INSO
16118
1st. Edition
May.2013

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

استاندارد ملی ایران
۱۶۱۱۸
چاپ اول
اردیبهشت ۱۳۹۲

میکروبیولوژی- شمارش باکتری‌ها و قارچ‌های قابل رشد در سوخت‌های مایع- روش‌های فیلتراسیون و کشت

Microbiology-Enumeration of viable Bacteria and fungi in Liquid fuels-filtration and culture procedures

ICS:07.100.99

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب بندیک 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.

نام موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب‌یکصد و پنجاه و دومین جلسه شورای عالی اداری مورخ ۹۰/۶/۲۹ به سازمان ملی استاندارد ایران تغییر و طی نامه شماره ۲۰۶/۳۵۸۳۸ مورخ ۹۰/۷/۲۴ جهت اجرا ابلاغ شده است .

تدوین استاندارد در حوزه‌های مختلف در کمیسیون‌های 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، سازمان‌های دولتی و غیر دولتی حاصل می شود . پیش نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی نفع و اعضای کمیسیون‌های 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 سازمان‌های علاقه مند و ذی صلاح 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 شوند که بر اساس مفاد نوشته شده در استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تدوین و در کمیتهٔ ملی استاندارد مربوط که سازمان ملی استاندارد ایران 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 نیازمندی‌های خاص کشور ،ازآخرین پیشرفت‌های علمی ، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین‌المللی 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 کشور 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 . همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده کنندگان از خدمات سازمان‌ها و مؤسسات فعال در زمینهٔ مشاوره ، آموزش ، بازرسی ، ممیزی و صدور گواهی سیستم‌های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی ، آزمایشگاه‌ها و مراکز کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش ، سازمان ملی استاندارد ایران این گونه سازمان‌ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می کند و در صورت احراز شرایط لازم ، گواهینامهٔ تأیید صلاحیت به آن‌ها اعطا و بر عملکرد آن‌ها نظارت می کند . ترویج دستگاه بین المللی‌یکاها ، 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 Electrotechnical Commission
3- International Organization of Legal Metrology (Organisation Internationale de Metrologie Legale)
4 - Contact point
5 - Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

" میکروبیولوژی- شمارش باکتری‌ها و قارچ‌های قابل رشد در سوخت‌های مایع- روش‌های فیلتراسیون و کشت"

رئیس:	**سمت و/ یا نمایندگی**
شاپوری، رضا (دکترای میکروب‌شناسی)	دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان- گروه میکروبیولوژی
دبیر:	
صنعتی منفرد، بهرام (لیسانس میکروب شناسی)	اداره کل استاندارد استان زنجان
اعضا: (اسامی با حروف الفبا)	
باقری رباطی، احمدرضا (لیسانس صنایع)	سازمان صنعت، معدن و تجارت استان زنجان
بهرامی، بهروز (لیسانس مهندسی کشاورزی- گرایش علوم و صنایع غذایی)	معاونت غذا و داروی دانشگاه علوم پزشکی استان زنجان
غنوی، زهره (فوق لیسانس باغبانی)	سازمان ملی استاندارد ایران
کاظمی، صابر (فوق لیسانس صنایع غذایی)	اداره کل استاندارد استان زنجان
مختاری، فهمیدخت (فوق لیسانس ایمنی‌شناسی)	پژوهشگاه استاندارد-پژوهشکده صنایع غذایی کشاورزی
مهرپور، رامش (لیسانس صنایع)	پژوهشگاه استاندارد-پژوهشکده صنایع غذایی کشاورزی
ولیان، نسرین (لیسانس میکروب‌شناسی)	شرکت شیر پاستوریزه پگاه استان زنجان

فهرست مندرجات

عنوان		صفحه
آشنایی با سازمان ملی استاندارد		ب
کمیسیون فنی تدوین استاندارد		ج
پیش گفتار		د
مقدمه		ه
۱	هدف و دامنه کاربرد	۱
۲	مراجع الزامی	۱
۳	اصطلاحات و تعاریف	۲
۴	اساس آزمون	۲
۵	مداخله گرها	۲
۶	تجهیزات	۳
۷	شناساگرها و مواد	۴
۸	روش آزمون	۶
۹	تفسیر نتایج	۱۰

پیش گفتار

استاندارد " میکروبیولوژی- شمارش باکتری‌ها و قارچ‌های قابل رشد در سوخت‌های مایع – روش‌های فیلتراسیون وکشت" که توسط کمیسیون‌های مربوط تهیه و تدوین شده و در سیصد و بیست و چهارمین اجلاس کمیته ملی استاندارد میکروبیولوژی و بیولوژی مورخ ۹۲/۱/۲۷مورد تصویب قرار گرفته است. اینک به استناد بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

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 موردتوجه قرار خواهد گرفت. بنابراین برای مراجعه به استانداردهای 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.

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

ASTM: D 6974-04, Standard Practice for Enumeration of viable Bacteria and Fungi in Liguid fuels-filtration and culture procedures.

مقدمه

میکروب‌هایی که قابلیت تخریب و تجزیه زیستی[1] دارند، سیستم‌های سوخت رسانی را آلوده می‌کنند. آن‌ها معمولاً در گل و لای جمع شده و در سطح سیستم و یا در سطح مشترک بین آب و سوخت باقی می‌مانند. اگرچه اغلب به دست آوردن نمونه‌ای از این موارد در داخل سیستم‌های سوخت رسانی غیر ممکن است، با اینحال به نظر می‌آید که باکتری‌های زنده‌ی مقاوم و قارچهای به دست آمده از نمونه‌های فاز سوخت در چندین مورد اندازه‌گیری انجام شده، از نمونه‌هایی که در فاز آب به دست می‌آیند کمتر بوده است. ارگانیسم‌های موجود در فاز سوخت اغلب نشانگرهای قابل دسترسی برای بررسی آلودگی میکروبی سیستم سوختی و خود سوخت هستند.

1 Biodeteriogenic

شمارش باکتری‌ها و قارچ‌های قابل رشد در سوخت‌های مایع- روش‌های کشت و فیلتراسیون

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، تعیین روشی برای جداسازی و شمارش باکتریهای هتروتروفیک (HPC)[1] و قارچهای موجود در سوختهای مایع، با گرانروی جنبشی کوچکتر یا مساوی $۲۴\ mm^2 .S^{-1}$ در دمای محیطی با استفاده از روش فیلتراسیون می‌باشد.

یادآوری ۱: این آزمون ممکن است هم در شرایط محیطی و هم در آزمایشگاه صورت پذیرد.

یادآوری ۲: توانایی هر یک از میکروب‌ها در تشکیل کلنی و در محیط خاصی که برای رشد آن‌ها مناسب باشد، به طبقه‌بندی، موقعیت فیزیولوژیکی میکروبها برای شمارش، ترکیبات شیمیایی و وضعیت گرمخانه گذاری بستگی دارد. بنابراین نباید نتایج آزمون فقط با یک معیار تعیین شود.

یادآوری ۳: این روش برای انتقال نمونه‌ی میکروب‌های سوخت به غشای فیلتر، حجم‌ها یا رقت‌های فیلتر شده، محیط‌های کشت مورد استفاده در آلودگیهای میکروبی سوخت و دمای گرمخانه گذاری، موقعیت‌های جایگزینی پیشنهاد می کند. این انعطاف پذیری جهت تسهیل در تشخیص می باشد و هنگام استفاده از این فعالیت به عنوان قسمتی ازیک برنامه‌ی پایش شده، باید ازیک روش واحد استفاده کرد.

یادآوری ۴: این استاندارد بیانگر تمامی نکات ایمنی که در استفاده از آن‌ها به کار می‌رود نیست. بنابر این مسئولیت استفاده کنندگان از این استاندارد برای ایجاد ایمنی مناسب و عملیات سالم‌سازی و تعیین قابلیت دسترسی به آن‌ها، برعهده‌ی کاربران خواهد بود.

یادآوری۵: داده‌های حاصل از شمارش باید به عنوان قسمتی از شناسایی میکروارگانیسمهایا برنامه‌ی روتین پایش باشد. این داده‌ها نباید به عنوان معیار کیفیت سوخت تلقی شوند.

۲ مراجع الزامی

مدارک الزامی زیر حاوی مقرراتی است که در متن این استاندارد ملی ایران به آن ارجاع داده شده است. بدین ترتیب آن مقررات جزئی از این استاندارد ملی ایران محسوب می‌شود. در صورتی که به مدرکی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد، اصلاحیه‌ها و تجدیدنظرهای بعدی آن موردنظر این استاندارد ملی ایران نیست. در مورد مدرکی که بدون تاریخ انتشار به آن‌ها ارجاع داده شده است همواره آخرین تجدیدنظر و اصلاحیه‌های بعدی آن موردنظر است.

استفاده از مراجع زیر برای این استاندارد الزامی است:

1 . Heterotrophic bacteria

۲-۱ استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- الزامات کلی برای آزمونهای میکروبیولوژی- راهنما

۳ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد، اصطلاحات و تعاریف زیر به کار می‌رود:

۳-۱

آسپتیک[1]: عاری از آلودگی‌های میکروبی قابل رشد

۴ اساس آزمون

۴-۱ آب آزاد موجود در نمونه‌ی سوخت را با قرار دادن در یک قیف جداکننده خارج شده، پس از خروج، حجمی مشخص از باقی مانده‌ی سوخت از یک فیلتر غشایی سترون با یکی از سه روش فیلتر می‌شود.

۴-۲ میکروب‌های موجود در سوخت توسط فیلتر غشایی جدا شده،و نمونه‌های سوخت مجدداً از فیلترهای تازه، عبور داده شده و در محیط مغذی کشت می‌شود.

۴-۳ پس از فیلتر شدن، هر غشاء، در یکی از دو نوع محیط کشت آگاردار قرار داده شده و به مدت سه روز و در دمای معین گرمخانه‌گذاری می‌شود، تا وجود کلنی‌های تشکیل شده، مورد بررسی قرار گیرند.

۴-۴ محیط کشت آگاردار حاوی فیلتر غشایی به مدت دو روز یا بیشتر گرمخانه‌گذاری شده و سپس به طور مجدد مورد ارزیابی قرار می‌گیرد.

۴-۵ کلنی‌ها به صورت دستی و یا با شمارنده‌ی الکتریکی، شمارش می‌شود.

۴-۵-۱ در صورت امکان، کلنی‌های مشخص و موجود در هر محیط کشت براساس رنگ کلنی، مورفولوژی و آزمون‌های میکروسکوپی تعیین می‌شود.

۴-۵-۲ تعداد کلنی‌های باکتریایی و قارچی به CFU در هر لیتر از سوخت گزارش می‌شود.

۵ مداخله‌گرها

۵-۱ رسوبات غیربیولوژیکی می‌توانند غشاء را سد کرده و مانع فیلتراسیون (تصفیه‌سازی) گردند.

۵-۲ با فرض این نکته که هر CFU از یک سلول منفرد میکروبی به وجود آید، در اغلب مواقع، میکروب‌ها توده‌هایی را ایجاد می‌کنند که مانند یک کلنی منفرد به نظر می‌آیند. در نتیجه، اطلاعات

1 Aseptic

محاسبه شده درباره باکتری‌های زنده و مقاوم به طور کلی از میزان تخمین ارگانیسم‌های زنده‌ی مقاوم در نمونه‌ی معمولی به دست می‌آیند.

۵-۳ ممکن است وضعیت متابولیکی میکروب‌های منفرد تحت تأثیر انواع گوناگونی از جنبه‌های فیزیکی و شیمیایی در سوخت قرار گیرد. سلول‌های صدمه دیده یا سلول‌هایی که زمان‌های تولیدمثل نسبتاً طولانی دارند، ممکن است در زمان اختصاص داده شده جهت مشاهدات در آزمون، کلنی تشکیل ندهند.

۶ تجهیزات

از تجهیزات معمول در آزمایشگاه میکروبیولوژی (طبق استاندارد ملی ایران شماره‌ی ۹۸۹۹) به ویژه آن‌هایی که در ادامه شرح داده می شوند، استفاده کنید.

۶-۱ قیف‌های جداکننده شیشه‌ای با ظرفیت اسمی ۵۰۰ml

۶-۲ استوانه‌ی مدرج شیشه‌ای با ظرفیت اسمی ۱۰۰ml و 1l

۶-۳ پی پت شیشه‌ای یا پلاستیک قابل تجزیه استریل شده با ظرفیت اسمی ۱۰ml یا پی پت با حجم قابل تطبیق و نوک‌های پلاستیکی تجزیه شونده و استریل شده

۶-۴ فیلتر غشایی

یادآوری ۱: زمانی‌که ماده‌ی تشکیل‌دهنده‌ی فیلتر موردنیاز، ترکیبی از استر سلولزی باشد، انتخاب ماده غشاء به اندازه میزان دلخواه و نوع سوخت بستگی خواهد داشت.

۶-۵ واحد فیلتراسیون باید یکی از موارد زیر باشد:

۶-۵-۱ واحدهایی با فیلترهای موجود از قبل استریل شده

۶-۵-۲ سرنگ زیرجلدی استریل ۱۰۰ml ، با فیلتر از قبل استریل شده

۶-۵-۳ هولدر باکتریولوژی، ساده یا چندگانه، شیشه‌ای و یا استیل ضد ضربه یا پروپیلن از قبل استریل شده

۶-۶ انبرک‌ها (پنس‌ها)یی با نوک بلند

۶-۷ فلاکس فیلتر با ظرفیت مناسب

۶-۸ پلیت از جنس شیشه یا پلاستیک‌یکبار مصرف سترون با قطر اسمی بزرگتر یا مساوی ۵۰mm

۶-۹ گرمخانه با ظرفیت دمایی ۲۵°C ± ۲°C

۶-۱۰ حمام آب با ظرفیت دمایی ۴۷°C ±۲°Cو بطری‌های با حجم ۵۰۰ ml که در آن قرار می‌گیرند.

۶-۱۱ بطری‌های شیشه‌ای با درپوش پیچشی محکم با ظرفیت اسمی ۵۰۰ml

۶-۱۲ تیوب‌های کشت شیشه‌ای ۱۲۵mm × ۱۶mm با درپوش پیچشی
۶-۱۳ اتوکلاو با ظرفیت نگهداری بطری‌های شیشه‌ای ۵۰۰ml و بیشتر

۷ شناساگرها و مواد

۷-۱ درجه خلوص شناساگرها، از لحاظ شیمیایی باید در تمام آزمون‌ها مشخص باشد.
۷-۲ آب خالص (به استاندارد ۹۸۹۹ مراجعه کنید).
۷-۳ کلروتتراسایکلین. ۰/۱ ٪ (وزنی/ حجمی) به صورت مایع که با ۰/۱gr از کلرتتراسایکلین در آب و افزایش حجمی ۱۰۰ml آب و با عبور دادن از فیلتری به اندازه ۰/۲ µm استریلیزه می‌شود.
۷-۴ محلول دترجنت ۰/۱٪ (حجمی/ حجمی) که ۱۰ml پلی اکسی اتیلن (۲۰) سوربیتال مونوالئات را در ۹۹۰ml آب حل کرده و از طریق فیلتر غشایی با قطر منافذ ۰/۲ µm عبور داده شده و یا با اتوکلاو کردن در دمای ۱۲۱ °C به مدت ۱۵ دقیقه سترون شده باشد.
۷-۵ اسید هیدروکلریدریک ۱ مول بر لیتر.
۷-۶ اسید لاکتیک با مایع حجمی ۱۰٪ (وزنی/ حجمی) که در آن ۱۰g اسید لاکتیک با افزودن ۱۰۰ml آب حل کرده و عبور دادن از فیلتر با قطر منافذ ۰/۲µm استریلیزه می‌شود.

۷-۷ مالت اکستراکت آگار[1]
۷-۷-۱ مواد تشکیل‌دهنده/ لیتر

عصاره مالت	۳۰ g
پپتون	۵ g
آگار	۱۵ g
آب	۱ l

۷-۷-۲ آماده‌سازی
مواد فوق را دریک لیتر آب بجوشانید تا حل شوند. pH را با اسید هیدروکلریک یک میلی‌لیتر/ لیتر یا هیدروکسید سدیم ۱۰٪ (وزن/حجمی) به میزان ۰/۲ ±۵/۴ تنظیم نمایید. ۲۵۰ ml از محیط کشت را در دو بطری شیشه‌ای با گنجایش ۵۰۰ml ریخته و در دمای ۱۲۱°C به مدت ۱۵ دقیقه سترون نمایید. محیط کشت سترون شده را به منظور خنک کردن در یک حمام آب با دمای ۲̊C± ۴۷̊C قرار دهید.
پس از خنک کردن آگار در دمای ۲̊C± ۴۷̊C، ۱ml از محلول تتراسایکلین ۱۰٪ را به آن اضافه کنید. اگر به طور میانگین pH برابر ۳/۵ موردنیاز باشد، با اضافه نمودن ۱۰٪ اسید لاکتیک pH آن

1 Malt extract agar

را تنظیم نمائید. از محیط کشت مذکور داخل پتری دیش ریخته تا لایه ای به ضخامت ۴ml تشکیل شود. اجازه دهید تا محیط کشت خنک شده و آماده شود.

۷-۸ محلول رینگر

۷-۸-۱ مواد تشکیل‌دهنده/ لیتر

کلرید سدیم	۲/۲۵ g
کلرید پتاسیم	۰/۱۰۵g
کلرید کلسیم	۰/۱۲ g
بیکربنات سدیم	۰/۰۵ g
آب	۱ l

۷-۸-۲ آماده‌سازی

نمک‌های فوق را در ۱ l آب حل نمائید. ۱۰ ml از آنرا داخل لوله‌های آزمایش درپوش‌دار و در حرارت ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو نمائید.

۷-۹ هیدروکسید سدیم، ۱۰٪ (وزنی/ حجمی) آب

۷-۹-۱ ۱۰gهیدروکسید سدیم را در آب حل نمائید و به حجم ۱۰۰ ml برسانید.

۷-۱۰ تریپتون سوی آگار[1]

۷-۱۰-۱ مواد تشکیل‌دهنده/ لیتر

تریپتون	۱۵ g
پروتئین سویا	۵ g
کلرید سدیم	۵ g
آگار	۱۵ g
آب	۱ l

۷-۱۰-۲ آماده‌سازی

مواد فوق را در ۱ l آب بجوشانید تا حل شوند. سپس ۲۵۰ ml از آن را در بطری‌های شیشه‌ای درپوش‌دار توزیع نمائید. در دمای ۲ ± ۱۲۱ ̊C و به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو نمائید. آگار استریل شده را با قرار دادن در حمام آب خنک نموده و به دمای ۲̊C ± ۴۷ ̊C برسانید. pH یک نمونه را

1 Tryptone soy agar

مورد آزمون قرار دهید. اگر pH # ۰/۳ ± ۷/۳ باشد، نمونه‌ای جدید تهیه کنید. از محیط کشت مذکور داخل پتری دیش ریخته تا لایه‌ای به ضخامت ml ۴ تشکیل شود. اجازه دهید تا محیط کشت خنک شده و آماده شود.

۸ روش آزمون

۸-۱ نمونه‌گیری

۸-۱-۱ کار در شرایط آسپتیک به صورت واقعی امکان پذیر نیست ولی برای کاهش خطرپذیری نمونه‌های عفونی، باید ابزار نمونه برداری با الکل ۷۰٪ (اتانل، متانل یا ایزوپروپانل) ضدعفونی شوند تا در اثر تماس با نمونه باعث آلودگی آن‌ها نشود. بنابراین با انجام این روش‌ها، احتمال بروز عفونت‌های میکروبی، به کمترین میزان ممکن خواهد رسید.

۸-۱-۲ عوامل مؤثر در عفونت میکروبی فعال هستند. ممکن است میکروب‌های موجود در نمونه‌ها طی مراحل جمع‌آوری نمونه و آزمایش تکثیریابند. بنابراین نمونه‌ها باید حداکثر تا ۲۴ ساعت پس از جمع آوری، مورد آزمون قرار گیرند.

۸-۱-۳ اگر نمونه بیش از ۴ ساعت پس از جمع‌آوری مورد آزمون قرار می گیرد، باید در یخ و یا در یخچال در دمای $^{\circ}C$ ۵ نگهداری شوند. از یخ زدن نمونه‌ها جلوگیری نمائید. نمونه‌های سرد شده را می توان بدون گرم کردن آنها و رساندن به دمای اتاق نیز آماده سازی کرد.

۸-۲ آماده‌سازی نمونه‌ها

۸-۲-۱ نمونه‌ها را به مدت‌یک ساعت در حالت سکون قرار داده و سپس به طور چشمی آنها را بررسی کنید.

۸-۲-۲ اگر نمونه‌ها دارای آب آزاد باشند آن‌ها را به قیف جداکننده‌ی استریل انتقال دهید. اجازه دهید مایع و نمونه‌های بی‌حرکت باقی بمانند. پس از اینکه فاز سوخت خارج شد، آن‌ها را آبگیری نمایید. این عمل را در فلاکس استریل و به طور همزمان انجام دهید. بوسیله‌ی پی پت کردن قسمت آبی از پایین ظرف نمونه و جدا کردن آن انجام می شود.

یادآوری ۱: سوخت‌ها مواد سمی هستند و میکروارگانیسم‌ها ممکن است بیماریزا، حساسیت‌زا، سمی ویا ترکیبی از همه اینها باشد. آزمایشگر لزوماً باید از عملیات آزمایشگاهی اطلاع داشته و روش‌های ایمنی موردنیاز در آزمایشگاه میکروبیولوژی، در زمان آماده‌سازی، استفاده و نیز انجام عملیات استریلیزاسیون را مراعات نماید.

یادآوری ۲: آزمایش‌های بیشتری با میکروسکوپ و سایر تکنیک‌های میکروبیولوژی قابل اجراست که می‌توان در آزمون فاز آبی و ذرات همراه، ازآن‌ها استفاده کرد.

۸-۲-۳ فاز سوخت نمونه را به شدت تکان دهید تا میکروارگانیسم‌های معلق در آن به صورت کامل پخش شوند.

۸-۲-۴ آزمایش نمونه در بخش‌های مربوط به فاز سوخت را با استوانه‌ی مدرج استریل برای حجم‌های بالا و یا با پیپت استریل برای حجم‌های کم، انجام دهید.

یادآوری ۳: برای بالا بردن احتمال بازیابی، CFU ۲۰ تا ۶۰در فیلتر غشایی، حجمهای مختلفی را فیلتر کنید. (به عنوان مثال ml ۲۰۰، ml ۲۰، ml ۲ از سوخت).

۸-۳

فیلتراسیون نمونه

۸-۳-۱ برای انجام عملیات فیلتراسیون، تصفیه و شستشو، دو بخش آزمون که دارای حجم مساوی هستند را از یک فیلتر عبور دهید. برای این کار از دو فیلتر، یکی برای شمارش بررسی باکتریایی و از دیگری برای شمارش قارچی، استفاده نمایید.

۸-۳-۱-۱

فیلتراسیون

۸-۳-۱-۱-۱ تجهیزات را با استفاده از لوله‌های استریل و قراردادن فیلتر استریل با قطر منافذ µm ۰/۴۵ ، در محل مناسب آماده نمایید.

۸-۳-۱-۱-۲ نمونه‌ی مورد نظر را در فلاکس نگهدارنده‌ی استریل پخش کنید.

۸-۳-۱-۱-۳ کل حجم نمونه که از فیلتر عبور کرده است را ثبت نمایید.

۸-۳-۱-۱-۴

تصفیه‌ی مواد شوینده

غشاء بدون سوخت را توسط پمپاژ و با ml ۱۰ از محلول شوینده‌ی استریل شده شستشو دهید.

۸-۳-۱-۱-۵

شستشوی نهایی فیلتر

فیلتر را بدون محلول شوینده و سه بار متوالی با ml۱۰ از محلول رینگر شستشو دهید.

۸-۳-۱-۲

استفاده از سرنگ زیرجلدی

۸-۳-۱-۲-۱ قسمتی از نمونه دلخواه را به درون سرنگ بکشید.

۸-۳-۱-۲-۲ به آرامی روی ستون سرنگ فشار آورید تا سوخت در ظرفی که آنرا به تدریج دریافت می‌کند، پخش شود. حجم سوخت تصفیه شده را ثبت نمایید.

۸-۳-۱-۲-۳

شستن فیلتر با مواد شوینده

فیلتر داخلی را به دقت از سرنگ جدا کنید و مراقب باشید که هیچ قسمتی از سوختی که در مدخل آن باقی مانده است نریزد. ۱۰ ml از محلول شوینده را در سرنگ داشته و دوباره فیلتر داخلی را در جای خود قرار داده و غشای بدون سوخت را با پمپاژ ۱۰ ml از ماده‌ی شوینده استریل از فیلتر داخلی بشویید.

۸-۳-۱-۲-۴

شستشوی نهایی فیلتر

به طور مجدد فیلتر داخلی را به دقت خارج کرده و ۳۰ml از محلول رینگر را به درون سرنگ بکشید. فیلتر را دوباره در جای خود قرار داده و غشای بدون ماده‌ی شوینده‌ی محلول را با پمپاژ ml ۳۰ از محلول رینگر، از یک فیلتر خطی درونی عبور داده و شستشو دهید.

۸-۳-۱-۳

تصفیه به صورت خلا

۸-۳-۱-۳-۱ با استفاده از انبرک‌های استریل یک فیلتر غشایی استریل به اندازه ۰/۴۵ µm در محفظه فیلتر قرار داده و محل قرارگیری فیلتر را تنظیم نمایید.

۸-۳-۱-۳-۲ نمونه‌ی دلخواه را درگیرنده‌ی فیلتر پخش کرده و با ایجاد خلا آن را از فیلتر غشایی عبور داده و تصفیه کنید. حجم نمونه‌ی تصفیه شده را ثبت نمایید.

۸-۳-۱-۳-۳

تصفیه‌ی ماده‌ی شوینده

با ایجاد خلا فیلتر غشایی بدون سوخت را با مقدار ۱۰ ml ماده‌ی شوینده‌ی محلول استریل شستشو دهید.

۴-۳-۱-۳-۸

شستشوی نهایی فیلتر

با ایجاد خلاء و سه بار متوالی عبور دادن مقدار ml ۱۰ از محلول رینگر، آن را شستشو دهید.

۴-۸

انتقال به محیط رشد:

۱-۴-۸ فیلتر غشایی را از محل فیلتر خارج کنید. پنس‌ها و محفظه‌های شیشه‌ای را با شستشو توسط اتانول، متانول و ایزوپروپانول و یا الکل بخار شده گندزدایی نمایید. از ایجاد شعله‌ی باز در اطراف نمونه‌های سوخت، خودداری کنید.

۱-۱-۴-۸ با استفاده از انبرک‌های استریل، فیلتر را در سطح محیط کشت MEA و یا محیط کشت TSA قرار دهید.

۵-۸ گرمخانه‌گذاری

۱-۵-۸ پلیتها را در گرمخانه‌ی کنترل شده‌ای در دمای $۲۵^{\circ}C \pm ۲$ ̊C قرار دهید.

۲-۵-۸ پلیتهای TSA و MEA را پس از سه روز و MEA را به طور مجدد و پس از پنج روز گرمخانه‌گذاری، مورد ارزیابی قرار دهید.

۶-۸

تعداد کلنی‌ها

۱-۶-۸ با استفاده ازیک شمارنده‌ی کلنی، تعداد CFUها را پس از سه روز گرمخانه گذاری در TSA و پس از پنج روز گرمخانه‌گذاری در MEA ، ارزیابی نمایید.

۲-۶-۸ تعداد باکتری‌های CFU در هر لیتر را با استفاده از معادله‌ی زیر محاسبه نمایید.

$$N = \frac{CC \times ۱۰۰۰}{V}$$

که در آن:

N تعداد بر حسب CFU/l

CC تعداد کلنی‌های موجود در پتری دیش

V حجم نمونه فیلتره شده برحسب میلی لیتر

۳-۶-۸ اگر چند قسمت فیلتر شده باشد، انحراف معیاراستاندارد در هر قسمت را با محاسباتی مانند $CFU.L^{-1}$ تعیین کرده و میانگین آن را محاسبه نمایید.

۴-۶-۸ اگر هیچ کلنی در محیط کشت دیده نشد، در این صورت با داده $CC=1$ می‌توانید N را محاسبه کرده و نتایج را با CFU باکتری‌ها و یا با CFU کپک گزارش نمایید.

۹ تفسیر نتایج

۹-۱ نتایج را با تعداد باکتری بـر حسـب CFU در لیتـر ($CFU.\ L^{-1}$) یـا تعـداد کپـک در لیتـر ($CFU.\ L^{-1}$) محاسبه نمایید. اگر هیچ کلنی در محیط رشد دیده نشود با فرض CC=1 می‌توانید N را محاسبه کرده و نتایج را با N < برای L^{-1} باکتری‌ها، یـا از L^{-1} کپـک‌هـای CFU> گـزارش نمایید.

۹-۲ دمای گرمخانه‌گذاری را گزارش نمایید.

INSO
16119
1st. Edition
May.2013

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

استاندارد ملی ایران
۱۶۱۱۹
چاپ اول
اردیبهشت ۱۳۹۲

ضدعفونی کننده ها و گندزداهای شیمیایی- تعیین کارآیی قارچ کشی ماده ضدعفونی کننده بهداشتی دست-روش آزمون و الزامات

Chemical disinfections and antiseptics– Determination of effectiveness of Hygienic Handwash and Handrub–Test method and requirements

ICS:11.080.20;71.100

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استانداردایران

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

نام موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی‌ایران به موجب‌یکصد و پنجاه و دومین جلسه شورای عالی اداری مورخ ۹۰/۶/۲۹ به سازمان ملی استانداردایران تغییر و طی نامه شماره ۲۰۶/۳۵۸۳۸ مورخ ۹۰/۷/۲۴ جهت اجرا ابلاغ شده است .

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 ملی‌ایران 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 ذی صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می کنند درکمیتهٔ ملی طرح و بررسی و درصورت تصویب ، به عنوان استاندارد ملی‌ایران چاپ و منتشر می شود . بدین ترتیب ، استانداردهایی ملی تلقی می شوند که بر اساس مفاد نوشته شده در استاندارد ملی‌ایران شمارهٔ ۵ تدوین و در کمیتهٔ ملی استاندارد مربوط که سازمان ملی استانداردایران تشکیل می‌دهد به تصویب رسیده باشد.

سازمان ملی استانداردایران 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 ملی‌ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی های خاص کشور ، از آخرین پیشرفت های علمی ، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین‌المللی بهره‌گیری می‌شود .

سازمان ملی استانداردایران می تواند با رعایت موازین پیش بینی شده در قانون ، برای حمایت از مصرف کنندگان ، حفظ سلامت وایمنی فردی و عمومی ، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست محیطی و اقتصادی ، اجرای بعضی از استانداردهای ملی‌ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور 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 . همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده کنندگان از خدمات سازمان ها و مؤسسات فعال در زمینهٔ مشاوره ، آموزش ، بازرسی ، ممیزی و صدور گواهی سیستم های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی ، آزمایشگاه ها و مراکز کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش ، سازمان ملی استانداردایران‌این گونه سازمان ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت‌ایران 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 المللی‌یکاها ، کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش ، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی‌ایران از دیگر وظایف‌این سازمان است .

1- International Organization for Standardization
2 - International Electrotechnical Commission
3- International Organization of Legal Metrology (Organisation Internationale de Metrologie Legale)
4 - Contact point
5 - Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

ضدعفونی کننده ها و گندزداهای شیمیایی- تعیین کارآیی قارچ کشی ماده ضدعفونی کننده بهداشتی دست - روش آزمون و الزامات

رئیس:	**سمت و/ یا نمایندگی**
شاپوری، رضا (دکترای میکروب‌شناسی)	دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان- گروه میکروبیولوژی
دبیر:	
صنعتی منفرد، بهرام (لیسانس میکروب شناسی)	اداره کل استاندارد استان زنجان
اعضا: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)	
ایوبی، فرانک (لیسانس میکروب‌شناسی)	شرکت پارس حیات ساغلیک ارونلری
باقری رباطی، احمدرضا (لیسانس صنایع)	سازمان صنعت، معدن و تجارت استان زنجان
بهرامی، بهروز (لیسانس مهندسی کشاورزی- گرایش علوم و صنایع غذایی)	دانشگاه علوم پزشکی استان زنجان- معاونت غذا و دارو
غنوی، زهره (فوق لیسانس باغبانی)	سازمان ملی استاندارد ایران
کاظمی، صابر (فوق لیسانس صنایع غذایی)	اداره کل استاندارد استان زنجان
مختاری، فهمیدخت (فوق لیسانس ایمنی‌شناسی)	پژوهشگاه استاندارد- پژوهشکده صنایع غذایی و کشاورزی
مهرپور، رامش (لیسانس صنایع)	پژوهشگاه استاندارد- پژوهشکده صنایع غذایی و کشاورزی

فهرست مندرجات

عنوان	صفحه
آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران	ب
کمیسیون فنی تدوین استاندارد	ج
پیش گفتار	ه
مقدمه	و
۱ هدف و دامنه کاربرد	۱
۲ مراجع الزامی	۱
۳ اصطلاحات و تعاریف	۲
۴ اساس آزمون	۴
۵ اهمیت و کاربرد	۴
۶ وسایل لازم	۴
۷ محیطهای کشت و معرف ها	۷
۸ میکروارگانیسم آزمون	۸
۹ آماده سازی ماده‌ی تلقیحی مورد آزمون	۸
۱۰ افراد مورد آزمون	۸
۱۱ روش آزمون	۹
۱۲ شمارش قارچ در کنترل و نمونه‌های آزمایش	۱۱
۱۳ تکرارپذیری و ارزیابی‌های آماری	۱۱
۱۴ دقت و صحت	۱۱
۱۵ پیوست الف	۱۲

پیش گفتار

استاندارد " ضدعفونی کننده ها و گندزداهای شیمیایی- تعیین کارآیی قارچ کشی ماده ضدعفونی کننده بهداشتی دست - روش آزمون و الزامات" که توسط کمیسیون‌های مربوط تهیه و تدوین شده و درسیصد و بیست و چهارمین اجلاس کمیته ملی استاندارد میکروبیولوژی و بیولوژی مورخ ۹۲/۱/۲۷ مورد تصویب قرار گرفته است. اینک به استناد بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

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 موردتوجه قرار خواهد گرفت. بنابراین برای مراجعه به استانداردهای 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.

منبع و ماخذی که برای تهیه این استاندارد به کار رفته به شرح زیر است:

ASTM E 2613-08, Standard Test Method for Determining Fungus- Eliminating Effectiveness of Hygienic Handwash and Handrub Agents using Fingerpads of Adults

مقدمه

دستان انسان به طور مداوم در تماس با سطوح مختلف است که به آسانی آلودگی‌های میکروبی را به خود می‌گیرد. آلودگیهای قارچی‌یک نوعی ازاین آلودگیها می باشد که در مکان‌هایی که مراقبت‌های بهداشتی به عمل می‌آید و همچنین مکان‌هایی که با غذا سروکار دارند شایع هستند. روش‌های استاندارد برای ارزیابی قابلیت قارچ کشی مواد شوینده‌ی دست، بایا بدون استفاده از آب تا کنون وجود نداشته واین روش آزمون دراین رابطه تدوین شده است.

ضدعفونی کننده ها و گندزداهای شیمیایی- تعیین کارآیی قارچ کشی ماده ضدعفونی کننده بهداشتی دست - روش آزمون و الزامات

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، تعیین روش آزمون جهت ارزیابی قابلیت مواد ضدعفونی کننده بهداشتی دست با یا بدون استفاده از آب، برای از بین بردن آلودگی قارچی در دستان افراد بزرگسال و نیز به منظور بررسی قابلیت حذف آلودگی قارچی از دست‌های آلوده شده در این آزمون است.

یادآوری۱- این استاندارد در مورد مایع شستشو دهنده ی دست جراح و نیز مایع شستشودهنده‌ی پوست بیمار قبل از عمل، کاربرد ندارد.

یادآوری۲- عملکرد این روش نیازمند وجود دانش و قوانین مربوط به آزمون انسانی است.

یادآوری۳- این روش آزمون، باید توسط افراد مجرب میکروبیولوژیست و در مکان‌هایی که برای کار با عوامل عفونی طراحی و تجهیز شده اند، انجام شود.

یادآوری۴- دراین استاندارد، مقادیر ذکر شده در واحدهای SI می‌بایست به عنوان مرجع تلقی گردند.

یادآوری۵- این استاندارد در مورد پاسخگویی به همه‌ی نگرانی‌های ایمنی مربوط به استفاده از آن ادعایی ندارد. برقراری شیوه‌های ایمنی و بهداشتی مناسب از مسئولیتهای کاربر بوده و می بایست محدودیت‌های مربوط به کاربر را تأمین کند.

۲ مراجع الزامی

مدارک الزامی زیر حاوی مقرراتی است که در متن این استاندارد ملی ایران به آن ارجاع داده شده است. بدین ترتیب آن مقررات جزئی از این استاندارد ملی ایران محسوب می‌شود. در صورتی که به مدرکی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد، اصلاحیه‌ها و تجدیدنظرهای بعدی آن موردنظر این استاندارد ملی ایران نیست. در مورد مدرکی که بدون تاریخ انتشار به آن‌ها ارجاع داده شده است همواره آخرین تجدیدنظر و اصلاحیه‌های بعدی آن موردنظر است.

استفاده از مراجع زیر برای این استاندارد الزامی است:

۲-۱ استاندارد ملی‌ایران شماره۹۸۹۹، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – الزامات کلی برای آزمون‌های میکروبیولوژی - راهنما

۲-۲استاندارد ملی‌ایران شماره۸۵۱۲، میکروبیولوژی فرآورده‌های آرایشی و بهداشتی- ضدعفونی کننده‌ها و گندزداهای شیمیایی - تعیین کارآیی ماده ضدعفونی بهداشتی دست- روش آزمون و الزامات

۲-۳ استاندارد ملی‌ایران شماره ۶۹۸۶، ضدعفونی کننده ها و گندزداهای شیمیایی- آزمون سوسپانسین کمی برای ارزیابی فعالیت‌های قارچ کشی و مخمرکشی ضدعفونی کننده‌ها و گندزداهای شیمیایی مورد استفاده در موادغذایی، صنعتی، فضاهای خانگی و سازمانی- روش آزمون و الزامات

۳ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد، اصطلاحات و تعاریف زیر به کار می‌رود:

۳-۱

جزء فعال[1]

ماده‌ی اضافه شده به فرمولاسیون که به طور خاص برای مهار و یا غیرفعال کردن میکروارگانیسم‌ها استفاده می شود.

۳-۲

کنترل خشک[2]

کنترل جهت تعیین تعداد واحدهای تشکیل‌دهنده‌ی کلنی(CFU)[3] قارچ مورد آزمون، که پس از خشک کردن اولیه‌ی ماده‌ی تلقیحی بر روی پوست زنده می‌مانند.

۳-۳

ماده‌ی شوینده بدون استفاده از آب[4]

مایع، ژل و یا کف که با مالش جهت آلودگی زدایی دست‌های تا حدودی کثیف، بین شستشوهای دست اعمال می‌شود و نیازمند آبکشی نیست و حاوی الکل به تنهایی‌یا همراه با ترکیبات فعال دیگر است.

۳-۴

آب سخت[5]

آبی که با سطح مشخصی از سختی مانند کربنات کلسیم همراه است.

۳-۵

ماده‌ی شوینده‌ی بهداشتی دست[6]

عاملی که معمولاً برای شستشوی دست توسط پرسنل در بیمارستان‌ها و دیگر مکان‌های بهداشتی-درمانی مانند مراکز مراقبت‌های پزشکی، خانه‌های پرستاری و مراکزی که با غذا سروکار دارند، جهت از بین بردن میکروارگانیسم‌های سطحی از روی پوست سالم استفاده می‌شود.

---

1 Active ingredient
2 Dry control
3 Colony Formig Unit (CFU)
4 Handrub
5 Hard Water
6 Hygienic handwash agent

۶-۳

کنترل ورودی[1]

کنترلی که جهت تعیین تعداد واحد های تشکیل دهنده‌ی کلنی قارچ مورد آزمون که بـر روی هـر انگشت داده شده است، استفاده می شود.

۷-۳

خنثی‌سازی[2]

فرآیندی که منجر به از بین بردن فعالیت ضدقارچی‌یک ماده‌ی مورد آزمون می شود.این فرآینـد از طریق رقیق‌سازی ماده‌ی مورد آزمون برای کاهش فعالیت ضـد قـارچی و یـا بـا اسـتفاده از عوامـل شیمیایی به نام خنثی کننده ها برای از بین بردن فعالیت ضد قارچی انجام می شود.

۸-۳

صابون غیر دارویی[3]

صابون یا ماده‌ی فعال سطحی ملایم برای شستشوی دست که حاوی ماده‌ی ضد میکروبی شیمیایی نباشد.

۹-۳

آلودگی مشابه خاک [4]

محلولی ازیک‌یا چند ماده‌ی آلی ویا غیر آلی که به محلول سوسپانسیون ارگانیسم مورد آزمون اضافه می شود تا وجود ترشحات، مواد دفعی و سایر مواد خارجی بدن با آن شبیه سازی شود.

۱۰-۳

فرمولاسیون آزمون[5]

فرمولاسیونی که به آن مواد ضد میکروبی اضافه شده است.

۱۱-۳

ارگانیسم مورد آزمون[6]:

از ارگانیسم آزمون، جهت شبیه‌سازی یک آلودگی قارچی موضعی استفاده مـی‌شـود. همچنـین‌ایـن ارگانیسم بعنوان‌یک ارگانیسم نشانگر، جانشین‌یا شبیه ساز قارچ محسوب می‌شود.

---

1 Input control
2 Neutralization
3 Non-medicated soap
4 Soil load
5 Test formulation
6 Test organism

۱۲-۳

آزمون[1]

عامل آزمایش بدون جزء فعال است.

۴ اساس آزمون

حجم مشخصی از سوسپانسیون قارچ بر روی نوک انگشتان دست و در ناحیه‌ای مشخص قرار می‌گیرد تا خشک شود. سپس ناحیه‌ی آلوده در زمان تماس مشخص و در شرایط کنترل شده، در معرض آب سخت استاندارد (بعنوان کنترل) و ماده‌ی ضدقارچ مورد آزمون (نمونه)، قرار می‌گیرد. ارگانیسم‌های باقیمانده بر روی نوک انگشتان با محلول رقیق کننده شستشو داده شده و تعداد قارچ (بر حسب CFU) در مایع حاصل از شستشوی انگشتان کنترل و نمونه تعیین می‌گردد. کاهش تعداد قارچ‌ها، بعد از تیمار در انگشتان کنترل و آزمون، محاسبه شده و بایکدیگر مقایسه می‌شود. اگر دو فرمولاسیون مختلف در یک آزمون مورد آزمایش قرار می‌گیرد، از یکی از آن‌ها به عنوان مرجع و به جای آب سخت استفاده می‌شود (به استانداردهای ملی‌ایران شماره ۸۵۱۲ و ۶۹۸۶ مراجعه کنید).

۵ وسایل لازم

وسایل معمول در آزمایشگاه میکروبیولوژی مطابق با استاندارد ملی‌ایران شماره۹۸۹۹، به ویژه وسایل زیر:

۱-۵

شمارنده‌ی کلنی[2]

هر یک از انواع آن می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

۲-۵

سینک دست‌شویی[3]

یک سینک با اندازه‌ی مناسب که افراد مورد آزمون بتوانند دست‌هایشان را در آن بشویند بدون اینکه دستشان به سطح سینک بخورد.

1 Test vehicle
2 Colony counter
3 Hand washing

۳-۵

گرمخانه[1]

دستگاهی که بتواند دمای مناسب برای رشد *کاندیدا آلبیکانس*[2] و *آسپرژیلوس نایجر*[3] را در ۲۵°C فراهم کند.

۴-۵

کابینت هوای لایه‌ای (لامینار فلو)[4]

۵-۵

همزن مغناطیسی و آهنربایی[5]

به اندازه‌ای باشد که بتواند یک ارلن مایر برای تهیه‌ی محیط‌های کشت میکروبی و یا محلول‌های دیگر را مخلوط نماید.

۶-۵

سیستم فیلتراسیون غشایی[6]

سیستم صافی غشایی با غشاهایی با قطر منافذ ۰/۴۵ µm و یا ۰/۲۲ µm ، جهت استریلیزه کردن شناساگرها و یا محلول‌های حساس به دما.

۷-۵

پی پت[7]

با ظرفیت اسمی ۱۰ml ، ۱ml و ۰/۱ml یا پی پتهای مدرج خودکار

۸-۵

پلیت[8]

سترون از جنس شیشه‌یا پلاستیک‌یکبار مصرف با قطر ۱۰۰mm برای کشت میکروبی قارچ.

۹-۵

لوله‌های آزمایشگاهی

به حجم ۲ml با قطر درونی حدود ۸ mm برای شستشوی نوک انگشتان.

---

1 Incubator
2 Candida albicans (ATCC 10231)
3 Aspergilus niger (ATCC 64958)
4 Laminar flow cabinet
5 Magnetic stirrer and magnets
6 Membrane filteration system
7 Positive displacement pipette
8 Culture plates

۱۰-۵

یخچال[1]

با ظرفیت دمایی ۴°C ± ۲°C برای ذخیره‌ی کشت میکروبی و شناساگرها.

۱۱-۵

استریل کننده[2]

دستگاه مناسبینظیر اتوکلاو و آون که بتواند شرایط استریلیزاسیون را ایجاد کند.

۱۲-۵

زمان سنج [3]

دستگاهی که بتوان دقیقه و ثانیه را از روی آن خواند.

۱۳-۵

ترمومتر[4]

به منظور پایش و تنظیم دمای آب در ۴۰°C ± ۲°C.

۱۴-۵

شیرهای آب[5]

که بالای سینک قرار داشته باشند و بتوان دست‌ها را بالاتر از آرنج در طول شستشو نگه داشت. شیرهایی که دارای حسگرهای الکتریکی هستند و یا آن‌هایی که با مچ، آرنج، زانو و یا پا کار می‌کنند، برای جلوگیری از دوباره آلوده شدن دست‌های شسته شده، توصیه می‌شود.

۶ محیط‌های کشت و معرف‌ها

۶-۱ آلودگی مشابه خاک

یک آلودگی مشابه خاک است که سه جزئی بوده و از سه محلول ذخیره به عنوان جایگزینی برای سرم تهیه شده است.

۶-۱-۱ ۰/۵ g تریپتون را به ۱۰ ml بافر فسفات اضافه کنید.

۶-۱-۲ ۰/۵ g آلبومین سرم گاوی را به ۱۰ ml بافر فسفات اضافه کنید.

۶-۱-۳ ۰/۰۴ g از موسین گاوی را به ۱۰ ml بافر فسفات اضافه کنید.

---

1 Refrigerator
2 Sterilizer
3 Timer
4 Tap Water temperature regulator and monitor
5 Water faucet (s)

۶-۱-۴ محلول‌های ذخیره را جداگانه آماده کنید. آن را با استفاده از فیلتری با قطر منافذ µm ۰/۲۲ استریل کرده و در حجم‌های کوچک در دمای $4 \pm 2^{\circ}C$ یا $-20 \pm 2^{\circ}C$ ذخیره کنید.

۶-۱-۵ برای به دست آوردن ۵۰۰µl محلول تلقیحی، µl ۳۴۰ از سوسپانسیون قارچی را به ۳۵µl تریپتون (طبق بند ۷-۱-۲)، µl ۲۵ آلبومین سرم گاوی (طبق بند ۷-۱-۳) و µl ۱۰۰ ماده‌ی بزاقی (طبق بند ۷-۱-۴)محلول ذخیره، اضافه کنید. این ترکیب حدوداً g/l ۲ از پروتئین کلی را تشکیل می‌دهد که با محتوای پروتئین ٪۵ از محلول سرم گاوی جنینی برابر است.

۶-۲ آب سخت استاندارد

کیفیت و باقیمانده‌ی ماده‌ی ضدعفونی‌کننده (مانند کلر) در آب لوله‌کشی در محل‌های مختلف و همچنین در یک محل در زمان‌های مختلف متفاوت است. به کارگیری آب سخت استاندارد، برای جلوگیری از اختلافات در نتایج حاصل از تفاوت کیفیت آب لوله‌کشی، توصیه می‌شود.

یادآوری ۱- چنانچه از کربنات کلسیم به عنوان کنترل برای رقیق کردن محصولات مورد آزمون در قارچ زدایی سطوح و آبکشی سرانگشتان استفاده می‌شود، سختی آب تهیه شده باید ppm ۲۰۰ باشد.

یادآوری ۲- سختی آب استاندارد و آب لوله‌کشی باید مورد سنجش قرار گیرد تا عدم فعالیت قارچ‌های مورد آزمون، اطمینان حاصل می‌شود.

یادآوری ۳- اگر آبی با درجه‌ی سختی بالاتر برای رقیق‌کردن استفاده شود، این تغییر باید در گزارش ثبت شود.

۶-۳ سالین نرمال (٪۰/۰۸۵ NaCl) با pH ۷/۲ -۷/۴ و یا تریپتون سدیم کلراید به عنوان رقیق کننده برای شمارش قارچ و نیز به عنوان شوینده برای بازیابی قارچ از سر انگشتان.

۶-۴ ترپتیک سوی براث[1] یا محیط کشت مناسب دیگر برای آماده‌سازی مایع تلقیحی *کاندیدا آلبیکانس*(به استاندارد ملی‌ایران شماره ۹۸۹۹ مراجعه کنید).

۶-۵ سابورو دکستروز آگار[2] برای آماده‌سازی مایع تلقیحی *آسپرژیلوس نایجر* و برای ارزیابی و محاسبه‌ی کلنی‌های ارگانیسم‌های مورد آزمون و کنترل، قبل از افزودن هر خنثی کننده‌ی دیگر (به استاندارد ملی‌ایران شماره ۹۸۹۹ مراجعه کنید).

۶-۶ اتانل ٪۷۰ ، جهت تهیه اتانل از آب مقطر استفاده شود.

۷ میکروارگانیسم آزمون

انتخاب میکروارگانیسم های مورد آزمون، بر اساس موارد زیر صورت می گیرد:

۷-۱ سلامت نسبی برای آزمایشگران و افراد مورد آزمون

۷-۲ توانایی در افزایش تیترهای مورد آزمون

۷-۳ تسهیل در بازیابی و شناسایی در آزمایشگاه

1 Tryptic soy broth
2 Sabouro'd dextrose agar

۷-۴ امکان توزیع‌یکنواخت از طریق دست‌های آلوده

۷-۵ دراین آزمون از قارچ‌های زیر استفاده می شود:

۷-۵-۱ *کاندیدا آلبیکانس*(ATCC 10231) :این قارچ شاخص قارچ‌های بدون ریسه بوده و از رایج‌ترین گونه‌های کاندیدا به عنوان نمونه‌ی بالینی در نظر گرفته می شود.

۷-۵-۲ *آسپرژیلوس نایجر*(ATCC 64958) :این قارچ شاخص قارچ‌های ریسه‌ای بوده که به عنوان آلودگی آزمایشگاهی بی‌خطر برای پوست، در آزمون بزرگسالان در نظر گرفته می‌شود.

۸ آماده‌سازی ماده‌ی تلقیحی مورد آزمون

۸-۱ جهت آماده‌سازی ماده‌ی تلقیحی *کاندیدا آلبیکانس*، ml ۰/۱ از کشت میکروبی فریز شده را به ml ۱۰ تریپتیک سوی براث اضافه نموده و به مدت ۴ ± ۴۸ ساعت در دمای مناسب گرمخانه گذاری نمائید.

۸-۲ برای آماده‌سازی ماده‌ی تلقیحی *آسپرژیلوس نایجر*، ml۰/۱ از محلول سوسپانسیون ذخیره را بر روی محیط کشت سابورو دکستروز آگار به صورت سطحی کشت داده و به مدت ۱۰ روز در دمای $۲۸^{\circ}C$ گرمخانه گذاری نمائید. میسلیوم‌های مات را از سطح آگار جدا کرده و با استفاده از پرل‌های شیشه‌ای استریل، محلول نرمال سالین و گاز استریل آنها را هموژنیزه کنید. این محلول برای تلقیح آماده است.

۸-۳ حداقل میزان قارچ برای تلقیح بر نوک انگشتان باید $۱۰^{۴}$ CFU باشد تا پس از شستشو و خشک شدن، بتوان در شرایط آزمون کاهش $\log_{۱۰}$ ۴ را بررسی کرد.

۸-۴ در صورت لزوم، آلودگی مشابه خاک را به محلول سوسپانسیول سلول قارچی مورد آزمون بیفزایید.

۸-۵ سوسپانسیون قارچی را پیش از استفاده برای تلقیح تکان دهید.

۹ افراد مورد آزمون

۹-۱ افراد بزرگسال سالم و بدون بیماری‌های پوستی، زخم باز، عفونت ناخن یا سایر ناراحتی‌های پوستی را انتخاب کنید.این افراد باید رضایت خود را جهت انجام آزمون اعلام کرده و از هر گونه استعمال محصولات حاوی عوامل ضد میکروبی برای مدت‌یک هفته منع شده باشند.

۹-۲ مسئولیت اطلاع‌رسانی‌های لازم برای افراد در این آزمون وگردآوری اطلاعات و رضایت کتبی از افراد، با فرد به کار گیرنده‌ی این آزمون می‌باشد.

۹-۳ به افراد باید اطلاع داده شود که از استفاده با محصولات میکروب کش، جز موارد مربوط به آزمون، در طول مدت آزمایش و یک هفته قبل از آزمون اول، اجتناب نمایند. این محدودیت شامل ضد عرق‌ها، دئودورانت‌ها، شامپوها، لوسیون ها و صابون‌های حاوی آنتی باکتریال، همچنین اسیدها، بازها و حلال‌ها است. ضمن‌اینکه از حمام کردن در استخرهای درمانی و آب چشمه‌ها نیز باید

اجتناب کنند. به افراد یک بسته‌ی محصولات بهداشت فردی فاقد مواد ضد میکروبی برای استعمال خارجی در طول تحقیق بدهید. در هنگام تماس با مواد آنتی باکتریال‌یا مواد شیمیایی سخت، استفاده از دستکش پلاستیکی نمی تواند جلوگیری کننده باشد.

۱۰ روش آزمون

۱۰-۱ آلوده کردن سرانگشتان افراد داوطلب

یادآوری۱- از آنجایی که نوک هر دو شست و هر هشت انگشت می توانند در آزمون مورد استفاده قرار گیرند، می توان دو انگشت را برای بررسی تعداد ارگانیسم تلقیح شده، دو انگشت را برای بررسی تعداد قارچ زنده مانده پس از خشک شدن دستها، دو انگشت را برای بررسی تعداد سلول قارچی حذف شده پس از اثر دادن محلول مرجع‌یا کنترل و حداکثر چهار انگشت را برای بررسی تعداد سلول قارچی حذف شده پس از شستشو با فرمولاسیون مورد آزمون، استفاده کرد. حداکثر ۱۰۰µl از سوسپانسیون قارچ برای هر آزمون مورد نیاز است.

یادآوری۲- میکروارگانیسم‌های عفونی باقیمانده بر روی دست‌ها پس از شستشو ممکن است با خشک کردن آن‌ها با دستمال کاغذی یا باد گرم کاهش یابد. مرحله‌ی خشک کردن نوک انگشتان بعد از قرار گرفتن در معرض محلول مورد آزمون یا کنترل لحاظ نمی‌شود، بنابراین به منظور جلوگیری از حذف قارچ ها، مرحله‌ی خشک کردن دراین آزمون گنجانده نشده است.

یادآوری۳- فردی که این آزمایش را انجام می‌دهد باید به دقت دست افراد را پیش از آلودگی آزمون بررسی کند که از عدم وجود هر آسیب قابل مشاهده در پوست مطمئن شود. استفاده از ذره‌بین در نور مناسب برای بررسی دقیق‌تر شرایط پوستشان توصیه می‌شود. افرادی که زخم آشکار در دست‌هایشان دارند نباید در این بررسی مورد آزمون قرار گیرند تا زمانی که پوستشان به طور کامل بهبود یابد.

۱۰-۱-۱ افراد، باید دست‌هایشان را با صابون غیر طبی به مدت ده ثانیه شستشو دهند، آب‌کشی کنند و با حوله یا دستمال به طورکامل خشک نمایند. این کار، تغییرپذیری نتایج را با از بین بردن چربی و آلودگی دست، کاهش می‌دهد. ml ۵-۳ اتانول ۷۰٪ در کف دست افراد قرار دهید و از آن‌ها بخواهید که آنرا به هر دو دست خود بمالند تا زمانیکه الکل و آب به طورکامل متصاعد شود.

۱۰-۱-۲ لوله‌ی آزمایش خالی را بین دو انگشت شست ویکی از انگشتان قرار داده و فشار دهید تا ناحیه‌ای که ماده تلقیح را دریافت خواهد کرد، مشخص شود.

۱۰-۱-۳ با استفاده از پی پتور، µl ۱۰ از سوسپانسیون قارچی را در مرکز ناحیه‌ی مشخص شده توسط لوله که بر روی انگشتان‌ایجاد شده است، قرار دهید.

۱۰-۱-۴ توصیه می‌شود که از نوک انگشتان شست برای مشخص کردن میزان ارگانیسم زنده قرار گرفته در ناحیه تعیین شده ، استفاده شود (کنترل ورودی). بلافاصله پس از شستشوی نوک انگشت شست آلوده، مطابق بند ۱۰-۱-۹ آن را محلول رقیق کننده شستشو دهید، تا مایع تلقیح شده خشک نشود.

۱۰-۱-۵ اجازه دهید مایع تلقیحی روی سر تمامی انگشتان به مدت حدود ۳۰- ۲۰ دقیقه تحت شرایط محیطی مناسب خشک شود.

۱۰-۱-۶ برای تعیین تعداد ارگانیسم‌هایی که پس از زمان خشک شدن زنده مانده اند، از روی دو سر انگشت (از هر دست‌یکی) که به شکل تصادفی انتخاب کرده اید، مایع تلقیحی را مطابق بند ۱۰-۱-۹ شستشو دهید.

۱۰-۱-۷ تعداد موردنیاز انگشتان انتخاب شده به طور تصادفی را که تلقیح خشک شده دارند، برای فرمولاسیون آزمون،کنترل‌یا محلول مرجع در معرض ۱ml رقیق کننده که در لوله های آزمایش ریخته شده، قرار دهید. انگشتان را روی لوله قرار داده و با حرکت دورانی بچرخانید. اجازه دهید محتویات آن با ناحیه‌ی آلوده بین ۳۰-۱۰ ثانیه و با ۱۰ بار واژگون کردن کامل آن، در تماس باشد. برای فرمولاسیون غلیظ، لوله آزمایش را سروته کنید و محتویات آن را برای زمان مطلوب در تماس با محل آلوده، بدون‌اینکه آنرا واژگون کنید، نگه دارید. نوک انگشت را با لبه‌ی داخلی لوله‌ی آزمایش خراش داده تا حداکثر میزان ممکن را به دست آورید.

۱۰-۱-۸ برای شبیه سازی محلول آبکشی شده پس از تیمار دستان، دو سر انگشت را در تماس با ml ۱ آب سخت برای مدت ۱۰- ۵ ثانیه نگه دارید تا ارگانیسم‌ها از سر انگشتان شما جدا شوند.

۱۰-۱-۹ برای جداکردن قارچ‌ها، سرانگشتان آلوده(شست و بقیه انگشتان) را روی دهانه‌ی لوله‌ی پلاستیکی حاوی ml ۱ شوینده قرار دهید. لوله‌ی آزمایش را برگردانده و اجازه دهید که محتویات آن ۱۰- ۵ ثانیه با محل آلوده در تماس باشد. ۲۰ بار دیگر لوله‌ی آزمایش را برگردانید. مرحله‌ی خیس کردن و واژگون کردن را یک بار دیگر انجام دهید. در آخر، لوله‌ی آزمایش را به شکل راست قرار دهید و سر انگشت خود را به لبه‌ی آن بکشید تا حداکثر میزان ممکن از آن بازیابی شود.

۱۰-۱-۱۰ سرانگشتان را با گذاشتن آن‌ها به مدت ۳-۲ دقیقه روی دستمال یا حوله‌ی خیسانده شده در اتانول ۷۰٪ آلودگی زدایی کنید.

۱۰-۱-۱۱ به داوطلبان دستور آلودگی زدایی را قبل از ترک کردن محل آزمون مطابق بند ۱۱-۱-۱۰ دهید که سپس به طورکامل با آب و صابون دستان خود را شسته و خشک نمایند.

۱۰-۱-۱۲ محلولها و کنترل های به دست آمده از سلولهای قارچی زنده را رقیق سازی کرده و در عرض ۳ تا ۴ ساعت جمع آوری نموده و کار را به اتمام برسانیددر غیراین صورت می توانید آن را به مدت‌یک روز در دمای C ۱۰-۴ نگهداری کرد.

۱۱ شمارش قارچ در کنترل و نمونه‌های آزمون

۱۱-۱ کنترل و نمونه‌های آزمون ممکن است با روش فیلتراسیون غشایی یا کشت مارپیچی در سطح پلیت جهت شمارش CFU صورت پذیرد. روش فیلتراسیون غشاء، این مزیت را دارد که اجازه دهد حجم بیشترنمونه در آزمونها دخیل باشند به ویژه وقتی تعداد موارد زنده در شمارش، پایین باشد. همچنین ما را قادر می‌سازد که فیلترها را آبکشی کرده و باقی‌مانده‌ی ماده‌ی میکروب‌کش را کاهش دهیم که ممکن است در ارزیابی قارچها مؤثر باشد.

۱۱-۲ موارد تلقیح شده در محیط کشت را برای ۴ ±۴۸ ساعت در دمای مناسب، گرمخانه گـذاری کنید.

۱۱-۳ کلنی ها را بشمارید. داده‌ها را به $\log_{10}$ تبدیل کنید.

۱۲ تکرار پذیری و ارزیابی های آماری

۱۲-۱ برای سنجش هر فرمولاسیون آزمون شده، این روش را برای حداقل دوبار و هر بـار روی سـه نفر تکرار کنید.

۱۲-۲ برای تعیین واحدهای زنده از قارچ‌ها، از دو انگشت شست برای تعیین واحد زنده‌ی قارچهای قرار گرفته بر روی انگشت (کنترل ورودی دست)، از دو سر انگشت برای بررسی تعداد ارگانیسم‌های باقی مانده‌ی زنده پس از خشک کردن مایع تلقیح (کنترل خشک)، از دو سر انگشـت بـرای تعیـین میزان حذف قارچ‌ها پس از درمان با آب سخت استاندارد و از چهار سرانگشت بـرای بررسـی میـزان حذف قارچ‌ها پس از اثر ترکیبی در معرض قرارگیری با نمونه‌ی مـورد آزمـون و شستشـوی بعـد از تیمار با آب سخت استفاده نمایید. برای مواد شوینده بدون آب، آبکشی با آب سخت لازم نیست.

۱۲-۳ تفاوت تعداد ارگانیسم‌های زنده در کنترل ورودی و کنترل خشـک، نشـان‌دهنـده‌ی از بـین رفتن قارچ‌های زنده در طی خشک کردن مایع تلقیح است. از تعداد ارگانیسم‌های زنده‌ی باقی‌مانده پس از خشک شدن مایع تلقیح، باید به عنوان پایه‌ای برای تعیین میزان حذف قارچ‌ها پس از تیمـار با محلول کنترل یا نمونه آزمون، استفاده نمایید.

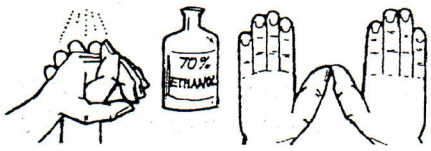
۱۳ دقت و صحت

این روش آزمون برای تعیین فعالیت ضدعفونی‌کننده‌ها در برابر *کاندیدا آلبیکـانس* کـاربرد داشـته و کارآیی حذف *کاندیدا آلبیکانس* از سر انگشتان دسـت توسـط مـاده شـوینده دسـت بیشـتر از ۸۰٪ است. این روش آزمون همچنین برای کار با *آسـپرژیلوس نـایجر* بـا کـارآیی بازیـابی کنیـدیا از سـر انگشتان دست، بدون تیمار در حدود ۹۲٪ کاربرد دارد.

پیوست الف
(الزامی)
مراحل انجام آزمون

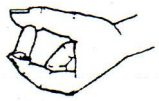
مرحله ۱:

دستان خود را با صابون معمولی بدون آنتی باکتریال و آب شیر بشویید. با حوله کاغذی آنرا خشک کنید. سپس حدود ۳ تا ۵ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ ٪ بر روی دستتان قرار دهید.دستتان را به هم بمالید تا خشک شود.



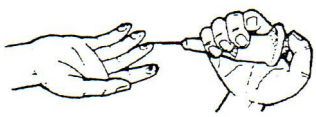
مرحله ۲:

هر انگشت را بر روی شیشه‌ی خالی کوچک (با قطر داخلی ۸mm)، فشار دهید تا سطح هدف را نشانه‌گذاری کند.



مرحله ۳:

۱۰µl از سوسپانسیون قارچ مورد آزمون با و یا بدون آلودگی مشابه خاک در مرکز هر ناحیه‌ی نشانه‌گذاری شده، قرار دهید. ماده‌ی تلقیحی را از انگشتان شست‌ها به عنوان کنترل ورودی به سرعت بشویید.



مرحله ۴:

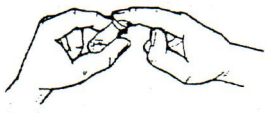
ماده را بر روی نوک انگشتان تلقیح نمایید و اجازه دهید تا خشک شود (۲۰ تا ۳۰ دقیقه). نوک دو انگشت را بصورت تصادفی و به طور سریع در پایان خشک کردن بشویید (کنترل پایه).

مرحله ۵:

ماده‌ی تلقیحی خشک شده بر روی حداقل نوک دو انگشت رادر معرض ml ۱ از محلول مورد آزمون و یا مایع کنترل در یک ویال پلاستیکی کوچک برای مدت زمان تماس دلخواه و با تعداد مشخص برگرداندن انجام دهید.

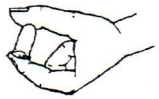
مرحله ۶:

پوست را به آرامی به داخل لبه‌ی شیشه بفشارید تا مقدار مایع بیشتری را جمع‌آوری کند. برای شوینده‌های بدون نیاز به آب و یا برای تعیین قارچ‌زدایی، بعد از در معرض قرار گرفتن محصول به تنهایی، می توانید نوک انگشتان را بدون نیاز به هیچ نوع تیماری شستشو دهید.



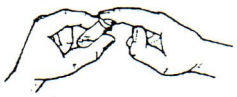
مرحله ۷:

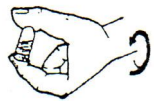
برای شستشوی بعد از تیمار دستان جهت مواد شستشو دهنده ی دست، نوک انگشتان را در معرض ۱ ml آب سخت به مدت ۵ تا ۱۰ ثانیه قرار دهید. دوباره، پوست را به داخل ظرف بفشارید تا مایع بیشتری را جمع‌آوری کند (قارچ مورد آزمون نیز می‌تواند شسته شود).



مرحله ۸:

برای شستشوی قارچ، انگشت را بر روی دهانه‌ی یک ظرف پلاستیکی کوچک با ۱ml از مورد شستشو دهنده قرار دهید و ۲۰ بار به طور کامل برگردانید. پوست را به داخل فشار دهید تا هر آنچه می‌تواند مایع جمع کند. (ماده‌ی شستشودهنده و کنترل‌ها از نظر قارچ زیست پذیر را با $\log_{10}$ محاسبه نمایید).





مرحله ۹:

دستان خود را با فشردن نواحی آلوده به ماده‌ی تلقیحی برای ۲ تا ۳ دقیقه در مقابل یک دستمال کاغذی خیس شده با اتانول ۷۰ درصد تمیز نمایید. سپس دستان خود را به صورت کامل با صابون و آب شستشو دهید و آن‌ها را قبل از رفتن خشک نمایید.