جمهوری اسلامی ایران

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

شمارهٔ استاندارد ایران

3619

جستجو و شناسائی استرپتوککهای مدفوعی دراک به روش غنی سازی در محیط مایع

چاپ اول

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران تنها سازمانی است در ایران که بر طبق قانون میتواند استاندارد رسمی فرآورده‌ها را تعیین و تدوین و اجرای آنها را با کسب موافقت شورایعالی استاندارد اجباری اعلام نماید. وظایف و هدفهای موسسه عبارتست از:

(تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی – انجام تحقیقات بمنظور تدوین استاندارد بالا بردن کیفیت کالاهای داخلی، کمک به بهبود روشهای تولید و افزایش کارائی صنایع در جهت خودکفائی کشور– ترویج استانداردهای ملی – نظارت بر اجرای استانداردهای اجباری – کنترل کیفی کالاهای صادراتی مشمول استانداردهای اجباری و جلوگیری از صدور کالاهای نامرغوب به منظور فراهم نمودن امکانات رقابت با کالاهای مشابه خارجی و حفظ بازارهای بین المللی کنترل کیفی کالاهای وارداتی مشمول استاندارد اجباری به منظور حمایت از مصرف کنندگان و تولیدکنندگان داخلی و جلوگیری از ورود کالاهای نامرغوب خارجی راهنمائی علمی و فنی تولیدکنندگان، توزیع کنندگان و مصرف کنندگان – مطالعه و تحقیق درباره روشهای تولید، نگهداری، بسته بندی و ترابری کالاهای مختلف – ترویج سیستم متریک و کالیبراسیون وسایل سنجش – آزمایش و تطبیق نمونه کالاها با استانداردهای مربوط، اعلام مشخصات و اظهارنظر مقایسه‌ای و صدور گواهینامه‌های لازم) .

موسسه استاندارد از اعضاء سازمان بین المللی استاندارد می باشد و لذا در اجرای وظایف خود هم از آخرین پیشرفتهای علمی و فنی و صنعتی جهان استفاده می نماید و هم شرایط کلی و نیازمندیهای خاص کشور را مورد توجه قرار می دهد.

اجرای استانداردهای ملی ایران به نفع تمام مردم و اقتصاد کشور است و باعث افزایش صادرات و فروش داخلی و تأمین ایمنی و بهداشت مصرف کنندگان و صرفه جوئی در وقت و هزینه ها و در نتیجه موجب افزایش درآمد ملی و رفاه عمومی و کاهش قیمتها می شود.

کمیسیون استاندارد جستجو و شناسائی استرپتوکک های مدفوعی در آب به روش غنی سازی در محیط مایع

رئیس

پورمنصور - مهدخت	پزشک	انستیتو پاستور

اعضاء

ایماندل - کرامت الله	متخصص بهداشت محیط	دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
روشن طبری - مژده	فوق لیسانس قارچ شناسی	مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
صدیقی – هما	لیسانس بیولوژی	شرکت آب و فاضلاب استان تهران
محبعلی – قاسمعلی	فوق لیسانس میکروبیولوژی	مرکز پژوهش وزارت نفت

دبیر

زند وکیلی – فاطمه	لیسانس علوم تغذیه	مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

فهرست مطالب

جستجو و شناسائی استرپتوککهای مدفوعی در آب به روش غنی سازی در محیط مایع

مقدمه

هدف

دامنه کاربرد

تعریف

اساس روش

میحطهای کشت و معرفها

دستگاهها و وسایل

نمونه برداری

روش آزمون

بسمه تعالی

پیشگفتار

استاندارد جستجو و شناسائی استرپتوککهای مدفوعی در آب به روش غنی سازی در محیط مایع که به وسیله کمیسیون فنی کشاورزی تهیه و تدوین شده و در یکصد و پنجاه و دومین کمیته ملی استاندارد کشاورزی و غذائی مورخ 74/3/2 مورد تائید قرار گرفته , اینک به استناد بند 1 ماده 2 قانون اصلاحی قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران مصوب بهمن ماه 1371 به عنوان استاندارد رسمی ایران منتشر می‌گردد .

برای حفظ همگامی و هماهنگی با پیشرفتهای ملی و جهانی در زمینه صنایع و علوم استانداردهای ایران در مواقع لزوم مورد تجدید نظر قرار خواهد گرفت و هر گونه پیشنهادی که برای اصلاح یا تکمیل این استانداردها برسد در هنگام تجدید نظر در کمیسیون فنی مربوط مورد توجه واقع خواهد شد .

بنابراین برای مراجعه به استانداردهای ایران باید همواره از آخرین چاپ و تجدید نظر آنها استفاده نمود .

در تهیه و تدوین این استاندارد سعی شده است که ضمن توجه به شرایط موجود و نیازهای جامعه حتی‌المقدور بین این استاندارد و استاندارد 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- 1- Internatinal Standard – ISO 7899/1 - 1984

Detection and enumeration of faecal streptococci
2- International Standard – ISO 5667/3 - 1985 guidance on the preservation and handling of sampels
3- Guidelines for Drinking water qulity / w . H . o - 1993

جستجو و شناسائی استرپتوککهای مدفوعی در آب به روش غنی سازی در محیط مایع

مقدمه

برای تعیین قابلیت شرب آب آشامیدنی از نظر میکروبی , لازم است که عدم آلودگی آن به میکروارگانیسم های بیماری زا محرز شود که یکی از آنها استرپتوککهای مدفوعی میباشد . این باکتریها باید به عنوان نشانگر آلودگی مدفوعی در آب آشامیدنی مورد توجه قرار گیرد اگرچه تعداد کمی از آنها به طرق دیگر نیز میتوانند آب را آلوده نمایند .

در این استاندارد روش جداسازی استرپتولکهای گروه D لانسفلید مانند استرپتوککهای مدفوعی در آب شرح داده شده است و از آنجا که در این روش باکتری فوق از نظر سرولوژیکی تائید نمیشود , لذا در این مورد از واژه " استرپتوکک مدفوعی " استفاده میشود .

لازم به ذکر است که در مواقع خاص , شناسائی بعدی و آزمونهای سرولوژیکی جهت جداسازی آن ضروری است .

1 ـ هدف

هدف از تدوین این استاندارد تعیین یک روش مرجع جهت تشخیص و شناسائی استرپتوککهای مدفوعی در آب به روش غنی سازی در محیط مایع میباشد .

2 ـ دامنه کاربرد

این استاندارد در مورد انواع مختلف آبها از جمله آبهای کدر کاربرد دارد .

3 ـ تعریف

در این استاندارد منظور از استرپتوککهای مدفوعی ,
باکتری‌هائی هستند که بر روی محیط کشت بندهای 5 ـ 2 ـ 1 و 5 ـ 2 ـ 2 دارای واکنش مثبت هستند و آزمون کاتالاز آنها منفی می‌باشد .

4 ـ اساس روش

استرپتوککهای مدفوعی در حجم مشخصی از نمونه طی دو مرحله شناسائی می‌شوند :

4 ـ 1 ـ غنی کردن

حجم معینی از نمونه به محیط انتخابی آبگوشت آزید ـ گلوکز اضافه شده و برای مدت 48 ساعت در 35 تا 37 درجه سلسیوس قرار داده می‌شود .

استرپتوککهای مدفوعی با تخمیر گلوگز تولید اسید می‌کنند که با تغییر رنگ شناساگر از ارغوانی به زرد مشخص می‌شود .

4 ـ 2 ـ آزمون تأییدی

از آنجا که برخی از باسیل‌ها و کوکسی‌های گرم مثبت نیز می‌توانند در این محیط واکنش مثبت داشته باشند لذا به منظور حذف آنها آزمونهای تائیدی به صورت زیر انجام می‌گیرد :

الف ـ از کلیه لوله‌های بند 4 ـ 1 که پس از 24 تا 48 ساعت واکنش مثبت نشان داده‌اند روی محیط صفرا اسکولین ـ آزید آگار کشت خطی داده و سپس پلیت ها در دمای 44 درجه سلسیوس برای مدت 48 ساعت قرار می‌گیرند .

استرپتوککهای مدفوعی در این محیط رشد کرده و سبب هیدرولیز اسکولین میشوند . محصول نهائی 6 ـ 7 دی هیدروکسی کومارین است با یون آهن سه ظرفیتی ایجاد ترکیب خرمائی تا سیاه رنگ میکند که در محیط پخش میشود .

ب ـ در مورد پرگنههای مشکوک آزمون کاتالاز طبق بند 9 ـ 4 این استاندارد انجام میشود . پرگنه هائی را که اسکولین مثبت و کاتالاز منفی هستند میتوان به عنوان استرپتوکک مدفوعی در نظر گرفت .

5 ـ میحطهای کشت و معرفها

یادآوری 1 ـ از آنجاکه کلیه محیطهای شرح داده شده حاوی ماده بسیار سمی و جهش زای خصوصاً استنشاق پودر آن خودداری نمود . همچنین این محیطها نباید با اسیدهای معدنی قوی مخلوط شوند زیرا تولید ماده سمی هیدروژن آزید HN_3 میکنند .

یادآوری 2 ـ چون محلولهائی که حاوی آزید هستند در صورت تماس با لولههای فلزی (برای مثال از طریق سینکهای ظرفشوئی) ایجاد ترکیبات قابل انفجار میکنند لذا باید در این زمینه توجه خاص مبذول داشت . توصیه میشود دور ریز محلولهای حاوی آزید را با آب فراوان مخلوط و رقیق نمود و پس از جمع آوری درون ظروف پلاستیکی (پی وی سی , پلی اتیلن , پلی استیرن) با دقت به مجرای فاضلاب ریخت .

5 ـ 1 ـ مواد اولیه

به منظور به دست آوردن نتایج هماهنگ از مواد شیمیائی با کیفیت یکسان و با درجه خلوص معین و محیطهای کشت مناسب استفاده نمائید . باید در نظر داشت که نیمه عمر

محیطهای کشت حاوی سدیم آزید کوتاه است بنابراین تاریخ انقضای محیط باید مورد توجه قرار گیرد .

5 ـ 2 ـ محیطهای کشت

5 ـ 2 ـ 1 ـ محیطهای کشت آبگوشت گلوکز ـ azide glucose broth

آزید (با غلظت معمولی)

ترکیب	مقدار	
عصاره گوشت	4/5 گرم	beef extract
تریپتون	15 گرم	trypton
گلوکز	7/5 گرم	glucose
سدیم کلراید	7/5گرم	sodium chloride (NaCl)
سدیم آزید	1میلی لیتر	bromo cresol purple (ethanolic solution 15g/l)
	(محلول اتانولی 15گرم در لیتر)	
آب مقطر	تا 1000 میلی لیتر	distilled water

روش تهیه :

مواد فوق را با هم مخلوط کرده و در بن ماری جوش قرار دهید . پس از حل شدن محیط را در حجمهای 10 میلی لیتری تقسیم کرده و به مدت 15 دقیقه در دمای 1 ± 121 درجه سلسیوس اتوکلاو نمائید . PH محیط را به گونه‌ای تنظیم نمائید که پس از سترون شدن 0/1 ± 7/2 باشد . (در دمای 25 درجه سلسیوس)

یادآوری : در مواردی که حجمهای بیش از یک میلی لیتر مورد آزمون قرار می‌گیرد از محیط کشت با غلظت دو برابر و هم حجم نمونه برداشت شده استفاده کنید .

در صورتی که محیط به صورت تجارتی در دسترس است طبق دستور سازنده عمل نمائید .

5 ـ 2 ـ 2 ـ محیط کشت صفرا ـ اسکولین ـ azide agar – bile – aesculin

اسکولین – آزید آگار

ترکیب	مقدار	
تریپتون	17 گرم	Tryptone
پپتون	3گرم	peptone
عصاره مخمر	5 گرم	yeast extract
صفرای گاوی به صورت خشک (پودر)	10 گرم	ox - bile dehydrated
سدیم کلراید	5 گرم	sodiom chloride (NaCl)
اسکولین	1 گرم	aesculine
سیترات امونیوم آهن سه ظرفیتی	0/5 گرم	ammonium iron (III) citrate
سدیم آزید	0/15 گرم	sodium azide NaN_3
آگار	12-20 گرم (طبق دستور سازنده)	agar
آب مقطر	تا 1000میلی لیتر	distilled water

روش تهیه :

مواد فوق را با هم مخلوط کرده و در بن ماری جوش قرار دهید پس از حل شدن در ظروف مناسب تقسیم نموده و به مدت 15 دقیقه در دمای 1±121 درجه سلسیوس اتوکلاو کنید .

PH محیط را به گونه‌ای تنظیم کنید که پس از سترون شدن 0/1±7/2 باشد . (در دمای 25 درجه سلسیوس)

محیط را تا دمای 50 تا 60 درجه سلسیوس سرد نموده و به میزان 15 تا 20 میلی لیتر به پلیت‌هائی به قطر حداقل 3 میلی متر اضافه کرده و تا جامد شده محیط آنها را روی یک سطح صاف و خنک قرار دهید .

در صورتی که محیط به صورت تجارتی در دسترس است طبق دستور سازنده عمل نمائید .

5 ـ 3 ـ پراکسیدهیدروژن , محلول 30 گرم در لیتر

6 ـ دستگاهها و وسایل

شامل وسایل معمول در آزمایشگاه میکرو بیولوژی می‌باشد .

7 ـ نمونه برداری

برای نمونه برداری از آبهای آشامیدنی و سایر آبهای بطری نشده , از بطریهای شیشه‌ای و یا ظروف پلاستیکی سترون استفاده می‌شود . این ظروف باید دمای خشک سترونی (160 درجه سلسیوس) را تحمل نمایند و در این دما نباید موادی را آزاد کننده که برای رشد باکتریها بازدارنده باشند .

ظروف باید قبل از سترون شدن با آب و ماده شوینده مناسب شسته و با آب مقطر آبکشی شوند و پس از شستشو با اسیدنیتریک HNO_3 مجددا با آب مقطر آبکشی شوند .

در صورتی که نمونه برداری از شیر آب انجام می‌گیرد باید داخل و خارج شیر آب را کاملا تمیز نموده و پس از باز گذاشتن شیر آب برای مدت یک دقیقه , شیر را بسته و با استفاده از چراغ الکلی سر شیر را حرارت دهید و سپس آنرا باز کرده تا آب خارج شده و خنک گردد .

ظروف نمونه برداری باید کاملا از آب پر شود و در هنگام نمونه برداری دقت نمود تا آلودگی ثانوی پیش نیاید . برای

نمونه برداری از آبهای کلر زده شده پیش از سترون کردن ظرف به ازای هر 125 میلی لیتر حجم ظرف , 0/1 میلی لیتر از محلول 10 درصد تیوسولفات سدیم ($Na_2S_2O_3$) اضافه کنید تا اثر بازدارندگی کلر را خنثی سازد . در مواردی که کلر باقیمانده بیش از 5 پی پی ام [1] می‌باشد مقادیر بیشتر تیوسولفات لازم است .

در مورد آبهائی که غلظت فلزات سنگین در آنها بیش از 0/01 میلی گرم در لیتر است , 0/3 میلی لیتر از محلول 15 درصد " اتیلن دی امین تترااستیک اسید[2]" به ازای هر 500 میلی لیتر حجم ظرف اضافه شود .

آبهای نمونه برداری شده تا رسیدن به آزمایشگاه و پس از آن تا زمان آزمایش در دمای 2 تا 5 درجه سلسیوس نگه داری شود . لازم است که زمان بین نمونه برداری تا آزمایش از 6 ساعت بیشتر نباشد .

8 ـ روش آزمون

8 ـ 1 ـ آماده سازی نمونه‌ها

آماده سازی نمونه‌ها و تهیه رقت‌های مورد نیاز را طبق استاندارد ملی ایران به شماره 356 انجام دهید .

8 ـ 2 ـ غنی سازی

یک میلی لیتر از نمونه اصلی و یا نمونه رقیق شده را به 10 میلی لیتر محیط آبگوشت آزید ـ گلوکز بند (5 ـ 2 ـ 1) بیافزائید و کاملا مخلوط شوند .

8 ـ 3 ـ گرمخانه گذاری

ظروف کشت داده شده را به مدت 24 ساعت در دمای 1± (35 یا 37) درجه سلسیوس گرمخانه گذاری کنید . پس از پایان این مدت کلیه لوله‌هائی را که به رنگ زرد تغییر رنگ داده‌اند به

عنوان واکنش مثبت در نظر بگیرید . توجه داشته باشید که تغییر رنگ می‌تواند در سراسر لوله و یا فقط در قسمت انتهائی لوله ایجاد شده باشد .

مجددا لوله‌های واکنش منفی را برای مدت 24 ساعت دیگر در دمای 1± (35 یا 37) درجه سلسیوس قرار دهید . پس از پایان این مدت حتی اگر تغییر رنگ ضعیفی (ارغوانی مایل به قرمز) مشاهده شود باید به عنوان واکنش مثبت در نظر گرفته شود .

به منظور تفسیر بهتر نتایج , مقایسه رنگ لوله‌ها با لوله شاهد توصیه می‌شود . در مواردی که شمارش تعداد باکتری مورد نظر باشد بهتر است از روش شمارش بیشترین تعداد احتمالی [3] استفاده شود .

8 ـ 4 ـ آزمون تائیدی

در صورتی که لوله‌های بند 8 ـ 2 دارای واکنش مثبت باشند پس از تکان دادن و یکنواخت نمودن , یک حلقه کامل از آن را برداشت کرده و روی پلیت حاوی آزید , اسکولین , صفرا آگار بند 5 ـ 2 ـ 2 کشت خطی داده و به مدت 48 ساعت در دمای 44±0/5 درجه سلسیوس قرار دهید .

کلیه پلیت‌هائی که دارای پرگنه‌های خرمائی رنگ هستند و یا رنگ فوق در محیط اطراف آنها پخش شده است به عنوان واکنش مثبت در نظر بگیرید .

9 ـ 4 ـ آزمون کاتالاز

یک قطره از محلول آب اکسیژنه بند 5 ـ 3 را روی پرگنه‌هائی که در محیط صفرا , اسکولین , آزید آگار رشد کرده‌اند قرار دهید . متصاعد شدن حبابهای اکسیژن دلیل بر وجود آتریم کاتالاز است .

استرپتوکک‌های مدفوعی کاتالاز منفی می‌باشند .

یادآوری : به منظور حذف خطای ناشی از آزمون کاتالاز منفی , آزمایش را روی یک محیط غیر انتخابی مثل آگارمغذی (Nutrient Agar) تکرار کنید . از آنجاکه آنزیم فوق فقط در کشت‌های زنده وجود دارد , بنابراین آزمایش را روی کشت‌های (18 تا 24) ساعته انجام دهید .

1- Part Per Million (P.P.M)

2- Ethylene diamine tetraacetic acid (E.D.T.A)

3- Most Probable Number (M.P.N)

ISLAMIC REPUBLIC OF IRAN

Institute of Standards and Industrial Research of Iran

ISIRI NUMBER

3619

Detection and enumeration of faecal strepotocci in Water by enrichment in liquid medium

1st Edition