



中华人民共和国国家标准

GB/T 38502—2020

消毒剂实验室杀菌效果检验方法

Test method for bactericidal effect of disinfectant in laboratory

2020-03-06 发布

2020-10-01 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

目 次

前言 III

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 基本要求 1

 4.1 实验室及人员要求 1

 4.2 消毒试验要求 2

5 消毒与灭菌效果试验方法 3

 5.1 细菌悬液与菌片的制备 3

 5.2 活菌培养计数技术 5

 5.3 残留消毒剂(化学因子)的去除方法 6

 5.4 中和剂鉴定试验 7

 5.5 过滤冲洗法去除残留消毒剂试验 9

 5.6 细菌杀灭试验 10

 5.7 分枝杆菌杀灭试验 12

 5.8 真菌杀灭试验 14

 5.9 消毒剂杀菌作用影响因素试验 15

附录 A (规范性附录) 实验室及人员要求 17

附录 B (规范性附录) 试剂 18

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国国家卫生健康委员会提出并归口。

本标准起草单位：中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所、解放军疾病预防控制中心、江苏省疾病预防控制中心、湖南省疾病预防控制中心、山东省疾病预防控制中心、黑龙江省疾病预防控制中心、福建省疾病预防控制中心。

本标准主要起草人：张流波、李新武、姚楚水、张文福、吴晓松、陈贵秋、杨彬、林玲、林立旺、李涛、赵斌秀、沈瑾、段弘扬。

消毒剂实验室杀菌效果检验方法

1 范围

本标准规定了消毒剂实验室杀菌效果检验的术语和定义、基本要求以及消毒与灭菌效果试验方法。本标准适用于各种消毒剂实验室杀菌效果的检验和评价。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

消毒剂 disinfectant

用于杀灭传播媒介上的微生物使其达到消毒或灭菌要求的制剂。

3.2

中和剂 neutralizer

在微生物杀灭试验中,用以消除试验微生物与消毒剂的混悬液中和微生物表面上残留的消毒剂,使其失去对微生物抑制和杀灭作用的试剂。

3.3

中和产物 product of neutralization

中和剂与消毒剂作用后的产物。

3.4

菌落形成单位 colony forming unit; CFU

在活菌培养计数时,由单个菌体或聚集成团的多个菌体在固体培养基上生长繁殖所形成的集落,以其表达活菌的数量。

3.5

杀灭对数值 killing log value

消毒前后微生物减少的对数值。

3.6

载体 carrier

试验微生物的支持物。

4 基本要求

4.1 实验室及人员要求

实验室及人员要求见附录 A。

4.2 消毒试验要求

4.2.1 检测要求

检测要求包括以下几点：

- a) 实验室试验以悬液定量试验为主,试验应重复 3 次。对不适宜用悬液定量试验评价的消毒剂,如黏稠的消毒剂、冲洗用消毒剂和原液使用的消毒剂等的实验室试验可用载体定量试验,试验应重复 3 次。无特殊要求的情况下,载体定量试验以布片为载体,用途单一、明确的可以选用对应的玻璃片、不锈钢片、滤纸片等。
- b) 评价消毒剂的实验室试验,消毒剂试验浓度应用产品说明书规定的该消毒剂对某一有代表性消毒对象的最低使用浓度。试验设 3 个不同作用时间,原则上第一时间为说明书规定的最短作用时间的 0.5 倍,第二时间为最短作用时间,第三时间为最短作用时间的 1.5 倍。
- c) 对多用途的消毒剂,消毒对象所涉及的微生物相同时,若使用浓度相同,选择各种用途中最短的作用时间。若作用时间相同,选择各种用途中最低的使用浓度。使用浓度低、作用时间短者与使用浓度高、作用时间长者同时存在时,以前者为准。使用浓度高、作用时间短者与使用浓度低、作用时间长者同时存在时,每个剂量均应进行试验。
- d) 灭菌试验应用载体定性试验,普通医疗器械的灭菌以不锈钢片为载体,特殊用途的可以选用玻璃片、聚四氟乙烯片等。灭菌试验按产品说明书规定的最低使用浓度(强度)和 0.5 倍的最短作用时间进行试验。载体定性试验应重复 5 次,样本总量应不少于 30 个,每次试验均应设立规定数量的阴性对照和阳性对照。
- e) 进行实验室试验时,对用于不经过清洗或较脏的消毒对象的消毒剂,有机干扰物牛血清白蛋白的浓度为 3.0%;对用于经过清洗或较清洁的消毒对象的消毒剂,有机干扰物牛血清白蛋白的浓度为 0.3%;对用于经过严格清洗或极清洁的消毒对象的消毒剂,可不使用有机干扰物。

4.2.2 重复试验的要求

重复性试验不是只在同次试验中增加菌片数,或多作几份样本,而是应分期分批进行。必要的器材和试剂应重新制备或灭菌,以防产生系统性误差。

4.2.3 结果评价

符合下列所有相应条件的消毒产品判为消毒效果试验结果合格：

- a) 去除残留消毒剂效果的鉴定试验合格。
- b) 消毒产品的实验室试验结果符合下列指标要求：
 - 1) 悬液定量杀菌试验时,每次试验对细菌繁殖体和细菌芽胞如金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌和枯草杆菌黑色变种芽胞的杀灭对数值大于或等于 5.00,对龟分枝杆菌脓肿亚种、白色念珠菌和黑曲霉菌的杀灭对数值大于或等于 4.00。对照组微生物数在规定的范围内。
 - 2) 载体浸泡定量杀菌试验时,每次试验对各类微生物的杀灭对数值或灭活对数值大于或等于 3.00,对照组微生物数在规定的范围内。载体浸泡定性灭菌试验时,各次试验所有载体均无试验菌生长,对照组微生物数在规定的范围内。

5 消毒与灭菌效果试验方法

5.1 细菌悬液与菌片的制备

5.1.1 实验器材

5.1.1.1 实验菌种

金黄色葡萄球菌 ATCC 6538、铜绿假单胞菌 ATCC 15442、大肠杆菌 8099、枯草杆菌黑色变种芽胞 ATCC 9372、白色葡萄球菌 8032。在上述规定的菌株基础上,根据消毒剂特定用途或试验特殊需要,还可增选其他菌株。

5.1.1.2 实验试剂

有机干扰物、磷酸盐缓冲液、无菌蒸馏水或其他纯化水、稀释液、细菌培养基、营养琼脂培养基、营养肉汤培养基、革兰染色液、芽胞染色液(见附录 B)。

5.1.1.3 实验设备与耗材

恒温水浴箱、离心机、电动混匀器、浊度计、恒温培养箱、玻璃漏斗、刻度吸管(1.0 mL、5.0 mL、10.0 mL)、毛细吸管、移液器(10 μ L、20 μ L、100 μ L、200 μ L、1 000 μ L)及配套的塑料吸头。

5.1.2 细菌悬液制备程序

5.1.2.1 细菌繁殖体悬液的制备

5.1.2.1.1 以无菌操作方式开启菌种管,用毛细吸管加入适量营养肉汤培养基,吹吸数次,使菌种融化分散。取含 5.0 mL~10.0 mL 营养肉汤培养基试管,滴入少许菌种悬液,置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h。用接种环取第 1 代培养的菌悬液,划线接种于营养琼脂培养基平板上,置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h。或从菌种保存管中取出一粒菌珠接种于平皿上,置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h,挑取上述第 2 代培养物中典型菌落,接种于营养琼脂斜面,置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h,即为第 3 代培养物。

5.1.2.1.2 取第 3 代~第 8 代的营养琼脂培养基培养 18 h~24 h 的新鲜斜面培养物,用 5.0 mL 吸管吸取 3.0 mL~5.0 mL 稀释液(一般用 TPS,酸化水用生理盐水)加入试管内,反复吹吸,洗下菌苔。随后,用 5.0 mL 吸管将洗液移至另一无菌试管中,用电动混匀器混合 20 s,或在手掌上振打 80 次,以使细菌悬浮均匀。

5.1.2.1.3 初步制成的菌悬液,先用细菌浓度比浊测定法粗测其含菌浓度,然后以稀释液稀释至所需浓度。

5.1.2.1.4 细菌繁殖体悬液应保存在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内备用。应当天使用,不得过夜。

5.1.2.1.5 怀疑有污染时,应以菌落形态、革兰染色与生化试验等法进行鉴定。

5.1.2.2 细菌芽胞悬液的制备

5.1.2.2.1 以无菌操作方式开启菌种管,用毛细吸管加入适量营养肉汤培养基,吹吸数次,使菌种融化分散。取含 5.0 mL~10.0 mL 营养肉汤培养基试管,滴入少许菌种悬液,置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h。用接种环取第 1 代培养的菌悬液,划线接种于营养琼脂培养基平板上,置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h。挑取上述第 2 代培养物中典型菌落,接种于营养肉汤培养基,置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h,即为第 3 代培养物。

5.1.2.2.2 用 10.0 mL 吸管吸取 5.0 mL~10.0 mL 第 3 代~第 5 代的 18 h~24 h 营养肉汤培养物,接

种于罗氏瓶中营养琼脂培养基表面,将其摇动使菌液布满营养琼脂培养基的表面,再将多余肉汤培养物吸出,将罗氏瓶置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱内培养 5 d~7 d。

5.1.2.2.3 用接种环取菌苔少许涂于玻片上,以改良芽胞染色法染色。

改良芽胞染色法步骤如下:

- a) 用接种环取菌苔涂布于玻片上,待自然干燥,而后通过火焰加热将菌固定于玻片上。
- b) 将涂片放入平皿内,片上放两层滤纸,滴加足量的 5.00%孔雀绿水溶液。将平皿盖好,放 $54\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下,加热 30 min。取出,去滤纸,用自来水冲去残留液。
- c) 加 0.5%沙黄水溶液,染 1 min。水洗,待干后镜检。芽胞呈绿色,菌体呈红色。并在显微镜(油镜)下进行镜检。当芽胞形成率达 90%以上时,即可进行后续处理。否则,应继续在室温下放置一定时间,直至达到上述芽胞形成率后再进行以下处理。

5.1.2.2.4 加 10.0 mL 无菌蒸馏水于罗氏瓶中,以 L 棒轻轻推刮下菌苔,吸出,再加入 5.0 mL 无菌蒸馏水冲洗培养基表面,吸出。将两次吸出的菌悬液集中于含玻璃珠的无菌锥形烧瓶中,振摇 5 min。

5.1.2.2.5 将烧瓶置 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中 24 h,使菌自溶断链,分散成单个芽胞。

5.1.2.2.6 用无菌棉花或纱布过滤芽胞悬液,清除琼脂凝块。

5.1.2.2.7 将芽胞悬液置无菌离心管内,以 3 000 r/min 速度离心 30 min。弃上清液,加蒸馏水吹吸使芽胞重新悬浮,本步骤重复 3 遍。

5.1.2.2.8 将洗净的芽胞悬液放入含适量小玻璃珠的烧瓶内, $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min(或 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min),以杀灭残余的细菌繁殖体。待冷至室温后,摇匀分装保存于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。有效使用期半年。

5.1.2.2.9 芽胞悬液在使用时,应先进行活菌培养计数。

5.1.2.2.10 怀疑有杂菌污染时,应以菌落形态、革兰染色与生化试验等方法进行鉴定。

5.1.3 菌片(染菌载体)的制备程序

5.1.3.1 菌片用载体应根据消毒对象选择相应的材料,如手术器械选择不锈钢片,物体表面选择棉布片,非金属管腔选择聚四氟乙烯片(管),光滑表面可选择玻璃片等。常用的材料有金属、玻璃、滤纸、棉布、聚四氟乙烯等,金属载体一般用 12 mm 直径圆形金属片(厚 0.5 mm),其他材质载体一般为方形,大小 $10\text{ mm}\times 10\text{ mm}$,特定用途的消毒产品可使用其他材质、形状的载体。

5.1.3.2 所用载体(除滤纸片外)于染菌前,应进行脱脂处理。脱脂过程应严格按照如下步骤进行:

- a) 将载体放在含洗涤剂的水中煮沸 30 min;
- b) 以自来水洗净;
- c) 用蒸馏水煮沸 10 min;
- d) 用蒸馏水漂洗至 pH 呈中性;
- e) 晾干、熨平备用。

5.1.3.3 布片用 40 织纱的白平纹棉布制作。将脱脂后的布块按载体规定的大小抽去边缘一周的经纬纱各一根,按抽纱痕剪开。金属片以不锈钢制作,纸片以滤纸制作。

5.1.3.4 载体经压力蒸汽灭菌后,使用滴染法染菌。

染菌用菌悬液:菌悬液和芽胞悬液的制备按 5.1.2 进行,试验用菌悬液的含菌量约为 10^9 CFU/mL ,可使用浊度计调整菌液浓度。然后加入等量 3.0%或 0.3%的牛血清白蛋白,使菌液的浓度约为 $5\times 10^8\text{ CFU/mL}$ 。

滴染法染菌时,将经灭菌的载体片平铺于无菌平皿内,用移液器逐片滴加菌液,必要时用接种环涂匀整个载体表面。置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱或室温干燥备用。

5.1.3.5 每个菌片(载体)的回收菌量应为 $1\times 10^6\text{ CFU/片}\sim 5\times 10^6\text{ CFU/片}$ 。

5.1.4 注意事项

5.1.4.1 用浊度计测定的菌悬液浓度,只用于在滴染菌片时对菌悬液稀释度的估计。作为菌悬液含菌

浓度或菌片染菌量的正式报告(如杀菌试验中阳性对照组菌悬液或菌片所含菌量),应以活菌培养计数的实测结果为准,不宜使用根据比浊法判定的估计值。

5.1.4.2 菌液滴加不宜过快,避免流散影响染菌的准确性。

5.1.4.3 细菌繁殖体在载体上干燥的过程中,可引起部分死亡。宜提高初始菌浓度,以便达到所需的回收菌量。

5.1.4.4 配制菌悬液和制备菌片时,应严格无菌操作,以防污染杂菌,影响杀菌试验的结果。

5.1.4.5 保存菌液的容器使用橡皮塞时,应将其预先煮沸 10 min 进行脱硫处理。

5.1.4.6 菌悬液和菌片应随时放入冰箱内,尽量缩短室温放置时间,以减少细菌的自然死亡。

5.2 活菌培养计数技术

5.2.1 实验器材

5.2.1.1 实验试剂

稀释液、细菌培养基、胰蛋白胨大豆琼脂培养基(TSA)、胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB)等(见附录 B)。

5.2.1.2 实验设备与耗材

刻度吸管(1.0 mL、5.0 mL、10.0 mL)、移液器(10 μ L、20 μ L、100 μ L、200 μ L、1 mL、5 mL)及配套的塑料吸头、电动混匀器、浊度计、恒温培养箱。

5.2.2 操作程序

活菌培养计数一般使用倾注法(有特殊规定者除外)。倾注法操作程序如下:

- 菌悬液可直接进行培养计数。将菌片和小型固体样本直接投入含 5.0 mL 稀释液的无菌试管中,将棉拭采样端剪入管内。用电动混匀器混合 20 s,或在手掌上用力振打 80 次,将菌洗下形成菌悬液。
- 将试管按需要数量分组排列于试管架上,每管加入 4.5 mL 稀释液。各组由左向右,逐管标上 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、…等。
- 将菌悬液样本用电动混匀器混合 20 s,或在手掌上用力振打 80 次,随即吸取 0.5 mL 加至 10^{-1} 管内。
- 将 10^{-1} 管用电动混匀器混合 20 s,或在手掌上用力振打 80 次,混匀,再吸取出 0.5 mL 加入 10^{-2} 管内。如此类推,直至最后一管。必要时,还可作某稀释度的 1:1 或 1:4 稀释。
- 选择适宜稀释度试管(以预计生长菌落数每平板为 15 CFU~300 CFU 者为宜),吸取其中混合均匀的悬液 1.0 mL 加于无菌平皿内。每一稀释度接种 2 个平皿。一般应接种 2 个~3 个不同稀释度。
- 将 40 $^{\circ}$ C~45 $^{\circ}$ C 熔化的培养基,倾注于已加入样液的平皿中,每平皿 15 mL~20 mL。
- 将平皿盖好,即刻轻轻摇动混匀,平放。待琼脂凝固后,翻转平板使底向上,置 36 $^{\circ}$ C $\pm$ 1 $^{\circ}$ C(嗜热脂肪杆菌芽胞的培养温度为 56 $^{\circ}$ C $\pm$ 2 $^{\circ}$ C,黑曲霉菌的培养温度为 30 $^{\circ}$ C $\pm$ 1 $^{\circ}$ C)恒温培养箱内培养。
- 培养至规定时间,计数菌落数。对于现场试验样本,应每日观察并记录菌落数。
- 计数菌落时,一般以肉眼观察,必要时用放大镜检查。以每平板菌落数在 15 CFU~300 CFU 的稀释度为准记录结果。对黑曲霉菌活菌计数时,以每平板菌落数在 15 CFU~100 CFU 的稀释度为准记录结果。对菌量极少的样本,按实际菌落数计算最终结果。
- 根据稀释倍数和接种量计算每毫升菌液中或每一菌片(染菌载体)上的平均菌落数。

5.2.3 活菌计数中技术操作误差的测定

平板间、稀释度间误差率不应超过 10%。按式(1)、式(2)计算误差率:

$$P_p = \frac{\sum |N - N_i|}{\sum N_i} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

P_p ——平板间误差率, %;

N ——平板间菌落平均数;

N_i ——各平板菌落数, 单位为菌落形成单位(CFU)。

$$P_x = \frac{\sum |A - A_i|}{\sum A_i} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中:

P_x ——稀释度间菌落数误差率, %;

A ——稀释度间菌落平均数;

A_i ——各稀释度菌落数, 单位为菌落形成单位(CFU)。

5.2.4 注意事项

5.2.4.1 严格无菌操作, 防止污染。

5.2.4.2 认真检查实验器材有无破损, 以防丢失样本和污染环境。

5.2.4.3 注意菌液的均匀分散。

5.2.4.4 取液要准确, 尽量减少误差。

5.2.4.5 每吸取一个稀释度样液, 应更换一支吸管或吸头。

5.2.4.6 样液加入平皿后应尽快倾注培养基, 避免样液干燥。

5.2.4.7 倾注时培养基温度不得超过 45℃, 以防损伤细菌或真菌。

5.2.4.8 倾注和摇动应尽量平稳, 勿使培养基外溢, 确保细菌分散均匀, 便于计数菌落。

5.3 残留消毒剂(化学因子)的去除方法

5.3.1 原则要求

5.3.1.1 应有效去除残留的消毒剂或消毒剂的影响。

5.3.1.2 对试验微生物无害, 不减少其回收菌量。

5.3.1.3 不破坏培养基的营养成分, 不影响其透明度。

5.3.2 去除方法

5.3.2.1 稀释中和法(中和剂法)

在消毒剂与微生物作用到达设定时间时, 取样加于适宜种类和浓度的中和剂中, 将残留消毒剂迅速中和, 使其不再持续杀灭和抑制微生物的方法。其操作要点如下:

- a) 将经消毒剂作用过的微生物样本, 在达到规定作用时间, 即刻取样移入鉴定合格的中和剂溶液中;
- b) 所用中和剂的浓度与用量应与鉴定试验结果规定的相同;
- c) 即刻混匀, 并按规定时间吸取样液进行随后的培养检测;
- d) 应在规定时间内进行样本接种培养基以前的操作, 以免微生物与中和剂或中和产物接触过久。

5.3.2.2 过滤冲洗法

将经消毒剂作用过的微生物样本,立即加入适量稀释液中混匀(通过适量稀释,可减轻消毒剂的持续作用),并倾入装有微孔滤膜的滤器内,接真空泵抽吸过滤(或加压过滤)后,再加适量稀释液冲洗,同时过滤,可去除残留的消毒剂。多用于难以找到适宜中和剂的消毒效果试验。其操作要点如下:

- a) 微孔滤膜、滤器灭菌后备用;
- b) 初次过滤后,应使用对微生物无害的稀释液进行冲洗,以洗净消毒剂为准;
- c) 冲洗、滤净后,以无菌操作方法取出微孔滤膜,进行随后的培养检测。

5.3.3 注意事项

5.3.3.1 每次吸液,均应更换无菌吸管,以防交叉污染。

5.3.3.2 所用吸管的容量宜尽量与拟吸取的液体量相近,不要用大吸管吸取少量液体。

5.3.3.3 试验条件可影响残留消毒剂的去除效果,故每进行一种消毒效果试验,均应按规定对所选方法进行去除效果的鉴定试验。

5.4 中和剂鉴定试验

5.4.1 实验器材

5.4.1.1 实验菌悬液和菌片(见 5.1)。

5.4.1.2 实验试剂:稀释液、培养基(见附录 B)。

5.4.1.3 实验设备与耗材:刻度吸管(1.0 mL、5.0 mL)、平皿、恒温水浴箱、电动混匀器。

5.4.2 设计原则

5.4.2.1 通过所设各组试验结果综合分析,应可确定所用中和剂是否具有良好的中和作用,对试验用微生物恢复和培养无不良影响。

5.4.2.2 试验中所用消毒剂的浓度应为杀菌试验中使用的最高浓度。

5.4.2.3 同一消毒剂对多种微生物进行杀灭试验时,所用中和剂应按微生物种类分别进行鉴定试验:

- a) 对细菌繁殖体,一般在大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌中任选其一进行试验,特殊情况按试验结果再行选择;
- b) 对细菌芽胞、白色念珠菌、黑曲霉菌、分枝杆菌应分别进行鉴定试验;
- c) 当用其他特定微生物进行杀灭试验时,均应以该特定微生物进行中和剂鉴定试验。

5.4.2.4 鉴定时根据所用杀菌试验方法,相应使用悬液或载体进行试验。

5.4.3 实验分组

各组试验如下:

- a) 第 1 组:中和剂+菌悬液;
- b) 第 2 组:(消毒剂+中和剂)+菌悬液;
- c) 第 3 组:稀释液+菌悬液;
- d) 第 4 组:稀释液+中和剂+培养基。

5.4.4 中和剂悬液定量鉴定试验操作程序

根据试验分组,准备足量试管和平皿,依次进行编号。将菌悬液用等量适合浓度的有机干扰物稀释成 2.5×10^3 CFU/mL~ 1.5×10^4 CFU/mL,作为试验菌悬液。鉴定试验包括 4 组:

- a) 第1组:取0.4 mL标准硬水于试管内,加入4.5 mL中和剂,混匀,置20℃±1℃水浴中5 min后,再加入0.1 mL试验菌悬液,混匀,作用10 min,分别吸取1.0 mL接种于两个平皿中,做活菌培养计数;
- b) 第2组:取0.4 mL消毒剂于试管内,加入4.5 mL中和剂(对于酸性氧化电位水检测时,取0.5 mL消毒剂于试管内,加入4.4 mL中和剂)混匀,置20℃±1℃水浴中5 min后,再加入0.1 mL试验菌悬液,混匀,作用10 min,分别吸取1.0 mL接种于两个平皿中,做活菌培养计数;
- c) 第3组:取0.4 mL标准硬水于试管内,加入4.5 mL稀释液,混匀,置20℃±1℃水浴中5 min后,再加入0.1 mL试验菌悬液,混匀,作用10 min,分别吸取1.0 mL接种于两个平皿中,做活菌培养计数;
- d) 第4组:分别吸取稀释液、标准硬水与中和剂各0.5 mL于无菌平皿内,倒入上述试验同批次的培养基15 mL~20 mL,培养观察。

5.4.5 中和剂载体定量鉴定试验操作程序

根据试验分组,准备足量试管和平皿,依次进行编号。各组分别用适宜的无菌定量吸管按以下程序吸取或添加试剂和试验样本。将适宜浓度的菌悬液用等量适合浓度的有机干扰物稀释作为试验菌悬液,载体试验用菌量应保证其回收菌量在 2.5×10^2 CFU/片~ 1.5×10^3 CFU/片之间。鉴定试验包括4组:

- a) 第1组:吸取中和剂5.0 mL于无菌试管中,将其置20℃±1℃水浴中5 min后,用无菌镊子夹入1菌片,并使浸透于中和剂内,作用10 min后,用电动混匀器混合20 s,或将试管振打80次,混匀,分别吸取1.0 mL接种于两个平皿中,做活菌培养计数;
- b) 第2组:吸取中和产物溶液(按每片浸有消毒剂的载体加入含5.0 mL中和剂的量制备中和产物)5.0 mL于无菌试管内,将其置20℃±1℃水浴中5 min后,用无菌镊子夹入1菌片,并使浸透于中和产物溶液中,作用10 min后,用电动混匀器混合20 s,或将试管振打80次,混匀,分别吸取1.0 mL接种于两个平皿中,做活菌培养计数;
- c) 第3组:吸取稀释液5.0 mL于无菌试管内,将其置20℃±1℃水浴中5 min后,用无菌镊子夹入1菌片,并使浸透于稀释液中,作用10 min后,用电动混匀器混合20 s,或将试管振打80次,混匀,分别吸取1.0 mL接种于两个平皿中,做活菌培养计数;
- d) 第4组:分别吸取稀释液与中和剂各1.0 mL于无菌平皿内,倒入上述试验同批次的培养基15 mL~20 mL,培养观察。

5.4.6 评价规定

试验结果符合以下全部条件,判为合格:

- a) 第1组、第2组和第3组有相似量试验菌生长,悬液试验作用体系中菌量在50 CFU/mL~300 CFU/mL之间,载体试验菌量在 2.5×10^2 CFU/片~ 1.5×10^3 CFU/片之间。其组间菌落数误差率应不超过15%。按式(3)计算第1组、第2组和第3组间菌落数误差率:

$$P_z = \frac{\sum |X - X_i|}{\sum X_i} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中:

P_z ——组间菌落数误差率, %;

X ——三组间菌落平均数;

X_i ——各组菌落平均数,单位为菌落形成单位(CFU)。

- b) 第4组无菌生长。否则应更换试剂,重新试验。

- c) 试验重复 3 次,每次试验均应符合 a)、b)的要求。

5.4.7 注意事项

- 5.4.7.1 试验所分各组均有其特定意义,不得任意删减。
 5.4.7.2 无菌操作,保持试验用液和器材的无菌,注意更换吸管,保证试验的准确性。
 5.4.7.3 实验组序应按本标准执行。

5.5 过滤冲洗法去除残留消毒剂试验

5.5.1 实验器材

- 5.5.1.1 过滤设备:灭菌处理的滤器、微孔滤膜(孔径为 $0.45\ \mu\text{m}$)、真空泵(或抽滤泵)。
 5.5.1.2 稀释液和冲洗液:应不影响滤膜的性质,对微生物无伤害作用。可用生理盐水、PBS、稀释液(见附录 B)、含吐温 80 的 PBS、可中和部分消毒成分的中和剂。
 5.5.1.3 其他器材随试验微生物确定。

5.5.2 设计原则

- 5.5.2.1 通过所设各组试验结果综合分析,应可确定所选方法是否对测试消毒剂有良好的去除作用,对试验用微生物恢复和培养无不良影响。
 5.5.2.2 试验中所用消毒剂的浓度应为杀菌试验中使用的最高浓度。
 5.5.2.3 同一消毒剂拟对多种微生物进行杀灭试验时,所用中和剂应按微生物种类分别进行鉴定试验,具体如下:
 a) 细菌繁殖体,可在大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌中任选其一进行试验;
 b) 细菌芽胞、白色念珠菌、黑曲霉菌、分枝杆菌应分别进行鉴定试验;
 c) 当用其他特定微生物进行杀灭试验时,均应以该特定微生物进行中和剂的鉴定试验。
 5.5.2.4 鉴定中应根据杀灭试验的设计,选择合适的试验方法。一般悬液鉴定试验结果可用于载体试验。

5.5.3 过滤冲洗去除方法的鉴定

根据实验分组,准备足量试管和平皿,依次进行编号。将菌悬液用等量适合浓度的有机干扰物稀释成 $1 \times 10^2\ \text{CFU/mL} \sim 5 \times 10^2\ \text{CFU/mL}$,作为试验菌悬液。其试验分以下 3 组进行:

- a) 第 1 组:吸取 1.0 mL 试验菌悬液于试管内,加入 4.0 mL 标准硬水,混匀,取 1.0 mL 加入到过滤器中,然后加入 50 mL 蒸馏水作冲洗过滤处理,然后将滤膜有菌面朝上贴于平板表面,放置在 $36\ ^\circ\text{C} \pm 1\ ^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中培养 48 h(真菌和芽胞培养 72 h),计数菌落数;
 b) 第 2 组:吸取 0.2 mL 试验菌悬液直接加入到过滤器中,然后加入 150 mL~500 mL 冲洗液于过滤器中,做第 1 次冲洗过滤处理,再加入 50 mL 蒸馏水做第 2 次冲洗过滤处理,最后将滤膜有菌面朝上贴于平板表面,放置在 $36\ ^\circ\text{C} \pm 1\ ^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中培养 48 h(真菌和芽胞培养 72 h),计数菌落数;
 c) 第 3 组:吸取 4.0 mL 消毒剂于试管中,加入 0.5 mL 有机干扰物,再加入 0.5 mL 稀释液,混匀,取 1.0 mL 加入到过滤器中,加入 150 mL~500 mL 冲洗液做第 1 次冲洗过滤处理,再加入 50 mL 冲洗液做第 2 次冲洗过滤处理,冲洗后吸取 0.2 mL 试验菌悬液直接加入到过滤器中,再加入 50 mL 蒸馏水做第 3 次冲洗过滤处理,然后将滤膜有菌面朝上贴于平板表面,置 $36\ ^\circ\text{C} \pm 1\ ^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中培养 48 h(真菌和芽胞培养 72 h),计数菌落数。

5.5.4 评价规定

试验结果符合以下全部条件,可判为合格:

- a) 第1组、第2组和第3组测定的结果,菌悬液菌数应在20 CFU/滤膜~100 CFU/滤膜之间,其组间菌落数误差率不得超过15%。组间菌落数误差率的计算见式(3)。
- b) 试验重复3次,每次试验均应符合a)的要求。

5.6 细菌杀灭试验

5.6.1 实验器材

5.6.1.1 实验菌种:金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌和枯草杆菌黑色变种芽胞等微生物的悬液或菌片。

5.6.1.2 消毒剂:作用浓度应以实验菌与消毒剂的混合液中有效成分的最终浓度为准。

5.6.1.3 去除残留消毒剂的中和剂或设备。

5.6.1.4 实验试剂:消毒剂稀释用标准硬水、有机干扰物质、TSA培养基(见附录B)、含中和剂的胰蛋白胨大豆肉汤培养基(中和剂TSB),中和剂经鉴定合格。

5.6.1.5 设备与耗材:刻度吸管(1.0 mL、5.0 mL)、恒温水浴箱、恒温培养箱、电动混匀器、秒表。

5.6.2 实验分组

试验中应分以下各组:

a) 实验组

按测试目的有两种选择:

——第一种适用于消毒产品鉴定。根据使用说明书,选定试验菌和一个消毒剂浓度(即产品使用说明书中指定的最低浓度)以及3个作用时间(说明书指定最短作用时间,指定最短作用时间的0.5倍,指定最短作用时间的1.5倍。如说明书指定最短作用时间为20 min,则3个作用时间应分别为10 min、20 min和30 min)进行试验。

——第二种适用于消毒产品日常监测。根据所试菌种和消毒剂对该菌的杀灭能力,选定一种或以上的微生物和一个消毒剂浓度(即产品使用说明书中指定的最低浓度)以及1个作用时间(说明书指定最短作用时间)进行试验。

b) 阳性对照组

用标准硬水代替消毒剂溶液,按上述同样的步骤进行试验。所得结果代表试验体系中的菌液浓度,以其作为对照组活菌浓度。

5.6.3 悬液定量杀菌试验操作程序

5.6.3.1 按照5.1.2配制实验用菌悬液,使其浓度为 1×10^8 CFU/mL~ 5×10^8 CFU/mL(回收菌落数为 1×10^7 CFU/mL~ 5×10^7 CFU/mL)。

5.6.3.2 按照产品说明书要求配制消毒液。无特殊说明者,一律使用无菌硬水配制,配制的浓度为待测浓度的1.25倍(例如要评价的消毒液浓度为200 mg/L,则应配制的浓度为250 mg/L),置 $20 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴备用。

5.6.3.3 取消毒试验用无菌试管,先加入0.5 mL试验用菌悬液,再加入0.5 mL有机干扰物质,混匀,置 $20 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中5 min后,用无菌吸管吸取上述浓度消毒液4.0 mL注入其中,迅速混匀并立即计时。

5.6.3.4 待试验菌与消毒剂相互作用至各设定时间,分别吸取0.5 mL试验菌与消毒剂混合液加于4.5 mL中和剂中,混匀。

5.6.3.5 各管试验菌与消毒剂混合液经加中和剂作用 10 min 后,分别吸取 1.0 mL 样液,按 5.2 进行活菌培养计数。

5.6.3.6 同时用标准硬水代替消毒液,进行平行试验,作为阳性对照。

5.6.3.7 所有试验样本均置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养,对细菌繁殖体培养 48 h 观察最终结果;对细菌芽胞应培养 72 h 观察最终结果。

5.6.3.8 试验重复 3 次,计算各组的活菌浓度(CFU/mL),并换算为对数值(N),然后按式(4)计算杀灭对数值:

$$KL = N_0 - N_x \quad \dots\dots\dots (4)$$

式中:

KL —— 杀灭对数值;

N_0 —— 对照组平均活菌浓度的对数值;

N_x —— 实验组活菌浓度对数值。

计算杀灭对数值时,取小数点后两位值,可以进行数字修约。但是,如果消毒实验组平均生长菌落数小于 1 时,本标准规定此时的杀灭对数值,即大于或等于对照组平均活菌浓度的对数值($KL \geq N_0$)。

5.6.4 载体浸泡杀菌试验操作程序

5.6.4.1 载体浸泡定量杀菌试验操作程序

5.6.4.1.1 按照 5.1.3 制备实验用菌片,使每个菌片的回收菌数为 1×10^6 CFU/片 $\sim 5 \times 10^6$ CFU/片。

5.6.4.1.2 取无菌平皿,标明所注入消毒液的浓度。按每片 5.0 mL 的量,吸取相应浓度的消毒剂溶液注入平皿中。

5.6.4.1.3 将盛有消毒剂平皿置 $20\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min,用无菌镊子取预先制备的菌片 3 片分别放入平皿中,并使之浸没于消毒液。

5.6.4.1.4 待菌液与消毒剂相互作用至各设定时间,用无菌镊子将菌片取出分别移入一含 5.0 mL 中和剂试管中。用电动混匀器混合 20 s,或将试管在手掌上振打 80 次,中和作用 10 min。混匀后,吸取 1.0 mL 直接接种平皿,每管接种 2 个平皿,测定存活菌数。

5.6.4.1.5 另取一平皿,加入 10.0 mL 稀释液代替消毒液,放入 2 片菌片,作为阳性对照组。其随后的试验步骤和活菌培养计数与上述实验组相同。

5.6.4.1.6 所有试验样本均在 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中,对细菌繁殖体培养 48 h 观察最终结果;对细菌芽胞培养 72 h 观察最终结果。

5.6.4.1.7 试验重复 3 次,计算各组的活菌量(CFU/片),并换算为对数值(N),然后按式(5)计算杀灭对数值:

$$KL = N_d - N_s \quad \dots\dots\dots (5)$$

式中:

KL —— 杀灭对数值;

N_d —— 对照组平均活菌量的对数值;

N_s —— 实验组活菌量对数值。

5.6.4.2 载体浸泡定性灭菌试验操作程序

5.6.4.2.1 按照 5.1.3 制备实验用菌片,使每个菌片的回收菌落数为 1×10^6 CFU/片 $\sim 5 \times 10^6$ CFU/片。

5.6.4.2.2 取无菌平皿,标明所加入消毒液的浓度。按每片 5.0 mL 的量,吸取相应浓度的消毒剂溶液加入平皿中。

5.6.4.2.3 将盛有消毒剂平皿置 $20\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min,用无菌镊子取预先制备的菌片 6 片分别放入

平皿中,并使之浸没于消毒液。

5.6.4.2.4 待试验菌与消毒液相互作用至设定时间,用无菌镊子将菌片取出分别移入含 5.0 mL 中和剂肉汤试管中。用电动混匀器混合 20 s,作为实验组样本。

5.6.4.2.5 另取一平皿,加入 20.0 mL 标准硬水代替消毒液,放入 4 片菌片,作用至设定时间,取出 2 片,分别移入含 5 mL 中和剂试管中,其随后的试验步骤与上述实验组相同,作为阳性对照组样本。另取出 2 片,分别移入一含 5.0 mL 中和剂肉汤试管中,按 5.2 进行活菌培养计数,作为菌数对照组样本。

5.6.4.2.6 所有试验样本均在 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养,对细菌繁殖体培养 48 h,观察最终结果;对细菌芽胞培养 7 d,观察最终结果。

5.6.4.2.7 试验重复 5 次,计算各组的活菌量(CFU/片)。

5.6.5 滤膜过滤悬液定量杀灭试验

5.6.5.1 菌悬液的制备和定量杀灭试验同 5.6.3.1、5.6.3.2 和 5.6.3.3,滤膜孔径 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 。

5.6.5.2 待试验菌与消毒剂(分别预先置 $20\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中 5 min)相互作用至各设定时间,分别吸取 1.0 mL 试验菌与消毒剂混合液加入到过滤器中过滤,然后加入 150 mL~500 mL 冲洗液做第 1 次冲洗过滤处理,再加入 50 mL 蒸馏水做第 2 次冲洗过滤处理,将滤膜有菌面朝上贴于平板表面,置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养至规定时间。

5.6.5.3 吸取 0.5 mL 试验菌悬液于试管内,加入 0.5 mL 有机干扰物,再加入 4.0 mL 标准硬水,混匀。做 10 倍系列稀释后取适当稀释度 1.0 mL 加入到过滤器中,然后加入 50 mL 蒸馏水作冲洗过滤处理,然后将滤膜有菌面朝上贴于平板表面,置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养至规定时间,计数菌落数,作为阳性对照。

5.6.5.4 分别吸取稀释液、蒸馏水和硬水各 1.0 mL 于无菌平皿内,倒入上述试验同批次的培养基 15 mL~20 mL,置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养至规定时间,计数菌落数,作为阴性对照。

5.6.5.5 试验重复 3 次,计算各组的活菌量(CFU/mL 或 CFU/片),并换算为对数值(N),然后按式(4)或式(5)计算杀灭对数值。

5.6.6 评价规定

5.6.6.1 评价消毒效果时,要求在产品说明书指定的浓度与 3 个作用时间,重复试验 3 次。在产品指定最低浓度与最短作用时间,以及最短作用时间的 1.5 倍时,要求悬液定量杀灭试验中各次的杀灭对数值均大于或等于 5.00。载体定量杀灭试验中,各次的杀灭对数值均大于或等于 3.00,判定为消毒合格。在产品指定浓度与最短作用时间的 0.5 倍时,可允许对不同细菌或在部分重复次数中,出现不合格结果。

5.6.6.2 对载体浸泡定性灭菌试验,阳性对照组有菌生长且菌数符合要求,阴性对照组无菌生长,5 次试验均无菌生长,判定为灭菌合格。

5.6.6.3 报告中应将各次试验的结果全部以表格的形式列出。阳性对照组应列出各次实验菌浓度,以及平均实验菌浓度。实验组应列出杀灭对数值,例如,杀灭对数值大于或等于 5.00 时,可表示为“ ≥ 5.00 ”而不必列出具体的数字;杀灭对数值小于 5.00 时,应列出具体的数字(例如 2.58, 4.65)。

5.6.7 注意事项

5.6.7.1 在杀菌试验中,每次均应设置阳性对照。

5.6.7.2 试验中所使用的中和剂、稀释液和培养基等,各批次均应进行无菌检查,发现有菌生长,则全部试验重做。

5.7 分枝杆菌杀灭试验

5.7.1 实验器材

5.7.1.1 实验菌株:龟分枝杆菌脓肿亚种 CMCC 93326(ATCC 19977)。

5.7.1.2 实验试剂:分枝杆菌培养基、0.1%胰蛋白胨的生理盐水溶液、消毒剂稀释用硬水、有机干扰物质(见附录B)、鉴定合格的中和剂。

5.7.1.3 实验设备与耗材:试验菌及其菌悬液或菌片的制备所需器材、刻度吸管、恒温水浴箱、电动混匀器、计时装置、恒温培养箱。

5.7.2 龟分枝杆菌脓肿亚种菌悬液的制备

5.7.2.1 以无菌操作方式开启冻干菌种管,用毛细吸管吸取适量营养肉汤于管中,吹吸数次,使菌种融化分散。取含 5.0 mL~10.0 mL 营养肉汤的试管,滴入少许菌种悬液,置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h。用接种环取第 1 代培养的菌悬液,划线接种于分枝杆菌培养基平板上,置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 72 h。挑取上述第 2 代培养物中典型菌落,接种于分枝杆菌培养基斜面,置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 72 h,即为第 3 代培养物。密封后, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,时间不超过 6 周。

5.7.2.2 试验时,取第 3 代斜面培养物在分枝杆菌干燥培养基斜面上按上述方法连续传代,培养方法与第 3 代相同,取第 5 代~第 6 代的分枝杆菌培养基斜面 72 h 培养物,用 5.0 mL 吸管吸取 3.0 mL~5.0 mL 稀释液加入斜面试管内,反复吹吸,洗下菌苔。用吸管将洗液移至另一含有 6 g~7 g 玻璃珠的无菌圆锥底塑料试管中,在电动混匀器混合 5 min,将菌液吸入到另一试管内制成菌悬液。

5.7.2.3 将制成的菌悬液,进行活菌培养计数(见 5.2),按其结果用稀释液稀释至所需浓度。

5.7.2.4 菌悬液保存在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内备用,当天使用,不得过夜。

5.7.3 实验分组

试验分为下列各组:

- 实验组:按 5.6.3 规定选定消毒剂浓度与作用时间;
- 阳性对照组:以标准硬水代替消毒剂溶液,按 5.6.3 规定程序进行试验,所得结果代表试验体系中所含受试菌的活菌浓度;
- 阴性对照组:观察同次试验用相关溶液和培养基有无污染。

5.7.4 试验程序

杀灭试验:悬液定量杀灭试验和载体浸泡定量杀灭试验等。其操作程序按 5.6.3、5.6.4 进行,接种后的平皿应放入干净的塑料袋内,置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 7 d,观察最终结果。

5.7.5 评价规定

5.7.5.1 悬液试验时,回收菌量为 $1\times 10^6\text{ CFU/mL}\sim 5\times 10^6\text{ CFU/mL}$ 。载体试验时,回收菌量为 $1\times 10^6\text{ CFU/片}\sim 5\times 10^6\text{ CFU/片}$ 。

5.7.5.2 评价消毒效果时,按产品使用说明书指定的使用浓度和 3 个作用时间,重复试验 3 次。具体评价规定如下:

- 用悬液定量杀菌试验评价杀菌效果时,在产品规定使用浓度与最低作用时间,以及最短作用时间的 1.5 倍时,各次试验的杀灭对数值均应大于或等于 4.00;在产品规定使用浓度与最短作用时间的 0.5 倍时,允许杀灭对数值小于 4.00,判定为实验室试验该产品对分枝杆菌污染物消毒的有效剂量;
- 用载体浸泡定量杀菌试验评价杀菌效果时,在产品规定使用浓度与最短作用时间和最短作用时间的 1.5 倍时,各次试验的杀灭对数值大于或等于 3.00;在产品规定使用浓度与最短作用时间的 0.5 倍时,允许杀灭对数值小于 3.00,判为实验室试验该产品对分枝杆菌污染物消毒的有效剂量。

5.8 真菌杀灭试验

5.8.1 实验器材

5.8.1.1 试验菌及其菌悬液或菌片:白色念珠菌 ATCC 10231 和黑曲霉菌 ATCC 16404 孢子悬液与菌片,按 5.8.2.1 和 5.8.2.2 所示方法制备。根据消毒剂特定用途和特殊需要,可选择相应的菌株。

5.8.1.2 实验试剂:沙堡液体培养基、琼脂、麦芽浸膏琼脂培养基(MEA)、麦芽浸膏营养肉汤培养基(MEB)、磷酸盐缓冲液、消毒剂稀释用硬水、有机干扰物质(见附录 B)、鉴定合格的中和剂。

5.8.1.3 实验设备与耗材:刻度吸管(0.1 mL、1.0 mL、5.0 mL)、恒温水浴箱、电动混匀器、计时装置、恒温培养箱。

5.8.2 真菌悬液制备

5.8.2.1 白色念珠菌悬液按以下步骤制备:

- 以无菌操作方式开启冻干菌种管,用毛细吸管吸加适量沙堡液体培养基于菌种管中,轻轻吹吸,使菌种沉淀物融化分散。取含 5.0 mL~10.0 mL 沙堡液体培养基试管,滴入少许菌种悬液,置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h。用接种环取第 1 代培养的菌悬液,划线接种于沙堡琼脂培养基平板上,置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h。挑取上述第 2 代培养物中典型菌落,接种于沙堡琼脂斜面,置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h,即为第 3 代培养物。
- 取第 3 代~第 6 代的沙堡琼脂培养基斜面新鲜培养物(18 h~24 h),用 5.0 mL 吸管吸取 3.0 mL~5.0 mL 稀释液加入斜面试管内,反复吹吸,洗下菌苔。随后,用 5.0 mL 吸管将洗液移至另一无菌试管中,用电动混匀器混合 20 s,或在手掌上振打 80 次,以使白色念珠菌悬浮均匀。
- 悬液定量杀灭试验时,菌悬液浓度为 $1\times 10^7\text{ CFU/mL}\sim 5\times 10^7\text{ CFU/mL}$ (回收菌量为 $1\times 10^6\text{ CFU/mL}\sim 5\times 10^6\text{ CFU/mL}$);载体定量杀菌试验时,菌片制备按 5.1.3 要求进行。
- 菌悬液保存在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内备用,当天使用不得过夜。
- 怀疑有污染时,应以菌落形态、革兰染色与生化试验等方法进行鉴定。菌落形态可直接用显微镜观察。菌体形态可在涂片后直接用高倍显微镜观察,也可用墨水阴地法染色(将菌与黑墨水在玻片上混匀,推成薄膜)后观察。

5.8.2.2 黑曲霉菌(ATCC 16404)孢子悬液或菌片按以下步骤制备:

- 以无菌操作方式开启冻干菌种管,用毛细吸管吸取少量麦芽浸膏营养肉汤培养基加到菌种管中,轻轻吹吸,使菌种沉淀物融化分散。取少许沉淀物悬液加到含 5.0 mL 麦芽浸膏营养肉汤培养基试管中,置 $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 42 h~48 h。用接种环划线接种第 1 代培养物于 MEA 培养基平板,置 $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 42 h~48 h。取平板培养物中的典型菌落,接种于麦芽浸膏营养肉汤培养基,置 $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 42 h~48 h,即为第 3 代培养物。
- 用 10.0 mL 吸管吸取 5.0 mL~10.0 mL 第 3 代培养物,接种罗氏瓶,并摇动使菌液布满 MEA 培养基表面,将多余肉汤培养物液体吸出,置 $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 42 h~48 h。
- 向罗氏瓶培养物中加入 5.0 mL~10.0 mL 0.05%(体积分数)吐温 80 生理盐水溶液,刮洗黑曲霉菌分生孢子于溶液中,将孢子悬液移入装有玻璃珠的锥形瓶中,轻轻振摇 1 min 后,过滤除去菌丝后,显微镜下(400 倍)观察是否仍有菌丝存在,若有可经 $5\text{ }000\text{ r/min}\sim 6\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 20 min。再次在显微镜下(400 倍)观察,必要时重复上述步骤。
- 黑曲霉菌分生孢子悬液在 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 储存不能超过 2 d,使用前,混合均匀,在显微镜下(400 倍)观察是否有孢子出芽,若有则不得使用。

- e) 悬液定量杀灭试验时,菌悬液浓度为 1×10^7 CFU/mL $\sim 5 \times 10^7$ CFU/mL(回收菌量为 1×10^6 CFU/mL $\sim 5 \times 10^6$ CFU/mL)。
- f) 菌片以滴染法制备。染菌后,置二级生物安全柜内干燥备用。回收菌量应为 1×10^6 CFU/片 $\sim 5 \times 10^6$ CFU/片。

5.8.3 实验分组

分为下列各组:

- a) 实验组:按 5.6.2 规定,确定消毒剂浓度与作用时间,对受试菌种的杀灭能力进行测定;
- b) 阳性对照组:以标准硬水代替消毒剂溶液,按 5.6.2 规定程序进行试验,所得结果代表试验体系中所含试验菌的活菌浓度;
- c) 阴性对照组:观察同次试验用相关溶液和培养基有无污染。

5.8.4 试验程序

悬液定量杀菌试验、载体浸泡定量杀菌试验的操作程序均见 5.6。白色念珠菌使用沙堡琼脂培养基,黑曲霉菌使用麦芽浸膏琼脂(MEA)。

活菌培养计数时,白色念珠菌在 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 72 h 观察最终结果;黑曲霉菌在 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 72 h 观察最终结果。

5.8.5 评价规定

评价消毒效果时,按产品使用说明书指定的使用浓度和 3 个作用时间,重复试验 3 次。具体评价规定如下:

- a) 在产品规定使用浓度与最短作用时间,以及最短作用时间的 1.5 倍时,各次试验的杀灭对数值均应大于或等于 4.00,判定为消毒合格;
- b) 用载体浸泡定量杀菌试验评价杀菌效果时,在产品规定使用浓度与最短作用时间,以及最短作用时间的 1.5 倍时,各次试验的杀灭对数值大于或等于 3.00,判定为消毒合格。

5.9 消毒剂杀菌作用影响因素试验

5.9.1 实验器材

5.9.1.1 实验菌种:菌片与菌悬液(按 5.1 的要求和方法制备)。

5.9.1.2 实验试剂:中和剂(经中和剂试验鉴定合格)、盐酸(用无菌纯化水配制)、氢氧化钠(用无菌纯化水配制);有机物,根据消毒剂的使用对象选择,如酵母粉、血清、蛋白胨、牛血清白蛋白。

5.9.1.3 实验设备与耗材:恒温水浴箱、冷水浴装置(可放入试管架的容器,以冰水调节水温)、温度计、pH 计。

5.9.2 试验微生物的选择

根据所测消毒剂鉴定需要决定。一般情况下,对细菌繁殖体应选择大肠杆菌和金黄色葡萄球菌,作为革兰阴性细菌与阳性细菌的代表;对细菌芽胞应选择枯草杆菌黑色变种芽胞。也可直接选择特定的微生物进行试验。

5.9.3 消毒剂浓度和作用时间的设定

试验应分为两组,各组消毒剂浓度和作用时间的设定如下:

- a) 实验组:各种因素影响的测定,均用杀灭相应微生物试验所得最低有效浓度和 3 个作用时间进

行杀灭试验。以该最低有效浓度所需的最短有效时间和最短有效时间的 2 倍、3 倍为 3 个作用时间。试验结果应测出合格杀灭对数值的最低有效剂量。必要时,可根据需要调整消毒剂浓度或作用时间,若最短有效时间较长(大于 30 min),可根据情况适当缩短作用时间的组距。对最短有效时间较短者(小于 5 min),可根据情况适当延长作用时间的组距。

b) 阳性对照组:用标准硬水代替消毒剂溶液,按 5.9.3 a) 进行试验。所得结果代表活菌浓度。

5.9.4 有机物对杀灭微生物效果影响的测定

5.9.4.1 以小牛血清为有机物代表,应设置无小牛血清对照组,含 25% 小牛血清组,含 50% 小牛血清组等 3 组。各组所用消毒剂浓度和作用时间,见 5.9.3。

5.9.4.2 菌悬液与无菌小牛血清按 1:1 与 3:1 比例混合,分别配成含 50% 与 25% 小牛血清的菌悬液。此含小牛血清的菌悬液,可用于悬液定量杀菌试验,亦可滴染菌片进行载体定量试验。

5.9.4.3 以悬液定量杀灭试验或载体浸泡定量杀灭试验进行测定,试验程序见 5.6。

5.9.4.4 试验应重复 3 次。

5.9.4.5 计算每次试验的杀灭对数值和平均杀灭对数值。

5.9.5 温度对杀灭微生物效果影响的测定

5.9.5.1 设置 $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 等,以 $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 为间隔。各组消毒剂浓度和作用时间的设置见 5.9.3。

5.9.5.2 以悬液定量杀灭试验或载体浸泡定量杀灭试验进行测定,试验程序见 5.6。

5.9.5.3 试验应重复 3 次。

5.9.5.4 计算每次试验的杀灭对数值和平均杀灭对数值。

5.9.6 pH 对杀灭微生物效果影响的测定

5.9.6.1 以该消毒剂的使用浓度 pH 和使用浓度的 pH 加 2、pH 减 2,设 3 组进行试验。对消毒液 pH 的调节,先用 pH 计测定原消毒剂的 pH,在偏酸时慢慢滴加氢氧化钠溶液,偏碱时慢慢滴加盐酸溶液以调整。随时用 pH 计测定消毒剂的 pH。当达到所要求的 pH 后,停止调整,进行随后的试验。必要时,在 pH 调整后测定有效成分含量以观察是否受到 pH 变化的影响。

5.9.6.2 各 pH 组所用消毒液浓度和作用时间,见 5.9.3。

5.9.6.3 以悬液定量杀灭试验或载体浸泡定量杀灭试验进行测定,试验程序见 5.6。

5.9.6.4 试验应重复 3 次。

5.9.6.5 计算每次试验的杀灭对数值和平均杀灭对数值。

5.9.7 评价规定

有机物影响试验以不含小牛血清组为对照,温度影响试验以 $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 组为对照,pH 影响试验以消毒剂使用溶液 pH 组为对照。具体评价规定如下:

- 任一组中第 1 个~第 3 个作用时间杀灭效果均合格,判为该组所试因素无影响;
- 任一组中第 1 个作用时间杀灭效果不合格,第 2 个、第 3 个作用时间杀灭效果合格,判为该组所试因素有轻度影响;
- 任一组中第 1 个、第 2 个作用时间杀灭效果不合格,第 3 个作用时间杀灭效果合格,判为该组所试因素有中度影响;
- 任一组中第 1 个~第 3 个作用时间杀灭效果均不合格,判为该组所试因素有重度影响。

附 录 A
(规范性附录)
实验室及人员要求

A.1 实验室要求

消毒实验室进行致病微生物包括分枝杆菌、黑曲霉菌、白色念珠菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌的消毒学试验时或检测现场标本时,应在生物安全Ⅱ级以上的实验室内进行,并符合 GB 19489 中的相关要求。实验室应采取封闭式布局,具备完成相关试验所需仪器设备,且便于清洁、消毒。

A.2 人员要求

A.2.1 消毒产品检测的实验室人员应为经过消毒学实验操作技术培训的专业人员。

A.2.2 实验审核人员应具有中级专业技术职称、5 年以上的消毒产品检测经历,并经过专门培训。

A.2.3 实验室技术负责人和质量负责人应具有高级专业技术职称、5 年以上的消毒产品检测经历,并经过专门培训。

A.3 无菌操作要求

A.3.1 试验开始前,应以湿式方法清洁台面和室内地面。

A.3.2 实验人员应穿戴工作服、防护鞋、口罩、帽子,进行无菌检验时,正确穿戴好无菌隔离衣、鞋套、帽子和口罩。

A.3.3 每吸取一次不同样液应更换无菌吸管,接种环(针)应在火焰上烧灼灭菌后,才可再次使用,也可用一次性使用的无菌吸管和接种环(针)。

A.3.4 要求无菌的试剂,如蒸馏水、生理盐水、磷酸盐缓冲液、培养基、标准硬水、中和剂等,均应灭菌。

A.3.5 无菌器材和试剂,使用前应检查容器或包装是否完整,有破损者不得使用。

A.3.6 正在使用的无菌器材和试剂不得长时间暴露于空气中。



附 录 B

(规范性附录)

试 剂

B.1 稀释液

B.1.1 胰蛋白胨生理盐水溶液(TPS)

胰蛋白胨	1.0 g
氯化钠	8.5 g

先用 900 mL 以上蒸馏水溶解,并调节 pH 值在 7.0 ± 0.2 ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$),最终用蒸馏水加至 1 000 mL,分装后,于 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 压力蒸汽灭菌 20 min 备用。

B.1.2 磷酸盐缓冲液(PBS, 0.03 mol/L, pH 7.2)

无水磷酸氢二钠	2.83 g
磷酸二氢钾	1.36 g
蒸馏水加至	1 000 mL

将各成分加入到 1 000 mL 蒸馏水中,待完全溶解后,调节 pH 至 7.2,于 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 压力蒸汽灭菌 20 min 备用。

B.1.3 标准硬水(硬度 342 mg/L)

氯化钙(CaCl_2)	0.304 g
氯化镁($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.139 g
蒸馏水加至	1 000 mL

将各成分加入到 1 000 mL 蒸馏水中,待完全溶解后,用 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌备用。

B.1.4 生理盐水

氯化钠	8.5 g
蒸馏水加至	1 000 mL

将氯化钠加入到 1 000 mL 蒸馏水中,待完全溶解后,于 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 压力蒸汽灭菌 20 min 备用。

B.2 革兰染色液

第 1 液:结晶紫溶液

结晶紫乙醇饱和溶液	100 mL
结晶紫	4 g~8 g
95%乙醇	100 mL
1%草酸胺溶液	

第 2 液:卢戈碘液

碘化钾	2 g
-----	-----

碘	1 g
蒸馏水	200 mL
第 3 液:脱色剂	
1) 95%乙醇	
2) 丙酮乙醇溶液	100 mL
95%乙醇	70 mL
丙酮	30 mL
第 4 液:稀释石炭酸复红液	
碱性复红乙醇饱和溶液	10 mL
碱性复红	5 g~10 g
5%石炭酸溶液	90 mL
蒸馏水	900 mL

B.3 孔雀绿与沙黄芽胞染色液

第 1 液:5.00%孔雀绿水溶液。

第 2 液:0.5%沙黄水溶液。

B.4 有机干扰物

牛血清白蛋白	30 g 或 3 g
蒸馏水	1 000 mL
溶解后用微孔滤膜(孔径为 0.45 μm)滤过除菌,冰箱保存备用。	

B.5 营养琼脂培养基

蛋白胨	10 g
牛肉膏	5 g
氯化钠	5 g
琼脂	15 g
蒸馏水	1 000 mL

除琼脂外其他成分溶解于蒸馏水中,调 pH 至 7.2~7.4,加入琼脂,加热溶解,分装,于 121 ℃压力蒸汽灭菌 20 min 备用。

B.6 营养肉汤培养基

蛋白胨	10 g
牛肉膏	5 g
氯化钠	5 g
蒸馏水	1 000 mL

将各成分溶解于蒸馏水中,调 pH 至 7.2~7.4,分装,于 121 ℃压力蒸汽灭菌 20 min 备用。

B.7 胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB)

胰蛋白胨	1.5 % (g/100 mL)
大豆蛋白胨	0.5 % (g/100 mL)
氯化钠	0.5 % (g/100 mL)

用蒸馏水配制而成,调节 pH 为 7.2 ± 0.2 ,于 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 压力蒸汽灭菌 20 min 备用。

B.8 胰蛋白胨大豆琼脂培养基(TSA)

胰蛋白胨	1.5 % (g/100 mL)
大豆蛋白胨	0.5 % (g/100 mL)
氯化钠	0.5 % (g/100 mL)
琼脂	1.6 % (g/100 mL)

用蒸馏水配制而成,调节 pH 为 7.2 ± 0.2 ,于 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 压力蒸汽灭菌 20 min 备用。

B.9 沙堡琼脂培养基

葡萄糖	40 g
蛋白胨	10 g
琼脂	20 g
蒸馏水	1 000 mL

将上述成分混合后,加热至完全溶解,调 pH 至 5.6 ± 0.2 ,于 $115\text{ }^{\circ}\text{C}$ 压力蒸汽灭菌 30 min 备用。

B.10 沙堡液体培养基

葡萄糖	40 g
蛋白胨	10 g
蒸馏水	1 000 mL

将上述成分混合后,加热至完全溶解,调 pH 至 5.6 ± 0.2 ,于 $115\text{ }^{\circ}\text{C}$ 压力蒸汽灭菌 30 min 备用。

B.11 麦芽浸膏琼脂培养基(MEA)

麦芽浸膏	30 g
大豆蛋白胨	3 g
琼脂	15 g
双蒸馏水	1 000 mL

将上述成分制成溶液, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 压力蒸汽灭菌 20 min,灭菌后无菌调节 pH 至 6.9 ± 0.2 备用。
