش اجرای آزمون ۱۰
۹. بیان نتایج ۱۷
پیوست الف ـ کریپتوسپوریدیوم پارووم ۱۹
پیوست ب ـ ژیاردیا لامبلیا ۲۱

پیشگفتار

استاندارد آب ـ شناسایی و شمارش ژیاردیا و کریپتوسپوریدیوم به روش ایمونوفلورسانس که توسط کمیسیون‌های مربوط تهیه و تدوین شده و در پنجاه و یکمین جلسه کمیته ملی استاندارد میکروبیولوژی و بیولوژی مورخ ۸۲/۱۰/۲۹ 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 ملی ایران منتشر می‌گردد.

برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفتهای ملی و جهانی در زمینه صنایع، علوم و خدمات استانداردهای ملی ایران در مواقع لزوم تجدیدنظر خواهد شد و هرگونه پیشنهادی که برای اصلاح یا تکمیل این استانداردها ارائه شود، در هنگام تجدیدنظر در کمیسیون فنی مربوط مورد توجه 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 شـود.

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

1. A.P.H.A/A.W.W.A/W.E.F: Standard Methods for the examination of water and waste water, 20th ed, 1998.
2. Markell, Voge, John. Medical Parasitology, 1992.
3. P.C. Beaver. Clinical Parasitology, 1989.

٤. نکودری، حمیده. «بررسی کیفی آب خام و تصفیه شدهٔ رودخانهٔ کرج»، پایان‌نامهٔکارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، سال ۱۳۷۸.

٥. روحانی، سهیلا. انگل‌شناسی هاریسون، ناشر شهراب، سال ۱۳۷۵.

مقدمه

تك‌ياخته‌هاي انگلي ژياردیا[1] و كريپتوسپوريديوم[2] در رودة حيوانات اهلي و وحشي و همچنين انسان ايجاد بيماري مي‌كنند. انتقال آلودگي از طريق تماس مستقيم مدفوع انسان و حيوان با آب آشاميدني انجام مي‌گيرد. مصرف آبهاي سطحي حاوي اين ارگانيسم‌ها نيز سبب ايجاد بيماري مي‌شود. ژياردیا در رشد ٤٥% كودكان مبتلا اختلال ايجاد مي‌نمايد.

خاك و آبهاي سطحي منبع آلودگي اين ارگانيسم‌ها مي‌باشند. آبهاي سطحي كه از كوهستانها جاري مي‌شوند و به منابع بزرگ آب شهري وارد مي‌شوند، در معرض آلودگي به كيست‌هاي ژياردیا قرار دارند. همچنين اين آلودگي در سيستم‌هاي آبرساني قديمي به علت نشت آب فاضلابها در اين سيستم بروز مي‌نمايد. در بين تك‌ياخته‌هاي بيماري‌زا ژياردیا بالاترين توان را جهت انتقال از طريق آب آشاميدني داراست كه به دلايل زير مي‌باشد:

۱) كيست‌هاي آن در مقابل گندزدايي مقاومت زيادي دارند و با مقدار كلري كه باكتريها را از بين مي‌برد، از بين نمي‌روند.

۲) كيست‌هاي آن مي‌توانند به مدت طولاني در آب سرد زنده بمانند.

---

1. Giardia
2. Cryptosporidium

شيوع كريپتوسپوريديوزيس[1] در ارتباط با آب آشاميدني تصفيه نشده، آبهايي كه فقط كلرزني شده‌اند و آبهايي كه از طريق روشهاي متعارف تصفيه شده‌اند، مي‌باشد. چون اندازة اووسيست آن فقط ٤ تا ٦ ميكرومتر مي‌باشد، ميزان حذف آنها از طريق فرايندهاي متنوع تصفيه هنوز واضح و روشن نيست.

آب ـ شناسايي و شمارش ژيارديا و كريپتوسپوريديوم به روش ايمنوفلورسانس ـ

روش آزمون ميكروبيولوژي

١ هدف

هدف از تدوين اين استاندارد ارائه روشي براي تشخيص و شمارش كيستهاي ژيارديا و اووسيستهاي كريپتوسپوريديوم به روش آنتي بادي فلورسنت مي‌باشد.

٢ دامنه كاربرد

اين روش براي تشخيص ژيارديا و كريپتوسپوريديوم در آبهاي خام و آشاميدني سطحي بكار مي‌رود.

٣ اصطلاحات و تعاريف

در اين استاندارد اصطلاحات و / يا واژه ها با تعاريف زير بكار مي‌رود.

٣-١ آكسونم[2]

ساختمان ميله‌اي شكل مركب از رشته‌هايي است كه در مركز تاژك قرار دارد و در تك‌ياخته‌هائي مانند ژيارديا، اسپيرونوكلئوس[3] و تريكوموناس[4] مشاهده مي‌شود.

---

3. Cryptosporidiosis
1. Axoneme
2. Spironucleus
3. Trichomonas

۳-۲ کیست ژیاردیا [۱]

مرحله‌اي از دورة تكاملي ارگانيسم است كه در شرايط نامناسب محيطي ايجاد مي‌گردد و هنگام تشكيل كيست (كيسته شدن[۲]) ديواره‌اي اطراف ارگانيسم را فرا مي‌گيرد.

۳-۳ اجسام میانی[۳]

یک جفت اندامک[۴] برجسته تیره رنگ است که حاوی میکروتوبولهای خلفی بوده و در ژیاردیای انسانی، چکشی شکل اما در ژیاردیا موریس[۵]، کروی می‌باشند.

۳-۴ اووسیست کریپتوسپوریدیوم[۶]

تخم کیسته شدهٔ اکثر هاگ‌زیان[۷] مانند کریپتوسپوریدیوم است که در مدفوع آلوده یافت می‌شود و در شرایط نامساعد محیطی مقاومت می‌کند. اووسیست مرحلهٔ آلوده‌کنندهٔ کریپتوسپوریدیوم می‌باشد.

۳-۵ جسم باقی‌مانده[۸]

ساختمان دانه‌داری که پس از تشکیل اسپوروزوئیت باقی می‌ماند و در اووسیست کریپتوسپوریدیوم مشاهده می‌شود. این اندامک توسط غشائی احاطه شده و حاوی ریبوزومها، شبکه آندوپلاسمی و میکرونم‌ها[۹] می‌باشد.

---

4. Cyst
5. Encystation
1. Median Bodies
2. Organle
3. Giardia Muris
4. Oocyst
5. Sporozoa
6. Residual Body
7. Micronema

۳-۶ اسپوروزوئیت

مرحلهٔ عفونت‌زا و متحرک اکثر هاگ‌زیان مانند کریپتوسپوریدیوم است که از طریق تولید مثل جنسی ایجاد می‌شود، در صورت انتقال به میزبان واسط، به صورت غیرجنسی در بافتها تکثیر می‌یابد.

۳-۷ آب خام[1]

آبی که هیچ پروسهٔ تصفیه‌ای روی آن صورت نگرفته باشد و شامل آبهای زیرزمینی و سطحی می‌باشـد.

۳-۸ آبهای سطحی

به آبهایی اطلاق می‌شود که برخلاف آبهای زیرزمینی بر روی زمین قرار دارند و بیشتر در معرض آلاینده‌ها (میکروبی و شیمیایی) هستند و می‌توانند کیفیت بسیار متغیری داشته باشند. این آبها شامل آب رودخانه‌ها و دریاچه‌ها می‌باشـند.

۳-۹ آبهای زیرزمینی

آبهایی که در زیرزمین قرار دارند و شامل آب چاهها می‌باشـند.

۴ اساس روش

این روش بر اساس نشاندار کردن تک یاخته با آنتی بادی فلورسنت می‌باشد. برای تشخیص تک‌یاخته‌های کریپتوسپوریدیوم و ژیاردیا حجم زیادی از آب (حد اقل ۳۸۰ لیتر) توسط صافی غشائی تغلیظ می‌شود. ذرات باقیمانده روی صافی غشایی توسط شوینده شسته شده و سپس سانتریفوژ می‌گردند. جداسازی تک‌یاخته‌های مذکور با شناور کردن در محلولی که دارای وزن مخصوص $1/1 g/cm^3$ می‌باشد، انجام می‌گیرد. تک‌یاخته‌ها روی یک لایه صافی غشائی پخش شده، با آنتی‌بادی فلورسنت، نشان‌دار شده و با میکروسکوپ ایمنوفلورسانس مشاهده می‌گردند.

---

1. Ground and Surface Water

۵ نمونه‌برداری

۵-۱ آماده‌سازی وسایل نمونه‌برداری

سترونی وسایل نمونه‌برداری ضروری نیست، اما باید عاری از اووسیستها و کیستهای انگل باشند. بدین منظور بین دو نمونه‌گیری باید وسایل با آب مقطر شسته شوند تا از انتقال انگلها به نمونه‌های بعدی جلوگیری به عمل آید (جلوگیری از مثبت کاذب). اگر چندین نمونه با یک دستگاه جمع‌آوری می‌شود (با استفاده از صافی‌ها و نگهدارنده‌های متفاوت)، نمونه‌گیری را به ترتیب از محل هایی که کمترین آلودگی را دارند (آب آشامیدنی کلردار) شروع کرده و به محلی که بیشترین آلودگی را دارد (آب منبع) ختم نمائید. اگر لازم باشد برای نمونه‌گیری بعدی، قطعات وسیله نمونه‌گیری باز و بسته شوند، قبل از استقرار سیستم فیلتراسیون، همه وسایل بجز صافی حداقل با ۱۹۰ لیتر نمونهٔ آب مورد آزمایش شستشو داده شـوند. به منظور جلوگیری از آلودگی، باید پمپ در انتهای خروجی دستگاه نصب شود و لوله‌های آن از جنس مقاوم باشـند.

۵-۲ جمع‌آوری نمونه

ابتدا مشخصات مربوط به نمونه مانند حجم جمع‌آوری شده، نام شخص نمونه‌بردار، میزان کدورت که هرچه میزان آن بیشتر باشد، حجم آب برای تغلیظ کمتر می‌باشد. تاریخ و محل نمونه‌گیری را روی برچسب نگهدارنده صافی بنویسـید. برای شروع کار پمپ، ورودی دستگاه را به شیر آب پُرفشار، متصل کنید. جریان آب را از صافی عبور دهید، میزان جریان آب را ٤ لیتر در دقیقه تنظیم کنید، اما می‌توان این میزان را تا ۱۰ لیتر در دقیقه افزایش داد. حداقل ۳۸۰ لیتر از نمونه را جمع‌آوری نمائید. برای حذف کلرباقیماندهٔ آب از محلول تیوسولفات سدیم با غلظت ۵ گرم در لیتر استفاده می‌شـود. بعد از فیلتراسیون جریان را قطع کرده،

زمان توقف، حجم آب عبوری و کدورت را روی برچسب نگهدارندهٔ صافی ثبت نمائیـد. به هنگام جدا کردن قطعات دستگاه، به منظور جلوگیری از برگشت ذرات جمع شده روی صافی، قسمت خروجی پائین‌تر از قسمت ورودی قرار گیرد.

آب باقیمانده روی نگهدارندهٔ صافی را در ظرف درداری خالی نموده، آن را در محفظه دیگری قرار دهیـد. اطلاعات قبلی را روی قسمت خارجی ظرف ثبت کرده و نمونه را روی یخ خشک در دمای ۲ تا ۵ درجه قرار داده و سپس نمونه را منجمدکنیـد.

۶ مواد لازم

۶-۱ محلول‌ها و محیط‌ها

۶-۱-۱ محلول فرمالدئیـد

ترکیبات	مقدار
فرمالدئید ۳۷٪	۱۰ میلی‌لیتر
آب مقطر	۹۰ میلی‌لیتر

طرز تهیه : فرمالدئید ۳۷ درصد را با آب مخلوط نمائید.

۶-۱-۲ محلول تیوسولفات سدیم ۵ گرم در لیتر

ترکیبات	مقدار
تیوسولفات سدیم با ۵ مولکول آب تبلور[1]	۰/۵ گرم
آب مقطر	تا ۱۰۰ میلی لیتر

طرز تهیه : تیوسولفات سدیم را در آب حل کرده، حجم نهائی را به ۱۰۰ میلی‌لیتر برسانید.

1. $Na_2S_2O_3.\ 5H_2O$

۶-۱-۳ بافر فسفاته نمکی[1] (محلول آماده به کار).

ترکیبات	مقدار
کلرید سدیم	۸۰ گرم
پتاسیم هیدروژن فسفات	۲ گرم
دی سدیم هیدروژن فسفات با ۱۲ مولکول آب[2]	۲۹ گرم
کلرید پتاسیم	۲ گرم
آب مقطر	تا ۱۰۰۰ میلی‌لیتر

طرز تهیه : مواد فوق را با هم مخلوط کرده و با آب مقطر به حجم یک لیتر برسانید. یک حجم از بافر ذخیره را با ۹ حجم آب مخلوط کرده با سود ۰/۱ نرمال یا اسیدکلریدریک ۰/۱ نرمال pH آن را به ۱/± ۷/٤ برسانید.

۶-۱-۴ محلول سدیم دودسیل سولفات[3] ۱٪

ترکیبات	مقدار
سدیم دودسیل سولفات	۱ گرم
آب	تا ۱۰۰ میلی‌لیتر

طرز تهیه : سدیم دودسیل سولفات را در آب حل کرده و به حجم ۱۰۰ میلی لیتر برسانید.

۶-۱-۵ محلول ذخیرهٔ پلی‌سوربات ۱ درصد

ترکیبات	مقدار

2. Phosphate-Buffered-Saline (PBS)
1. $Na_2HPO_4 \cdot {}_{12}H_2O$

3. Dodecyl Sulfate Solution

پلی‌سوربات	۱ میلی‌لیتر
آب	۹۹ میلی‌لیتر

طرز تهیه : پلی‌سوربات را در آب حل کرده و به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر برسانید.

۶-۱-۶ محلول الوشن[1]

ترکیبات	مقدار
سدیم دودسیل سولفات	۱۰۰ میلی‌لیتر
پلی‌سوربات	۱۰۰ میلی‌لیتر

طرز تهیه : مواد بالا را با بافر فسفاته نمکی (طبق بند ٦-۱-۳) به حجم یک لیتر برسانید (حداقل سه لیتر از این محلول موردنیاز می‌باشد).

۶-۱-۷ محلول شناورسازی [2]

ترکیبات	مقدار
سیلیکا یا پرکول[3] با وزن مخصوص ۱/۱۳	٤٥ میلی‌لیتر
آب	٤٥ میلی‌لیتر
محلول ساکارز ۲/۵ مولار	۱۰ میلی‌لیتر

طرز تهیه : مواد فوق را با هم مخلوط کرده و سپس وزن مخصوص آن را کنترل نمائید طوری که ۱/۰۹ تا ۱/۱۰ باشد. اگر وزن مخصوص آن کمتر از ۱/۰۹ بود، استفاده نشود.

۶-۱-۸ آنتی‌بادی نشاندار شده با مواد فلورسنت[1]

1. Eluting Solution
2. Flotation Solution
3. Polyvinylpyrrolidone-Coated Colloidal Silica (Percoll)

۶-۱-۹ محلول گلیسرول – اتانول

اتانول برای آبگیری نمونه و گلیسرول جهت ممانعت از شکنندگی صافی استفاده می گردد که با درجات مختلف اتانول طبق جدول ۱ تهیه میشود

جدول ۱- مقادیر گلیسرل و اتانول جهت تهیه محلول گلیسرل – اتانول

درصد نهائی اتانول	حجم نهائی (برحسب میلی‌لیتر)	مقدار آب مقطر (برحسب میلی‌لیتر)	گلیسرول (برحسب میلی‌لیتر)	مقدار اتانول ۹۵٪ (برحسب میلی‌لیتر)
۱۰	۹۵	۸۰	۵	۱۰
۲۰	۹۵	۷۰	۵	۲۰
٤۰	۹۵	۵۰	۵	٤۰
۸۰	۹۵	۱۰	۵	۸۰
۹۵	۱۰۰	۰	۵	۹۵

۶-۱-۱۰ محیط مونته‌کننده ۲٪ [۲]

ترکیبات	مقدار
گلیسرول	۹۵ میلی‌لیتر
دی‌آزبی‌سیکلواکتان[۳]	۲ گرم

طرز تهیه : دی‌آزبی‌سیکلواکتان را به گلیسرول اضافه کنید (این کار روی همزن[۱] مجهز به گرم‌کننده انجام گیرد). سپس با گلیسرول حجم آن را به ۱۰۰ میلی‌لیتر برسانید و در دمای اتاق نگهداری کنید.

---

۱. به صورت تجارتی در دسترس می‌باشد.

2. Mounting Medium

3. Diazabicyclo Octane (DABCO)

یاد آوری ۱- این ماده غیرقابل استنشاق و سوزش‌آور است.

۶-۱-۱۱ سرم آلبومین گاوی ۱٪

ترکیبات	مقدار
سرم آلبومین گاوی کریستاله	۱ گرم
بافر فسفاته	۸۵ میلی‌لیتر

طرز تهیه : ترکیبات بالا را با استفاده از همزن مگنت‌دار کاملاً مخلوط کنید. سپس حجم آن رابا بافر فسفاته نمکی (طبق بند ٦-۱-۳) به ۱۰۰ میلی‌لیتر برسانید (محلول فوق را در دمای ٤ درجه سلسیوس نگهداری کنید).

۶-۲ وسایل لازم

٦-۲-۱ نگهدارنده صافی با طول ۱۰ اینچ (۲۵/٤ سانتیمتر)

٦-۲-۲ صافی پلی‌پروپلین با منافذ به قطر یک میکرون

٦-۲-۳ صافی استات سلولز

٦-۲-٤ نگهدارندهٔ صافی با قطر ۲۵ میلی‌متر (تکی یا چندتائی)

٦-۲-٥ آب‌سنج[۲]

٦-۲-٦ انژکتور برای تزریق کلر آب

٦-۲-۷ شیر کنترل آب (٤ تا ۱۰ لیتر در دقیقه)

٦-۲-۸ پمپ

٦-۲-۹ خنک‌کنندهٔ آب

٦-۲-۱۰ سانتریفوژ باروتور سوئینگ آوت[۱]

---

1. Stirrer
1. Water Meter

۶-۲-۱۱ مخلوط‌کننده

۶-۲-۱۲ منبع ایجادکنندهٔ خلأ

۶-۲-۱۳ گرمخانه ۳۷ درجه سلسیوس

۶-۲-۱۴ هموژنایزر

۶-۲-۱۵ حمام اولتراسونیک برای تمیز کردن پروب هموژنایزر

۶-۲-۱۶ میکروسکوپ ایمونوفلورسانس

۷ روش اجرای آزمون

۷-۱ جداسازی انگلها از صافی

۷-۱-۱ حداکثر ۴۸ ساعت پس از جمع‌آوری نمونه با استفاده از دستکشهای لاتکس صافی را از روی دستگاه بردارید و در ظرفی با عمق مناسب قرار دهید تا قطرات آبی که از میان صافی می‌چکد، در آن ظرف جمع‌آوری شـود.

۷-۱-۲ آب جمع‌آوری شده را درون یک بشر بریزید و ظرف را با محلول الوشن (طبق بند ۶-۱-۶) شستشو داده، به بشر اضافه کنید.

۷-۱-۳ با یک وسیله برنده، سه برش طولی در صافی ایجاد کنید. قسمت داخلی تمیزتر است شستشو را از قسمت داخلی شروع کنید (هر قسمت با یک لیتر محلول الوشن شستشو داده شود).

۷-۱-۴ برای شستشوی فیبرهای صافی آنها را بوسیلهٔ دست با بهره‌گیری از انبرک داخل محلول الوشن تکان دهید. آنگاه صافی‌ها را به مدت ۵ دقیقه در یک لیتر محلول الوشن قرار داده، سپس سونیکه کنید. این

---

2. Swing Out

کار را برای لایه‌های دیگر فیبر تکرار کنید. وقتی که همه فیبرها شسته شدند، سه حجم فوق (یک لیتری) را به آب جمع‌آوری شدهٔ قبلی بیافزائید. از روش زیر نیز می‌توان استفاده نمود.

۷-۱-۵ صافی‌ها را با استفاده از دستگاه هموژنایزر آزمایشگاهی همگن کنید.

۷-۱-٦ صافی‌ها را از قسمت مرکزی پلاستیکی برش داده، به قطعات ۵ سانتیمتری تقسیم کنید. سپس آن را در کیسه‌های سترون هموژنایزر (با گنجایش ۳/۵ لیتر) قرار داده و ۱۷۵۰ میلی‌لیتر محلول الوشن به آن بیافزائید.

۷-۱-۷ قطعات مذکور ۳ بار به مدت ۱۵ دقیقه با فواصل زمانی ۳ دقیقه در دستگاه هموژنایزر قرار داده و همگن نمائید. بین فواصل همگن کردن صافیها را با دست جابجا کنید.

۷-۱-۸ پس از همگن کردن، قطعات صافی را با دست بفشارید تا مایع درون آنها خارج شود.

۷-۱-۹ مواد حاصل از شستشوی صافی‌ها را با شتاب ۱۰۵۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ نمائید. **یادآوری**

۱. مناسب‌تر است که از لوله‌های مخروطی و روتور سوینگ اوت استفاده نمائید.

۷-۱-۱۰ حجم رسوب حاصله را یادداشت کرده و با دقت مایع روئی را جدا کنید و رسوب را با مقدار هم حجم فرمالدئید ۳۷٪ مخلوط نمائید. اگر حجم رسوب کمتر از ۰/۵ میلی‌لیتر باشد، به آن فرمالدئید اضافه کرده و حجم آن را با آب مقطر به ۱ میلی‌لیتر برسانیـــد.

۷-۲ خالص‌سازی به روش شناور کردن

حداکثر ۱ میلی‌لیتر از محلول تهیه شده را با محلول الوشن به حجم ۲۰ میلی‌لیتر برسانید. به مدت ۲۰ دقیقه سونیکه نموده و سپس در ۳۰ میلی‌لیتر محلول شناورسازی توسط پیپت یا سرنگ مخلوط نمائید (در لوله مخروطی شکل ۵۰ میلی‌لیتری). به آرامی محلول را به مدت ۱۰ دقیقه با شتاب ۱۰۵۰g سانتریفوژ نمائید. به

آرامی سرعت سانتریفوژ را زیاد کنید تا وقتی که لوله‌ها به صورت افقی درآیند. سرعت را نیز به آرامی کاهش دهیـد و از توقف ناگهانی سانتریفوژ پرهیز کنیـد. توسط یک پیپت پاستور (ابتدا با محلول الوشن آن را تمیز کنید)۲۰ میلی‌لیتر از محلول روئی و مقدار ۵ میلی‌لیتر محلول شناورسازی را به لوله سانتریفوژ منتقل کرده و با مخلوط کردن، سوسپانسیون آن را برای ایمونو فلورسنت غیر مستقیم آماده نمائیـد.

۳-۷ روش فلورسنت آنتی‌بادی غیرمستقیم[1]

از نگهدارنده‌های صافی استفاده نمائیـد .روی نگهدارندهٔ هر صافی یک محافظت‌کننده صافی با قطر ۲۵ میلی‌متر و همچنین یک صافی از جنس استات سلولز با اندازهٔ روزنه ۰/۲ میکرومتر قرار دهیـد.

به تعداد نمونه‌های مورد آزمایش، صافی آماده کنید. بعلاوه در هر آزمایش کنترل مثبت و منفی در نظر بگیرید. قبل از قرار دادن نمونه‌ها روی صافی بهتر است چاهکها و غشاءهای استات سلولز با ۲ میلی‌لیتر سرم آلبومین گاوی ۱٪ شسته شـوند. بخشی از محلول مذکور را روی صافی استات سلولز قرار دهید. مطمئن شوید که نمونه کاملاً روی صافی پخش شده است. برای قابل تشخیص شدن آن توسط میکروسکوپ، تعداد کافی از نمونه‌ها را بکار برید تا تک‌لایه‌ای ایجاد شود. ممکن است لازم باشد این کار چندین بار تکرار شود تا حداقل یک تک‌لایه از مواد روی صافی ایجاد شود. وجود ذرات خارجی زیاد روی صافی‌ها، تشخیص کیست‌ها و اووسیست‌ها را مشکل نموده و در مشاهدهٔ ساختمان داخلی آنها تداخل ایجاد می‌کند. می‌توانید آنتی‌بادی اولیه کریپتوسـپوریدیوم پاروم و ژیاردیا لامبلیا را می‌توانیـد با هم یا جدا جدا با بافر فسـفاته نمکی (طبق بند ٦-۱-۳) مخلوط نمائید، بطوریکه یک محلول مناسبی ایجاد شود. مقدار کافی از مخلوط آنتی‌بادی (معمولاً ۰/۵ میلی‌لیتر) را روی صافی ریخته تا مانع خشک شدن آن گردد. مخلوط باقیمانده را به مدت ۲۵ دقیقه در حرارت اتاق با صافی تماس دهید. پس از تماس آنتی‌بادی با صافی‌ها، هر

1. Indirect Flourscent Antibody (IFA)

صافی را ۵ بار با ۲ میلی‌لیتر بافر فسفاته نمکی شستشو دهید. ۰/۵ میلی‌لیتر از مادهٔ کونژوگه را به هر غشاء اضافه کنید و اجازه دهید تا به مدت ۲۵ دقیقه در حرارت اتاق با صافی در تماس باشند. با پوشاندن چاهکها از تابش مستقیم نور به آنها جلوگیری کرده و مانع آبگیری و کریستالیزه شدن رنگ فلورسین ایزوتیوسیانات[1] شوید. نهایتاً هر چاهک و صافی را ۵ دفعه با ۲ میلی‌لیتر بافر فسفاته نمکی شستشو دهید. صافی‌ها را در مقادیر ۱ میلی‌لیتر از اتانول ۱۰، ۲۰، ٤۰، ۸۰ و ۹۵ درصد حاوی گلیسرول ۵ درصد آبگیری نمائید. قبل از شروع مرحلهٔ بعدی، محلول را از روی صافی حذف کنید.

۷-۴ ثابت کردن صافی

برای هر صافی یک لام میکروسکوپی (۷۵ × ۲۵ میلی‌متر) علامت‌گذاری کنید و ۷۵ میکرولیتر از محیط مونته‌کنندهٔ ۲٪ (طبق بند ٦-۱-۱۰) را روی آن بریزید. چنانچه محیط از قبل گرم نشده باشد، لام میکروسکوپی را در گرمخانه ۳۷ درجه سلسیوس قرار دهید. قسمت بالای صافی از جنس استات سلولز را با یک انبرک نوک باریک جدا کرده و بر روی لام آماده شده قرار دهید، بطوریکه نمونه رو به بالا باشد. برای تماس کامل صافی با محیط مونته‌کننده آن را با انبر جابجا کنید تا محیط به زیر آن نفوذ کند. بعد از یک دوره ۲۰ دقیقه‌ای صافی شروع به شفاف شدن می‌کند اما، اگر سفید شد، مقداری از محیط مونته‌کننده (طبق بند ٦-۱-۱۰) زیر آن بریزید. سپس ۲۰ میکرولیتر از محیط فوق روی هر صافی بریزید و با لامل (۲۵×۲۵ میلی‌متر) آن را بپوشانید. با گوشه انبرک حبابها را خارج کرده، اطراف لام را تمیز نمائید. اطراف هر یک از لامها را با لاک ناخن شفاف درزگیری[2] کنید. لامها را در یک دسیکاتور در ٤ درجه سلسیوس نگهداری کنید و آنها را حداکثر طی مدت ۵ روز مورد بررسی میکروسکوپی قرار دهید.

یاد آوری ۲- لامهای کدر ارزش مطالعه ندارند.

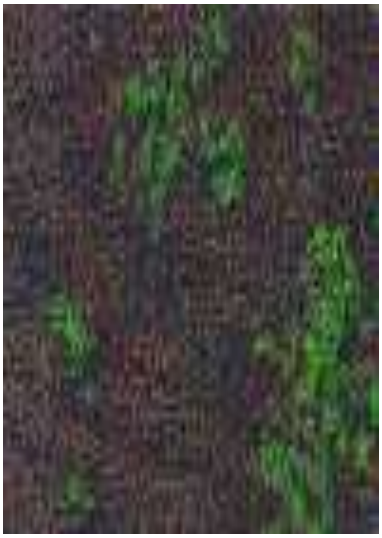
---

1. Fluorescein Isothiocyanate (FITC)
1. Seal

۷-۵ بررسی میکروسکوپی

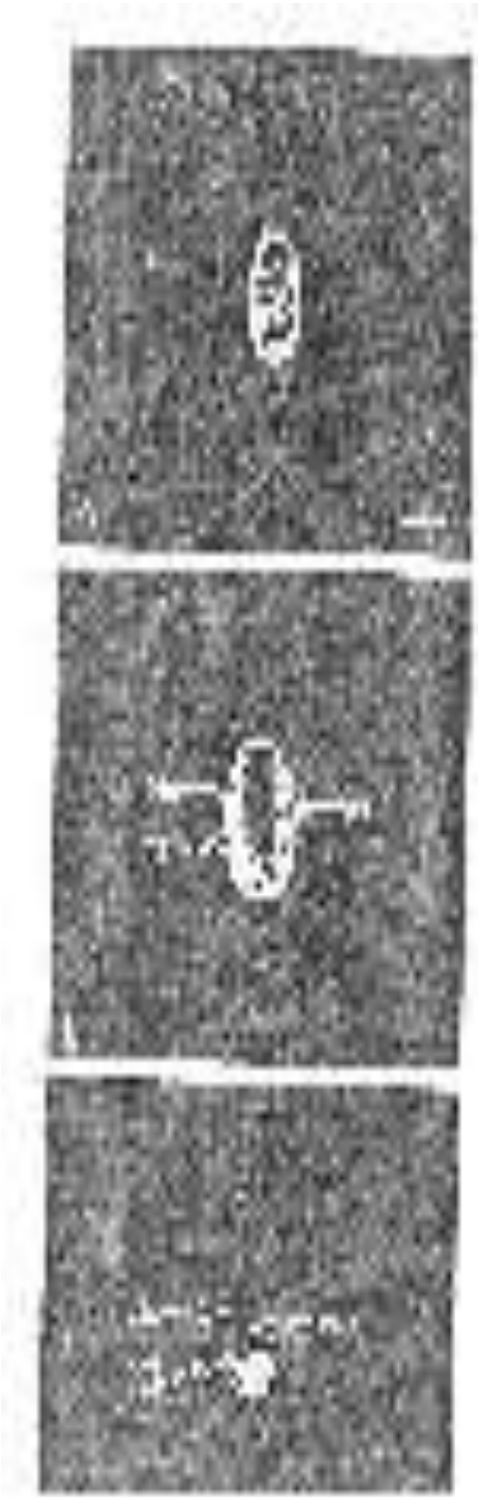
کنترلهای مثبت و منفی را بررسی کنید تا مطمئن شوید که معرفها به خوبی عمل نموده‌اند. هر نمونه را به طور کامل بررسی کنید. در شکل ۱ و ۲ مربوط به اووسیستهای کریپتوسپوریدیوم و شکل ۳ مربوط به کیستهای ژیاردیا می‌باشد. فلورسنت شدن نمونه با آنتی‌بادی دلیل بر وجود کریپتوسپوریدیوم و ژیاردیا نمی‌باشد و حتماً مشخصات میکروسکوپی و ساختمان داخلی انگلهای فوق را مورد نظر قرار دهید. تعداد هسته‌ها، اکسونم و مدیان بادی و همچنین کیستهائی را که دارای ساختمان داخلی کامل بوده‌اند، یادداشت نمائیـد.

بررسی تعداد اسپروزوئیت‌ها، اجسام باقیمانده در اووسیست کریپتوسپوریدیوم لازم می‌باشد. تعداد اسپوروزوئیت‌ها و همچنین اووسیستهائی را که ساختمان داخلی کاملی دارند، یادداشـت کنیـد.



شکل ۷-۵-۱ اووسیست کریپتوسپوریدیوم

شکل ۷-۵-۲ کریپتوسپوریدیوم



شکل ۷-۵-۳ کیست ژیاردیا

۸ بیان نتـایــج

درصد کل نمونه‌هائی را که بررسی میکروسکوپی شده‌اند، یادداشت کنید. حجم نهائی نمونه را نسبت به حجم کل آب صاف شده، حجم رسوب تغلیظ شده، تعداد صافی‌های آزمایش شده (۲۵ میلی‌متری) و مقدار نمونه‌ای را که برای هر صافی استفاده شده محاسبه کنید. تعداد کیستهای ژیاردیا و اووسیستهای کریپتوسپوریدیوم را در ۱۰۰ لیتر نمونه گزارش کنیـد.

پیوست الف

کریپتوسپوریدیوم پاروم

(اطلاعاتی)

کریپتوسپوریدیوم کوکسیدیائی کوچک با انتشار جهانی می‌باشد که ۲۰ گونه آن از انواع مهره‌داران (پستانداران، پرندگان، خزندگان و ماهی‌ها) گزارش گردیده‌اند. گونهٔ مبتلاکننده انسانی و بسیاری از پستانداران پاروم نام دارد. بیماری از طریق بلع شکل بیماری‌زای تک‌یاخته که اووسیست می‌باشد، ایجاد می‌شـود. انسانها و سایر پستانداران منبع ذخیرهٔ ارگانیسم می‌باشند و آلودگی منابع آب با فضولات آنها به انتقال آن از طریق آب آشامیدنی منجر می‌شود. انتقال بیماری می‌تواند از طریق تماس شخص به شخص نیز صورت گیرد که در مهدکودک‌ها و پانسیون‌های روزانه، در بین افراد یک خانواده و در بین کارکنان سرویس‌های پزشکی دیده می‌شـود. اووسیست‌های جدا شده از انسان برای بسیاری از پستانداران نظیر گاو و گوسفند می‌تواند آلوده‌کننده و بیماری‌زا باشـد. اووسیست‌ها کاملاً مقاوم هستند و در مقابل کلری که به آب جهت کشتن میکروبها زده می‌شود، مقاومت نشان می‌دهند. در انتقال بیماری ناشی از کریپتوسپوریدیوم استخرهای شنا نیز می‌توانند نقش داشته باشند.

سیر تکاملی کریپتوسپوریدیوم در داخل سلولهای اپی‌تلیال پرزهای روده رخ می‌دهد. کریپتوسپوریدیوزیس در افراد با سیستم ایمنی کامل از طریق علائمی چون اسهال خود محدود شونده‌ای

مشخص می‌گردد که معمولاً حدود ۲ هفته به طول می‌انجامد. گرچه در این افراد ممکن است علائمی چون ناراحتی شکمی، بی‌اشتهائی، تب، تهوع و کاهش وزن نیز دیده شود، اما در بین بیماران مبتلا به نقص ایمنی به وضوح اسهال شدیدتر بوده، همراه با شدت علائم فوق می‌باشد.در مبتلایان به ایدز و یا در افرادی با دیگر اختلالات ایمنی نیز ایجاد اسهال می‌کند.

به منظور پیشگیری از خطر ابتلا به کریپتوسپوریدیوزیس ناشی از آب می‌توان موارد زیر را رعایت نمود:

۱) جوشاندن آب آشامیدنی به مدت ۱ دقیقه (در ارتفاعات بیش از ۲۱۰۰۰ متر این زمان به ۳ دقیقه افزایش می‌یابد).

۲) پالایش آب آشامیدنی با وسائلی که بتواند میکروارگانیسم‌های ۱ میکرومتری و بزرگ را برداشت کند.

۳) استفاده از آبهای بسته‌بندی شده[1]، بویژه آبهای بدست آمده از منابع زیرزمینی مانند چشمه‌ها و یا چاههای عمیق که احتمال آلودگی آن به اووسیست کریپتوسپوریدیوم کمتر از آبهای تصفیه شده به روش متعارف است.

پیوست ب

ژیاردیا لامبلیا

(اطلاعاتی)

ژیاردیا لامبلیا تک‌یاخته‌ای روده‌ای است که به راحتی قابل تشخیص می‌باشد. تروفوزوئیت آن تقارن دو طرفی داشته و تمام ساختارهای درون آن جفت می‌باشند. حرکت آن تا حدودی گردشی و همراه با چرخش آهسته‌ای حول محور طولی می‌باشد. کیستها تخم‌مرغی شکل و دارای چهار هسته مشخص و چهار جسم

1. Packaged Water

میانی می‌باشد. به نسبت بزرگسالان، فراوانی ژیاردیازیس در کودکان بیشتر بوده و با وجود این مبتلایان می‌توانند در هر سنی علائمی از اسهال خفیف، نفخ شکم، بی‌اشتهایی، دفع مدفوع چوب و نشانگان کامل سوء جذب را نشان دهند. این بیماری می‌تواند منجر به ایجاد تغییرات در بافتها بویژه در مخاط روده شود و باعث تخریب دیوارهٔ روده، تحلیل و تضعیف پرزهای روده و تکثیر سلولهای بافتی مرموز شـود. علاوه بر اثرات موضعی که توسط انگل ایجاد می‌شود، متابولیسم و ترشحات حاصله، وضعیت غذایی، سیستم ایمنی بدن و مصونیت مخاطی میزبان نیز می‌تواند در شدت تخریب بافتها مؤثر باشـند. مهدکودکها اصلی‌ترین مکان انتقال ژیاردیازیس بومی می‌باشند. ژیاردیا انتشار جهانی داشته و به عنوان یک عامل اصلی اسهال می‌باشد. ژیاردیا قادر به مقاومت در برابر پالایش و کلرینه کردن معمولی آب آشامیدنی می‌باشد، هرچند حفاظت منابع آب شهری در برابر آلودگی توسط سگها یا جوندگان آبزی دیگر غیرممکن است ولی حداقل باید بتوان آن را در برابر آلودگی توسط حامل‌های انسانی محافظت نمود. برای پالایش مقادیر کم آب آشامیدنی، محلول اشباع شده ید که در مقادیر دو برابر و همراه با ۲۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری در حرارت ۲۰ درجه سلسیوس استفاده می‌شود، در کشتن کیست‌های ژیاردیا مؤثر است. از بین سیستم‌های عملی پالایش آب در دسترس اردوگاهها و کوهنوردان، استفاده از محلولهای ید مؤثرترین است مشروط بر آنکه دستورالعمل‌های داده شده به دقت دنبال شـوند.

ISLAMIC REPUBLIC OF IRAN

Institute of Standards and Industrial Research of Iran

ISIRI NUMBER

6987_

_

Water – Detection and enumeration of giardia and cryptosporidium by immunofluorescence method- Microbiological test method

1st. Revision