INSO
20142
1st.Edition
2016

جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran
سازمان ملی استانداردایران
Iranian National Standardization Organization

استاندارد ملی ایران
۲۰۱۴۲
چاپ اول
۱۳۹۴

فاضلاب – بازیابی ویروس‌ها از لجن‌های فاضلاب– آئین‌کار

Wastewater- Recovery of viruses from wastewater sludges- Guideline

ICS: 13.060.30

سازمان ملی استاندارد ایران

تهران، ضلع جنوب غربی میدان ونک، خیابان ولیعصر، پلاک ۲۵۹۲

صندوق‌پستی: ۶۱۳۹-۱۴۱۵۵ تهران- ایران

تلفن: ۵-۸۸۸۷۹۴۶۱

دورنگار: ۸۸۸۸۷۰۸۰ و ۸۸۸۸۷۱۰۳

کرج ، شهر صنعتی، میدان استاندارد

صندوق پستی: ۱۶۳-۳۱۵۸۵ کرج - ایران

تلفن: ۸- ۳۲۸۰۶۰۳۱ (۰۲۶)

دورنگار: ۳۲۸۰۸۱۱۴ (۰۲۶)

رایانامه: standard@isiri.org.ir

وبگاه: http://www.isiri.org

Iranian National Standardization Organization (INSO)

No.1294 Valiasr Ave., South western corner of Vanak Sq., Tehran, Iran

P. O. Box: 14155-6139, Tehran, Iran

Tel: + 98 (21) 88879461-5

Fax: + 98 (21) 88887080, 88887103

Standard Square, Karaj, Iran

P.O. Box: 31585-163, Karaj, Iran

Tel: + 98 (26) 32806031-8

Fax: + 98 (26) 32808114

Email: standard@isiri.org.ir

Website: http://www.isiri.org

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

سازمان ملی استاندارد ایران به موجب بند یک مادهٔ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفه تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) ایران را به عهده دارد.

تدوین استاندارد در حوزه های مختلف در کمیسیون های فنی مرکب از کارشناسان سازمان صاحب نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می شود وکوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانهٔ صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف‌کنندگان، صادرکنندگان و وارد کنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان های دولتی و غیر دولتی حاصل می شود .پیش نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی نفع و اعضای کمیسیون های فنی مربوط ارسال می‌شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادها در کمیتهٔ ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب به عنوان استاندارد ملی(رسمی) ایران چاپ و منتشر می شود.

پیش نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان های علاقه مند و ذیصلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می کنند درکمیتهٔ ملی طرح و بررسی و درصورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می شود .بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می شود که بر اساس مفاد نوشته شده در استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تدوین و در کمیتهٔ ملی استاندارد مربوط که سازمان استاندارد تشکیل می‌دهد به تصویب رسیده باشد.

سازمان ملی استاندارد ایران از اعضای اصلی سازمان بین المللی استاندارد (ISO)[1] کمیسیون بین المللی الکتروتکنیک (IEC)[2] و سازمان بین المللی اندازه شناسی قانونی (OIML)[3] است و به عنوان تنها رابط[4] کمیسیون کدکس غذایی (CAC)[5] در کشور فعالیت می کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی های خاص کشور، از آخرین پیشرفت‌های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین المللی بهره‌گیری می‌شود.

سازمان ملی استاندارد ایران می تواند با رعایت موازین پیش بینی شده در قانون، برای 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 استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشو ر و / یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری نماید. سازمان می تواند به منظور حفظ بازارهای بین المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری نماید. هم چنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده کنندگان از خدمات سا زمان ها و مؤسسات فعال در زمینهٔ مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدورگواهی سیستم های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی، آزمایشگاه ها و مراکز کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش ، سازمان استاندارد این گونه سازمان ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامهٔ تأیید صلاحیت به آن ها اعطا و بر عملکرد آن ها نظارت می کند .ترویج دستگاه بین المللی یکاها، کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این سازمان است.

1- International organization for Standardization
2 - International Electro technical Commission
3- International Organization for Legal Metrology (Organization International de Metrology Legal)
4 - Contact point
5 - Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

((فاضلاب – بازیابی ویروس‌ها از لجن‌های فاضلاب – آئین‌کار))

رئیس:	**سمت و/ یا محل اشتغال:**
مسیحا، علیرضا (دکتری میکروبیولوژی)	عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان
دبیر:	
صادقی‌پور شیجانی، معصومه (فوق لیسانس محیط زیست)	رئیس اداره هماهنگی و تدوین استاندارد- اداره کل استاندارد گیلان
اعضاء : (به ترتیب حروف الفبائی)	
آبادیان، محمدرضا (لیسانس شیمی)	مدیر عامل- شرکت پویندگان بهبود کیفیت
ابراهیمی، سیده مریم (فوق لیسانس صنایع غذایی)	مسئول کنترل کیفیت - شرکت کامپوره خزر
اسلامی، محمد صادق (فوق لیسانس مهندسی محیط زیست)	کارشناس مسئول- معاونت بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی گیلان
باقرزاده، آسان (دکتری محیط زیست و توسعه پایدار)	مدیر دفتر محیط زیست و کیفیت منابع آب - شرکت آب منطقه استان گیلان
پورحسن گیسمی، ریحانه (فوق لیسانس شیمی آلی)	کارشناس- شرکت نگین آسای معتمد
زبده، نسیم (فوق لیسانس شیمی)	مدیر کنترل کیفیت -واحد تولیدی لویه
زلفی نژاد،کامران (فوق لیسانس شیلات)	کارشناس - مرکز ملی تحقیقات آبزیان استان گیلان

اعضاء : (به ترتیب حروف الفبائی)	**سمت و/ یا محل اشتغال:**
شریعتی، فاطمه (دکتری محیط زیست دریایی)	عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان
فرحناک شهرستانی، لحیا (فوق لیسانس شیمی آلی)	کارشناس تدوین- اداره کل استاندارد گیلان
فلاح اسکندرپور، افشین (فوق لیسانس بیولوژی دریا)	کارشناس- مدیریت پسماند شهرداری رشت
قماش‌پسند، مریم (دانشجوی دکتری شیمی)	مدرس- دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان
موقر حسنی، فرحناز (لیسانس مهندسی مکانیک)	کارشناس - شرکت آب و فاضلاب شهری استان گیلان
میر روشندل، اعظم السادات (فوق لیسانس شیمی تجزیه)	رئیس اداره امور آزمایشگاه‌ها- اداره کل حفاظت محـیط زیست استان گیلان
نجدی، یاسمن (فوق لیسانس شیمی آلی)	مسئول کنترل کیفیت- شرکت کارتن پلاست نفیس
ویراستار:	
سیروسی، آریادات (لیسانس متالورژی)	کارشناس مسئول صنایع فلزی استاندارد گیلان

فهرست مندرجات

عنوان **صفحه**

پیش گفتار ز

۱ هدف و دامنه کاربرد ۱
۲ مراجع الزامی ۱
۳ اصطلاحات و تعاریف ۲
۴ وسایل ۲
۵ خلوص واکنشگرها و آب ۳
۶ واکنشگر و مواد ۴
۷ خلاصهٔ روش ۴
۸ روش کار ۴
۹ دقت و انحراف ۱۰
۱۰ خلاصهٔ روش ۱۰
۱۱ وسایل ۱۱
۱۲ روش ۱۴
۱۳ دقت و انحراف ۱۵
۱۴ کتابنامه ۱۶

پیش گفتار

استاندارد " فاضلاب – بازیابی ویروس‌ها از لجن‌های فاضلاب – آئین‌کار " که پیش‌نویس آن درکمیسیون‌های مربوط تهیه و تدوین شده است، در یکصد و پنجمین اجلاس کمیتهٔ ملی استاندارد ملی محیط زیست مورخ ۹۴/۱۲/۸ تصویب شد، این استاندارد به استناد بند یک مادهٔ ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱، به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود

استانداردهای ملی ایران براساس استاندارد شماره ۵ (استانداردهای ملی ایران- ساختار و شیوه نگارش) تدوین می‌شوند. برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت‌های ملی و جهانی در زمینهٔ صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در صورت لزوم تجدیدنظر خواهد شد و هر پیشنهادی که برای اصلاح و تکمیل این استانداردها ارائه شود، هنگام تجدیدنظر در کمیسیون‌های مربوط مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین، باید همواره از آخرین تجدیدنظر استانداردهای ملی ایران استفاده کرد.

منبع و ماخذی که برای تهیه و تدوین این استاندارد مورد استفاده قرار گرفته به شرح زیر است:

ASTM D4994 : 89 (Reapproved 2014), Standard Practice for Recovery of Viruses from Wastewater Sludges

فاضلاب- بازیابی ویروس‌ها از لجن‌های فاضلاب – آئین‌کار

هشدار- در این استاندارد تمام موارد ایمنی و بهداشتی درج نشده است. در صورت مواجهه با چنین مواردی، مسئولیت برقراری شرایط بهداشت و ایمنی مناسب و اجرای آن برعهدهٔ کاربر این استاندارد است.

۱ هدف و دامنهٔ کاربرد

۱-۱ هدف از تدوین این استاندارد، تعیین روش‌هایی به منظور بازیابی ویروس‌ها از لجن‌های فاضلاب به‌نفع انترو ویروس‌ها[1] است.

روش‌های ارائه شده دراین استاندارد به شرح زیر است:

- روش الف – روش جذب سطحی که در بندهای ۶ تا ۹-۳-۳ شرح داده شده است.
- روش ب - روش فراصوت که در بندهای ۱۰ تا ۱۴-۳-۳ شرح داده شده است.

۱-۲ این استاندارد در موارد زیر کاربرد دارد:

۱-۲-۱ ارائه روش‌هایی به منظور بازیابی ویروس‌ها از لجن‌های فاضلاب به‌نفع انتروویروس‌ها؛

۱-۲-۲ روش‌های الف و ب برای لجن‌های خام، هضم شده وآبگیری شده قابل اجراست.

۱-۲-۳ دراین استاندارد روی لجن استاندارد شده مطابق بند ۹-۱، آزمون می‌شود.

اطمینان از اعتبار این آیین‌کار برای بافت آزمون نشده برعهدهٔ کاربر است.

یادآوری ۱- اگر چه درحال حاضر، بسیاری از آزمایشگاه‌ها ویروس‌ها را از لجن جداسازی می‌کنند، اما به دلیل فقدان روش‌های آزمون استاندارد، مقایسه معتبر از داده‌های حاصل، امکان پذیر نبوده‌است.

یادآوری ۲- توصیه می‌شود، فقط پرسنل آموزش دیده و ماهر این روش را اجرا کنند. اقدامات پیشگیرانه بهداشتی که مراجع ذیصلاح[2] برای حفاظت افراد درگیر با آزمون‌های بیولوژیکی مخاطره‌آمیز تعیین نموده‌اند، باید اعمال شود.

۲ مراجع الزامی

در مراجع زیر ضوابطی وجود دارد که در متن این استاندارد به صورت الزامی به آن‌ها ارجاع داده شده است. بدین ترتیب، آن ضوابط جزئی از این استاندارد محسوب می شود.

۱-دستهٔ بزرگی از ویروس‌ها از جمله ویروس سرماخوردگی که در تصفیهٔ فاضلاب صنعت مشکلات زیادی ایجاد می‌کنند.
1-Enteroviruse

۲- وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی

در صورتی که به مرجعی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد، اصلاحیه‌ها و تجدید نظرهای بعدی آن برای این استاندارد الزام‌آور نیست. در مورد مراجعی که بدون ذکر تاریخ انتشار به آن‌ها ارجاع داده شده است، همواره آخرین تجدیدنظر و اصلاحیه‌های بعدی برای این استاندارد الزام‌آور است.

استفاده از مراجع زیر برای کاربرد این استاندارد الزامی است:

۲-۱ استاندار ملی ایران شمارهٔ ۱۷۲۸، آب مورد مصرف در آزمایشگاه تجزیه- ویژگی‌ها و روش‌های آزمون

2-1 ASTM D 1129 Terminology Relating to Water

۳ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد، اصطلاحات و تعاریف ارائه شده در ASTM D1129 به‌کار می‌رود.

۴ وسایل

۴-۱ سانتریفیوژ(ها)

سانتریفیوژ یخچال‌دار با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه، دارای ظرف‌های ml ۱۰۰ درپیچ‌دار سانتریفیوژ است که می‌تواند ۱۰۰۰۰ دور را تحمل کند و ظرف‌های ml ۲۵۰ درپیچ دار سانتریفیوژ برای ۲۵۰۰ دور.

۴-۲ pH متر

با دقت حداقل ۰٫۱واحد pH، مجهز به یک الکترود نوع ترکیبی، کالیبره شده با بافر استاندارد.

۴-۳ دستگاه پالایه

برای استریل کردن غشایی، با نگه‌دارنده پالایه به قطر mm ۴۷ و سرنگ نوک لغزشی[1] ml ۵۰ (برای نوع مادهٔ پالایه به بند ۶-۷ مراجعه شود) .

۵ خلوص واکنشگرها و آب

۵-۱ درجهٔ خلوص واکنشگرها

۱- نوعی سرنگ‌های بدون سرسوزن و یک‌بار مصرف هستند.

1- slip-tip syringe

در کلیهٔ آزمون‌ها، مواد شیمیایی با درجه خلوص شیمیایی واکنشگر باید به‌کار برده شوند و درجه خلوص آنها به تایید مرجع معتبر رسیده باشد. امکان استفاده از درجه‌های خلوص دیگر نیز وجود دارد، مشروط بر این‌که محرز شود که درجهٔ خلوص آن‌ها به اندازهٔ کافی بالا است، بـه نحوی که باعث کاهش دقت اندازه‌گیری نشود.

۲-۵ درجه خلوص آب

آب مورد استفاده باید مطابق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۷۲۸ باشد.

روش الف-جذب سطحی

۶ واکنشگرها و مواد

۶-۱ محلول آلومینیوم کلرید (۱۲٫۰۷ g/l)

۱۲٫۰۷g آلومینیوم کلرید ($AlCl_3.6H_2O$) را در ۵۰۰ ml آب حل کنید و بـه حجـم ۱۰۰۰ ml برسـانید. محلـول $AlCl_3$ را در ۱۲۱ °C به‌مدت ۱۵ min اتوکلاو کنید.

۶-۲ عصارهٔ بیف بافرشده (عصارهٔ گوشت گاو)

۱۰ g پودر استخراجی از گوشت، ۱٫۳۴ g از $Na_2HPO_4.7H_2O$ و۰٫۱۲ g از سیتریک اسید را در یک ظرف درپیچ دار در ۱۰۰ ml آب حل کنید و به مدت تقریبی ۲ h روی هم‌زن مغناطیسی بگذارید تا هـم زده شـود. در ۱۲۱ °C به‌مدت ۱۵ min اتوکلاو کنید.

۶-۳ محلول دی سدیم هیدروژن فسفات (۴ g /۱۰۰ ml)

۴ g از دی سدیم هیدروژن فسفات ($Na_2HPO_4.7H_2O$) را در ۱۰۰ ml آب حل کنید. در ۱۲۱ C° به‌مدت ۱۵ min اتوکلاو کنید.

۶-۴ هیدروکلریک اسید (۱+۱)

یک حجم اسید غلیظ (۱٫۱۹sp gr) به یک حجم آب اضافه کنید.

۶-۵ هیدروکلریک اسید (۱+۹)

یک حجم اسید غلیظ (۱٫۱۹sp gr) به نه حجم آب اضافه کنید.

۶-۶ محلول سدیم هیدروکسید (۴ g /۱۰۰ ml)

۴ g سدیم هیدروکسید خشک (NaOH) را در آب حل کنید و به حجم ۱۰۰ml برسانید.

۶-۷ پالایه[1]ها، دیسک، غشاء، mm ۴۷

کاغذ پالایه‌هایی با منفذهای ۳μm، ۰٫۴۵ μm، ۰٫۲۵ μm، به اندازهٔ مناسب از صفحهٔ پالایه برش دهید. نگه‌دارندهٔ پالایه را باز کنید پالایه با منفذ ۰٫۲۵ μm. را روی صفحهٔ پایهٔ نگه‌دارندهٔ پالایه قرار دهید و پالایه‌های باقیمانده را به ترتیب افزایش اندازهٔ منفذ در بالا، برروی هم بگذارید.

نگه‌دارندهٔ پالایه را بازکرده، محکم کنید. پالایه‌ها همان‌گونه که تشریح شد، روی هم قرار می گیرد تا هنگامی‌که مواد گل آلود از آنها پالایه می‌شود با سرعت کمتری پرشوند. چندین ردیف پالایه را آماده کنید.

۷ خلاصهٔ روش

۱-۷ روش جذب سطحی، بر پایهٔ جذب سطحی ویروس‌ها از فاز مایع به جامدات لجن است که به‌وسیلهٔ سانتریفیوژ تغلیظ می‌شود. لجناب (مایع رویی نمونهٔ سانتریفیوژ شده)[2] دور ریخته می‌شود. ویروس‌ها به‌وسیلهٔ خواص فیزیکوشیمیایی از جامدات واجذب شده و توسط لخته‌سازی با مواد آلی، غلیظ‌تر می‌شوند. آلودگی‌زدایی به‌وسیلهٔ پالایه‌کردن انجام می‌شود.

۸ روش‌کار

۸-۱ آماده‌سازی لجن

از ml ۱۰۰ لجن مایع و g ۱۰۰ لجن هضم شده و لجن‌های آبگیری شده استفاده کنید. ممکن است در آماده‌سازی لجن از تجربه نیز استفاده شود.

۸-۱-۱ ml ۱۰۰ لجن به‌خوبی مخلوط شده را در یک استوانهٔ مدرج ml ۱۰۰ اندازه‌گیری کنید. لجن را سریعا قبل از وارد کردن به استوانهٔ مدرج به اندازه کافی مخلوط کنید. زیرا جامدات لجن که حاوی بیشترین تعداد ویروس هستند در فاصلهٔ بعد از مخلوط شدن سریعا شروع به ته‌نشینی می‌کنند.

۸-۱-۲ میلهٔ همزن را در یک بشرml ۲۵۰ قرار دهید.

۸-۱-۳ ml ۱۰۰ لجن اندازه‌گیری شده را از استوانهٔ مدرج به بشر ml ۲۵۰ منتقل کنید. درصورت نیاز، چندین بار لجن را از بشر به استوانه ریخته و از استوانه به بشر منتقل کنید تا تمام جامدات لجن از استوانه خارج شود. مراقب باشید که ذرات معلق آن در هوا تشکیل نشود.

۸-۱-۴ بشر را روی همزن مغناطیسی قرار داده تا به‌صورت گردابی با سرعت کافی هم زده شود.

1-Filter
2-Supernatant

۸-۱-۵ ۱ ml محلول آلومینیوم کلرید به لجن اضافه کنید، غلظت نهایی آلومینیوم کلرید در لجن به‌طورتقریب ۰٫۰۰۰۵ M است.

۸-۱-۶ الکترود pH نوع ترکیبی[1] را در لجن قرار دهید و pH لجن را با کلریدریک اسید (۱+۱) به ۳٫۵ ± ۰٫۱ برسانید. اگر pH پایین‌تر از ۳٫۵ شد با محلول NaOH (۴ g /۱۰۰ ml) آنرا تنظیم کنید و به عدد مذکور برسانید. اگر لجن به الکترودها چسبید آنها را به آرامی با بالا پایین‌کردن در مخلوط لجن، تمیز کنید. pH متر را با pH=۴ استاندارد کنید.

۸-۱-۷ به‌مدت ۳۰ min به مخلوط کردن ادامه دهید. در فواصل معین pH لجن را کنترل کنید. درصورت تغییر pH آن را به ترتیب با کلریدریک اسید (۱+۹) و محلول سود (۴ g /۱۰۰ ml)در مقدار ۳٫۵ ± ۰٫۱ تنظیم کنید.

۸-۱-۸ همزن را خاموش کنید و الکترود pH را از لجن خارج کنید.

۸-۱-۹ درپوش یک ظرف سانتریفیوژ درپیچ‌دار را بازکنید و لجن آماده‌شده را در بطری ریخته، مگنت را با آهنربا از بشر بیرون بیاورید تا در ظرف سانتریفیوژ نیافتد. لجنی که به مگنت یا میلهٔ همزن چسبیده است را به‌وسیلهٔ یک میلهٔ همزن جداکنید. درصورت لزوم، چندین بار لجن آماده شده را از بطری به بشر و برعکس منتقل کنید تا تمام جامدات لجن خارج شود. دقت کنید که ذرات معلق در هوا تشکیل نشود.

۸-۱-۱۰ درپوش ظرف سانتریفیوژ را درجای خود قرار دهید و محکم روی ظرف ببندید.

۸-۱-۱۱ لجن آماده‌شده را در دور ۲۵۰۰، به‌مدت ۱۵ min در ۴ C° سانتریفیوژ کنید. لجناب را دور بریزید.

۸-۲ شست‌وشوی ویروس‌ها از جامدات لجن

۸-۲-۱ در ظرف سانتریفیوژ که حاوی لجن رسوبی و آماده شده است یک مگنت مغناطیسی اضافه کنید.

۸-۲-۲ ۱۰۰ ml محلول بافراستخراجی از گوشت گاو را به لجن رسوبی و آماده شده اضافه کنید. حجم محلول بافر استخراجی از گوشت گاو استفاده شده برای شست و شوی ویروس‌ها از لجن آماده‌شده، معادل حجم اصلی نمونه است(به بند ۸-۱ مراجعه شود).

۸-۲-۳ درپوش ظرف سانتریفیوژ را درجای خود قرار دهید و محکم روی ظرف ببندید.

۸-۲-۴ ظرف سانتریفیوژ را روی همزن مغناطیسی قرار داده با سرعت مناسب هم بزنید تا به حالت گردابی برسد. برای به‌حداقل رساندن تشکیل کف (که ممکن است موجب غیرفعال شدن ویروس‌ها شود) سرعت را از حد مورد نیاز برای حالت گردابی افزایش ندهید. باید مراقب باشید تا ظرف واژگون نشود. درصورت نیاز ظرف را ثابت کنید.

1- Combination-type pH electrode

۸-۲-۵ همزدن را به مدت ۳۰ min ادامه دهید.

۸-۲-۶ دستگاه همزن مغناطیسی را خاموش کنید و مگنت را از ظرف بیرون آورید.

۸-۲-۷ درپوش ظرف سانتریفیوژ را در جای خود قرار دهید و محکم روی ظرف ببندید و مخلوط لجن آماده شده- شستشوشده را با دور ۱۰۰۰۰ به‌مدت ۳۰min در ۴ ° C سانتریفیوژ کنید.

۸-۲-۸ درپوش ظرف سانتریفیوژ را بردارید، فاز مایع بالا را در بشر ریخته و رسوب ته نشین‌شده را دور بریزید.

۸-۲-۹ نگه‌دارنده پالایه را که بستهٔ پالایه[1] برروی آن قرار دارد (به بند ۶-۷ مراجعه شود) روی یک ارلن مایر جمع کنندهٔ ۲۵۰ ml قرار دهید.

۸-۲-۱۰ سرنگml ۵۰ را از محلول حاصل از شستشو پرکنید.

۸-۲-۱۱ نوک سرنگ را در نگه‌دارندهٔ پالایه قرار دهید.

۸-۲-۱۲ محلول حاصل از شستشو را با فشار از میان بستهٔ پالایه به داخل ارلن مایر جمع‌کنندهٔ ۲۵۰ ml عبور دهید. مراقب باشید تا نوک سرنگ نشکند و از طرفی فشار روی ارلن مایر جمع‌کننده به حداقل برسد چون ممکن است فشار باعث شکسته شدن و/ یا واژگون شدن ارلن مایر جمع‌کننده شود.

اگر بستهٔ پالایه به‌صورت نامطلوبی شروع به مسدود شدن کرد محتوی سرنگ را دربشر حاوی مواد پالایه نشده خالی کنید. سرنگ را از هوا پر کنید و به بستهٔ پالایه تزریق کنید تا مواد باقی‌مانده در پالایه‌ها بیرون بیاید. پالایه کردن را با یک نگه‌دارنده و بستهٔ پالایهٔ دیگر ادامه‌دهید. نگه‌دارنده و بستهٔ پالایهٔ آلوده شده را دور بریزید. مراحل بندهای ۸-۲-۹ تا ۸-۲-۱۲ را تکرار کنید تا تمام حجم مواد حاصل از شستشو پالایه شود. هر نگه‌دارندهٔ پالایه را باز و ته پالایه‌ها را بررسی کنید تا مطمئن شوید که پاره نشده‌اند. اگر یکی از پالایه‌ها پاره شده باشند، مراحل بندهای ۸-۲-۱۰ را تا ۸-۲-۱۲را با نگه‌دارنده و بستهٔ پالایهٔ جدید تکرار کنید.

۸-۲-۱۳ بلافاصله مواد حاصل از شستشو را تا دمای ۴ ° C سرد کنید و تا مرحلهٔ سنجش ویروس‌ها، در این دما نگه‌داری کنید(به بند ۸-۳ مراجعه کنید) . تعداد محیط‌های کشت سلولی مورد نیاز برای سنجش ویروسی ممکن است با تغلیظ ویروس‌های موجود در عصارهٔ گوشت گاو، با روش لخته‌سازی با موادآلی، کاهش یابد. ممکن است، در این روش ممکن است مقداری از ویروس‌ها از بین بروند. اگر ویروس‌ها در مادهٔ حاصل نیاز به تغلیظ داشته باشند، بلافاصله مطابق بند ۸-۴ اقدام کنید. اگر تغلیظ بیشتر نیاز نیست و سنجش ویروس‌ها بیشتر از ۸ h طول نکشد مادهٔ حاصل را به بطری‌های استریل شدهٔ نمونه منتقل کنید، محکم درب آنها را ببندید و بلافاصله در دمای C° ۷۰- ذخیره کنید.

1- Filter stack

۸-۳ سنجش ویروسی

۸-۳-۱ هنگام سنجش ویروسی به سرعت کنستانترهٔ منجمد شده را در دمای ۳۷ ° C گرم کنید و با روش معمول اندازه‌گیری ویروس‌ها کار کنید. بهتراست، حداقل ٪۱۰ از ایزوله شده‌ها از طریق مرحلهٔ دوم تایید شود.

۸-۴ روشی برای تغلیظ ویروس‌ها از محلول حاصل از شستشوی لجن(تغلیظ لخته‌سازی با مواد آلی)

سنجش ویروس‌های محلول حاصل ازشستشوی عصارهٔ گوشت گاو بدون تغلیظ آنها، ترجیح داده می‌شود. زیرا ممکن است، تعدادی از ویروس‌ها براثر تغلیظ از بین بروند. هرچند ممکن است تعداد محیط‌های کشت سلولی مورد نیاز برای سنجش ویروسی با تغلیظ ویروس‌های موجود در مادهٔ حاصل از شستشو کاهش پیدا کند. ممکن است عصارهٔ گوشت گاو برای جذب‌سطحی همهٔ ویروس‌های عفونی معلق، لختهٔ مناسب را تولید نکند، بنابراین ممکن است مقدار بیشتری از ویروس‌ها از بین برود.

۸-۴-۱ مواد حاصل از بند ۸-۲-۱۳ را به استوانهٔ مدرج ریخته و حجم آن را یادداشت کنید.

۸-۴-۲ مواد را در بشرml ۶۰۰ بریزید.

۸-۴-۳ برای هرml ۳ از مادهٔ حاصل از شستشوی مادهٔ استخراجی گوشت گاو، ml ۷ آب استریل شده در بشر ml ۶۰۰ بریزید تا غلظت عصارهٔ گوشت گاو ٪ ۳ شود. این رقیق‌سازی لازم است، زیرا اغلب مادهٔ استخراجی گوشت گاو باغلظت٪ ۱۰ از روش تغلیظ لخته‌سازی با مواد آلی جواب نمی‌دهد.

۸-۴-۴ عصارهٔ گوشت گاو رقیق شده و پالایه شده را در استوانهٔ مدرج ریخته و حجم کل را یادداشت کنید.

۸-۴-۵ عصارهٔ گوشت گاو پالایه شده و رقیق شده را به بشر ml ۶۰۰ بریزید و یک مگنت مغناطیسی در آن قرار دهید.

۸-۴-۶ بشر را روی همزن مغناطیسی قرار داده با سرعت مناسب هم بزنید تا به حالت گردابی برسد. برای به حداقل رساندن تشکیل کف (که ممکن است موجب غیرفعال شدن ویروس‌ها شود) سرعت را از حد مورد نیاز برای حالت گردابی افزایش ندهید.

۸-۴-۷ الکترود ترکیبی pH را در عصارهٔ گوشت گاو پالایه شده و رقیق شده قرار دهید و به آرامی در آن کلریدریک اسید (۱+۹) بریزید تا pH آن به ۰٫۱± ۳٫۵ برسد. لخته شدن یا تشکیل رسوب رخ خواهد داد. اگر pH پایین‌تر از ۳٫۴ رسید با محلول NaOH (۴ g /۱۰۰ ml) آن را تنظیم کنید و به عدد مذکور برسانید. اجازه ندهید که pH به زیر ۳٫۴ برسد، زیرا امکان دارد برخی از ویروس‌ها غیرفعال شوند. به مدت ۳۰ min به همزدن ادامه دهید.

۸-۴-۸ همزن مغناطیسی را خاموش کنید. الکترود را از بشر بیرون آورید و محتویات بشر را به‌طور مساوی در ظرف‌های سانتریفیوژ توزیع‌کنید. مگنت را با یک آهنربا یا مگنت دیگر در زیر بشر نگه دارید تا هنگام ریختن محتویات، وارد ظرف‌های سانتریفیوژ نشود.

۸-۴-۹ درپوش ظرف سانتریفیوژ را درجای خود قرار دهید و محکم روی بطری ببندید. سوسپانسیون لخته شدهٔ عصارهٔ گوشت گاو را در ۲۵۰۰ دور به‌مدت min ۱۵در °C ۴ سانتریفیوژ کنید. لجناب را دور بریزید.

۸-۴-۱۰ در هر ظرف سانتریفیوژ که حاوی لخته است، یک مگنت کوچک مغناطیس قرار داده و درپوش‌ها را به‌صورت آزاد قرار دهید.

۸-۴-۱۱ یک حجم از محلول $Na_2HPO_4.7H_2O$ معادل با ۱/۲۰ (یک بیستم) حجم یادداشت شده در بند ۸-۴-۴ را اندازه بگیرید. این حجم را به‌طور مساوی در لخته‌های موجود در ظرف‌های سانتریفیوژ تقسیم کنید.

۸-۴-۱۲ درپوش ظرف سانتریفیوژ را درجای خود قرار دهید و محکم روی بطری ببندید و هرکدام را روی همزن مغناطیسی قرار دهید. به آرامی لخته‌ها را هم بزنید تا به‌طورکامل حل شود. مراقب باشید بطری‌ها واژگون نشود. از بوجود آمدن کف که موجب غیر فعال شدن ویروس‌ها می‌شود و هم‌چنین از تشکیل ذرات معلق حاوی ویروس جلوگیری کنید. لخته‌ها ممکن است تا حدی از طریق همزدن با اسپاتول، قبل یا طی فرایند همزدن با همزن مغناطیس، از بین بروند.

۸-۴-۱۳ درپوش‌ها را از ظرف‌ها برداشته و لخته‌های حل شده را با هم در یک بشر کوچک مخلوط کنید. هنگام خالی کردن مایع، مگنت‌ها را با یک آهنربا یا مگنت دیگر در زیر ظرف‌های سانتریفیوژ نگه دارید تا مگنت ها به بشر انتقال پیدا نکند.

۸-۴-۱۴ pH لخته‌های حل شده را اندازه‌گیری کنید. اگر بیشتر یا کمتر از ۷ تا ۷/۵ بود، با کلریدریک اسید (۹+۱) یا محلول سدیم هیدروکسید (۴ g /۱۰۰ ml) در این محدوده تنظیم کنید.

۸-۴-۱۵ کنستانترهٔ نهایی را بلافاصله در دمای °C ۴ در یخچال بگذارید و تا سنجش کامل ویروس‌ها در آن دما نگه‌داری کنید. اگر سنجش ویروس‌ها نتوانست در مدت h ۸ انجام شود، رسوب‌های حل شده را به ظرف‌های نمونهٔ استریل شده منتقل کنید. درپوش آن را محکم ببندید و بلافاصله در دمای °C ۷۰- قرار داده و نگه‌داری کنید.

۸-۴-۱۶ در زمان سنجش ویروسی به سرعت کنستانترهٔ منجمد شده را در دمای °C ۳۷ گرم کنید و با روش معمول اندازه‌گیری ویروس‌ها کار کنید. حداقل ٪۱۰ از ایزوله شده‌ها باید از طریق مرحلهٔ دوم تایید شود.

۹ دقت و انحراف

۹-۱ هشت آزمایشگاه مستقل، در ارزیابی این روش بازیابی ویروس‌ها در لجن شرکت کردند. پنج نمونهٔ لجن استاندارد شده دراین مطالعه به شرح زیر استفاده شد:

- بی‌هوازی، سرعت رشد بالا، هضم شده(مزوفیلی)؛
- بی‌هوازی، سرعت رشد استاندارد، هضم شده (مزوفیلی)؛
- بی‌هوازی، هضم شده، آبگیری شده؛
- هوازی، هضم شده؛
- اولیه، هضم نشده.

۹-۱-۱ دو قسمت مساوی از هر نوع لجن، توسط یک آزمایشگاه آماده و نمونه همراه یخ به آزمایشگاه‌های شرکت‌کننده برده می‌شود. پس از پذیرش نمونه در هر آزمایشگاه، آنالیزهای سه گانه روی هر لجن به‌مدت ۷۲ ساعت انجام می‌شود که هر آزمایشگاه از تجهیزات، محیط، شناساگرها، روش‌های سنجش کشت سلولی خود استفاده می‌کند. دو قسمت از آزمون‌های سه‌گانه در یک روز و قسمت سوم روز بعد انجام می‌شود.

۹-۲ انحراف[1]

هیچ انحرافی در داده‌های مطالعه مشاهده نگردید، زیرا هر لجن به طور ذاتی حاوی ویروس است. با این وجود میانگین‌های هندسی زیر به ما ایده‌هایی در مورد محدوده‌های شمارش مورد مطالعه می‌دهد.

جدول۱- نوع لجن و تعداد میانگین هندسی

نوع لجن	تعداد میانگین هندسی باروش آزمون نوع الف(PFU[A]/L)
بی‌هوازی، سرعت رشد بالا، هضم شده(مزوفیلی)	۸۹/۱
بی‌هوازی، سرعت رشد استاندارد، هضم شده (مزوفیلی)	۵۵۰
بی‌هوازی، هضم شده، آبگیری شده	۳۰۲
هوازی،هضم شده	۱۷/۴
اولیه، هضم نشده.	۱۴۴۵

[A] Plaque Forming Units.

۹-۳ دقت

۹-۳-۱ دقت درون آزمایشگاهی

1-Bias

۹-۳-۱-۱ دقت تک اپراتوری توسط انحراف استاندارد در لگاریتم برپایهٔ ۱۰ از تکرار آنالیزها در هر آزمایشگاه برای هر نوع لجن تخمین زده شد. هیچ اختلاف آماری در این تخمین‌ها در آزمایشگاه‌هایا انواع لجن‌ها دیده نشد. در مواردی که میانگین بازیابی متفاوت بود، تخمین ادغامی به‌شرح زیر بدست آمد:

$$S_o \text{ as a } \log_{10}=۰/۲۶$$

۹-۳-۲ انحراف استاندارد کل نیز از لگاریتم بر پایهٔ ۱۰ از داده‌های مورد مطالعه برای هر لجن تخمین زده شد.

از آنجا که تفاوت مهمی در لجن‌ها وجود نداشت تخمین ادغامی به‌شرح زیر به‌دست آمد:

$$S_T \text{ as a } \log_{10}=۰/۴۱$$

۹-۳-۳ داده‌ها و اطلاعات خاص بیشتر مربوط به این ارزیابی از ویروس‌ها درروش‌های بازیابی از لجن ممکن است در منابع دیگر موجود باشد(به منبع شمارهٔ [۱] کتابنامه مراجعه شود).

روش ب-فراصوت

۱۰ خلاصهٔ روش

۱۰-۱ روش فراصوت، برپایهٔ مایع حاصل از شستشوی ویروس‌های متصل به لجن با امواج فراصوت به لجن در حضور عصاره گوشت گاو در pH =۹ برای جلوگیری از واجذب ویروس‌ها به جامدات لجن، استوار است. بعداز سانتریفیوژ، جامدات دور ریخته می‌شود و ویروس‌ها در مایع شناور برروی سطح(لجناب) با فرآیند لخته‌سازی آلی تغلیظ می‌شوند. آلودگی‌زدایی و سم‌زدایی از طریق روش‌های فیزیکوشیمیایی انجام می‌شود.

۱۱ وسایل

۱۱-۱ مخلوط کن، با قابلیت سرعت بالا و پایین و ظرف مخلوط کنml ۱۰۰۰با درپوش.

همهٔ شیشه‌آلات باید قبل از استفاده، استریل شوند. قبل از استریل کردن، درپوش‌ها را آزاد کنید.

۱۱-۲ سونیکاتور[1] با الکترود دارای قابلیت توان خروجی ۱۰۰ وات

الکترود سونیکاتور را با غوطه‌ور کردن درکلریدریک اسید (۱+۹) به‌مدتmin ۵ ضدعفونی کنید و به‌طور کامل با آب شستشو دهید.

1-Sonicator

۱۱-۳ همزن مغناطیسی و دو عدد مگنت که با پلی تترا فلوئور اتیلن پوشیده شده‌اند.

۱۱-۴ PH متر، با دقت حداقل ۰/۱ واحدPH. در محدودهٔ pH ۴ تا ۱۰ با بافر استانداردکالیبره کنید. الکترود PH متر را مانند الکترود سونیکاتور ضدعفونی کنید.

۱۱-۵ سانتریفیوژ یخچال‌دار با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه

ظرف درپیچ‌دار ۲۵۰ml در سرعت ۱۰۰۰۰ دور و ظرف‌های سانتریفیوژ درپیچ دار ml ۵۰ در سرعت ۱۰۰۰۰ دوردر دقیقه (سازگار با کلروفرم).

۱۲ واکنشگرها و مواد

۱۲-۱ آنتی بیوتیک‌ها(استوک IU[1] 100X:10000پنی سیلین)، µg ۱۰۰۰استرپتو مایسین، µg ۵۰۰ تتراسایکلین و µg ۵۰۰ آمفوتریسین-B به ازای هر میلی لیتر)

با توجه به رویه‌های روی ظرف شرایط استریل را رعایت کنید و در دمای C ° ۲۰- نگه‌داری کنید.

۱۲-۲ محلول ضدکف

طبق مدلی که عرضه شده استفاده کنید.

۱۲-۳ عصارهٔ گوشت گاو به‌صورت پودر یا خمیر

طبق مدلی که عرضه شده استفاده‌کنید

۱۲-۴ محلول کلسیم کلرید g/l (۱)

g ۰/۱ کلسیم کلرید ($CaCl_2$) را درml ۱۰۰آب حل کنید و به‌مدتmin ۱۵ در دمای C ° ۱۲۱اتوکلاو کنید.

۱۲-۵ محلول دی سدیم هیدروژن فسفات(ml ۱۰۰/ g ۴)

g ۴دی سدیم هیدروژن فسفات $Na_2HPO_4.7H_2O$ را درآب حل کنید و به حجم ml ۱۰۰ برسانید و در دمای C° ۱۲۱ به‌مدت min ۱۵ اتوکلاو کنید.

۱۲-۶ واکنشگر دی‌تیزون/کلروفرم(محلول استوک غلیظ)

1-International unit(IU)

۱۰۰mg از واکنشگر با درجهٔ تجزیه‌ای دی فنیل تیوکاربازون را در ml ۱۰۰۰کلروفرم (تایید شدهٔ توسط مراجع معتبر متناسب با آزمون دی‌تیزون) حل کنید و در دمای °C ۴ در بطری قهوه‌ای نگه‌داری کنید. (زمان نگه‌داری به‌طور تقریب ۳۰ روزه است).

۱۲-۶-۱ واکنشگر دی‌تیزون/کلروفرم (محلول کاری)

محلول استوک غلیظ (به بند ۱۲-۶ مراجعه شود)را به‌میزان ۱+۱۰ در کلروفرم رقیق کنید. هر روز آن را تازه آماده کنید.

۱۲-۷ هیدروکلریک اسید (۱+۴)

۱حجم از هیدروکلرید اسید غلیظ (۱٫۱۹ sp gr) به ۴ حجم از آب اضافه کنید.

۱۲-۸ هیدروکلریک اسید (۱+۴۹)

۱ حجم از هیدروکلرید اسید غلیظ (۱٫۱۹ sp gr) به ۴۹ حجم از آب اضافه کنید.

۱۲-۹ محلول هیدروکسید سدیم (۸ g /۱۰۰ ml)

۸ gاز سدیم هیدروکسید خشک (NaOH) را در آب حل کنید به حجم ml ۱۰۰ برسانید.

۱۲-۱۰ محلول هیدروکسید سدیم (۰٫۸ g /۱۰۰ ml)

۰٫۸ g از سدیم هیدروکسید خشک (NaOH) را در آب حل کنید و به حجم ml۱۰۰ برسانید.

۱۳ روش

۱۳-۱ سوسپانسیون جامدات لجن

۱۳-۱-۱ به‌مقدار کافی از لجن سرد (°C ۴) که بازده آن g ۲۰ از مادهٔ خشک لجن باشد را اندازه‌گیری کنید و در ظرف مخلوط‌کن بریزید و با آب سرد مقطر (°C ۴) و استریل به حجم نهایی ml ۴۰۰ برسانید. برای لجن‌های حاوی کمتر از ٪ ۵ مادهٔ خشک، ml ۴۰۰ به ظرف مخلوط کن وارد کنید.

۱۳-۱-۲ g ۹٫۶ از پودر عصارهٔ گوشت گاو یا g ۱۲ خمیر عصارهٔ گوشت گاو بنابرمدلی که عرضه شده اضافه کنید.

۱۳-۱-۳ به‌منظور جلوگیری از ایجاد کف ml ۰٫۵ از ضد کف-B اضافه کنید و به مدت min ۲ با سرعت کم مخلوط کنید. سپس min ۱ با بالاترین سرعت مخلوط کنید.

۱۳-۱-۴ سوسپانسیون لجن را به بشر استریل حاوی مگنت مغناطیسی منتقل کنید.

۱۳-۱-۵ مراحل بیان شده در بندهای ۱۳-۱-۱ تا ۱۳-۱-۳ را با دومین قسمت مساوی از لجن تکرار کنید و با اولین قسمت مساوی در بشر ترکیب کنید. حجم نهایی ml ۸۰۰ می‌شود.

۱۳-۱-۶ لجن ترکیب شده را هم بزنید و pH آن‌را با اضافه کردن قطره قطره از محلول سدیم هیدروکسید (g /۱۰۰ ml ۸) به ۹ برسانید. هم بزنید و pH را برایmin ۱۰ دیگر نظارت کنید. pH آن را درصورت لزوم با اضافه کردن قطره قطره از محلول سدیم هیدروکسید (g /۱۰۰ ml ۸) یا هیدروکلریک اسید (۱+۴) در ۹ نگه‌دارید.

۱۳-۲ فراصوت

۱۳-۲-۱ سوسپانسیون لجن را به‌طور مساوی در ۴ ظرف استریل ml ۲۵۰ سانتریفیوژ که در حمام یخ قرار دارند، تقسیم کنید.

۱۳-۲-۲ الکترودهای سونیکاتور را حدود cm ۱ زیر سطح مایع سوسپانسیون در ظرف سانتریفیوژ قرار دهید و هر قسمت را به مدت min ۲ در معرض امواج فراصوت با توان ۱۰۰ وات قرار دهید.

۱۳-۲-۳ قسمت‌های مساوی تحت امواج فراصوت قرار گرفته را در دور ۱۰۰۰۰ به‌مدت min ۳۰ در دمای C° ۴، سانتریفیوژ کنید.

۱۳-۲-۴ لجناب را در بشر استریل شده حاوی مگنت مغناطیسی بریزید. رسوب را دور بریزید.

۱۳-۳ غلیظ‌سازی (روش لخته‌سازی با مواد آلی)

۱۳-۳-۱ بشر را روی همزن مغناطیسی قرار دهید و لجناب داخل بشر را با اضافه کردن قطره قطره از HCl (۱+۴) به pH= ۳٫۵ برسانید.

۱۳-۳-۲ pH را به مدت min ۳۰ پایش کنید. با اضافه کردن قطره قطره HCl (۱+۴) یا NaOH (g /۱۰۰ ml ۸) در pH= ۳/۵ نگه‌دارید. لخته تشکیل خواهد شد.

۱۳-۳-۳ سوسپانسیون لخته شده را به‌طور مساوی در ۴ ظرف استریل سانتریفیوژ ml ۲۵۰ تقسیم کنید و با دور ۱۰۰۰۰ به‌مدت min ۳۰ در دمای C° ۴، سانتریفیوژ کنید.

۱۳-۳-۴ لجناب را دور ریخته، مراقب باشید، لخته‌ها خراب نشوند.

۱۳-۳-۵ هر لختهٔ گلوله شده را در ml ۵ محلول $Na_2HPO_4.7H_2O$ به‌وسیلهٔ پیپت دوباره حل کنید، لخته‌های دوباره حل شده را یک جا جمع کنید (غلظت نهایی) و در pH = ۶ تا pH= ۸ به وسیلهٔ اضافه کردن قطره قطره محلول NaOH (g /۱۰۰ ml ۸) یا HCl (۱+۴) تنظیم کنید.

۱۳-۴ سم‌زدایی و ضدعفونی کردن

۱۳-۴-۱ مواد حاصل از تغلیظ را به‌طور مساوی در دو لولهٔ سانتریفیوژ که با کلروفرم سازگارند، وارد کنید.

۱۳-۴-۲ ml ۱۰از محلول استوک دی‌تیزون/کلروفرم را به هر لوله اضافه کنید. با سرعت، به‌وسیلهٔ ورتکس، به‌مدت min ۱هم بزنید و با دور ۱۰۰۰۰ به‌مدت min ۳۰ در دمای C° ۴ سانتریفیوژ کنید.

۱۳-۴-۳ به‌وسیلهٔ پیپت، فاز بالایی از هر لوله را بردارید (نه سطح جداکنندهٔ دو فاز)، باهم‌در یک ظرف نمونه ریخته و فازهای پایینی و سطح جداکنندهٔ دو فاز را دور بریزید.

۱۳-۴-۴ ml ۰٫۰۵ محلول $CaCl_2$ اضافه کنید، با یک پیپت پاستور استریل مسدود شده با پنبه، به مدت min ۱۰ به‌آرامی هوادهی کنید (یک حباب در ثانیه).

۱۳-۴-۵ ml ۰٫۱ از هر محلول استوک آنتی بیوتیک اضافه کنید.

۱۳-۴-۶ مادهٔ غلیظ شده را به استوانهٔ مدرج منتقل کنید و حجم نهایی را یادداشت کنید.

۱۳-۴-۷ مادهٔ غلیظ شده را به تعدادی ظرف نشکن در فریزر توزیع کنید. درپوش ظرف‌ها را محکم ببندید.

۱۳-۴-۸ تا زمان سنجش، ویروس‌ها را در دمای C° ۷۰- نگه‌داری کنید.

۱۳-۵ سنجش ویروسی

در زمان سنجس ویروسی، به‌سرعت کنستانترهٔ یخ‌زده را در دمای °C ۳۷ گرم کنید و با روش معمول سنجش ویروسی کار را انجام دهید. حداقل ٪ ۱۰ ایزوله شده‌ها باید توسط مرحلهٔ دوم تایید شود.

۱۴ دقت و انحراف

۱۴-۱ هشت آزمایشگاه مستقل، در ارزیابی این روش بازیابی ویروس‌ها در لجن شرکت کردند. پنج نمونهٔ لجن استاندارد شده دراین مطالعه به شرح زیراستفاده شد:

- بی‌هوازی، سرعت رشد بالا، هضم شده(مزوفیلی)؛
- بی‌هوازی، سرعت رشد استاندارد، هضم شده (مزوفیلی)؛
- بی‌هوازی، هضم شده، آبگیری شده؛
- هوازی، هضم شده؛
- اولیه، هضم نشده.

۱۴-۱-۱ دو قسمت مساوی از هر نوع لجن، توسط یک آزمایشگاه آماده و نمونه همراه یخ به آزمایشگاه‌های شرکت کننده برده می‌شود. پس از پذیرش نمونه در هر آزمایشگاه، آنالیزهای سه گانه روی هر لجن به‌مدت ۷۲ ساعت انجام می‌شود که هر آزمایشگاه از تجهیزات، محیط، شناساگرها، روش‌های سنجش کشت سلولی خود استفاده می‌کند. دو قسمت از آزمون‌های سه گانه در یک روز و قسمت سوم روز بعد انجام می‌شود.

۱۴-۲ انحراف

هیچ انحرافی درداده‌های مطالعه مشاهده نگردید، زیرا هر لجن به طور ذاتی حاوی ویروس است. با این وجود میانگین‌های هندسی زیر به‌ما ایده‌هایی در مورد محدوده‌های شمارش مورد مطالعه می‌دهد.

جدول۱- نوع لجن و تعداد میانگین هندسی

نوع لجن	تعداد میانگین هندسی باروش آزمون نوع ب(PFU^A/L)
بی‌هوازی، سرعت بالا، هضم شده(مزوفیلی)	۴۱/۷
بی‌هوازی، سرعت استاندارد، هضم شده (مزوفیلی)	۲۸۸
بی‌هوازی، هضم شده، آبگیری شده	۲۹۵
هوازی،هضم شده	۴/۹
اولیه، هضم نشده.	۶۴۶

[A] Plaque Forming Units.

۱۴-۳ دقت

۱۴-۳-۱ دقت درون آزمایشگاهی

۱۴-۳-۱-۱ دقت تک اپراتوری توسط انحراف استاندارد در لگاریتم برپایهٔ ۱۰ از تکرار آنالیزها در هر آزمایشگاه برای هر نوع لجن تخمین زده شد. هیچ اختلاف آماری در این تخمین‌ها در آزمایشگاه‌هایا انواع لجن‌ها دیده نشد. در مواردی که میانگین بازیابی متفاوت بود، تخمین ادغامی به‌شرح زیر بدست آمد:

$$S_o \text{ as a } \log_{10}=۰/۲۴$$

۱۴-۳-۲ انحراف استاندارد کل نیز از لگاریتم بر پایهٔ ۱۰ از داده‌های مورد مطالعه برای هر لجن تخمین زده شد.

از آنجا که تفاوت مهمی در لجن‌ها وجود نداشت تخمین ادغامی به‌شرح زیر به‌دست آمد:

$$S_T \text{ as a } \log_{10}=۰/۴۸$$

۱۴-۳-۳ داده‌ها و اطلاعات خاص بیشتر مربوط به این ارزیابی از ویروس‌ها در روش‌های بازیابی از لجن ممکن است در منابع دیگر موجود باشد (به منبع شمارهٔ [۱] کتاب‌نامه مراجعه شود).

کتاب‌نامه

[1] Goyal, S. M., et al., “Round Robin Investigation of Methods forRecovering Human Enteric Viruses from Sludge,” *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, Vol 48, No. 3, 1984, pp. 531–538