جمهوری اسلامی ایران

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

شمارهٔ 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، 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 مربـوط ارسال میشود و پس از دریـافت نظـرات وپیشنهادهـا در کـمیته ملـی مرتبـط بـا 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 بـررسی 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 تـوجه به شرایط کلی ونیازمندیهای خاص کشور، از آخرین پیشرفتهای علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهـای بین المـللی استفـاده 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.

همچـنین بمنظـور اطـمینان بخـشیدن به استفاده کنندگـان از خـدمات 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 – جستجو و شناسایی لژیونلا"– روش آزمون میکروبیولوژی

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

فهرست مندرجات

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

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 وخدمات ، 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 ماخذی 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 [1] عامل شیوع بیماری لژیونرها در سال ۱۹٤۷ در فیلادلفیا بوده است. دو شکل بیماری توسط این ارگانیسم شناخته شده است، شکل اول پنوموتیک [2] (ریوی) و شکل دوم غیر پنوموتیک که تحت عنوان تب پونتیاک [3] 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 نتیجهٔ استنشاق مه پاش [4] 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 شناسائی لژیونلا – روش آزمون میکروبیولوژی

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این‌استاندارد تعیین روش‌جستجو و شناسایی لژیونلا و تخمین تعداد آنها در نمونه های آب می‌باشد. این روش برای انواع آبهای آشامیدنی ، غیر آشامیدنی و مواد همراه آنها شامل ، رسوبات، مواد تـه نشین شده و لجن قابل استفاده می‌باشد.

۲ مراجع الزامی

مدارک الزامی زیر حاوی مقرراتی است که در متن این استاندارد به آنها ارجاع داده شده است. به این‌ترتیـب آن مقـررات جزئـی از ایـن اسـتاندارد محسـوب مـی‌شـود. در مـورد مراجـع دارای تـاریخ چـاپ و / یا تجدیدنظر، اصلاحیه‌ها و تجدیدنظرهای بعدی این مدارک مورد نظر نیست. معهذا بهتر اسـت‌کـاربران ذینفع این استاندارد امکان کاربرد آخرین اصلاحیه‌ها و تجدیدنظرهای مدارک الزامی زیر رامورد بررسی قرار دهند. در مورد مراجع بدون تاریخ چاپ و / یا تجدید نظر، آخرین چاپ و/ یاتجدید نظر آن مدارک الزامـی ارجاع داده شده مورد نظر است.

استفاده از مراجع زیر برای کاربرد این استاندارد الزامی است :

استاندارد ملی ایران شماره ٤٢٠٨: سال ١٣٧٦ – آئین کار نمونه برداری از آب جهت آزمونهای‌میکروبیولوژی

استاندارد ملی ایران شماره ٤٢٠٧: سال ١٣٧٦ آئین کار آزمون‌های باکتریولوژیکی آب

استاندارد ملی ایران شماره ٢٧٤٧: سال ١٣٨٠آئین کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی

۳ اصطلاحات و تعاریف

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

۳-۱ لژیونلا

باکتری گرم منفی هوازی میله ای شکل ، بدون اسپور و تاژکدار است که عرض آن ۰/۳ الی ۰/۹ میکـرون و طول ۲۰میکرون می‌باشد و قادر است در مدت بیش از دو روز بر روی محیط بافری حـاوی آگـار، عصـاره

مخمر، کربن فعال ، ال – سیستئین[1] و آهن سه ظرفیتی کلنی‌های سفید یا ارغوانی یا آبی متمایل‌به سبز لجنی رنگ ظاهر نمایند.

یادآوری ۱ – برخی از گونه‌های لژیونلا در طول موج‌های بلند اشعه ماوراء بنفش تولید فلوئورسانس‌می‌کنند.کلنی‌ها در زیراستریو میکروسکوپ[2]، دارای ظاهری شفاف و شیشه مانند[3] است .

یادآوری ۲ – به‌استثنای مواردی چند رشد این باکتریها در غیاب ال ـ سیستئین امکان‌پذیر نمی‌باشد.

۴ نمونه برداری

نمونه برداری باید مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ٤٢٠٨ سال ١٣٧٦ – آئین کار نمونه برداری از آب جهت‌آزمونهای میکروبیولوژی انجام می گیرد .

۴-۱ ظروف نمونه برداری

از ظروف معمول در آزمایشگاه میکروبیولوژی استفاده کنید و چنانچه ظروف قبلاً استفاده شده باشدباید 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 ۲۷٤۷ ظروفی که در برابر اتوکلاو مقاومت ندارند را، می‌توانید با شناور کردن آن در آب داغ ، (دمای بیش از ۷۰ درجه‌سلسیوس) 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 نمونه‌برداری مشکل می‌باشد، ظروف شیشه‌ای بعلت امکان شکستگی مناسب نیست‌و بهتر است که از ظروف شیشه‌ای که در حفاظ پلاستیکی قرار دارند استفاده گردد.

۴-۲ نمونه برداری از آبهای حاوی مواد گندزدا و زیست‌کش[1]

آبهایی که حاوی مواد گندزدای اکسید کننده مانند کلر می‌باشند،باید مطابق با استاندارد ملی ایران‌شماره ٤٢٠٨ آئین کار نمونه برداری از آب جهت آزمونهای میکروبیولوژی، یک عامل غیرفعال‌کننده و یا خنثی کنندهٔ ترکیبات گندزدا را قبل از نمونه برداری یا در هنگام آن به ظرف نمونه برداری‌اضافه کنید.

۴-۳ انتقال نمونه

1- Buffered Charcoal Yeast Extract Agar Medium (BCYE)
2- Sterio microscope
3- Ground glass
1- Biocide

نمونه‌ها باید در دمای کمتر از ۱۸ درجه سیلیوس و بیشتر از ٦ درجه سلسیوس نگهداری شوند و در مدت زمان حداکثر دو روز، به دور از گرما و نور خورشید به آزمایشگاه ارسال شوند.
توصیه می‌شود نمونهٔ آب پس از دریافت آن ، هرچه سریعتر و ترجیحا" همان روز نمونه برداری (به‌ویژه برای نمونه هایی که حاوی گندزدا می‌باشند) 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 نمونهٔ تغلیظ شده ١٤ روز است .

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

یادآوری ۲ – بهتر است نمونه هادرطی انتقال دردمای ۲ □ ٦ درجه سلسیوس نگهداری شوند تا،تغییرات تعداد باکتریهای زنده (خصوصاً با توجه به رشد و تحریک پذیری میکروارگانیسم‌های‌هتروتروفیک[2] در دمای بیش از ۲۰ درجه سلسیوس) به حداقل برسد.

۵ مواد لازم

۵- ۱ محیط کشت

از مواد شیمیائی با درجه خلوص بالا در آماده سازی محیط‌های کشت و معرفها استفاده نمائید.ترجیحاً از محیط‌های کشت تجارتی و معرفهای معتبر استفاده کنید.

محیط کشت را بر طبق‌دستورالعمل سازنده تهیه نموده و عوامل انتخابی و سایر ملزومات رشد را درغلظت های پیشنهادی به آن اضافه کنید. توجه داشته‌باشید که آب مورد استفاده در آماده سازی محیط کشت باید از دستگاه آب مقطرگیری شیشه‌ای تهیه‌شده باشد.

۵-۱-۱ محیط کشت بافری حاوی‌آگار ، 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

2- Heterotrophic

salt ACES BUFFER

دو- استامیدو- آمینواتانی سولفونیک اسید (N-2-acetamido-2 aminoethanesulfonic acid	۱۰ گرم
هیدروکسید پتاسیم (Potassium hydroxide(KOH) Pellets)	۲/۸ گرم
ال- سیستئین هیدروکلراید منوهیدراته L- cysteine hydrochloride monohydrate	۰/٤ گرم
پیرو فسفات آهن سه ظرفیتی	۰/۲۵ گرم
آب مقطر	تا ۱۰۰۰ میلی لیتر Distilled

طرز تهیه :

الف - محلولهای سیستئین و آهن

۰/٤گرم ال- سیستئین هیدروکلرید و ۰/۲۵ گرم پیرو فسفات آهن سه ظرفیتی را ، هر یک بطور جداگانه به ۱۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه نموده تا محلولهایی از آن تهیه شود . آنگاه هر محلول را باعبور از صافی با اندازه روزنه ۰/۲۲ میکرون سترون نمائید. محلول های بدست آمده را در ظرف تمیز وسترون شده ریخته و در دمای ۳ □ ۲۰- درجه سلسیوس حداکثر بمدت ۳ ماه می‌توانید نگهداری کنید.

ب - بافر ACES

پودرACES را، مطابق با دستورالعمل سازنده در ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر ریخته و با قرار دادن درحمام آب گرم در دمای ٤۵ تا ۵۰ درجه سلسیوس حل نمائید سپس هیدروکسید پتاسیم رابه طور جداگانه به ٤۸۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه کرده و به آرامی تکان دهید. برای آماده کردن بافرACES، این دو محلول بدست آمدهٔ فوق را با هم مخلوط کنید.

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

پ - محیط نهایی

به طور متوالی به ۹۸۰ میلی لیتر از بافر ACES فوق ، کربن فعال، عصاره مخمر و آلفاکتوگلوتارات(طبق بند ۵-۱-۱) اضافه کنید. ۵/٦ گرم از هیدروکسید پتاسیم را در یک لیتر آب مقطرجداگانه حل کنید تا محلول ۰/۱ مول بر لیتر بدست آید. ۵/۳ میلی لیتر از اسید سولفوریک راجداگانه به یک لیتر آب مقطر اضافه کنید. pH محیط را با استفاده از محلول ۰/۱ مول بر لیترهیدروکسید پتاسیم یا محلول ۰/۱ مول بر لیتر اسید سولفوریک در محدوده ۰/۲۵ ٦/۹ تنظیم‌نمائید.سپس آگار را (طبق بند ۵-۱-۱) به آن اضافه کنید و در دمای

۱□۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱□ ۱۵ دقیقه در اتوکلاو سترون نمائید. سپس دمای آن را در حمام آب گرم تا ۲□ ۵۰ درجه سلسیوس کاهش دهید. محلولهای ال – سیستئین و پیرو فسفات آهن سه ظرفیتی تهیه‌شده در بند الف را در شرایط سترون به تدریج به آن افزوده و مخلوط نمائید. pH نهایی محیط را دردمای ۲۵ درجه سلسیوس حدود ۰/٤ ۹□/٦ تنظیم کنید. و از محیط فوق به حجم‌های ۲۰ میلی لیتری در پلیت‌های سترون تقسیم نمائیدو سپس در دمای اتاق بگذارید تا رطوبت اضافی‌پلیت‌ها خشک شود، پلیت‌های فوق را در دمای ۲□ ٤ درجه سلسیوس داخل ظروفی با درپوش‌محکم [1] و در تاریکی بمدت حداکثر تا ٤ هفته می‌توانید نگهداری کنید.

۵-۱-۲ محیط بافری حاوی عصاره مخمر و کربن فعال بدون ال – سیستئین[1]

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

۵-۱-۳ محیط انتخابیGVPC- محیط بافری حاوی عصاره مخمر وکربن فعال با مکمل های انتخابی[2]

این محیط با محیط BCYE (طبق بند ۵-۱-۱) از نظر کارایی یکسان بوده و تفاوت آن در۳ نوع آنتی بیوتیک و یک اسید آمینه گلیسین به عنوان مکمل است، که (طبق بند ۵-۱-۳-۳)به آن افزوده می‌شود.

۵-۱-۳-۱ مکمل‌های انتخابی

غلظت‌های نهایی در محیط GVPC عبارتست از :

گلاسین عاری از آمونیوم بدون گلیسین	۳ گرم در لیتر Ammonium- free glycine
پلی میکسین B بصورت نمک سولفات	۸۰۰۰۰ واحد بین المللی در لیتر Polymyxin B Sulfate
وانکو مایسین هیدروکلراید	۰/۰۰۱ گرم در لیتر Vancomycin hydrochloride
سیکلو هگزیماید	۰/۰۸ گرم در لیتر Cycloheximide

۵-۱-۳-۲ طرز تهیه مکمل‌های آنتی بیوتیک

الف – حدود ۲۰۰ میلی گرم از پلی میکسین B به صورت نمک سولفات را به ۱۰۰ میلی لیتر آب‌مقطر بیافزائید تا غلظتی معادل ۱٤٥٤٥ واحد بین المللی[3] در میلی لیتر به دست آید. سپس آنرامخلوط نموده و توسط صافی غشایی با اندازه روزنه ۰/۲۲ میکرون سترون نمائید. آنگاه درحجم‌های ۵/۵ میلی لیتری در ظروف سترون تقسیم نموده، و در دمای ۳□۲۰– درجه سلسیوس نگهداری نمائید.

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

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 باعبور از صافی غشایی با اندازه روزنه ۰/۲۲ میکرون آن را سترون نمائید. سپس آن را در لوله‌های یک میلی لیتری سترون شده تقسیم نموده و در دمای ۳ □ ۲۰– درجه سلسیوس نگهداری نمائید. قبل ازاستفاده 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 اندازه‌روزنه ۰/۲۲ میکرون آن را سترون نمائید، آنگاه در لوله‌های ٤ میلی لیتری سترون شده تقسیم نموده و در دمای ۳ □۲۰– درجه سلسیوس نگهداری نمائید، قبل از استفاده نمودن با قرار دادن در درجه حرارت اتاق آنرا به حالت مایع تبدیل کنید.

یادآوری ۱– مکمل‌های آنتی بیوتیک دار را می‌توان در وضعیت انجماد به مدت حداکثر تا شش ماه نگهداری‌نمود.

یادآوری ۲– سیکلوهگزیماید، سم کبدی[1] محسوب می‌شود و در زمان کار با شکل پودری این ماده‌شیمیائی باید از دستکش و دهان‌بند[2] استفاده شود.

۵-۱-۳-۳ طرز تهیه محیط کشت GVPC

این محیط را (طبق بند ۵–۱–۱) تهیه کنید با این تفاوت که بعد از اضافه کردن آلفاکتوگلوتارات‌به محیط کشت ، ۳ گرم گلیسین عاری از آمونیم (طبق بند ۵–۱–۳–۱)به آن اضافه نموده وpH را درمحدوده ۰/٤ □ ٦/۹ تنظیم نمائید.پس از اضافه کردن ال– سیستئین و آهن، یک حجم از هر یک از سه آنتی بیوتیک (طبق بند ۵–۱–۳–۲) را به محیط نهایی افزوده و خوب مخلوط کنید.

۵-۱-۳-۴ کنترل کیفیت محیط کشت

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

1- Hepatotoxic
2- Mask

به منظور ارزیابی مناسب بودن محیط کشت GVPC برای لژیونلا توصیه می‌شود:
یک نمونه آب حاوی ارگانیسم‌های 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 میکرواورگانیسم‌های ایران[1] تهیه نمود. سپسس طبق توصیه مرکز فوق، به منظور ارزیابی و احیاء 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، برای‌تهیه 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 ۳ □ ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری‌نمائید. همچنین می‌توانید آن را در محلول نمکی (طبق بند ۵-۳-۱) و یا آب مقطر سترون در دمای ۵ □ ۷۰ - درجه سلسیوس نگهداری کنید .(در هنگام استفاده در دمای اتاق قرار دهید تا از حالت‌انجماد خارج شود. سپس خوب تکان داده و به مدت ۵ الی ۱۰ دقیقه ساکن بماند تا بخارات حاصل‌کاملا" نشست نماید.)

۵-۲ معرف‌ها

۵-۲-۱ بافر اسیدی

محلول ۰/۲ مول بر لیتر اسید کلریدریک (الف) و محلول 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 محلول "الف "و ۲۵ میلی لیتر از محلول "ب" را با یکدیگر مخلوط کنید. pH محلول فوق را با افزودن محلول یک‌مول بر لیتر هیدروکسید پتاسیم در محدوده ۰/۲ □ ۲/۲ تنظیم نمائید.

یادآوری ۱ – محلول فوق را می‌توانید در یک ظرف شیشه‌ای در پیچ دار، در محلی تاریک و دمای اتاق بمدت حداکثر یکماه نگهداری کنید.

۱- منظور مرکز کلکسیون قارچ ها و باکتری های صنعتی و عفونتی ایران – سازمان پژوهش های علمی و صنعتی است.

یادآوری ۲- برای تهیه محلول ۰/۲ مول بر لیتر اسید کلریدریک باید ، ۱۷/٤ میلی لیتر اسید کلریدریک غلیظ با وزن مخصوص ۱/۱۸ گرم و درصد خلوص حداقل ۳۵/٤ ویا ۲۰ میلی لیتراسید کلریدریک غلیظ با وزن مخصوص ۱/۱٦ گرم و درصد خلوص حداقل ۳۱/۵ را به یک لیتر آب‌مقطر اضافه کنید.

۵-۲-۲ محیط گلیسرول مانته[1]

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 بصورت تجاری موجود می‌باشد استفاده نمائید.

۵-۲-۳ محیط آبگوشت گلیسرول[2]

طرز تهیه: ۵ گرم از پودر محیط کشت آبگوشت مغذی که بصورت تجاری در دسترس می‌باشد را در ۱۷۰ میلی لیتر آب مقطر حل نمائید سپس به آن ۳۰ میلی لیتر گلیسرول (طبق بند ۵-۲-۲) اضافه‌کنید و در لوله‌های خشک و تمیز شیشه‌ای از جنس سیلیکات در حجم‌های ۲ میلی‌لیتری تقسیم نموده و در دمای ۱ □ ۱۲۱ درجه سلسیوس بمدت ۱ □ ۲۰ دقیقه در اتوکلاو، سترون نمائید.

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

۵-۲-۴ معرفهای سرولوژیکی

الف ـ آنتی سرم برای لژیونلا نموفیلا و سایر گونه‌های لژیونلا

برای شناسایی لژیونلا نموفیلا از آنتی سرم‌های منو کلونال[1] و یا پلی کلونال[2] که قادر به واکنش باتمام زیر گروههای لژیونلانموفیلا هستند استفاده می‌گردد.

یادآوری۱ - در صورت لزوم برای شناسایی گونه‌های دیگر لژیونلا نموفیلا از آنتی سرمهای ویژه نیزمی‌توان استفاده نمود.

1- Glycerol mounting medium
2- Glycerol
1- Monoclonal
2- Polyclonal

ب – آنتی بادی کونژوگه خرگوشی نشان دار شده با ایزو تیوسیانات فلوئورسانس[3]، که بصورت تجاری‌در دسترس می‌باشد.

یادآوری۲- بند های الف و ب مندرج در فوق به منظور تشخیص گونه‌های لژیونلا کاربرد دارد و برای هر میکروارگانیسم‌باید آنتی بادی کونژوگه مخصوص به آن تهیه شود.

۵-۳ رقیق کننده‌ها

۵-۳-۱ محلول سالین پیج[1]

ترکیبات :	مقدار :
کلرید سدیم	۰/۱۲ گرم Soudium chloride (Nacl)
سولفات منیزیم	۰/۰۰٤ گرم Magnesium sulfate (MgSO4,7H20)
کلرید کلسیم	۰/۰۰٤ گرم Calcium chloride (CaC12, 2H20)
هیدروژن فسفات دی سد یک	۰/۲۱٤ گرم(Disoduim hydrogenphosphate (Na2HPO4
هیدروژن فسفات دی پتاسیک	۰/۱۳٦ گرم Potassium dihydrogenphosphate (KH2HPO4)
آب مقطر	تا حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر Distilled water

ترکیبات فوق را به آب مقطر اضافه کنید و بخوبی مخلوط نمائید تا حل شود سپس در دمای ۱ □ ۱۲۱درجه سلسیوس به مدت ۱ □ ۱۵ دقیقه در اتوکلاو سترون نمائید.

۵-۳-۲ محلول رینگر

با استفاده از قرص هایی که به صورت تجارتی و آماده در دسترس هستند رینگر یک به‌چهار تهیه شود و پس از تقسیم به حجم‌های مورد نیاز در دمای ۱□ ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱ □۲۰ دقیقه در اتوکلاو سترون گردند.

۵-۳-۳ محلول نمک بافر فسفات[2]

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

۵-۳-۴ محلول نمکی فرمل[3]

3- Flouoroscein
1- Pages Saline
2- Phosphate – Buffered saline (pH = 7.5)
3- Formal saline

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

۶ وسایل لازم

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

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

۶-۲ گرمخانه قابل تنظیم در دمای ۱ □ ۳۶ درجه سلسیوس .

۶-۳ لامپ فراء بنفش که نور آن با طول موج ۲۰ □ ۳۶۰ نانومتر منتشر گردد.

۶-۴ 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.

۶-۵ پمپ خلاء

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

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

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

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

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

۶-۱۰ سانتریفوژ با قابلیت شتاب ۱۰۰□ ۶۰۰۰ دور و مجهز به درپوش ایمنی

۶-۱۱ لرزاننده[1] ، با قابلیت حداقل ۵ □ ۲۰۰ دور در دقیقه

۶-۱۲ حمام آب فراء صوتی[2] ،که برای استفاده نمودن نمونه‌های آب بیش از ۲۵ میلی لیتر مناسب باشد.

1- Shakare

۱۳-۶ مخزن ماوراء صوت

۱۴-۶ حمام آب، با قابلیت نگهداری در دمای ٤٥ الی ٥٠ درجه سلسیوس .

۱۵-۶ لوازم شیشه‌ای معمول در آزمایشگاه میکروبیولوژی

یادآوری – کلیه ظروف شیشه‌ای را در فور یا آون[1] با درجه حرارت ٥ □ ۱۷۰ درجه سلسیوس بمدت یک ساعت یا در اتوکلاو با دمای ۱ □ ۱۲۱ درجه سلسیوس بمدت ۲۰ دقیقه سترون نمائید.

۱۶-۶ میکروسکوپ‌ها

۶ -۶-۱ میکروسکوپ فلوئورسانس[2]

میکروسکوپ از نوع دو چشمی با انتشار نور فلوئورسانس، که بزرگنمایی لنزهای شیئی آن بایدحداقل ۸ ، ۱۰ و ٤٠ برابر عدسی چشمی باشد.

۶ -۱۶-۲ میکروسکوپ صفحه‌ای[3] ، استریوسکوپ[4]، با انتشار غیر مستقیم نور و بزرگنمایی‌حداقل ۳۰ برابر

۱۷-۶ یخچال قابل تنظیم در دمای ۲ □ ٦درجه سلسیوس

۱۸-۶ فریزرقابل تنظیم در دمای ۳□ ۲۰- درجه سلسیوس

۷ آماده سازی نمونه

چنانچه احتمال می‌دهید که تعداد لژیونلا در نمونه از (^{5} ۱۰) در لیتر بیشتر باشد، از قسمت مایع نمونه برداشته و مستقیماً بر روی پلیت کشت دهید .

– اگرتعداد لژیونلا درنمونه کم باشد، به منظور حصول اطمینان در شناسایی آن از روشهای تغلیظاستفاده کنید.

– از آنجائیکه معمولاً" اطلاعات قبلی و دقیقی از نمونه ارسالی در دسترس نیست، لذا استفاده ازشیوه‌های تغلیظ (سانتریفوژ و یا صافیی غشایی) ضروری است.

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

2- Ultrasound water bath
1- Oven
2- Fluorescent microscope
3- Plate microscope
4- Stereoscope

اجزاء مختلف دستگاه شامل (صافی غشایی، پایه نگهدارندهٔ صافی ولوله ها) را بر روی ارلن تخلیه‌سوار کنید. طبق استاندارد ملی ایران به شماره ٤٢٠٧ 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.

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 ٤٢٠٧ 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 دررسوبات باقی مانده تغییری حاصل نشود. سپس مستقیما" آن را در یک ظرف سترون در پیچ دار قراردهید. به منظور جداسازی ارگانیسم‌ها از روی سطح غشاء صافی می‌توان از ۵ تا ۲۵ میلی لیتر رقیق‌کننده سترون طبق (بندهای ۵-۳-۱) و (۵-۳-۲) و یا آب مقطر سترون استفاده نمود، آنگاه‌محلول جمع آوری شده حاوی باکتری را بمدت ۲ دقیقه بشدت تکان دهید.(برای کمک به‌جداسازی باکتری از صافی و سرعت عمل می‌توان به کمک یک قیچی سترون، صافی را به قطعات‌کوچکتر تقسیم نمود و سپس آنها را در رقیق کننده مناسب با آن غوطه ور کنید.)

روش دیگر جداسازی باکتری از صافی این است که ظرف را همراه با صافی در یک مخزن ماوراءصوت برای مدت ۲ تا ۱۰ دقیقه قرار دهید.باید برای هر نمونه بطور جداگانه عمل شود و اطمینان‌حاصل کنید تا سطح میزان رقیق کننده که صافی را پوشانده است ،از سطح آب مخزن ماوراء صوت‌پائین‌تر 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 شدهٔآن ، مقدار ۵ □ ۲۰۰ میلی لیتراز 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 g ٦۰۰۰ برای مدت ۱۰ دقیقه و یا دور g ۳۰۰۰ برای مدت ۳۰ دقیقه

سانتریفوژ نمائید. (در طی سانتریفوژ، دمای ۱۵ الی ۲۵ درجه سلسیوس در محیط حفظ‌گردد). سپس لایه فوقانی یا مواد شناور در سطح را در شرایط سترونی برداشته و دور بریزید ورسوب حاصل را در ۲ الی ۲۰ میلی لیتر ماده رقیق کننده (بند ۵-۳-۱) یا (۵-۳-۲) و یا آب مقطر سترون ریخته تا به حال تعلیق درآید و حجم رقیق کننده اضافه شده را ثبت نمائید.

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

یادآوری ۲ – در صورتی که حجم نمونه جهت تغلیظ کمتر از ۵ ± ۲۰۰ میلی لیتر باشد رسوبات باید درحجم‌های مناسب با رقیق کننده حل شود.

۷-۳ رسوب‌ها، ته نشست‌ها و لجن‌ها

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

رقت‌های فوق را در رقیق کننده‌های سترون (بند ۵-۳-۱ یا (۵-۳-۲) تهیه کنید و با استفاده ازدستگاه تکان دهنده آن را به مدت زمان حداکثر تا ۲ دقیقه مخلوط کنید. به منظور یکنواخت سازی‌ذرات 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 رعایت‌نکات زیر به پلیت حاوی محیط کشت اضافه نمائید:

الف – بعد از عمل آوری[1] با گرمامطابق 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)

یادآوری۲ – در صورتی که لجن مورد آزمون، به مواد خشک و یا به مواد ساختاری دیگری متصل باشد،در این صورت باید به کمک قاشقک سترون آن را خراشیده و در حجم کمی از مایع رقیق کننده سترون‌بند (۵-۳-۱) یا (۵-۳-۲) به صورت تعلیق درآورد سپس مطابق با (بند ۷-۲)عمل کنید..

1- Treatment

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

۷-۳-۱ عمل آوری با گرما

۰/۵ □ ۱ میلی لیتر از نمونه تغلیظ شده (بند ۷-۲) را به یک ظرف سترون انتقال دهید و آن را درحمام آب گرم ،(بند۶-۱۲) و در دمای ۱□۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۲ □ ۳۰ دقیقه قرار دهید.

۷-۳-۲ عمل آوری با اسید

۱ الی ۱۰ میلی لیتر از نمونه تغلیظ شده (بند ۷-۲) را در لوله درپوش دار سترون ریخته و در دورg۶۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه و یا در دور g ۳۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ نمائید و با یک پیپت‌سترون قسمت فوقانی نمونه را برداشته و دور بریزید به گونه‌ای که حجم اولیه آن نصف گردد سپس‌رسوب‌ها را با استفاده از تکان دهنده، مجددا" به حالت تعلیق درآورید. با افزایش بافر اسیدی (بند ۵-۲-۱) حجم نمونه را به حجم اولیه‌اش رسانده و به آرامی مخلوط کنید و آنرا به مدت ۵دقیقه به حالت ساکن قرار دهید.

۷-۳-۳ بدون هیچگونه عمل آوری

یادآوری۱ – نمونه‌های تغلیظ شده، رسوب‌ها، ته نشست‌ها و لجن‌ها حتی الامکان سریعاً مورد آزمایش قرار گیرند و چنانچه امکانپذیر نباشد باید در دمای ۲ □ ٦ درجه سلسیوس حداکثر به مدت ١٤ 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 مواردشیوع بیماری ناشی از لژیونلا حائز اهمیت است.

۸ مراحل اجرای آزمون

۸-۱ کشت

نمونه را با توجه به نوع آن (تغلیظ شده یا تغلیظ نشده) به سه قسمت تقسیم کنید. یک قسمت آن رابدون هیچگونه عمل آوری کنار بگذارید. قسمت دوم را برای عمل آوری با گرما و قسمت سوم رابرای 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) تلقیح‌کنید و با یک میله شیشه‌ای سترون آن را در سطح محیط کشت پخش نمائید .

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 نمائید و توجه‌داشته 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 محیط‌کشتGVPC 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 گیرشناسی[1]، پیشنهاد می‌شود که پس از مراحل کشت،قسمت‌های استفاده نشدهٔ نمونه تغلیظ شده به همان روش برای مدت حداقل تا ۳ ماه نگهداری‌شود.همچنین جزئیات و تاریخ تغلیظ نمونه و حجم نمونه‌های تلقیح شده در روش‌های مختلف بایدثبت شود.

۸-۲ گرمخانه گذاری

برای اینکه مواد تلقیح شده جذب محیط کشت شود، پلیت‌ها را مدتی به حالت سکون قرار دهیدسپس آنها را به طور وارونه در دمای ۱□ ۳۶ درجه سلسیوس ، حداکثر بمدت ۱۰ روز گرمخانه گذاری نمائید و هر چند وقت یکبار پلیت‌ها را بررسی کنید.به منظور اطمینان داشتن ازرطوبت 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 ازگونه‌های لژیونلاها سودمند است ولی ضروری نیست.

۸-۳ بررسی پلیت‌ها

در طی ده روز گرمخانه گذاری، پلیت‌ها را با میکروسکوپ صفحه‌ای مجهز به جایگاه پلیت (بند ٦-١٦) حداقل سه مرتبه در روز بررسی نمائید.از آنجائیکه رشد لژیونلا به آهستگی می‌باشد و ممکن است توسط میکروارگانیسم‌های دیگر پوشانده شوند، لذا باید در هر مرحله بررسی، شمارش شده و تعداد آنها ثبت گردد.

1- Epidemiolgical

پرگنه‌های لژیونلا اغلب به رنگ سفید،آبی ، خاکستری یا ارغوانی بوده اما ممکن است به رنگ‌های‌قهوه‌ای، صورتی زرد کهربائی تا سبز کمرنگ و یا قرمز دیده شوند. همچنین دارای لبه و سطحی‌صاف و یکدست با ظاهری شفاف همانند قطرات آب می‌باشند و برخی از گونه‌های آن نیز تحت‌تاثیر لامپ نور ماورا بنفش (بند ٦-٣) از خود فلورسانس سفید درخشان[2] و برخی دیگرفلورسانس قرمز[3] ایجاد می‌کنند. پرگنه‌های لژیونلانموفیلا اغلب به رنگ سبز تیره که با رنگ زردآمیخته شده است دیده می‌شوند . در نمونه هایی که گونه‌های مختلف لژیونلا وجود دارد رنگ‌فلورسانس می‌تواند عامل کمکی در تشخیص آنها باشد.

یادآوری ۱ – پلیت‌ها نباید برای مدت زمان بیشتر از حد نیاز در معرض نور ماوراء بنفش قرار گیرند،زیرا باعث از بین رفتن سلولهای لژیونلا می‌گردد.

یادآوری ۲ –امکان دارد گونه‌های جدیدی از لژیونلا دیده شوند که با بقیه گونه‌ها متفاوت باشند که نیازبه بررسی بیشتری دارد.

۸-۴ مراحل تأییدی

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

حداقل ۳ پرگنه مشخص از هر پلیت حاوی GVPC (بند ۸-۳) برای کشت تأییدی انتخاب کنیدو بطور همزمان بر روی پلیت‌های محیط کشت بافری دارای آگار، عصاره مخمر و کربن فعال (بند ۵-۱-۱) و (بند ۵-۱-۲)بدون سیستئین کشت دهید و در دمای ۱ □ ۳٦ درجه سلسیوس برای مدت حداقل ۲ روز گرمخانه گذاری نمائید.

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

یادآوری ۱ – گروه و یا زیرگروه‌های لژیونلاهای رشد کرده بر روی محیط BCYE را می‌توان با استفاده از آزمون‌های سرولوژیکی تایید و تعیین هویت نمود.

2- (L.Cherrii-L.ansia – L.dumoffii – L.gormanii – LbozemaniiL.parsisiensisi – L.tucsonensis)
3- L.erythra – L.rubrilucens

یادآوری ۲ – به جای محیط BCYE-CYS فاقد سیستئین بند (۵-۱-۲) می‌توانید از محیط‌های‌آگار مغذی[1] و یا آگار خون دار[2] استفاده کنید. چنانچه رشدی برروی محیط‌ها مشاهده نشد، پرگنه های بیشتری از پلیت‌های اصلی برداشت کنید و مراحل کشت تأییدی را مجدداً انجام دهید.

۸-۴-۲ شناسائی گونه‌های لژیونلا به روش ایمونو فلوئورسانس[1]

قبل از انجام آزمایش‌های اختصاصی برای شناسایی گونه‌های لژیونلا لازم است ابتدا با بررسی‌ریخت شناختی[2] پرگنه‌ها، از خالص و یک دست بودن رشد بر روی محیط کشت BCYE مطمئن‌شوید و کلنی منفرد را مجدداً در محیط BCYE کشت دهید و مطابق زیر عمل کنید.

یادآوری – برای شناسایی گونه‌های لژیونلا یکی از روشهای زیر را می‌توانید استفاده‌کنید.

الف – روش گاز کروماتوگرافی مایع اسیدهای چرب سلولی و کینونهای ایزوپرینوزل[3]
ب – سنجش آنتی بادی ایمونوفلوئورسانس غیر مستقیم و مستقیم[4]
پ – روش انعقاد بر روی لام[5] با آنتی بادی اختصاصی
ت – اروش نعقاد لاتکس[6] با آنتی بادی اختصاصی
ث – روش لکه گذاری پرگنه ها[7]
ج – روش الیزا [8]

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 تعدادواحدهای تشکیل دهنده پرگنه[9] محاسبه و گزارش نمائید.

1- Nutrient agar
2- Blood agar
1- Immunofluorescence
2- Morphology
3- Isoprenozel
4- Direct and indirect immunoflurescent antibody assay
5- Slide agglutination
6- Latex bead
7- Colony blot assay
8- Elisa (Enzme linked immuno assay
9- Colony forming unit (CFU)

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

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 نمونهٔ 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.

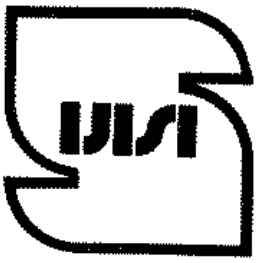
۶-۱۰ بیان نتایج طبق بند ۹ این استاندارد بیان گردد .

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