

消毒技术规范

（征求意见稿）

中华人民共和国卫生部

二〇〇六年十二月

目 录

1 总则.....	1
2 消毒产品检验技术规范.....	9
3 消毒产品理化检验技术规范.....	116
4 消毒产品毒理学实验技术.....	147

1 总 则

General Principle

1.1 引言

根据《中华人民共和国传染病防治法》和卫生部《消毒管理办法》制订本规范。

1.2 适用范围

本规范适用于消毒产品申报和监督时为评价其安全性、有效性和理化特性而开展的检测活动及与检测活动相关的实验条件的控制。

1.3 术语

1.3.1 消毒 disinfection

杀灭或清除传播媒介上病原微生物，使其达到无害化的处理。

1.3.2 灭菌 sterilization

杀灭或清除传播媒介上一切微生物的处理。

1.3.3 化学指示物 chemical indicator

利用某些化学物质对某一杀菌因子的敏感性，使其发生颜色或形态改变，以指示杀菌因子的强度（或浓度）和/或作用时间是否符合消毒或灭菌处理要求的制品。

1.3.4 生物指示物 biological indicator

染有一定量的特定微生物，用于指示消毒或灭菌效果的制品。

1.3.5 消毒剂 disinfectant

用于杀灭传播媒介上的微生物使其达消毒或灭菌要求的制剂。

1.3.6 有效氯 available chlorine

有效氯是衡量含氯消毒剂氧化能力的标志，是指与含氯消毒剂氧化能力相当的氯量（非指消毒剂所含氯量），其含量用 mg/L 或%浓度表示（有效碘及有效溴的定义和表示法与有效氯对应）。

1.3.7 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。

1.3.8 中和产物 product of neutralization

指中和剂与消毒剂作用后的产物。

1.3.9 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，称为菌落形成单位，以其表达活菌的数量。

1.3.10 自然菌 natural bacteria

在消毒试验中，指存在于某一试验对象上非人工污染的细菌。

1.3.11 存活时间 survival time, ST

用于生物指示物抗力鉴定时,指受试指示物样本,经杀菌因子作用后全部样本有菌生长的最长作用时间 (min)。

1.3.12 杀灭时间 killing time, KT

用于生物指示物抗力鉴定时,指受试指示物样本,经杀菌因子作用后全部样本无菌生长的最短作用时间 (min)。

1.3.13 D 值 D value

杀灭微生物数量达 90%所需的时间 (min)。

1.3.14 杀灭对数值 killing log value

当微生物数量以对数表示时,指消毒前后微生物减少的对数值。

1.3.15 杀灭率 killing rate, KR

在微生物杀灭试验中,用百分率表示微生物数量减少的值。

1.3.26 灭菌保证水平 sterility assurance level, SAL

指灭菌处理后单位产品上存在活微生物的概率,通常表示为 10^{-n} ,本规范规定为 10^{-6} ,即经灭菌处理后在一百万件物品中最多只允许有一件物品存在活微生物。

1.3.21 无菌检验 sterility testing

为明确灭菌后的物品中是否存在活微生物所进行的试验。

1.3.22 生物负载 bioburden

被测试的一个单位物品上承载活微生物的总数。

1.3.23 暴露时间 exposed time

消毒或灭菌物品受到消毒因子作用的时间。又称作用时间、处理时间。

1.3.24 载体 carrier

试验微生物的支持物。

1.3.25 抗菌 antibacterial

采用化学或物理方法杀灭细菌或妨碍细菌生长繁殖及其活性的过程。

1.3.26 抑菌 bacteriostasis

采用化学或物理方法抑制或妨碍细菌生长繁殖及其活性的过程。

1.4 消毒产品检验的基本要求

1.4.1 实验室要求

开展消毒产品检测的检测机构应该通过计量认证,其认证的检测项目应该涵盖消毒产品检测项目。开展脊髓灰质炎病毒灭活试验、黑曲霉菌杀灭试验和分枝杆菌杀灭试验的检测机构应该通过卫生部认定。进口消毒产品申报卫生部卫生许可批件时,应该在卫生部认定的检测机构进行检测。国产消毒产品申报卫生部卫生许可批件时,应该在卫生部或省级行政部门认定的检测机构进行检测。

消毒实验室应按《微生物实验室生物安全管理条例》管理，符合 GB 19489《实验室 生物安全通用要求》的条件，进行致病菌包括分枝杆菌、黑曲霉菌、白色念珠菌、金黄色葡萄球菌和脊髓灰质炎病毒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，并符合国家有关生物安全的标准。实验室应采取封闭式布局，便于清洁、消毒。无菌检验必须在 100 级洁净度的实验室或 100 级层流操作柜中进行。

容量分析实验室工作温度应控制在 20℃～25℃。

毒理实验室应该为生物安全Ⅱ级或高于此要求。

1.4.2. 人员要求

进行消毒产品检测的实验室人员应该是经过实验操作技术培训的专业人员。

实验审核人员应该具有中级职称、五年以上的消毒产品检测经历并经过专门培训。

实验室技术负责人和质量负责人应该具有高级职称，五年以上的消毒产品检测经历并经过专门的培训。

1.4.3 受理要求

对申报卫生部卫生许可批件的国产消毒产品，检验机构应该只受理由生产企业所在地的卫生监督部门现场抽样并封样的样品，发现封签破损或其他异常情况导致封样无效时，应不予受理。

对申报卫生部卫生许可批件的进口消毒产品，检验机构受理时应该查验并留存消毒产品生产地所在国的销售证明和经我国海关验证的报关单底单。留存的销售证明和报关单可以为送检单位盖章认可的复印件。

进口原料在国内分装的消毒产品按国产消毒产品对待。

检验项目由送检单位决定。受理样品数量应满足各项检测需要，发现数量不足时应该拒绝受理。因不可预知的原因，试验中确实需要补充样品数量时，送检单位应该按规定重新送样并在检验申请中说明理由，检验机构应重新受理，重新编排受理号。

受理时应同时要求送检单位提供盖章认可的产品说明书、配方、研制报告等材料。盖章认可的说明书应该与每件样品的说明书完全一致。受理后发现按说明书无法完成检验项目时应停止检测并向送检单位说明理由。

1.4.4 消毒效果检验要求

1.4.4.1 无菌操作要求

(1) 试验开始前，应以湿式方法清洁台面和打扫室内地面；

(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，需经风淋后进入实验室，然后，正确穿戴好无菌隔离衣、鞋套、帽和口罩；

(3) 每吸取一次不同样液应更换无菌吸管，接种环（针）需在火焰上烧灼灭菌后，才可再

次使用；

(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、牛血清白蛋白、标准硬水、中和剂等，均需灭菌；

(5) 无菌器材和试剂，使用前须检查容器或包装是否完整，有破损者不得使用；

(6) 正在使用的无菌器材和试剂不得长时间暴露于空气中；

(7) 移液或接种时，应将试管口和琼脂平板靠近火焰；（生物安全柜不准有明火）

(8) 重复使用的器材，使用后应立即放入盛有消毒液的容器中，一次性使用的器材使用后应立即放入感染性废物收集袋中；

(9) 若不慎发生微生物培养物打碎或其他试验微生物泄漏事故时，不论是否具有致病性，均应立即停止手中工作，对污染及可能波及的区域进行消毒处理；

(10) 全部试验结束后，应按常规对室内环境进行消毒处理。

1.4.4.2 检测要求

(1) 消毒学试验分为实验室试验、模拟试验和现场试验三个阶段。

(2) 实验室试验以悬液定量试验为主，试验须重复 3 次。对不适宜用悬液定量试验评价的消毒剂，如一些一次性使用的粘稠消毒剂、冲洗用消毒剂和醇类消毒剂等的实验室试验用载体定量试验，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。评价消毒剂的实验室试验，消毒剂试验浓度需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。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和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，每个剂量均须进行试验。

消毒器械产生的化学杀微生物因子的试验要求同消毒剂。对于冲洗用化学消毒因子可以用载体流动浸泡试验。如为物理杀微生物因子，试验一般用载体定量试验，在无特殊要求的情况下，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。试验重复 3 次。

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。载体定性试验至少分三次完成，每次试验均应该设立规定数量的阴性对照和阳性对照。

(3) 模拟现场或现场试验，以使用说明书的最低有效浓度和最短作用时间进行试验。消毒试验应重复 3 次，消毒器械的灭菌试验应重复 5 次，消毒液的灭菌试验应至少分三次完成，共计 60 个试验样本。每次试验均应该设立规定数量的阴性对照和阳性对照。

(4) 在对消毒剂进行监督监测时, 定量杀菌试验选择以消毒对象中需要杀灭的抗力最强的微生物为试验微生物, 以说明书规定的最低浓度和最短时间验证其消毒效果。对用于灭菌的消毒剂则以说明书中规定的使用浓度和其 0.5 倍的作用时间验证其灭菌效果。

(5) 鉴定和监测多用途消毒剂与消毒器械消毒效果时, 现场或模拟现场试验的消毒对象原则上是在类似物品中最难达到消毒合格者, 如医疗器械消毒或灭菌选用止血钳齿端; 皮肤消毒选择人体前臂屈面皮肤; 织物消毒选择棉布; 一般物品表面(包括木质、塑料、橡胶、玻璃)消毒选择木质表面; 餐具消毒选用竹(木)筷, 不用于筷子消毒的可选用瓷质碗盘; 地面消毒选择水泥地面; 手消毒选择五指屈面; 对于特指消毒对象而又在上述物品中不能选出有代表性物品时, 则需用该特指对象进行试验。

(6) 进行实验室试验和模拟现场试验时, 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%。

1.4.4.3 对重复试验的要求

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。

1.4.5 理化检验要求

1.4.5.1 标准品或对照品的纯度 $\geq 99.0\%$; 用标准品或对照品进行标定过的标准溶液作为含量测定的对照物也可。

1.4.5.2 以滴定法分析有效成分时, 滴定液用量不宜超过滴定管所标示的量。本规范文内规定滴定时所取样本的质量或容量(包括浓度), 均根据此原则设定。若所测消毒剂浓度过高, 可适当减少取样量或经稀释后测定, 以减少测定结果的误差; 若消毒剂浓度过低, 可增加取样量或采用灵敏度更高的方法进行测定。

1.4.5.3 有效成分含量以法定计量单位表示。复方消毒剂以其杀菌主要有效成分含量表示; 植物消毒剂以百分浓度表示, 如 1 份原液加 4 份水即该消毒剂溶液的浓度为 20%。溶液或消毒剂的有效成分含量的表示, 以 mg/L 或 mg/kg 为主。采用百分数表述含量时有下列 2 种含义: ①液体和液体之间为体积百分数, 用“%”表示, 即 100 ml 溶液中含溶质若干 ml, 或 100 ml 消毒剂中含有效成分若干 ml; ②固体和固体之间为质量百分数, 用“%”表示, 即 100 g 消毒剂中含有效成分若干 g;

对固体和液体之间采用质量浓度表示(mg/L、g/L 等), 即 1L 溶液中含溶质若干 mg 或 g, 或 1L 消毒剂中含有效成分若干 mg 或 g 等。

1.4.5.4 方法中所用试剂的纯度涉及基准、分析纯、化学纯及色谱纯等, 未作专门说明者, 一般采用分析纯。配制滴定液试剂(如硫代硫酸钠)因配制后尚需专门处理, 亦可用化学纯。

1.4.5.5 本规范中, “滴定液”是指经过标定, 浓度准确至 0.001 mol/L~0.0001 mol/L 的溶液。未经浓度标定者则称“溶液”, 以示区别。摩尔(mole, mol)为物质的量的单位, 当分子、原子

或其它粒子等的个数约为 6.02×10^{23} 时即为 1 mol。本规范中滴定液浓度的计算，除碘滴定液按原子量计算外，其它滴定液均按分子量计算。

1.4.5.6 滴定液的标定及所有样品测定均平行进行两次。将滴定管中滴定液补足至全量后滴定。所有试验结果（包括消毒剂有效成分测定及滴定液标定）应当以空白试验校正。所使用的滴定液应按要求在有效使用期内使用。

1.4.5.7 粉剂和片剂的取样量为测定所需量的 10 倍以上，经研磨后精确称取适量样品进行测定。

1.4.5.8 如果选用色谱法或分光光度法，进行方法可靠性论证时应附空白样品（不含被测成分的其它成分所构成的样品）、模拟样品（空白样品加有效成分的标准品）以及待测样品的色谱图或光谱图。如果无法提供空白样品，可用加入标准量法进行方法可靠性的论证。

1.4.5.9 对于本规范中测定方法不适用的产品，有效成分的测定，由厂家提供检测方法及方法可靠性的论证报告，经检验机构认可后方可采用。

1.4.5.10 样品的重量测定用称重法，天平的精度应为测定样品重量的 1% 以上。

1.4.5.11 对消毒剂测定一个样品，对消毒器械的杀菌因子强度应该确定强度曲线，曲线应能反映消毒器械运转时杀菌因子强度的变化趋势。

1.4.5.12 对仪器设备进行计量检定。玻璃仪器清洗干净，用蒸馏水冲洗 3 遍。所用容量瓶和量筒等不能加热。

1.4.6 毒理学实验要求

1.4.6.1 消毒产品毒理学实验评价程序

消毒剂安全性毒理学评价，可分为 4 个阶段。

第一阶段 包括急性经口毒性试验、急性吸入毒性试验、皮肤刺激试验、急性眼刺激试验、阴道黏膜刺激试验和皮肤变态反应试验等。

第二阶段 包括亚急性毒性试验和致突变试验。后者包括体外哺乳动物细胞基因突变试验（L5178Y 细胞基因突变试验、V79 细胞基因突变试验）、体外哺乳动物细胞染色体畸变试验（体细胞染色体水平，体外试验）、小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验（体细胞染色体水平，体内试验）、哺乳动物骨髓细胞染色体畸变试验（体细胞染色体水平，体内试验）、程序外 DNA 修复合成试验（DNA 水平，体外试验）、小鼠精子畸形试验（性细胞基因和染色体水平，体内试验）、睾丸生殖细胞染色体畸变试验（性细胞染色体水平，体内试验）、小鼠精原细胞染色体畸变试验和小鼠精母细胞染色体畸变试验等。

第三阶段 包括亚慢性毒性试验和致畸胎试验等。

第四阶段 包括慢性毒性试验和致癌试验等。

1.4.6.2 毒理学试验受试物

1) 在急性经口毒性试验、急性吸入毒性试验、亚急性毒性试验、致突变试验、亚慢性毒性试验、致畸胎试验、慢性毒性试验和致癌试验时,一般采用消毒剂原形样品。消毒剂原形是指在销售过程中原包装的粉剂、片剂或原液。对于二元或多元包装的消毒剂,以按比例混合配制后作为消毒剂原形。

2) 在皮肤刺激试验、急性眼刺激试验和阴道黏膜刺激试验中所用受试物的浓度,通常是对皮肤、黏膜消毒时应用浓度的 5 倍。使用原形(原液)对皮肤、黏膜进行消毒的消毒剂,则采用消毒剂原形(原液)作为试验受试物,不需对消毒剂原形再进行浓缩。

3) 在皮肤变态反应试验时,采用的诱导浓度应为引起皮肤刺激反应的最低浓度或原液,激发浓度应为不引起皮肤刺激反应的最高浓度或原液。

1.4.7 检测记录要求

实验室对所进行的试验,必须按计量认证(或实验室认可)要求认真观察试验结果,作好原始记录。为使记录规范化,须用表格方式记录,表格中应包括样品名称与编号、检验日期、检测项目、检测依据、试验条件、使用仪器编号、观察结果、试验者和校核者签名等栏目。表格中每一栏目应用蓝黑或碳素墨水逐项填写。一次试验填写一份表格。原始记录数据和计算应及时校核,整理装订附于检验报告后,入档保存备查。

1.4.8 检测报告要求

检测报告是试验情况和结果的书面表达,具有长期保存和法律价值,因此必须逐项填写清楚。因为技术规范或标准等的规定只写出共性部分,即使再详细亦难以包括所有情况和要求。各样品检测可能有其特殊性,因样品用途、用法不同,其检验条件和检验方法亦可随之改变,若检验报告中不说明其改变的情况,将会影响对所得结果做出准确的评价。凡是检验方法与本规范不一致或有更改者,必须详细叙述补充或删改的部分,以便阅读者了解检验工作的全过程,对检验样品的质量作出恰如其分的评价。

检验报告的结果部分,用表格将各试验组、阳性对照、阴性对照及其他对照组的数据列出(定性的对照可用文字加以说明)。试验组应列出其杀灭对数值,杀灭对数值 ≥ 5.00 时,无须列出具体的数值,当杀灭对数值 ≤ 5.00 时,则应列出具体的杀灭对数值。并用文字简要叙述所得的结果。

检验报告的结论部分,应根据试验结果得出明确的结论。

此外,对试验中出现某些异常现象亦应加以说明。

1.4.9 检测结果评价

消毒效果试验、理化检验和毒理学实验针对的是检测样品。样品的代表性越好,检测结果就越能反应消毒产品的实际质量,越能反应该产品的安全性和有效性。当消毒效果试验、理化检验和毒理学实验均符合要求时才可以认为该产品的检测结果合格。

1.4.9.1 理化检验结果评价 符合下列所有条件的消毒产品认为理化检验合格:

(1) 消毒剂有效成分符合我国允许的消毒剂组分,不含有抗生素、激素等各种处方药成分和卫

生部规定的禁用物质。

(2) 用于皮肤黏膜消毒的消毒剂限量成分符合要求；用于饮用水、食品和餐饮具消毒的消毒剂其有毒有害成分在使用浓度下符合有关标准的限量要求；消毒器械产生的有毒有害物质符合有关标准和规范的限量要求。

(2) 消毒剂的成分与申报的配方一致。在产品有效期内，有效成分含量在企业标准规定的范围内，其含量变化小于 15%。

(3) 最小样品单位间的重量误差小于 15%，主要有效成分含量误差小于 15%。

(4) 用于金属物品消毒的消毒剂无金属腐蚀性，偶尔接触金属物品的消毒剂如果存在金属腐蚀性时在标识中有警示。

(5) 消毒剂的 pH 值在合理的范围内，并与企业标准一致。

1.4.9.2 消毒效果试验结果评价 符合下列所有条件的消毒产品认为消毒效果试验结果合格：

(1) 去除残留消毒剂效果的鉴定试验合格。

(2) 消毒产品的实验室试验结果符合下列条件：

a. 悬液定量试验时，每次试验对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌、白色葡萄球菌、枯草杆菌黑色变种芽孢的杀灭对数值 ≥ 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 ≥ 4.00 ，对脊髓灰质炎病毒-I 型疫苗株的灭活对数值 ≥ 4.00 。对照组微生物数在规定的范围内。

b. 载体定量试验（含载体流动浸泡）时，每次试验对各类微生物的杀灭对数值或灭活对数值 ≥ 3.00 ，对照组微生物数在规定的范围内。载体定性试验时，各次试验所有载体相应细菌芽孢均无生长，对照组微生物数在规定的范围内。

(3) 消毒模拟现场试验时，各次试验对试验微生物的杀灭对数值 ≥ 3.00 ，对照组微生物数在规定的范围内。灭菌模拟现场试验时，各次试验所有载体相应细菌芽孢均无生长，对照组微生物数在规定的范围内。根据消毒剂特定用途或试验特殊需要，增选其他菌、毒株所进行的试验也应该符合上述要求。

(4) 现场试验时，对消毒对象上自然菌的平均杀灭对数值 ≥ 1.0 ，对照组微生物数在规定的范围内。

1.4.9.3 毒理学实验的结果评价

直接用于人体的消毒剂所有毒理学项目应该合格。用于其他物品的消毒剂毒理学项目出现不合格时可以结合使用情况综合判定，但必须在产品说明书和标签中给预警示。

2 消毒产品检验技术规范

2.1 消毒剂杀灭微生物试验

2.1.1 适用范围

主要适用于消毒剂产品的消毒功效学方面的注册验证和日常监督检测,可用来评价各种用途的消毒剂对微生物的杀灭效果。本节中规定的实验方法,只是对消毒剂的杀菌能力方面进行验证,侧重反映消毒剂的实用剂量与杀菌能力。不能反映消毒剂的全面特性。

2.1.2 菌悬液与菌片的制备

2.1.2.1 适用范围

制备消毒剂杀菌试验用菌悬液与菌片,以供消毒剂杀菌试验时使用。

2.1.2.2 实验器材

(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ATCC 9372、龟分枝杆菌脓肿亚种ATCC19977、白色葡萄球菌 8032、白色念珠菌ATCC 10231、黑曲霉菌ATCC 16404。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。

(2) 有机干扰物:见附录A

(3) 磷酸盐缓冲液:见附录A

(4) 无菌蒸馏水

(5) 稀释液:见附录A

(6) 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A

(7) 真菌培养基:沙堡琼脂培养基(用于白色念珠菌),麦芽浸膏琼脂(MEA,用于黑曲霉菌)见附录A

(8) 分枝杆菌培养基:分枝杆菌干燥培养基,见附录A

(9) 革兰染色液:见附录A

(10) 芽孢染色液:见附录A

(11) 恒温水浴箱

(12) 玻璃漏斗

(13) 刻度吸管(1.0ml、5.0ml、10.0ml),毛细吸管

(14) 数字可调移液器(10 μ l, 20 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 1000 μ l)及配套用一次性塑料吸头

(15) 离心机

(16) 电动混合器

（17）浊度计

2.1.2.3 细菌悬液制备程序

（1）细菌繁殖体悬液的制备

1) 取冻干菌种管，在无菌操作下打开，以毛细吸管加入适量营养肉汤，轻柔吹吸数次，使菌种融化分散。取含 5.0 ml~10.0ml 营养肉汤培养基试管，滴入少许菌种悬液，置37℃培养 18h~24h。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，于37℃培养 18h~24h。挑取上述第2 代培养物中典型菌落，接种于营养琼脂斜面，于37℃培养18h~24h，即为第3代培养物。

2) 取菌种第3代~6代的营养琼脂培养基斜面新鲜培养物（18h~24h），用5.0ml吸管吸取 3.0ml~5.0ml 稀释液加入斜面试管内，反复吹吸，洗下菌苔。随后，用5.0ml吸管将洗液移至另一无菌试管中，用电动混合器混合（振荡）20s，或在手掌上振敲80次，以使细菌悬浮均匀。

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使用的浓度。

4) 细菌繁殖体悬液应保存在4℃冰箱内备用。应当天使用不得过夜。

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。

（2）细菌芽孢悬液的制备

1) 取冻干菌种管，在无菌操作下打开，以毛细吸管吸加适量营养肉汤培养基，轻柔吹吸数次，使菌种融化分散。取含5 ml~10ml营养肉汤培养基试管，滴入少许菌种悬液，置37℃培养 18h~24h。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，于37℃培养 18h~24h。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，于37℃培养 18h~24h，即为第 3 代培养物。

2) 用10.0ml 吸管吸取5.0 ml~10.0ml 第 3代~5代的18h~24h 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，将罗氏瓶置于37℃温箱内，培养 5d~7d。

3) 用接种环取菌样少许涂于玻片上，固定后以改良芽孢染色法染色，并在显微镜（油镜）下进行镜检。当芽孢形成率达 95% 以上时，即可进行以下处理。否则，应继续在室温下放置一定时间，直至达到上述芽孢形成率后再进行以下处理。

改良芽孢染色法：①用接种环取菌样涂布于玻片上，待自然干燥。而后通过火焰加热将菌固定于玻片上。②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℃~56℃ 条件下，加热 30min。取出，去滤纸，用自来水冲洗残留孔雀绿溶液。

③加0.5% 沙黄水溶液，染1min。水洗，待干后镜检。芽孢呈绿色，菌体呈红色。

4) 罗氏瓶培养物，用10.0ml 吸管加10.0ml 无菌蒸馏水于每一罗氏瓶中，以L棒轻轻推刮下菌苔。吸出第一批洗下的菌悬液，再向瓶内吸加5.0ml 无菌蒸馏水，重复洗菌一遍。将第一和第二批洗下的菌悬液集中于一含玻璃珠的无菌三角烧瓶中，振摇5min，打碎菌块，使成均匀的芽孢

悬液。

5) 必要时, 将盛装菌悬液的三角烧瓶置45℃水浴中 24h, 使菌自溶断链, 分散成单个芽孢。

6) 用无菌棉花或纱布过滤芽孢悬液, 清除其中的琼脂凝块。

7) 将过滤后的芽孢悬液, 置无菌离心管内, 以3000 r/min 速度离心 30min。弃上清液, 加蒸馏水吹吸使芽孢重新悬浮。再离心和重新悬浮清洗, 先后共3遍。

8) 将洗净的芽孢悬浮于三角烧瓶内蒸馏水中, 并加入适量小玻璃珠。

9) 将芽孢液放于80℃水浴中 10min (或60℃, 30min), 以杀灭残余的细菌繁殖体。待冷至室温后, 保存于4℃冰箱中备用。有效使用期为半年。

10) 芽孢悬液在使用时, 应先进行活菌培养计数。

11) 怀疑有杂菌污染时, 应以菌落形态、革兰染色与生化试验等法进行鉴定。

2.1.2.4 菌片的制备程序

(1) 消毒试验中使用的菌片是以菌液滴加于载体上制成。载体应根据消毒对象选择, 常用的有金属、玻璃、滤纸、线、棉布等。根据其特点选择适宜材料载体作为代表。载体可以为方形, 大小为 10mm×10mm。当以金属片为载体时, 因方形金属载体在振敲时可将玻璃试管撞碎, 故改用 12mm 直径圆形金属片 (厚 0.5mm)。

(2) 所用载体 (除滤纸片外) 于染菌前, 应进行脱脂处理。脱脂方法如下: ①将载体放在含洗涤剂的水中煮沸30 min; ②以自来水洗净; ③用蒸馏水煮沸 10min; ④用蒸馏水漂洗至 pH 呈中性; ⑤晾干、熨平备用。

(3) 布片用白平纹棉布制作。在剪开前, 先将脱脂的布块按载体规定的大小, 抽去边缘一周的经纬纱各一根, 再按抽纱痕剪开。此法制成的载体大小一致, 且无毛边。金属片以不锈钢制作, 纸片以新华滤纸制作。

(4) 载体经压力蒸汽灭菌后, 使用滴染法染菌。

染菌用菌悬液: 应使用稀释液配制。细菌繁殖体可先用稀释液洗脱经18h~24h培养的新鲜斜面培养物制成洗脱液; 细菌芽孢可使用4℃冰箱贮存液。取1份菌悬液, 加入9份稀释液中, 混合均匀, 使其中的含菌量约为 2×10^8 cfu/ml~ 1×10^9 cfu/ml, 可使用浊度计调整菌液浓度, 然后根据消毒对象的不同加入等量3%或0.3%的牛血清白蛋白, 使菌液的浓度为 1×10^8 cfu/ml~ 5×10^8 cfu/ml。

滴染法染菌时, 将经灭菌的载体片平铺于无菌平皿内, 逐片滴加菌液。菌液滴加量每片为10 μ l。用10 μ l移液器接灭菌塑料吸头滴染菌液, 并用接种环涂匀整个载体表面。滴染菌液后, 染菌载体可置37℃温箱内干燥 (约20min~30min), 或置室温下自然阴干后再使用。

(5) 每个菌片的回收菌数, 按活菌培养计数所得结果, 应为 1×10^6 cfu/片~ 5×10^6 cfu/片。

2.1.2.5 注意事项

(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），必须以活菌培养计数的实测结果为准，不得使用根据比浊法判定的估计值。

（2）滴染时，菌液滴加量不宜过多，避免流散影响染菌的准确性。

（3）细菌繁殖体在载体上干燥的过程中，可引起部分死亡，如铜绿假单胞菌在37℃干燥过程中，滴度最高可下降1个对数值。此时，应提高初始菌浓度，以便达到所需的菌量。

（4）配制菌悬液和制备菌片时，严格按无菌要求操作，以防污染杂菌，影响随后杀菌试验的结果。

（5）用带橡皮塞的容器保存菌液时，应将其预先煮沸10min 进行脱硫处理。

（6）制得的菌悬液和菌片，用毕应随时放入冰箱内，尽量减少在室温下放置时间，以减少细菌的自然死亡。

2.1.3 活菌培养计数技术

2.1.3.1 适用范围

测定细菌悬液、菌片、采样液等样本中含有活菌的数量。

2.1.3.2 实验器材

（1）刻度吸管（1.0ml、5.0ml）

（2）稀释液：见附录A。

（3）营养琼脂培养基：见附录A

（4）电动混合器

2.1.3.3 操作程序

本规范要求在进行杀菌试验中的活菌培养计数统一使用倾注法。其操作程序如下。

（1）对菌悬液可直接进行培养计数。对菌片、采样棉拭与小型固体样本等，应将其上的细菌洗下成为菌悬液后进行培养计数。洗菌时，一般以稀释液为洗液。具体方法如下：取含 5.0ml 稀释液无菌试管，对菌片或小型固体样本直接投入即可，对棉拭则将其采样端剪入管内，每管一份样本。而后，用电动混合器混合20s（或在手掌上用力振敲 80 次），将菌洗下形成菌悬液。以上操作应严格按无菌要求进行。

（2）将试管按需要数量分组排列于试管架上， 每管加入 4.5ml 稀释液。各组由左向右，逐管标上 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} ……等。

（3）将菌悬液样本在用电动混合器混合20s（或在手掌上用力振敲 80次），随即吸取 0.5ml 加至 10^{-1} 管内。

（4）将 10^{-1} 管依前法用电动混合器混合20s（或在手掌上用力振敲 80次），混匀，再吸取出0.5ml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。

（5）选择适宜稀释度试管（以预计生长菌落数每平板为 15cfu~300cfu 者为宜），吸取其中混合均匀的悬液 1.0ml 加于无菌平皿内。每一稀释度接种 2个平皿。一般需接种2个~3个不同稀释度。平皿加样前，应先按组编号，以免弄混。

(6) 将冷至40℃~45℃熔化的适宜培养基，倾注于已加入样液的平皿中，每平皿15ml~20ml。

(7) 将平皿盖好，即刻轻轻摇动混匀，平放于台上。待琼脂凝固后，翻转平皿，使底向上，置37℃温箱内培养。

(8) 每日观察细菌生长情况。培养至规定时间（细菌繁殖体为 48h，白色念珠菌与细菌芽孢为 72h），计数最终结果的菌落数。

(9) 对菌片和采样棉拭洗液的活菌培养计数，先按各试验要求处理（如去除残留消毒剂等），而后取其最终样液按上法进行培养计数。

(10) 计数菌落时，一般以肉眼观察，必要时用放大镜检查。以菌落数在15cfu~300cfu的平板为准，以该2个平板的菌落平均值作为结果；但对黑曲霉菌活菌计数及杀灭试验时，平板菌落数应在15cfu~100cfu之间。

对估计菌量极少的样本（如消毒处理后样本），在培养计数时可不作稀释，即使平板菌落数未达15时，亦可用其计算最终结果。

将求得的平均菌落值，再乘以稀释倍数，即得每毫升原样液中的菌量。菌量单位为cfu。

2.1.3.4 活菌计数中技术操作误差的测定

试验者在活菌计数中因技术操作而引起的菌落数误差率（平板间、稀释度间）不宜超过10%。对误差率的自检，可按以下公式计算。

(1) 平板间误差率计算公式：

$$\text{平板间误差率} = \frac{\text{平板间菌落数平均差}}{\text{平板间菌落平均数}} \times 100\%$$

$$\text{平板间菌落数平均差} = \frac{(\text{平板间菌落平均数} - \text{各平板菌落数}) \text{的绝对值之和}}{\text{平板数}}$$

$$\text{平板间菌落平均数} = \frac{\text{各平板菌落数之和}}{\text{平板数}}$$

(2) 稀释度间误差率计算公式：

$$\text{稀释度间菌落数误差率} = \frac{\text{稀释度间菌落数平均差}}{\text{稀释度间菌落平均数}} \times 100\%$$

$$\text{稀释度间菌落平均差} = \frac{(\text{稀释度间菌落平均数} - \text{各稀释度菌落数}) \text{的绝对值之和}}{\text{稀释度数}}$$

$$\text{稀释度间菌落平均数} = \frac{\text{各稀释度平均菌落数之和}}{\text{稀释度数}}$$

2.1.3.5 注意事项

- (1) 严格无菌操作，防止污染。
- (2) 认真检查实验器材有无破损（要特别注意试管底的裂痕和破洞），以防丢失样本和污染环境。
- (3) 注意菌液的均匀分散。
- (4) 稀释或取液时要准确，尽量减少吸管使用中产生的误差。
- (5) 每吸取一个稀释度样液，必须更换一支吸管，以减少误差。
- (6) 样液接种于平皿后应尽快倾注营养琼脂培养基，避免样液干燥于平皿上，影响结果的准确性。
- (7) 倾注时琼脂培养基温度不得超过45℃，以防损伤细菌或真菌。倾注和摇动时，动作应尽量平稳，以利细菌分散均匀，便于计数菌落。勿使培养基外溢，以免影响结果的准确性和造成环境的污染。
- (8) 为提高试验成功率，最好先用浊度计对原菌液含菌量做出估计，尽可能在首次试验时所取的有限稀释范围内（2个~3个 稀释度）即有长菌在 15cfu~300cfu 之间的平板。
- (9) 结果计算时，必须弄清稀释倍数，以免计算错误。

2.1.4 残留消毒剂的去除方法

2.1.4.1 目的

在化学消毒试验中，达到规定消毒时间终点时，要求立即终止残留消毒剂的继续作用，以便准确检测出消毒体系中残留存活的微生物及其数量。因为消毒体系中残留的消毒剂，可能对微生物的生长繁殖具有一定抑制作用，从而可导致对杀菌效果偏好的错误判断，甚至产生假阴性结果。残留消毒剂的去除，可排除残留消毒剂对微生物的抑制作用，从而使试验获得正确结果。

2.1.4.2 残留消毒剂去除的原则

- (1) 可有效去除残留的消毒剂。
- (2) 对微生物无害，不减少微生物应有的回收量。
- (3) 不破坏培养基的营养成份，不影响其透明度。
- (4) 必须按规定方法进行鉴定试验，并认为合格者方可在相应的消毒试验中使用。

2.1.4.3 残留消毒剂去除的方法

(1) 稀释中和法（又称中和剂法），是指在消毒剂与微生物作用到达规定时间的终点时，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，使其不再持续抑制或杀灭微生物的方法。本法同时含有稀释作用效果（至少对倍稀释，常用10倍稀释），是最为普遍使用的方法。

对常用消毒剂，虽有一些中和剂介绍，但在实用中由于情况多变，效果不一定都理想。所以，

在消毒试验前仍应将拟用中和剂按试验具体情况，经鉴定合格后再使用。

操作要点：①对接触消毒剂的微生物样本，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；②所用中和剂的浓度与容量应与鉴定试验结果规定的相同；③即刻混匀，并按规定时间吸取样液进行随后的培养检测；④在将样本接种培养基以前的操作，应按规定时间内进行，以免微生物与中和剂或中和产物接触过久。

（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剂试验中，如以植物提取物制备的消毒剂。本除药方法应按拟进行试验具体情况，经鉴定合格后再使用。

操作要点：①准备好装有相应孔径微孔滤膜的滤器；②滤膜及滤器需先经灭菌处理；③初次过滤后，应使用一定量对微生物无害的稀释液进行冲洗，冲洗次数一般以洗净消毒剂为准；④最后一次冲洗、滤净后，将微孔滤膜以无菌操作法取出，进行随后的培养检测。

2.1.4.4 注意事项

（1）处理时应严守无菌操作要求，所有试液须无菌，接触样本和试液的器材（如吸管、平皿、试管、滤材等）亦均须经灭菌，以免污染样本，影响试验结果。

（2）每次吸液，均须更换一支无菌吸管，以防交叉污染。此点由于操作繁琐，器材需求量大，往往不能认真执行，应加以注意。

（3）为保证试验的准确性，所用吸管的容量应尽量与拟吸取的液体量相近，不要用大吸管吸取少量液体；试验样本的混匀操作，必须认真进行；尽量减少中和剂或中和产物与试验微生物的接触时间。

（4）所用方法适宜与否，和消毒剂性质、复方中的附加成份、试验微生物种类、消毒试验种类等等均有关系，试验条件稍有改变就可能影响除药效果。故每进行一种消毒试验（包括消毒剂或微生物的更换），均需按规定对所选方法进行鉴定试验，合格者方可用于正式试验。此步骤绝不可省略，否则极有可能导致试验产生错误结果。

2.1.5 中和剂鉴定试验

2.1.5.1 目的

确定所选中和剂是否适用于拟进行的细菌和真菌杀灭试验。

2.1.5.2 实验器材

- （1）实验菌悬液和菌片（见 2.1.2）
- （2）刻度吸管（1.0ml、5.0ml）
- （3）小平皿（4cm~6cm 直径）
- （4）恒温水浴箱
- （5）稀释液：见附录A

(6) 培养基：见附录A

(7) 电动混合器

2.1.5.3 试验设计原则

(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对测试消毒剂有良好的中和作用，对试验用细菌以及其恢复期培养是否有害或不良影响。

(2) 试验中所用消毒剂的浓度应以杀菌试验中使用的最高浓度为准。否则，不足以显示能否将高浓度消毒剂全部中和。

(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，不得取代。对细菌繁殖体的试验，在大肠杆菌（8099）、金黄色葡萄球菌（ATCC 6538）、铜绿假单胞菌（ATCC 15442）中任选其一进行试验即可；对细菌芽孢，以枯草杆菌黑色变种（ATCC 9372）芽孢进行。

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。

(4) 鉴定时根据所用杀菌试验方法，使用相应的悬液或载体定量试验。

2.1.5.4 实验分组

在细菌与真菌杀灭试验中所用除药方法的鉴定，至少应平行进行以下各组试验。

(1) 中和剂 + 菌悬液 → 培养

观察中和剂是否抑菌。

(2) (消毒剂 + 中和剂) + 菌液 → 培养

观察中和产物，或未被完全中和的残留消毒剂对细菌有无抑制作用。

(3) 稀释液 + 菌悬液 → 培养

作为菌悬液阳性对照。

(4) 稀释液 + 中和剂 + 培养基 → 培养

作为试验材料阴性对照。

2.1.5.5 中和剂悬液定量鉴定试验操作程序

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 2.5×10^3 cfu/ml~ 1.5×10^4 cfu/ml，作为实验菌悬液。

(1) 第 1 组 取0.4ml标准硬水于试管内，加入4.5ml中和剂，混匀，置 $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 水浴中 5min 后，再加入0.1ml实验菌悬液，混匀，作用 10min，分别吸取 1.0ml，接种于两个平皿中，做活菌培养计数。

(2) 第 2 组 取0.4ml消毒剂于试管内，加入4.5ml中和剂，（对于酸性氧化电位水检测时，取0.5ml消毒剂于试管内，加入4.4ml中和剂）混匀，置 $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 水浴中 5min 后，再加入0.1ml实验菌悬液，混匀，作用 10min，分别吸取 1.0ml，接种于两个平皿中，做活菌培养计数。

(3) 第 3 组 取0.4ml标准硬水于试管内，加入4.5ml稀释液，混匀，置 $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 水浴中 5min 后，再加入0.1ml实验菌悬液，混匀，作用 10min，分别吸取 1.0ml，接种于两个平皿中，

做活菌培养计数。

(4) 第 4 组 分别吸取稀释液、标准硬水与中和剂各0.5ml于同一无菌小平皿内，倒入上述试验同批次的培养基15ml~20ml，培养观察。如出现细菌生长，可能提示试验材料或操作过程中有污染。应重新进行试验。

2.1.5.6 中和剂载体定量鉴定试验操作程序

根据实验分组，准备足量试管和平皿，依次进行编号。各组分别用适宜大小容量的无菌定量吸管按以下程序吸取或添加试剂和试验样本。

(1) 第 1 组 吸取中和剂 5.0ml 于无菌小平皿中，将其置 20℃±1℃ 水浴中 5min 后，用无菌镊子夹入 1 菌片，并使浸透于中和剂内，作用 10min。立即用无菌镊子取出菌片移入含 5.0ml 中和剂试管中，用电动混合器混合20s，或将试管振打 80 次，混匀，分别吸取 1.0ml，接种于两个平皿中，做活菌培养计数。

(2) 第 2 组 吸取中和产物溶液（以浸有消毒剂的载体置 5.0ml 中和剂内，作用 10min）5.0ml 于无菌小平皿内，将其置 20℃±1℃ 水浴中 5min 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 10min，用无菌镊子取出菌片，移入含 5.0ml 中和产物溶液的试管中，用电动混合器混合20s，或将试管振打 80 次，混匀。分别吸取 1.0ml，接种于两个平皿中，做活菌培养计数。

(3) 第 3 组 吸取稀释液 5.0ml 于无菌小平皿内，将其置 20℃±1℃ 水浴中 5min 后，用无菌镊子夹入 1 菌片，并使浸透于稀释液中。作用10min，立即用无菌镊子取出菌片移入含 5.0ml 稀释液的试管中，用电动混合器混合20s，或将试管振打 80 次，混匀，分别吸取 1.0ml，接种于两个平皿中，做活菌培养计数。

(4) 第 4 组 分别吸取稀释液与中和剂各1.0ml于同一无菌小平皿内，倒入上述试验同批次的培养基15ml~20ml，培养观察。如出现细菌生长，可能提示试验材料或操作过程中有污染。应重新进行试验。

2.1.5.7 评价规定

实验结果符合以下全部条件，所测中和剂可判为合格：

(1) 第 1、2和3组有相似量实验菌生长，悬液试验在 2.5×10^3 cfu/ml~ 1.5×10^4 cfu/ml 之间，载体试验在 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%。第1、2和3组间菌落数误差率计算公式如下。

$$\text{组间菌落数误差率} = \frac{(\text{3组间菌落平均数} - \text{各组菌落平均数}) \text{的绝对值之和}}{3 \times \text{3组间菌落平均数}} \times 100\%$$

(2) 第4组无菌生长。否则，说明试剂有污染，应更换无污染的试剂重新进行试验。

(3) 连续 3 次试验取得合格评价。

2.1.5.8 注意事项

- (1) 试验所分各组均有其特定意义，不得任意删减。
- (2) 严守无菌操作，保持试验用液和器材的无菌，注意更换吸管，以防止沾染影响试验的准确性。
- (3) 实验组序应按本规范所列排列。

2.1.6 过滤冲洗法去除残留消毒剂试验

2.1.6.1 目的

通过滤膜过滤和冲洗的方法，去除消毒体系中的残留消毒剂，使消毒剂鉴定试验显示出真正的杀菌效果。

2.1.6.2 实验器材

- (1) 过滤冲洗法需用经过灭菌处理的滤器、微孔滤膜（孔径为0.45μ）、真空泵（或抽滤泵）。
- (2) 稀释液（TPS）见附录A
- (3) 冲洗液 要求不应影响滤膜的性质，对微生物无伤害作用。常用的有：水、缓冲液（如PBS）、稀释液、0.5%吐温80的PBS、中和剂（可中和部分消毒成分）。
- (4) 其他器材随所用试验微生物而定。

2.1.6.3 试验设计原则

(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，对试验用微生物以及其恢复期培养是否有害或不良影响。

(2) 试验中所用消毒剂的浓度应以杀菌试验中使用的最高浓度为准。否则，不足以显示能否将高浓度消毒剂全部去除。

(3) 同一消毒剂拟对多种微生物进行杀灭试验时，所用过滤冲洗去除法应按微生物种类分别进行鉴定试验，不得互相取代。对细菌繁殖体的试验，可在大肠杆菌（8099）、铜绿假单胞菌（ATCC 15442）或金黄色葡萄球菌（ATCC 6538）中任选其一进行试验即可；对细菌芽孢，以枯草杆菌黑色变种（ATCC 9372）芽孢进行。

当用其他特定微生物（如龟分枝杆菌脓肿亚种）进行杀灭试验时，均应以该特定微生物再次进行除药方法的鉴定试验。

(4) 鉴定中应根据正式杀灭试验的设计，选择使用悬液定量试验，还是载体定量试验。通常，悬液鉴定试验结果可用于载体试验。

2.1.6.4 过滤冲洗去除方法的鉴定

(1) 分组方法如下：

第1组（菌悬液 + 水） + 过滤冲洗处理 → 培养

观察除药处理是否影响实验菌的生长数量。

第2组 菌悬液 → 过滤 + 过滤冲洗 → 培养

过滤作用的影响

第3 组干扰物+稀释液+消毒剂→过滤+冲洗过滤+菌悬液→过滤+冲洗过滤→培养

消毒剂、有机干扰物对过滤冲洗法的影响

(2) 操作程序如下:

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 2.5×10^2 cfu/ml $\sim 1.0 \times 10^3$ cfu/ml,作为实验菌悬液。

1) 第 1 组 吸取1.0ml实验菌悬液于试管内,加入4.0ml标准硬水,混匀。取 1.0ml 加入到过滤器中,然后加入50ml蒸馏水(预先置 $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 水浴中 5min)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 37°C 培养箱中培养48h,计数菌落数。

2) 第 2 组 吸取0.2ml实验菌悬液直接加入到过滤器中,然后加入150ml至500ml冲洗液(预先置 $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 水浴中 5min)于过滤器中,做第1次冲洗过滤处理,再加入50ml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 37°C 培养箱中培养48h(真菌和芽孢培养72h),计数菌落数。

3) 第3 组吸取4.0ml消毒剂于试管中,加入0.5ml有机干扰物,再加入0.5ml稀释液,混匀,取 1.0ml加入到过滤器中,加入150至500ml冲洗液(预先置 $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 水浴中 5min)做第1次冲洗过滤处理,再加入50ml冲洗液做第2次冲洗过滤处理,冲洗后吸取0.2ml实验菌悬液直接加入到过滤器中,再加入50ml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,放置在 37°C 培养箱中培养48h(真菌和芽孢培养72h),计数菌落数。

(3) 评价规定

试验结果符合以下全部条件,所测中和剂可判为合格:

1) 第 1、2 和3 组测定的结果,微生物数量应在 2.5×10^2 cfu/ml $\sim 1 \times 10^3$ cfu/ml 之间,其组间差不得超过3组回收菌数平均值的15%。组间差的计算可按下式进行:

$$\text{组间菌落数误差率} = \frac{(\text{3组间菌落平均数} - \text{各组菌落平均数}) \text{的绝对值之和}}{3 \times \text{三组间菌落平均数}} \times 100\%$$

2) 连续 3 次试验取得合格评价。

2.1.6.5 注意事项 见 2.1.5.8。

2.1.7 细菌定量杀灭试验

2.1.7.1 目的

在实验室内测定消毒剂杀灭悬液中或载体上细菌繁殖体和细菌芽孢所需剂量,以验证实用消毒剂量。

2.1.7.2 实验器材

(1) 按 2.1.2 所示方法制备的金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌和枯草杆菌黑色变种芽孢悬液或菌片。此外,根据消毒剂特定用途或试验特殊需要,准备其他菌种的悬液或菌片。

(2) 消毒剂溶液除有特殊规定者外,应使用无菌硬水配制。消毒剂溶液浓度应以所含有效

成份为准。例如，含氯消毒剂以所含有效氯浓度为准，碘伏以所含有效碘为准，过氧乙酸以所含过氧乙酸量为准，复方消毒剂浓度以主要杀菌有效成分含量为准。各组消毒剂溶液有效成份浓度的计算，应以实验菌与消毒剂的混合液中有效成份的最终浓度为准。

(3) 去除残留消毒剂的中和剂或设备（经鉴定试验证实合格的中和剂或有关器材）。

(4) 消毒剂稀释用标准硬水：见附录A。

(5) 有机干扰物质。悬液试验和载体试验用牛血清白蛋白溶液，本规范中规定使用 3.0% 牛血清白蛋白，代表一般污染对象上可能存在的有机物水平；0.3%牛血清白蛋白，代表先经清洁操作，然后进行消毒处理的对象上可能存在的有机物水平、或连续冲洗消毒的物品上污染的有机物水平。有机干扰物的配置方法见附录A。

(6) TSA培养基：见附录A

(7) 含中和剂的胰蛋白胍大豆肉汤培养基（中和剂TSB），中和剂经鉴定合格。

(8) 刻度吸管（1.0ml、5.0ml）

(9) 恒温水浴箱

(10) 电动混合器

(11) 秒表

2.1.7.3 实验分组

试验中应分以下各组：

(1) 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，选定实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20min，则应进行10min、20min和30min 3个时间）进行试验。

第二种适用于消毒产品监督机构日常监测。根据所试菌种和消毒剂对该菌的杀灭能力，选定一株抗力较强的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1个作用时间（说明书指定最短作用时间）进行试验。

(2) 阳性对照组。根据各种试验的规定，用标准硬水代替消毒剂溶液，按上述同样的步骤进行试验。所得结果代表菌液原有浓度，以其作为计算杀灭对数的初始浓度。

2.1.7.4 悬液定量杀菌试验操作程序

(1) 按照2.1.2 配制实验用菌悬液，使其浓度为 1×10^8 cfu/ml $\sim 5 \times 10^8$ cfu/ml（回收菌落数为 1×10^7 cfu/ml $\sim 5 \times 10^7$ cfu/ml）。

(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200mg/L，则应配制250mg/L），置 $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 水浴备用。

(3) 取消毒试验用无菌大试管，先加入0.5ml试验用菌悬液，再加入0.5ml有机干扰物质，

混匀，置 $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 水浴中 5min 后，用无菌吸管吸取上述浓度消毒液 4.0ml 注入其中，迅速混匀并立即记时。

(4) 待实验菌与消毒剂相互作用至各预定时间，分别吸取 0.5ml 实验菌与消毒剂混合液加于 4.5ml 经灭菌的中和剂中，混匀。

(5) 各管实验菌与消毒剂混合液经加中和剂作用 10min 后，分别吸取 1.0ml 样液，按活菌培养计数方法测定存活菌数，每管样液接种 2 个平皿即可。如平板上生长的菌落数较多时，可进行系列 10 倍稀释后，再进行活菌培养计数。

(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。

(7) 所有试验样本均在 37°C 温箱中培养，对细菌繁殖体培养 48h 观察最终结果；对细菌芽孢需培养 72h 观察最终结果。

(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)，然后按下式计算杀灭对数值：

杀灭对数值 (KL) = 对照组平均活菌浓度的对数值 (N_0) - 实验组活菌浓度对数值 (N_x)

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，如果消毒实验组消毒处理后平均生长菌落数小于 1 时，本规范规定此时的杀灭对数值，即大于等于对照组平均活菌浓度的对数值。即 $KL \geq \text{Log}(N_0)$ 。

2.1.7.5 载体浸泡杀菌试验操作程序

(1) 载体浸泡定量杀菌试验操作程序

1) 按照 2.1.2.4 制配实验用菌片，使每个菌片的回收菌落数为 1×10^6 cfu/片 $\sim 5 \times 10^6$ cfu/片。

2) 取无菌小平皿，标明所注入消毒液的浓度。按每片 5.0ml 的量，吸取相应浓度的消毒剂溶液注入平皿中。

3) 将盛有消毒剂平皿置 $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 水浴箱内 5min 后，用无菌镊子分别放入预先制备的菌片 3 片，并使之浸没于消毒液中。

4) 待菌药相互作用至各预定时间，用无菌镊子将菌片取出分别移入一含 5.0ml 中和剂试管中。用电动混合器混合 20s，或将试管在手掌上振敲 80 次，使菌片上的细菌被洗脱进入中和液中，再放置 5min 以上，使中和作用充分。最终进一步混匀后，吸取 1.0ml 直接接种平皿，每管接种 2 个平皿，测定存活菌数。

5) 另取一平皿，注入 10.0ml 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。

6) 所有试验样本均在 37°C 温箱中培养，对细菌繁殖体培养 48h 观察最终结果；对细菌芽孢需培养 72h 观察最终结果。

7) 试验重复 3 次 (包括对照)，计算各组的活菌量 (cfu/片)，并换算为对数值 (N)，

然后按2.1.7.4(8)公式计算杀灭对数值。

(2) 载体浸泡定性灭菌试验操作程序

1) 按照2.1.2.4 制配实验用菌片, 使每个菌片的回收菌落数为 1×10^6 cfu/片 $\sim 5 \times 10^6$ cfu/片。

2) 取无菌小平皿, 标明所注入消毒液的浓度。按每片5.0ml的量, 吸取相应浓度的消毒剂溶液注入平皿中。

3) 将盛有消毒剂平皿置 $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 水浴箱内5min后, 用无菌镊子分别放入预先制备的菌片6片, (每个作用时间2片菌片) 并使之浸没于消毒液中。

4) 待实验菌与消毒液相互作用至各预定时间, 用无菌镊子将菌片取出分别移入一含5.0ml中和剂TSB试管中。用电动混合器混合20s, 作为实验组样本。

5) 另取一平皿, 注入20.0ml标准硬水代替消毒液, 放入4片菌片, 作用至预定时间, 取出2片, 分别移入含5ml中和剂TSB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5.0ml中和剂试管中, 用电动混合器混合20s, 或将试管在手掌上振敲80次, 然后用稀释液做10倍系列稀释, 选择适宜稀释度, 吸取1.0ml接种平皿, 每管接种2个平皿, 做活菌培养计数, 作为菌数对照组样本。

6) 所有试验样本均在 37°C 温箱中培养, 对细菌繁殖体培养48h, 观察最终结果; 对细菌芽孢需培养7d, 观察最终结果。

7) 试验重复5次(包括对照), 计算各组的活菌量(cfu/片)。

2.1.7.6 流动浸泡载体定量杀灭试验操作程序

(1) 按照2.1.2.4 制配实验用菌片, 使每个菌片的回收菌落数为 1×10^6 cfu/片 $\sim 5 \times 10^6$ cfu/片。

(2) 开启臭氧水消毒设备, 待产生的酸性氧化电位水或臭氧水中有效成分处于稳定状态时, 进行杀灭试验。

(3) 取尼龙网片或不锈钢网片放250ml烧杯底部中央, 将染菌载体放于尼龙网片或不锈钢网片表面, 染菌载体上再盖一尼龙网片或不锈钢网片。将臭氧水通过管路沿烧杯壁流下, 流动浸泡消毒至规定作用时间, 用无菌镊子将染菌载体取出分别移入一含5.0ml中和剂试管中。用电动混合器混合20s或将试管在手掌上振敲80次, 使菌片上的细菌被洗脱进入中和液中, 再放置5min以上, 使中和作用充分。最终进一步混匀后, 吸取1.0ml直接接种平皿, 每管接种2个平皿, 作为实验组样本。

(4) 另取两个染菌载体放入250ml烧杯中, 放置方法与实验组相同。以自来水代替臭氧水, 在相同流量下流动浸泡至最长作用时间, 其余步骤与实验组相同, 作为阳性对照组样本。

(5) 分别吸取稀释液与中和剂各1.0ml于同一无菌平皿内, 倒入上述试验同批次的培养基15ml $\sim$ 20ml, 作为阴性对照样本。

(6) 所有试验样本均在 37°C (黑曲霉菌在 30°C) 培养箱中培养, 对细菌繁殖体培养48h 观

察最终结果；对真菌和细菌芽孢需培养 72h 观察最终结果。

(7) 试验重复 3 次（包括对照），计算各组的活菌量（cfu/片），并换算为对数值（N），然后按2.1.7.4（8）公式计算杀灭对数值。

2.1.7.7 滤膜过滤悬液定量杀灭试验

(1) 菌悬液的制备和定量杀灭试验同2.1.7.4（1）、（2）和（3）。

(2) 待实验菌与消毒剂相互作用至各预定时间，分别吸取1.0ml实验菌与消毒剂混合液加入到过滤器中过滤，然后加入150至500ml冲洗液（预先置 $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 水浴中 5min）做第1次冲洗过滤处理，再加入50ml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 37°C 培养箱中培养48h。

(3) 吸取0.5ml实验菌悬液于试管内，加入0.5ml有机干扰物，再加入4.0ml标准硬水，混匀。做10倍系列稀释后 取适当稀释度该混合液1.0ml加入到过滤器中，然后加入50ml蒸馏水（预先置 $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 水浴中 5min）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 37°C 培养箱中培养48h，计数菌落数，作为阳性对照。

(4) 分别吸取稀释液、蒸馏水和硬水各1.0ml于同一无菌平皿内，倒入上述试验同批次的培养基15ml~20ml，放置在 37°C 培养箱中培养48h，计数菌落数，作为阴性对照。

(5) 试验重复 3 次（包括对照），计算各组的活菌量（cfu/ml或片），并换算为对数值（N），然后按2.1.7.4（8）公式计算杀灭对数值。

2.1.7.8 评价规定

(1) 产品监督检验，在产品说明书指定的最低浓度与最短作用时间，重复试验3次。要求悬液定量杀灭试验中，各次的杀灭对数值均 ≥ 5.00 ，可判定为消毒合格。要求载体定量杀灭试验，各次的杀灭对数值均 ≥ 3.00 ，可判定消毒合格。

(2) 产品申报卫生许可检验中，要求在产品说明书指定的浓度与3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均应 ≥ 5.00 。要求载体定量杀灭试验和流动浸泡载体定量杀灭试验中，各次的杀灭对数均应 ≥ 3.00 ，可判定为消毒合格。在产品指定浓度与最短作用时间的0.5倍时，可容许对不同细菌或在部分重复次数中，出现不合格结果。

在申报卫生许可检验中，检验机构如果发现产品说明书指定的浓度与作用时间，与常规消毒剂剂量差异较大，不能进行消毒试验评价时，可根据专业知识合理调整其浓度与时间，然后再进行测试。

(3) 对载体浸泡定性灭菌试验，阳性对照组应有菌生长，菌数对照组符合要求，阴性对照组应无菌生长，5 次试验所有作用时间均无菌生长为灭菌合格。

(4) 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，杀灭对数值大于5.00时，应表示为 ≥ 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）。

2.1.7.9 注意事项

(1) 在杀菌试验中，每次均应设置阳性对照。

(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，则全部试验需换用未污染试剂或培养基重做。

(3) 悬液定量杀菌试验时，有机干扰物质一般采用3.0% (W/V) 牛血清白蛋白贮存溶液，在消毒体系中稀释10倍（含量为0.3%），进行消毒试验。如果某消毒剂使用说明书中指定，其产品只用于清洁物品或器械的消毒或只用于冲洗浸泡消毒，可采用0.3% (W/V) 牛血清白蛋白贮存溶液，在消毒体系中稀释10倍（含量为0.03%），进行消毒试验。

2.1.8 杀灭分枝杆菌试验

2.1.8.1 目的

在实验室内测定消毒剂杀灭悬液中或载体上分枝杆菌所需剂量，以作为制定对分枝杆菌（包括结核杆菌）实用消毒剂量的参考。

2.1.8.2 实验器材

- (1) 实验菌株 龟分枝杆菌脓肿亚种 CA 93326 (ATCC 19977)
- (2) 培养基 分枝杆菌干燥培养基（上海奥普生物医药有限公司）
- (3) 实验菌及其菌悬液或菌片的制备
- (4) 中和剂（根据 2.1.5 所示方法鉴定合格者）
- (5) 稀释液 0.1% 胰蛋白胨的生理盐水溶液
- (6) 消毒剂稀释用硬水：见附录 A
- (7) 有机干扰物质：见附录 A
- (8) 刻度吸管（0.1ml、1.0ml、5.0ml）
- (9) 恒温水浴箱
- (10) 电动混合器
- (11) 计时装置
- (12) 恒温培养箱

2.1.8.3 龟分枝杆菌脓肿亚种ATCC 19977 菌悬液的制备

(1) 取冻干菌种管，在无菌操作下打开，以毛细吸管吸加适量营养肉汤于管中，轻柔吹吸数次，使菌种融化分散。取含 5.0ml~10.0ml 营养肉汤试管，滴入少许菌种悬液，置 37℃ 培养 18h~24h。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，于 37℃ 培养 72h。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，于 37℃ 培养 72h，即为第3代培养物。密封后，在4℃保存，时间不得超过6周。

(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新鲜培养物(72h)，用 5.0ml 吸管吸取 3.0ml~5.0ml 稀释液加入斜面试管内，反复吹吸，洗下菌苔。随后，用 5.0ml 吸管将洗液移至另一含

有6~7g玻璃珠的无菌圆锥底试管中,在电动混合器混合5min 然后将菌液吸入到另一试管内制成菌悬液。

(3) 将制成的菌悬液,进行活菌培养计数(见 2.1.3),按其结果用稀释液稀释至所需浓度。

(4) 菌悬液保存在4℃ 冰箱内备用,当天使用不得过夜。

2.1.8.4 实验分组

试验分为下列各组:

(1) 实验组,按 2.1.7.3 规定,选定消毒剂浓度与作用时间。

(2) 阳性对照组,以标准硬水代替消毒剂溶液,按 2.1.7.3 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初始浓度,并以其计算消毒因子对受试菌的杀灭对数值。

(3) 阴性对照组,观察同次试验用相关溶液和培养基有无污染。

2.1.8.5 试验程序

常用杀灭试验有:悬液定量杀灭试验、载体浸泡定量杀灭试验和流动浸泡载体定量杀菌试验等。其操作程序按 2.1.7.4,2.1.7.5和2.1.7.6 进行,接种后的平皿应放入干净的塑料袋内,在 37℃ 中培养7d,观察最终结果。

2.1.8.6 评价规定

(1) 产品监督检验,按产品使用说明书指定的使用浓度和作用时间,重复试验 3 次,要求悬液定量杀灭试验各次试验的杀灭对数值均 ≥ 4.00 ,要求载体定量杀灭试验各次试验的杀灭对数值均 ≥ 3.00 ,可判定该产品对分枝杆菌污染物消毒合格。

(2) 产品申报卫生许可检验,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。

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 ≥ 4.00 ,在产品规定使用浓度与最短作用时间的一半时,允许杀灭对数值 < 4.00 ,可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。

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 ≥ 3.00 ,在产品规定使用浓度与最短作用时间的一半时,允许杀灭对数值 < 3.00 ,可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。

2.1.8.7 注意事项

(1) 分枝杆菌试验操作应在生物安全 II 级实验室中进行,避免造成实验人员实验室感染和对环境污染。

(2) 其它注意事项见 2.1.7.9。

2.1.9 真菌杀灭试验

2.1.9.1 目的

在实验室内测定消毒剂杀灭悬液中或载体上真菌繁殖体或真菌孢子所需剂量,以作为制定实用消毒剂量的参考。

2.1.9.2 实验器材

(1) 麦芽浸膏琼脂 (MEA): 见附录 A。

(2) 沙堡琼脂培养基: 见附录 A。

(3) 实验菌及其菌悬液或菌片的制备

白色念珠菌 ATCC 10231 和黑曲霉菌 ATCC 16404 孢子悬液与菌片按 2.1.9.3 (1) 和 2.1.9.3 (2) 所示方法制备。

此外,根据消毒剂特定用途和特殊需要,可选用其它真菌或孢子悬液与菌片。

(4) 中和剂 (根据 2.1.5 所示方法鉴定合格者)。

(5) 磷酸盐缓冲液 (PBS, 0.03 mol/L, pH7.2)。

(6) 消毒剂稀释用硬水: 见附录 A。

(7) 有机干扰物质: 见附录 A。

(8) 刻度吸管 (0.1ml、1.0ml、5.0ml)。

(9) 恒温水浴箱。

(10) 电动混合器。

(12) 计时装置。

2.1.9.3 真菌悬液制备

(1) 白色念珠菌悬液的制备

1) 取冻干菌种管,在无菌操作下打开,以毛细吸管吸加适量沙堡液体培养基于管中,轻柔吹吸数次,使菌种融化分散。取含 5.0ml~10.0ml 沙堡液体培养基试管,滴入少许菌种悬液,置 37℃ 培养 18h~24h。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,于 37℃ 培养 18h~24h。挑取上述第 2 代培养物中典型菌落,接种于沙堡琼脂斜面,于 37℃ 培养 18h~24h,即为第 3 代培养物。

2) 取第3代~6代的沙堡琼脂培养基斜面新鲜培养物 (18h~24h), 用 5.0ml 吸管吸取 3.0ml~5.0ml 稀释液加入斜面试管内,反复吹吸,洗下菌苔。随后,用 5.0ml 吸管将洗液移至另一无菌试管中,用电动混合器混合20s,或在手掌上振敲 80次,以使白色念珠菌悬浮均匀。

3) 悬液杀菌试验时,实验用菌悬液的含菌量为 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ / ml; 菌片制备按2.1.2.4 要求进行。

4) 菌悬液保存在 4℃ 冰箱内备用。当天使用不得过夜。

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。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。

(2) 黑曲霉菌(ATCC 16404)孢子悬液或菌片的制备。

1) 在无菌操作下打开冻干菌种管,以毛细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 5.0ml 麦芽浸膏营养肉汤培养基试管中,置 $30^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 42h~48h。用接种环划线接种第 1 代培养物于 MEA 培养基平板,置 $30^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 42h~48h。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 $30^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 42h~48h,即为第 3 代培养物。

2) 用 10.0ml 吸管吸取 5.0ml~10.0ml 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,然后将多余肉汤培养物液体吸出,置 $30^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 42h~48h。

3) 向罗氏瓶培养物中加入 5.0ml~10.0ml 0.05% (V/V) 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三角瓶中,轻轻振摇 1min 后,滤过除去菌丝。滤过后,显微镜下(400 倍)观察是否存在菌丝,若悬液中有菌丝存在,可经 $5000\text{ r/min}\sim 6000\text{ r/min}$,离心 20min。再次在显微镜下(400 倍)观察,若悬液中仍有菌丝存在,须再离心。

4) 黑曲霉菌分生孢子悬液在 $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 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,若有孢子出芽,则弃之不用。

5) 使用时,可用稀释液适当稀释。悬液试验时实验用菌悬液的含菌量为 $1\times 10^7\sim 5\times 10^7\text{ cfu/ml}$ 。

6) 制备染菌样片时染菌方法为滴染法,每片加菌悬液 $10\mu\text{ l}$ 。染菌后,置 37°C 培养箱内干燥(约 30min),或置室温下自然阴干后再使用。

7) 回收菌数应达 $1\times 10^6\text{ cfu/片}\sim 5\times 10^6\text{ cfu/片}$,可依试验要求确定。

2.1.9.4 实验分组

试验分为下列各组:

(1) 实验组,按 2.1.7.3 规定,选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。

(2) 阳性对照组,以标准硬水代替消毒剂溶液,按 2.1.7.3 规定程序进行试验。所得结果代表试验体系中所含实验菌的初始浓度,并以其计算消毒因子对实验菌的杀灭对数值。

(3) 阴性对照组,观察同次试验用相关溶液和培养基有无污染。

2.1.9.5 试验程序

常用杀灭试验有:悬液定量杀菌试验、载体浸泡定量杀菌试验等。对白色念珠菌使用沙堡琼脂培养基,对黑曲霉菌使用麦芽浸膏琼脂(MEA)。其操作程序详见 2.1.7。

活菌培养计数时,对白色念珠菌,在 37°C 培养箱中培养 48h 观察最终结果。对黑曲霉菌,在 30°C 培养箱中培养 72h 观察最终结果。

2.1.9.6 评价规定

(1) 产品监督检验,按产品使用说明书指定的使用浓度和作用时间,重复试验 3 次,

对白色念珠菌和黑曲霉菌各次试验的杀灭对数值均 ≥ 4.00 , 可判定该产品对真菌污染物消毒合格。对所试特定真菌的杀灭对数值均 ≥ 4.00 , 可判定该产品对特定真菌污染物消毒合格。

(2) 产品申报卫生许可检验, 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, 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 ≥ 4.00 , 在产品规定使用浓度与最短作用时间的一半时, 允许杀灭对数值 < 4.00 , 可判为实验室试验该产品对真菌污染物消毒合格。

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 ≥ 3.00 , 在产品规定使用浓度与最短作用时间的一半时, 允许杀灭对数值 < 3.00 , 可判为实验室试验该产品对真菌污染物消毒合格。

2.1.9.7 注意事项

(1) 黑曲霉菌试验操作应在生物安全 II 级实验室内进行, 避免造成环境污染和操作人员受污染。

(2) 其它注意事项见 2.1.7.9。

2.1.10 病毒灭活试验

2.1.10.1 适用范围

主要适用于消毒产品鉴定或日常监测。用具有一定代表性的、活的病毒及其细胞感染技术, 评价各种用途的消毒因子对测试病毒的杀灭效果。按此方法进行的试验, 只是对消毒因子灭活病毒的能力进行验证。

2.1.10.2 实验器材

(1) 试验用病毒株: 脊髓灰质炎病毒 1 型 (poliovirus- I, PV- I) 疫苗株; 艾滋病病毒 1 型 (human immunodeficiency virus, HIV-1) 美国株。

(2) 宿主细胞: 可采用 VERO 细胞系、BGM 细胞、Hela 细胞系或 FL 细胞系, 作为 PV-1 的测试细胞。用含有人 T 淋巴细胞白血病病毒 1 型 (human T cell leukemia virus 1, HTLV-1) 基因的人淋巴细胞 (MT4 株) 作为 HIV-1 的测试细胞。

(3) 细胞培养瓶与 96 孔培养板

(4) 恒温水浴箱

(5) 二氧化碳培养箱

(6) 层流超净工作台

(7) 低温冰箱 (-20°C , -80°C)

(8) 液氮罐

(9) 倒置显微镜

(10) 离心机

(11) 可调移液器及配套一次性塑料吸头

(12) 细胞维持培养基: 见附录 A

(13) 细胞完全培养基：见附录A

(14) 去离子水、标准硬水（硬度为324mg/L）

(15) 有机干扰物：3.0%牛血清白蛋白，代表一般污染对象上的有机物。0.3%牛血清白蛋白，代表先经清洁操作，然后进行消毒的对象上污染的有机物或连续冲洗消毒的物品上污染的有机物。

(16) 新生牛血清或胎牛血清

2.1.10.3 病毒悬液的制备

(1) 从液氮中取出冻存的试验用宿主细胞，在37℃温水中迅速融化，用毛细吸管移置于含有细胞维持液的细胞管内，吹吸数次，使混匀，立即离心（3000r/min，3min），去上清液。再加入适当的细胞维持液，吹吸数次，使混匀，同上离心后，转种于加有10ml完全培养基的培养瓶中。逐日观察细胞生长情况，在细胞长满单层时，用于传代或消毒试验。

(2) 取出低温冻存的试验病毒毒种，室温融化，用不含胎牛血清的培养基作10倍稀释，然后全部接种于已经长满单层细胞的细胞瓶内，置37℃温箱中，吸附1~2h，吸出病毒悬液，入细胞维持液，至37℃，CO₂培养箱内培养。待3/4细胞出现病变时，收获病毒。

(3) 将含有病毒及宿主细胞的培养液，在冰浴条件下，用超声波（或室温与-20℃反复冻融3次）破碎宿主细胞，释放病毒。然后，尽快离心（6000r/min，15min）去除沉淀（主要为细胞碎片），上清液即为所需的病毒悬液。按每管1.0ml分装于无菌离心管（1.5ml）中。

(4) 取1支病毒悬液，按病毒滴度测定法，测定其病毒滴度。其余均冷冻保存于-80℃备用。

2.1.10.4 病毒灭活滴度计算方法

(1) 终点稀释法病毒感染滴度的计算

以半数细胞感染剂量（TCID₅₀）表示。TCID₅₀的对数值计算公式如下。

TCID₅₀ 对数值= 病变率高于50%组稀释度的对数值 + 距离比例

（“病变率高于 50% 组”是指病变率超过50%的最低组，下简称“高于 50% 组”；“病变率低于50%组”是指病变率低于50%的最高组，下简称“低于50%组”）。

具体计算方法如下：

1) 计算细胞病变率。先计数培养板上不同稀释度样本细胞病变发生与未发生的孔数，然后分别计算“细胞病变（-）”和“细胞病变（+）”的累积总计值。计算“细胞病变（-）”累积值时，由稀释度低样本组向稀释度高样本组累积；“细胞病变（+）”累积值则相反，由稀释度高样本组向稀释度低样本组累积（见表 2-1）。

各稀释度样本组“细胞病变（+）”累积总计值，除以该稀释度样本组“细胞病变（-）”与“细胞病变（+）”累积总计值之和即为其病变比，由之可得病变率（%）（见表 2-1）。

2) 计算距离比例。距离比例可按式计算：

$$\text{距离比例} = \frac{\text{高于50\%组的病变率} - 50}{\text{高于50\%组的病变率} - \text{低于50\%组的病变率}}$$

3) 计算举例

设试验数据如表 2-1

表 2-1 某消毒剂对 HIV 灭活作用的测定结果

样本 稀释度	接种 孔数	细胞病变		累积值		病变比	病变率 (%)
		—	+	细胞病变 (—)	细胞病变 (+)		
10^{-4}	4	0	4	0	12	12/12	100
10^{-5}	4	0	4	0	8	8/8	100
10^{-6}	4	1	3	1	4	4/5	80
10^{-7}	4	3	1	4	1	1/5	20
10^{-8}	4	4	0	8	0	0/8	0

本例，高于 50% 组病变率 (%) 为80；低于50%病变率 (%) 为20；高于50%组稀释度对数值为6。

$$\text{距离比例} = \frac{80 - 50}{80 - 20} = 0.5$$

$$\text{TCID}_{50} \text{ 对数值} = 6 + 0.5 = 6.5$$

(2) 噬斑法病毒感染滴度的计算

噬斑法病毒感染滴度，以噬斑形成单位数 (pfu)，简称噬斑数表示。计数方法同活菌培养计数技术 (参见 2.1.3)。

每毫升测试样品中的病毒含量计算 (pfu/ml) = 平板平均噬斑数 × 稀释倍数

(3) 平均灭活对数值的计算

平均灭活对数值按下式计算：设阳性 (病毒) 对照组平均病毒感染滴度 (TCID₅₀或pfu) 为N₀，试验 (消毒) 组平均病毒感染滴度 (TCID₅₀或pfu) 为N_x。

$$\text{平均灭活对数值 (KL)} = \log (N_0) - \log (N_x)$$

本规范规定：如果试验 (消毒) 组平均病毒感染滴度 (N_x) 的对数值，小于0时，此时的平均灭活对数值，即大于等于阳性 (病毒) 对照组平均病毒感染滴度的对数值。即 $\log (N_x) < 0$ 时，即 $KL \geq \log (N_0)$ 。

2.1.10.5 残留消毒剂中和稀释法的鉴定试验

(1) 目的

本鉴定试验只在确定所选中和剂是否适用于拟进行的细胞感染法病毒灭活试验。

(2) 试验设计原则

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对测试消毒药物有良好的中和作用,对试验用病毒和细胞株是否有害或不良影响。

2) 根据试验目的,选择适宜的病毒株和细胞株。

3) 中和试验用药物浓度应为正式消毒试验最高浓度。作用时间最短不得少于30s。

(3) 实验分组

1) 中和剂 + 病毒悬液 → 细胞维持培养基系列稀释,接种细胞培养
观察中和剂对病毒有无抑制作用。

2) (消毒剂 + 中和剂) + 病毒悬液 → 细胞维持培养基系列稀释,接种细胞培养
观察中和产物,或未被完全中和的残留消毒剂对病毒有无抑制作用或对检测方法有无干扰。

3) 病毒悬液 → 细胞维持培养基系列稀释,接种细胞培养
观察病毒是否可正常生长,并将其结果作为阳性对照值。

4) 未接种病毒的细胞 → 培养
观察其生长是否正常。

(4) 病毒悬液定量法中和剂鉴定试验操作程序

根据实验分组,准备足量有关器材,依次摆放,进行编号。各组分别用适宜大小容量的无菌定量吸管按以下程序吸取或添加试剂和试验样本。各组每吸一次试剂或样本,即应更换一次吸管或微量移液器吸头,以防相互污染。将脊髓灰质炎病毒悬液与有机干扰物进行对倍稀释,备用。消毒剂用标准硬水按试验浓度1.25倍配制,备用。

第1组:吸取 0.98 ml 中和剂溶液于试管内,置 $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 水浴中 5 min 后,再吸加 0.02 ml 病毒悬液,混合均匀,作用 10 min,以细胞维持培养基作系列稀释,取样进行脊髓灰质炎病毒滴度 (TCID_{50}) 测定。

第2组:吸取 0.98 ml 中和产物(0.9ml 中和剂+0.08ml 消毒剂溶液于试管内,置 $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 水浴中 5 min 后,再吸加 0.02 ml 病毒悬液,混合均匀,作用 10 min,以细胞维持培养基作系列稀释,取样进行脊髓灰质炎病毒滴度 (TCID_{50}) 测定。

第3组:吸取 0.98 ml 细胞维持液于试管内,置 $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 水浴中 5 min 后,再吸加 0.02 ml 病毒悬液,混合均匀,作用 10 min,以细胞维持培养基作系列稀释,取样进行脊髓灰质炎病毒滴度 (TCID_{50}) 测定。

第4组:将试验用细胞,加细胞维持液。

在 37°C ,放置 1h~2h,以确保残留病毒全部吸附在细胞上。取出培养板,更换细胞维持培养液。继续放入二氧化碳培养箱中(37°C , 5% CO_2)培养,逐日在显微镜下观察细胞病变,连续

观察 3d, 逐孔观察并记录细胞病变情况。

(5) 病毒载体定量中和剂鉴定试验操作程序

取出低温冻存的脊髓灰质炎-1毒株, 室温融化, 将有机干扰物与病毒液按1: 1的比例相混合, 取0.02ml滴染于载体片上, 室温凉干备用。

第 1 组 吸取中和剂 1.0ml 于无菌试管中, 将其置 $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 水浴中 5min 后, 用无菌镊子夹入1片病毒载体片, 并使浸透于中和剂内, 作用 10min, 用细胞维持液做10倍系列稀释, 取样进行脊髓灰质炎病毒滴度 (TCID_{50}) 测定。

第 2 组 吸取中和产物溶液 (以浸有消毒剂的载体置 1.0ml 中和剂内, 作用 10min) 1.0ml 于无菌试管中, 将其置 $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 水浴中 5min 后, 用无菌镊子夹入1片病毒载体片, 并使浸透于中和产物溶液中。作用 10min, 用细胞维持液做10倍系列稀释, 取样进行脊髓灰质炎病毒滴度 (TCID_{50}) 测定。

第 3 组 吸取细胞维持液 1.0ml 于无菌试管中, 将其置 $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 水浴中 5min 后, 用无菌镊子夹入1片病毒载体片, 并使浸透于细胞维持液中。作用10min, 用细胞维持液做10倍系列稀释, 取样进行脊髓灰质炎病毒滴度 (TCID_{50}) 测定。

第 4 组: 将试验用细胞, 加细胞维持液。

(6) 3d~5d 记录试验结果; 试验重复 3 次。

(7) 评价规定

试验结果符合以下全部条件, 所测中和剂可判为合格:

- 1) 试验中 1、2、3组病毒滴度的误差率小于50%。
- 2) 试验中第4组细胞生长正常。
- 3) 连续3次试验取得合格评价。

2.1.10.6 残留消毒剂物理去除方法的鉴定试验

病毒灭活试验中的物理除药法, 首先稀释法, 其次为吸附柱法、分子筛柱法、载体冲洗法。

(1) 分 组

- 1) (病毒悬液 + 消毒剂) + 除药处理 → 细胞维持培养液系列稀释, 接种培养观察去除残留药物后病毒可否恢复对细胞的感染作用。
- 2) 病毒悬液 + 除药处理 → 细胞维持培养液系列稀释, 接种培养观察除药处理对病毒滴度有无影响。
- 3) 病毒悬液 → 细胞维持培养液系列稀释, 接种培养观察病毒生长是否正常, 并以该结果作为阳性对照值。
- 4) 未接种病毒的细胞 → 培养观察细胞生长是否正常。

(2) 悬液定量操作程序

将病毒悬液与3.0%牛血清白蛋白进行对倍稀释备用。将消毒剂用标准硬水按试验浓度1.25

倍配制备用。

第1组：吸消毒剂 0.8ml 于试管内，置 $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 水浴中经 5min 后，吸加 0.2ml 病毒悬液，混匀。待作用至规定的时间，对此液进行除药处理，根据试验规定量，吸取最终样本（或用细胞维持培养液系列稀释的样液），进行随后的病毒滴度测定。

第2组：吸取病毒悬液 0.2ml，加 0.8ml 细胞维持培养液，做除药处理。根据试验规定量，吸取最终样本（或用细胞维持培养液系列稀释的样液），进行随后的病毒滴度测定。

第3组：吸取病毒悬液 0.2 ml，加细胞维持培养液 0.8ml，不加消毒剂亦不做任何除药处理。直接进行病毒滴度测定。

第4组：向未接种病毒的细胞管内，加入细胞维持培养液进行正常培养。

（3）评价规定

试验结果符合以下全部条件，所测物理除药法可判为合格：

- 1) 第1组无试验病毒或仅有少量病毒生长。且明显少于第2组、第3组的病毒生长。
- 2) 第2、3组病毒生长量相近，二者差异不超过1个对数滴度。
- 3) 连续 3 次试验取得合格评价。
- 4) 可使用病毒载体，按同样的原理与操作步骤进行试验，判定合格标准相同。

2.1.10.7 脊髓灰质炎病毒灭活试验

（1）目的

测定消毒剂对脊髓灰质炎病毒灭活所需的剂量，以验证病毒污染物消毒的实用剂量。

（2）实验原理

用细胞感染法测定消毒剂作用前后（或实验组与对照组）样本中脊髓灰质炎的量。以细胞病变作为判断指标，确定各组病毒的感染滴度，计算消毒剂对脊髓灰质炎的灭活对数值。

（3）实验分组

1) 实验组。根据所测消毒剂对其他微生物的杀灭或灭活剂量估计，设定适宜的浓度与作用时间组（不少于1个浓度，3个作用时间），对作用时间的设计应不短于30s。

2) 阳性对照组。悬液法的对照是用细胞维持液代替消毒剂，按实验组规定步骤加入脊髓灰质炎悬液进行试验和培养，载体法的阳性对照是将染毒载体加入到细胞维持液的试管中，振打后进行脊髓灰质炎病毒滴度测定，其目的是观察脊髓灰质炎病毒生长是否良好，病毒的数量是否符合要求。

3) 阴性对照组。用不含脊髓灰质炎的完全培养基作为阴性对照，观察所用培养基有无污染，细胞是否生长良好。

（4）脊髓灰质炎悬液定量灭活试验操作程序

1) 从液氮中取出冻存的试验宿主细胞，在 37°C 温水中迅速融化，并用细胞维持液洗涤两次后，转种于加有10ml完全培养基培养瓶中。逐日观察细胞生长情况，在细胞长满单层时，用于消毒试验。

2) 取出低温冻存的脊髓灰质炎-1毒株, 室温融化, 用细胞维持液作10倍稀释, 然后全部接种于含已经长满单层细胞的细胞瓶内, 置37℃温箱中, 培养18h~24h使与细胞吸附、生长。待3/4细胞出现病变时, 收获病毒。收获时, 将培养液取出, 用超声波或反复冻融破碎宿主细胞, 尽快离心, 并将含病毒的上清液按每管1.0ml分装于无菌离心管(1.5ml)中, 冷冻保存于-80℃备用。

3) 取待测消毒剂, 用灭菌硬水稀释至所需浓度的1.25倍, 于20℃±1℃水浴中备用。

4) 取100 μl 有机干扰物质与100 μl 病毒原液混合, 于20℃±1℃水浴中作用5min, 加入0.8ml 待检消毒剂, 立即混匀并计时。作用规定时间, 立即取出0.1ml, 加入中和剂中混匀, 用细胞维持液做10倍系列稀释, 取样进行脊髓灰质炎病毒滴度 (TCID₅₀) 测定。

5) 阳性(病毒)对照组试验中, 用无菌去离子水代替消毒剂, 其它同实验组。

6) 各组分别进行病毒滴度测定, 可采用终点稀释法或噬斑法进行。

7) 试验重复3次。

(5) 脊髓灰质炎载体定量灭活试验操作程序

1) 取出低温冻存的脊髓灰质炎-1毒株, 室温融化, 将有机干扰物与病毒液按1:1的比例相混合, 取0.02ml滴染于载体片上, 室温凉干备用。

2) 取无菌小平皿, 按每片 5.0ml 的量, 吸取相应浓度的消毒剂溶液注入平皿中。

3) 将盛有消毒剂平皿置 20℃±1℃ 水浴内 5min 后, 用无菌镊子分别放入病毒载体片, 并使之浸没于消毒液中。

4) 待作用到规定时间, 用无菌镊子将载体片取出分别移入含 1.0ml 中和剂试管中。振打后进行脊髓灰质炎病毒滴度 (TCID₅₀) 测定。

5) 阳性(病毒)对照组试验中, 直接将病毒载体片加到含1.0ml 细胞维持液的试管中, 振打后进行脊髓灰质炎病毒滴度 (TCID₅₀) 测定。

6) 各组进行病毒滴度测定, 可采用终点稀释法或噬斑法进行。

7) 试验重复3次。

(6) 病毒滴度测定方法

1) 终点稀释法操作步骤: 先用细胞维持液对待滴定样本做10倍系列稀释, 然后在96孔培养板上滴定各稀释度样本中残留的病毒量, 每个稀释度做4孔(各孔中应该已经长满单层的宿主细胞), 在37℃, 放置1h~2h, 以确保残留病毒全部吸附在细胞上。取出培养板, 更换细胞维持培养液。继续放入二氧化碳培养箱中(37℃, 5%CO₂)培养, 逐日在显微镜下观察细胞病变, 连续观察3d, 逐孔观察并记录细胞病变情况。

终点稀释法病毒感染滴度的计算: 以半数细胞感染剂量(TCID₅₀)表示。

2) 噬斑法操作步骤: 先用细胞维持液对待滴定样本做10倍系列稀释, 然后接种于细胞培养瓶中, 滴定各稀释度样本中残留的病毒量。

接种细胞前, 将生长致密的单层细胞中的培养液倾出, 加入 1ml 待测样品, 放置 37℃吸符 1h~2h, 倾出样液, 加入含 0.8%琼脂的细胞维持液 3ml, 冷却后翻转细胞瓶, 放置 37℃培养 48h~

72h。然后每瓶细胞加入 2ml 甲醛溶液固定数分钟，用自来水冲洗后加结晶紫溶液染色数分钟，冲洗干净后计数。细胞瓶内圆形不着色的透明区即为一个蚀斑单位，每毫升测试样品中的病毒含量计算：

$$\text{pfu/ml} = \text{平板平均蚀斑数} \times \text{稀释倍数}$$

注意：为了便于计数，病毒蚀斑数一般控制在每细胞瓶 10pfu~30pfu。

（7）平均灭活对数值的计算

平均灭活对数值按下式计算：设阳性（病毒）对照组平均病毒感染滴度（TCID₅₀或pfu）的为 N₀，试验（消毒）组平均病毒感染滴度（TCID₅₀或pfu）为 N_x。

$$\text{平均灭活对数值} = \log N_0 - \log N_x$$

（8）评价规定

1) 悬液定量杀灭试验中，杀灭对数值 ≥ 4.00 ，阳性对照组病毒滴度对数值在5~7 之间为消毒合格。

2) 载体定量灭活试验中，杀灭对数值 ≥ 3.00 ， 阳性对照组病毒滴度对数值在4~6 之间为消毒合格。

（9）注意事项

- 1) 操作人员应具有基本的病毒学实验工作经验，尽量使用移液器与无菌一次性吸头。
- 2) 在病毒灭活试验中，每次均应设置阳性对照。
- 3) 脊灰病毒灭活试验操作应在生物安全Ⅱ级以上实验室内进行，避免造成实验人员实验室感染和对环境污染。

2.1.10.8 艾滋病病毒灭活试验

（1）目 的

测定消毒剂对艾滋病病毒灭活所需的剂量，以验证对该病毒污染物消毒的实用剂量。

（2）实验原理

用细胞感染法测定消毒剂作用前后（或实验组与对照组）样本中HIV 的量。以细胞病变作为判断指标，确定各组病毒的感染滴度，计算消毒剂对 HIV 的灭活对数值。

（3）安全防护

试验中要求采取严密防护措施。我国规定所有接触 HIV 的试验均需在生物安全三级（biological safety level 3, BSL 3）实验室内进行，并制定有相应的安全防护措施。在 HIV 灭活试验时，必须严格按照有关安全规定进行。

（4）实验分组

1) 实验组。根据所测消毒剂对其他微生物的杀灭或灭活剂量估计，设立适宜的浓度与作用时间组（不少于1个浓度，3个作用时间），对作用时间的设计应不短于30s。所设组应能测出使 HIV 全部灭活所需的最低有效剂量（药物浓度与作用时间）。

2) 阳性对照组。用细胞维持液代替消毒剂, 按实验组规定步骤加入 HIV 悬液进行试验和培养, 观察 HIV 生长是否良好。

3) 阴性对照组。用不含 HIV 的完全培养基作为阴性对照, 观察所用培养基有无污染, 细胞是否生长良好。

4) 消毒剂对细胞毒性组。取系列稀释的不同浓度的待测消毒剂各 100 μ l, 分别加入含有 100 μ l 用完全培养基制备的 MT4 细胞悬液 (含细胞 400 000 个/ml) 的 96 孔培养板内。置二氧化碳温箱 (37 $^{\circ}$ C) 中培养 7 d, 观察细胞生长情况, 确定对细胞无毒性的消毒剂最高稀释度。

(5) HIV 悬液定量灭活试验操作程序

1) 从液氮中取出冻存的 MT4 细胞, 在 37 $^{\circ}$ C 温水中迅速融化, 并用细胞维持液洗涤两次后, 转种于加有 10ml 完全培养基培养瓶中。逐日观察细胞生长情况, 在细胞对数生长期时收获细胞用于消毒试验。

2) 从液氮中取出冻存 HIV-1 毒种, 接种于含 10ml 细胞悬液 (含细胞 700 000 个/ml ~ 800 000 个/ml) 培养瓶中。逐日观察病变, 待 3/4 细胞出现病变时, 收获病毒。收获时, 将培养液取出, 尽快离心, 并将含病毒的上清液按每管 0.5ml 分装于无菌离心管 (1.5ml) 中, 冷冻保存于 -80 $^{\circ}$ C 备用。如不能立即离心, 可暂将培养瓶冷冻保存于 -20 $^{\circ}$ C, 并争取尽快离心分装。

3) 取待测消毒剂, 用无菌去离子水作 1:2、1:4、1:8 ... 系列稀释。视消毒剂的类型和实验目的, 确定最高稀释度。为防止污染培养液, 必要时在试验前需将消毒剂过滤除菌。

4) 取 100 μ l 有机干扰物, 与 100 μ l 病毒原液混合。然后加入 0.8ml 待检消毒剂, 立即记时。待作用至规定时间, 立即取出 100 μ l, 加入 0.9ml 用完全培养基制备的 MT4 细胞悬液 (400 000 个/ml), 在 37 $^{\circ}$ C, 放置 40min, 以确保残留病毒全部吸附在细胞上。阳性 (病毒) 对照组试验中, 用无菌细胞维持液代替消毒剂; 消毒剂对细胞毒性组试验中, 用细胞维持液代替病毒。

5) 取出反应管, 立即采取去除残留消毒剂处理。处理可用物理去除法或中和稀释法 (所用方法需先经试验证明, 既可有效去除残留消毒剂, 又对细胞和 HIV 无杀灭或抑制作用)。

6) 在 96 孔培养板上滴定样本中残留的病毒量。先在培养板 (96 孔) 的各孔中, 加入 100 μ l 用完全培养基制备的 MT4 细胞悬液 (含细胞 400 000 个/ml)。同时, 用完全培养基对待滴定样本做 1:10 系列稀释, 然后取 100 μ l 稀释好的样本加入已含 MT4 细胞悬液的 96 孔培养板内。每个稀释度做 4 孔。

7) 将按上述程序加液的 96 孔培养板, 放入二氧化碳培养箱中 (37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂), 逐日在显微镜下观察细胞病变。被感染细胞融合肿胀, 出现多核巨细胞。第 4 d, 在各反应孔内补加 50 μ l 新鲜完全培养基。第 7d, 逐孔观察并记录细胞病变情况。

8) 试验重复 3 次。

(6) 评价规定

1) 对测试滴度的 HIV, 3 次灭活试验后均应不再检出, 此时的灭活对数值应 ≥ 4.00 , 可判为该消毒剂浓度与作用时间, 对 HIV 污染物消毒的实验室试验合格。

2) 在正常情况下, HIV阳性对照组病毒感染滴度(TCID₅₀)对数值应在5~7之间。阴性对照组宿主细胞生长良好, 并且无HIV 检出。所用浓度的消毒液对宿主细胞生长无不良影响。否则, 根据发现的问题, 或调整 HIV悬液浓度, 或选择适宜消毒液浓度, 或更换污染试剂和培养基, 或改进其他有关条件后, 重做试验。

(7) 注意事项

1) 操作人员应具有较丰富的病毒学实验工作经验, 必须绝对遵守BSL3实验室的安全制度。身体状态欠佳, 或有伤口时, 应暂时停止工作。

2) 有感染可能性的操作, 均应在BSL3实验室的层流负压超净工作台中进行。

3) 一旦发生事故, 有病毒感染或污染环境的可能时, 切莫惊慌, 除立即进行妥善消毒处理外, 并应尽快报告实验室和单位领导。

4) 本试验周期较长, 在全部过程中应注意防止样本污染。

2.1.12 各种因素对消毒剂杀菌作用影响试验

2.1.12.1 目的

了解有机物、温度和pH 对消毒剂杀菌作用的影响规律, 为制定消毒剂的实用剂量提供参考。

2.1.12.2 实验器材

- (1) 菌片与菌悬液(按 2.1.2 要求和方法制备)
- (2) 恒温水浴箱
- (3) 冷水浴装置(可放入试管架的容器, 以冰水调节水温)
- (4) 温度计
- (5) pH 计
- (6) 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
- (7) 中和剂(经中和剂试验鉴定合格)
- (8) 盐酸(用无菌蒸馏水配制)
- (9) 氢氧化钠(用无菌蒸馏水配制)

2.1.12.3 实验微生物的选择

根据所测消毒剂鉴定需要决定。一般情况下, 除需用于特定微生物者外, 对细菌繁殖体应选择大肠杆菌和金黄色葡萄球菌, 作为革兰阳性与阴性细菌的代表即可; 用作灭菌剂, 可使用枯草杆菌黑色变种芽孢。

2.1.12.4 消毒液浓度和作用时间的设定

试验中应分以下各组:

- (1) 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, 选定实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, 指定最低作用时间的1.5倍。)进行试验。

第二种适用于消毒产品的研究。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。在 3 个作用时间中，以该最低有效浓度所需的最短有效时间为第 1 时间 (T)，其后的第 2 时间为第 1 时间的一倍 (2T)。依此，第 3 时间为 3T。试验结果应根据需要测出杀灭对数值达 5.00 (消毒用) 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，若第 1 时间较长 (> 30min)，可根据情况适当缩短作用时间的组距。对第 1 时间较短者 (< 5min)，可根据情况适当延长作用时间的组距。

(2) 阳性对照组。根据各种试验的规定，用稀释液代替消毒剂溶液，按上述同样的步骤进行试验。所得结果代表菌液原有浓度，以其作为计算杀灭对数的初始浓度。

2.1.12.5 有机物对杀灭微生物效果影响的测定

(1) 如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。各组所用消毒液浓度和作用时间，见 2.1.12.4。

(2) 以稀释液配制的微生物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% 小牛血清的微生物悬液。此含小牛血清的微生物悬液，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。

(3) 试验中根据需要，选择悬液定量杀灭试验或载体浸泡定量杀灭试验之一进行测定即可。具体试验程序根据微生物种类可参见 2.1.7。

(4) 其它有机物按此设计类推。各组试验应重复 3 次，按相应微生物杀灭试验计算杀灭对数值。

2.1.12.6 温度对杀灭微生物效果影响的测定

(1) 设置 $10^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 等，以 10°C 为间隔。各组所用消毒液浓度和作用时间，见 2.1.12.4。

(2) 对要求试验温度高于室温者，用恒温水浴箱 (电热) 调节；低于室温者用冷水浴装置 (加适量冰水) 调节。当上述温度调节装置到达要求温度后，放入装有试验样液的试管，同时放入一含与试验样液等量蒸馏水并插有温度计的试管。待试管内温度计指示到达试验所需温度时，开始随后的试验。

(3) 根据需要，选择悬液定量杀灭试验或载体浸泡定量杀灭试验之一进行测定即可。具体试验程序根据微生物种类可分别参见 2.1.7。

(4) 试验重复 3 次，按相应微生物杀灭试验计算杀灭对数值。

2.1.12.7 pH 对杀灭微生物效果影响的测定

(1) 本项试验根据所测消毒剂使用溶液的 pH 值，分为以下 3 组进行：

第 1 组 pH 值 $x - 2$

第 2 组 pH 值 x

第 3 组 pH 值 $x + 2$

(例如，所测消毒剂使用溶液的 pH 值为 7.8，则 3 组的 pH 值应为：第 1 组 5.8，第 2

组 7.8, 第 3 组 9.8)。

各 pH 组所用消毒液浓度和作用时间, 见 2.1.12.4。

(2) 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 计测定消毒液的 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 调整后可测定有效成分含量以观察是否受到 pH 变化的影响。

(3) 根据需要, 选择悬液定量杀灭试验或载体浸泡定量杀灭试验之一进行测定即可。具体试验程序见 2.1.7。

(4) 试验重复 3 次, 按相应微生物杀灭试验计算杀灭对数值。

2.1.12.8 评价规定

评价时, 有机物影响试验应以不含外加有机物组(直接用稀释液配制微生物)的结果为对照; 温度影响试验应以 $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 组的结果为对照; pH 影响试验应以消毒剂使用溶液 pH 组的结果为对照。

(1) 该组第 1 个~3 个作用时间的试验, 对所试微生物杀灭效果均合格, 判为该组所试因素无影响。

(2) 该组第 2 个~3 个作用时间的试验, 对所试微生物杀灭效果合格, 判为该组所试因素有轻度影响。

(3) 该组第 3 个作用时间的试验, 对所试微生物杀灭效果合格, 判为该组所试因素有中度影响。

(4) 全部试验对所试微生物杀灭效果均不合格, 对所试微生物杀灭效果合格, 判为该组所试因素有重度影响。

2.1.12.9 注意事项

(1) 本试验目的是为制定消毒剂实用剂量提供必要的参考数据, 系统研究各种因素对消毒剂杀灭微生物效果的影响, 尚需作更多系统的观察。

(2) 为加强各组结果的可比性和可重复性, 非观察因素应保持稳定不变。例如, 在观察有机物的影响时, 除有机物浓度根据需要改变外, 其他如温度和 pH 等因素均应先后一致。

2.2 消毒剂模拟现场和现场消毒鉴定试验

2.2.1 消毒剂对食(饮)具消毒效果的模拟现场鉴定试验

2.2.1.1 目的

用于鉴定消毒剂对食(饮)具上细菌和病毒的杀灭作用, 并测出所需使用的剂量, 作为确定该消毒剂对食(饮)具消毒实用剂量的参考。

2.2.1.2 实验器材

(1) 实验菌株: 大肠杆菌(8099), 对尚需用于杀灭其他特定细菌者, 可增用该特定细菌进行试验。菌悬液制备按 2.1.2 规定的方法和要求进行。

(2) 中和剂溶液: (经中和剂鉴定试验合格)

(3) 稀释液: 见附录 A

(4) 培养基: 胰蛋白胨大豆琼脂培养基

(5) 有机干扰物: 对清洗后再消毒的餐饮具使用 0.3%牛血清白蛋白, 对未清洗直接消毒的餐饮具使用 3.0%牛血清白蛋白。

(6) 无菌棉拭

(7) 规格板 (用可略弯曲的软性材料制备, 中央留一大小为 $5.00\text{cm} \times 5.00\text{cm}$ 空格作为采样部位)。

(8) 试验用食 (饮) 具样本 瓷碗 (盘) 或竹 (木) 筷前端 (周长约 2.0cm , 长度为 12.5cm , 总面积约 25cm^2)。

(9) 标准硬水: 见附录 A

2.2.1.3 操作程序

(1) 按产品使用说明书的用法, 选定本试验拟用浓度和作用时间, 分别进行大肠杆菌杀灭试验。

(2) 用无菌规格板在试验用瓷碗 (盘) 中间标出染菌区 ($5.00\text{cm} \times 5.00\text{cm}$)。用无菌吸管吸取菌悬液, 分别滴加于染菌区, 每区 0.1ml , 用无菌 L 棒在区内涂匀, 并置 37°C 恒温箱干燥。

对筷子取前端 12.5cm 长度, 蘸染预定量菌液后, 并置 37°C 或室温干燥。

(3) 实验组: 将 30 个染菌碗 (盘) 或 30 个筷子样本, 依次定时放入含消毒剂溶液的容器中, 使其完全浸没。作用至规定时间, 将碗 (盘) 轻轻取出, 弃掉消毒剂, 分别向瓷碗 (盘) 内的染菌区加入 5ml 中和剂溶液, 用 L 棒刮洗染菌区, 作用 10min , 分别取 1.0ml 样液, 以倾注法接种 2 块平皿。将筷子轻轻取出, 放入含 $20\text{ml} \sim 25\text{ml}$ 中和剂溶液的试管中, 电动混匀器震荡 20s 或振敲 200 次, 作用 10min , 分别取 1.0ml 样液, 以倾注法接种 2 块平皿。将接种好的平板放 37°C 培养箱培养 48h , 计数菌落数, 作为实验组。

(4) 阳性对照组: 将 3 个染菌碗 (盘) 或 3 只染菌筷子样本不在消毒剂中浸泡, 直接向瓷碗 (盘) 内的染菌区加入 5ml 中和剂, 或直接将筷子放入含 $20\text{ml} \sim 25\text{ml}$ 中和剂溶液的试管中。待实验组消毒处理完毕后, 随实验组进行采样、检测。检测结果作为消毒前菌量, 菌量应在 $2.5 \times 10^7 \text{ cfu/样本} \sim 1.25 \times 10^8 \text{ cfu/样本}$ (相当于 $1 \times 10^6 \text{ cfu/cm}^2 \sim 5 \times 10^6 \text{ cfu/cm}^2$)。

(5) 阴性对照组: 将本次试验未用完的中和剂、稀释液、培养基等分别设阴性对照。

(6) 按下式计算每件食具上的生长菌落数。

每件食具样本生长菌落数 (cfu/样本) = 平板上平均菌落数 $\times$ 检测时样本稀释倍数

(7) 按 2.1.7.4 (8) 计算杀灭对数值。

2.2.1.4 评价规定

阴性对照组均无菌生长, 阳性对照组菌量为 $2.5 \times 10^7 \text{ cfu/样本} \sim 1.25 \times 10^8 \text{ cfu/样本}$ (相当于 $1 \times 10^6 \text{ cfu/cm}^2 \sim 5 \times 10^6 \text{ cfu/cm}^2$), 以每种食 (饮) 具 30 个样本中大肠杆菌杀灭对数值均 ≥ 3.00 ,

所用消毒剂的浓度和作用时间为消毒合格剂量。

2.2.2 反复使用稳定性试验

2.2.2.1 目的

用于测定消毒剂在反复取放浸泡餐饮具条件下的使用次数。

2.2.2.2 试验器材

(1) 实验菌株：大肠杆菌 8099

(2) 中和剂溶液：经中和剂鉴定合格

(3) 培养基：胰蛋白胨大豆琼脂培养基，见附录 A

(4) 载体：不锈钢圆片（直径 1.2cm）

(5) 满载用餐饮具：选用瓷碗（盘）、竹（木）筷子或根据说明书选用其他食饮具，不需灭菌处理。

(6) 带盖不锈钢盆 容积为 5000ml~10000ml

(7) 标准硬水：见附录 A

2.2.2.3 操作程序

(1) 试验时，按说明书中的使用浓度配制 5000ml~10000ml 消毒液，分别盛装于无菌带盖不锈钢盆中。各放入清洁的试验用餐饮具，使达满载要求。

(2) 不锈钢盆内放入餐饮具后，作用至规定时间将餐饮具取出，用清水洗涤，沥干，再回放入消毒液中。连续将餐饮具取出、洗涤、沥干、再放入，直至说明书中规定的次数。

(3) 将餐饮具取出，按 2.2.1.3 进行消毒模拟现场试验。

2.2.2.4 评价规定

按说明书中规定的消毒剂使用浓度和作用时间及反复浸泡次数处理后，以每种食（饮）具 30 个样本中大肠杆菌杀灭对数值均 ≥ 3.00 ，可判为反复使用稳定性试验合格。

2.2.2.5 注意事项

(1) 试验操作过程必须采取严格的无菌技术。直接或间接接触样本的器材必须经灭菌后使用。模拟现场试验所用食（饮）具在染菌前亦必须经灭菌处理。

(2) 每次试验必须设置阳性和阴性对照，绝不可省略。

2.2.3 消毒剂对医疗器械的消毒模拟现场试验

2.2.3.1 目的

用于鉴定消毒剂对医疗器械上细菌芽孢的杀灭作用，并测出消毒所需使用剂量，作为确定对医疗器械处理时实用剂量的参考。

2.2.3.2 实验器材

(1) 实验菌株：对用于高水平消毒的消毒剂，使用枯草杆菌黑色变种（ATCC 9372）芽孢（下简称芽孢，其悬液的制备按 2.1.2.3（2）规定进行）；对用于中水平消毒的消毒剂，使用龟分支杆菌脓肿亚种（ATCC19977）；对用于低水平消毒的消毒剂，使用白色念珠菌（ATCC 10231）。

(2) 中和剂溶液：经中和剂鉴定试验合格

(3) 培养基：胰蛋白胨大豆琼脂培养基，分支杆菌干燥培养基，沙堡琼脂培养基，见附录 A

(4) 有机干扰物：0.3%牛血清白蛋白

(5) 载体：将医用止血钳截断，取其由轴至齿端部分，参照 2.1.2.4 (2) 规定方法进行脱脂处理。灭菌后，备用。

(7) 塑料试管（1.8cm×18cm）。

(8) 标准硬水：见附录 A

2.2.3.3 操作程序

(1) 以载体浸泡定量杀菌试验进行消毒效果的测定。按产品使用说明书的剂量，选定本试验拟用浓度和作用时间。

(2) 染菌时，用无菌镊子将 33 个止血钳样本两齿分开，使其一侧齿面朝上，并固定无菌支撑物上。用 0.1ml 无菌吸管或 100 μl 无菌移液器，将 0.02ml 芽孢悬液滴染齿部，涂匀，置 37℃ 恒温箱内干燥备用。

(3) 取无菌平皿，按每个载体 10ml 用量加入消毒液，置 20℃ ± 2℃ 水浴中保温 5min。

(4) 将 30 个染菌样本浸没于消毒液中，进行消毒处理。

(5) 作用至规定时间，取出样本，分别移入含 10ml 中和剂溶液的塑料试管内。在手掌上振敲 200 次，分别取样液 1.0ml，以倾注法接种两个无菌平皿，放 37℃ 恒温箱培养 72h，计数菌落数，作为试验组。

(6) 以标准硬水代替消毒液，将 3 个染菌样本以同样条件处理，然后与实验组样本同法进行活菌培养计数，作为阳性对照组，其菌量应在 1×10^6 cfu/样本 ~ 5×10^6 cfu/样本。

(7) 将本次试验未用完的同批次中和剂溶液、稀释液、培养基等分别设阴性对照。

2.2.3.4 评价规定

阴性对照均无菌生长，阳性对照组均有实验菌生长且菌量达到规定要求，以对试验组 30 个样本上人工污染芽孢的杀灭对数值均 ≥ 3.00 ，可判为消毒合格。

2.2.3.5 注意事项

与本试验有关的其它试验中的注意事项亦适用于本试验。

2.2.4 消毒剂对医疗器械的模拟现场灭菌试验

2.2.4.1 目的

用于验证消毒剂对人工染有芽孢的医疗器械灭菌效果。

2.2.4.2 实验器材

(1) 实验菌株：枯草杆菌黑色变种 (ATCC 9372) 芽孢（下简称芽孢，其悬液的制备按 2.1.2.3

(2) 规定进行）

(2) 稀释液：见附录 A

(3) 中和剂溶液：经中和剂鉴定试验合格

(4) 培养基：胰蛋白胨大豆琼脂培养基，见附录 A

(5) 含中和剂的胰蛋白胨大豆肉汤培养基

(6) 标准硬水：见附录 A

(7) 载体：将医用止血钳截断，取其由轴至齿端部分，参照 2.1.2.4 (2) 规定方法进行脱脂处理。灭菌后，备用。

(8) 塑料试管（1.8cm×18cm）

2.2.4.3 操作程序

(1) 按产品使用说明书中的最低使用浓度与 0.5 倍最短作用时间。

(2) 25 个染菌样本制备按 2.2.3.3 (2) 规定进行。

(3) 取无菌平皿，按每个载体 10ml 用量加入消毒液，置 20℃±2℃水浴中保温 5min。

(4) 将 20 个染菌样本浸没于消毒液中，进行灭菌处理，作用至规定时间，将样本取出，分别放于含 10ml 中和剂肉汤的试管内（共 20 支），置 37℃培养箱中定性培养 7d，观察最终结果，作为实验组。有菌生长者，肉汤培养基呈轻度浑浊，有皱褶状菌膜，轻轻振摇可见絮状沉淀，无菌生长者肉汤清澈透明。

(5) 以标准硬水代替消毒液，将 2 个染菌载体依上同样条件处理，然后与实验组载体同法接种、培养、观察结果，作为阳性对照组。

(6) 另取 3 个染菌样本，分别放入 10ml 中和剂溶液塑料试管内。在手掌上振敲 200 次，取样液进行活菌培养计数。培养 72h 计数菌落。作为菌数对照组，其菌量应为 1×10^6 cfu/样本～ 5×10^6 cfu/样本。

(7) 将本次试验未用完的同批次中和剂溶液、稀释液、培养基等分别设阴性对照。

(8) 试验重复 3 次。

2.2.4.4 评价规定

阴性对照组均无菌生长，实验组 60 个样本均无菌生长，同时阳性对照组均有试验组菌生长，且菌量达到规定要求，可判定为灭菌合格。

2.2.4.5 注意事项

(1) 灭菌效果观察时，应严格无菌操作，否则可将灭菌合格误判为失败。

(2) 与本试验有关的其它试验中的注意事项亦适用于本试验。

2.2.5 连续使用稳定性试验

2.2.5.1 目的

用于测定消毒剂在连续使用有效期内反复消毒、灭菌医疗器械是否达到合格要求。

2.2.5.2 实验器材

(1) 枯草杆菌黑色变种（ATCC 9372）芽孢（下简称芽孢，其悬液的制备按 2.1.2.3 (2) 规定进行）

- (2) 中和剂溶液（经中和剂鉴定合格者）
- (3) 含中和剂的胰蛋白胍大豆肉汤培养基 见附录 A
- (4) 胰蛋白胍大豆肉汤培养基 见附录 A
- (5) 载体（直径 1.2cm 不锈钢圆片）
- (6) 满载用医疗器械（选用医用剪刀、止血钳等小型器械，或根据需要选用其他器械。）
- (7) 无菌带盖搪瓷盘
- (8) 标准硬水 见附录 A

2.2.5.3 操作程序

- (1) 按 2.2.3.3 (2) 制备染菌样本。
- (2) 试验时, 配制双份 2000ml 消毒液, 分别盛装于 2 个无菌带盖搪瓷盘中。各放入清洁的试验用医疗器械, 使达满载要求。每次试验, 同时对 2 个搪瓷盘中的消毒液进行检测。
- (3) 搪瓷盘内放入器械后, 每日将器械取出, 用清水洗涤, 沥干, 再回放入消毒液中。连续每日将器械取出、洗涤、沥干、再放入, 直至试验结束。
- (4) 放入器械至使用说明书上连续使用的最长时间, 吸取消毒液样本。对于医疗器械消毒的消毒剂按消毒剂对医疗器械的消毒模拟现场试验 (2.2.3) 的方法, 每盘用 5 个染菌样本进行试验; 对于医疗器械灭菌的消毒剂按消毒剂对医疗器械的模拟现场灭菌试验 (2.2.4) 的方法, 每盘用 10 个染菌样本进行试验。测定该消毒液对芽孢的杀灭效果。

2.2.5.4 评价规定

试验重复 3 次, 以 3 次试验均达到合格要求, 可判为连续使用稳定性试验合格。

2.2.5.5 注意事项

- (1) 盛装消毒液的搪瓷盘, 在操作完毕后应加盖, 以免有杂菌污染。
- (2) 灭菌效果观察时, 应严格无菌操作, 否则可将灭菌合格误判为失败。
- (3) 与本试验有关的其它试验中的注意事项亦适用于本试验。

2.2.6 消毒剂对手消毒模拟现场试验

2.2.6.1 目的

用于测定消毒剂对人工污染于手表面细菌的杀灭作用, 并作为确定该消毒剂对手消毒实用剂量的参考。

2.2.6.2 实验器材

- (1) 实验菌株: 大肠杆菌 8099 或 NCTC 10538, 对尚需用于杀灭其他特定细菌目的者, 可增用该特定细菌进行试验。菌悬液制备按 2.1.2.3 规定的方法和要求进行。
- (2) 培养基: 胰蛋白胍大豆琼脂培养基 (TSA): 见附录 A
胰蛋白胍大豆肉汤培养基 (TSB): 见附录 A
- (3) 中和剂溶液（经中和剂鉴定合格者）
- (4) 液体肥皂 200g/L

(5) 参考样品: 正丙醇 60% (V/V) 与异丙醇 60% (V/V)

(6) 标准硬水 见附录 A

(7) 稀释液 见附录 A

(8) 无菌纱布巾

(9) 吸管、试管、平皿若干

(10) 振荡混合器

2.2.6.3 试验步骤

(1) 菌悬液的制备 取 2 支在 TSB 中培养 18h~24h 的大肠杆菌培养物分别接种于 1LTSB 大三角烧瓶中, 在 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 18h~24h, 用 TSB 将其稀释为 $2 \times 10^8 \text{ cfu/ml} \sim 2 \times 10^9 \text{ cfu/ml}$ 菌悬液。

(2) 将 12 名~15 名志愿者随机分为两组, 第一组使用参考样品, 第二组使用试验样品。

(3) 使用液体肥皂洗手 1min 去除手表面污染的自然菌, 然后用无菌纱布将手擦干。

(4) 将 $2 \times 10^8 \text{ cfu/ml} \sim 2 \times 10^9 \text{ cfu/ml}$ 大肠杆菌的菌悬液放入一无菌容器。

(5) 将手掌中间到指尖部位浸入菌悬液中, 手指分开, 停留 5 s, 将手离开菌悬液, 在空气中干燥 3 min。

(6) 干燥后立即将拇指与其它手指尖在含 10ml TSB 的平皿中搓洗 1 min, 取适当稀释度接种平皿。计数菌落数, 作为试验前菌数。

(7) 不再重复污染手, 立即进行消毒处理。

(8) 按说明书规定的用量、作用时间和使用频率以标准的洗手方法(如图 2-1)搓擦 30s~60s (卫生手消毒) 或最长 5min (外科手消毒)。

(9) 以流动的自来水冲洗 5s, 抖掉手上残留的水。

(10) 立刻将拇指与其它手指尖在盛有 10ml 含中和剂的 TSB 的平皿中搓洗 1min, 做适当稀释后, 分别取样液 1.0ml 以倾注法接种两个无菌平皿, 放 37°C 恒温箱培养 48h, 计数菌落数, 作为实验组。

(11) 参考样品组, 对于卫生手消毒, 取 60%异丙醇 3 ml 于手心中, 按标准的洗手方法用力搓擦 30s。以确保手的所有部位均匀接触异丙醇。重复使用异丙醇按上述方法搓擦使总的搓擦时间为 60s。对于外科手消毒, 使用 60%正丙醇 3ml, 按标准的洗手方法用力搓擦, 当接近干燥时, 再加 3ml 正丙醇搓擦。以保持作用 5min。



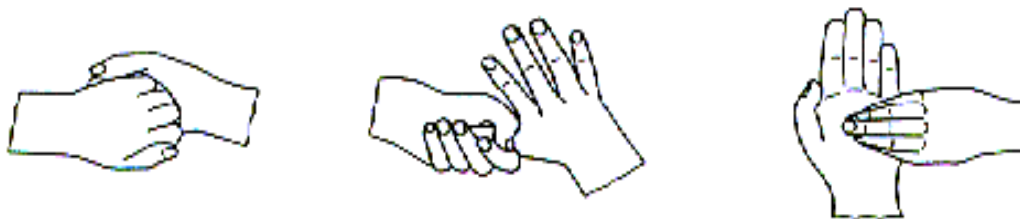
1. 掌心对掌心搓擦



2. 手指交错掌心对手背搓擦



3. 手指交错掌心对掌心搓擦



4. 两手互握互搓指背

5. 拇指在长中转动搓擦

6. 指尖在掌心中摩擦

图 2-1 标准的洗手方法

(12) 用流动的自来水冲洗 5s，抖掉手上残留的水。

(13) 其余步骤与试验样品组相同。

(14) 在试验当日，第一组与第二组样品对换，重复上述试验。

(15) 分别计算参考样品组和试验样品组的菌数减少的对数值。

2.2.6.4 评价规定

(1) 试验样品的杀灭对数值大于或等于参考样品的杀灭对数值为合格。

(2) 若试验样品的杀灭对数值小于参考样品的杀灭对数值，应进行统计学处理，以确定差异是否显有统计学意义。若试验样品的杀灭对数值小于参考样品的杀灭对数值，但无统计学意义，可判为消毒合格。若试验样品的杀灭对数值小于参考样品的杀灭对数值，且有统计学意义，表明该试验样品不符合本规范的要求。

2.2.6.5 注意事项

(1) 实验必须在同一受试者、同一天、相同环境、同样条件下进行，使试验样品和参考样品的结果具有可比性。

(2) 所有受试者应年满 18 岁，身体健康。手部皮肤应无破损、无皮肤病，手指甲短而干净。

(3) 试验用菌悬液应在第 1 只手浸入后 3h 内使用。在 1 次试验中，无论使用试验样品还是参照样品，所有受试者手的染菌都应使用同一批菌悬液。

(4) 对于免洗手类消毒液，试验组应根据说明书介绍的方法涂擦，作用时间一般到消毒液干燥后停止。

2.2.7 消毒剂对手消毒现场试验

2.2.7.1 目的

测定消毒剂对手表面自然菌消毒所需使用的剂量，作为确定该消毒剂对手消毒实用剂量的参考。

2.2.7.2 实验器材

(1) 中和剂溶液：经中和剂鉴定合格

(2) 培养基：胰蛋白胨大豆琼脂培养基，见附录 A

(3) 稀释液：见附录 A

- (4) 标准硬水：见附录 A
- (5) 无菌纱布巾
- (6) 无菌棉拭
- (7) 振荡混合器
- (8) 吸管、试管、平皿若干

2.2.7.3 试验步骤

- (1) 在使用现场,随机选定受试者。试验不少于 30 人次。
- (2) 消毒前,在受试者双手相互充分搓擦后,让受试者左手指并拢,用无菌棉拭在含 10ml 稀释液试管中浸湿,于管壁上挤干后,在五指屈面指尖至指根,往返涂擦 2 遍,每涂擦一遍,将棉拭转动一次。采样后,以无菌操作方式将棉拭采样端剪入原稀释液试管内,作为阳性对照组样本。
- (3) 根据消毒剂使用说明书规定的的方法和剂量使用浓度对右手进行消毒,对手的卫生消毒一般设定作用时间为 1min,对外科洗手后的泡手一般设定作用时间为 3min。消毒后用中和剂溶液代替稀释液,与阳性对照组同样的方法对受试者右手上残留的自然菌采样一次,作为实验组样本。
- (4) 将阳性对照组和实验组样本,分别取 1.0ml,以琼脂倾注法接种平皿,每个样本接种 2 个平皿,放 37℃ 恒温培养箱中培养 48h,观察最终结果。
- (5) 将本次试验未用完的同批次中和剂溶液、稀释液、棉拭、培养基等分别设阴性对照。
- (6) 计算杀灭对数值

2.2.7.4 评价规定

阴性对照组应无菌生长,阳性对照组应有较多细菌生长,以对 30 人次手上自然菌的平均杀灭对数值 ≥ 1 ,可判为消毒合格。

2.2.7.5 注意事项

- (1) 本试验需有志愿者参与,重复人次较多,一人可多次受试,但不得在一批试验或同日反复参与,否则可影响结果的准确性。
- (2) 受试者接受试验时,不得触摸任何表面,以免使手的试验部位沾染杂菌。
- (3) 棉拭涂抹采样,较难标准化,为此应尽量使棉拭的大小,用力的均匀,吸取采样液的量,以及洗菌时敲打的轻重等先后保持一致。
- (4) 擦拭消毒时,涂药量要适宜,涂抹要均匀。
- (5) 现场样本须及时检测,室温存放不得超过 2h。否则应放 4℃ 冰箱内,但亦不得超过 4h。
- (6) 对于免洗手类消毒液,试验组应根据说明书介绍的方法涂擦,作用时间一般到消毒液干燥后停止。

2.2.8 消毒剂对皮肤消毒模拟现场试验

2.2.8.1 目的

用于测定消毒剂对人工污染于皮肤表面细菌的杀灭作用,并作为确定该消毒剂对皮肤消毒

实用剂量的参考。

2.2.8.2 实验器材

(1) 实验菌株：金黄色葡萄球菌 ATCC 27217，对尚需用于杀灭其他特定细菌目的者，可增用该特定细菌进行试验。

(2) 培养基：胰蛋白胨大豆琼脂培养基（TSA），见附录 A

(3) 稀释液：见附录 A

(4) 中和剂溶液：经中和剂经鉴定合格

(5) 液体肥皂 200g/L

(6) 金属筒（直径 2.2cm、高度 3cm）

(7) 尼龙刮菌棒

(8) 无菌纱布巾

(9) 吸管、试管、平皿若干

(10) 振荡混合器

(11) 一次性接种环（直径 4mm）

(12) 外用皮肤消炎药膏（例如：百多帮抗生素软膏）

(13) 皮肤消毒剂（例如 4%葡糖酸洗必泰）

(14) 标准硬水：见附录 A

(15) 恒温培养箱

2.2.8.3 试验步骤

(1) 菌悬液的制备按 2.1.2.3 规定的方法和要求进行。

(2) 使用液体肥皂清洗受试者前臂内侧 1min，用自来水冲净残留皂液，然后用无菌纱布擦干，以去除前臂内侧表面污染的自然菌。

(3) 在受试者的每只前臂中段（不要在手腕和肘褶皱处），用带有印墨直径为 3.00cm 的玻璃筒扣在皮肤上，划分出一个试验区。

(4) 使用加样器取 $10\mu\text{l}$ 上述菌悬液，滴加于前臂试验区（使回收菌落数为 2×10^6 cfu/试验区 $\sim 1\times 10^7$ cfu/试验区），用一次性接种环，把菌悬液涂成一圆形，并与试验区边缘应有 4mm $\sim$ 5mm 的距离，使其在空气中自然干燥。

(5) 根据消毒剂使用说明书规定的方法对右前臂内侧进行消毒，一般设定作用时间为 1min $\sim$ 3min。

(6) 作用至规定时间，用中和剂溶液对前臂上涂菌的区域进行取样。采样时，将金属筒放置于试验区中间部位，罩住染菌区，不要接触到盖有印墨的边缘。将 1.0ml 中和剂溶液吸移至金属筒内，用尼龙刮菌棒刮洗金属筒罩住区域内的皮肤 60s，将筒内液体吸移至试管内，再加 1.0ml 中和剂溶液对该区域内的皮肤进行第二次刮洗 30s，将第二次擦洗的液体，注入含第一次刮洗液体的试管中，作为实验组样本。

(7) 以标准硬水代替消毒剂对左前臂中段做同样处理, 用稀释液做适当稀释, 取适宜稀释度作为对照组样本。

(8) 将阳性对照组和实验组样本, 分别取 1.0ml, 以琼脂倾注法接种平皿, 每个样本接种 2 个平皿, 放 37℃ 恒温培养箱中培养 48h, 观察最终结果。

(9) 将本次试验未用完的同批次中和剂溶液、稀释液、棉拭、培养基等分别设阴性对照。

(10) 计算杀灭对数值。

(11) 试验不得少于 15 人次。

2.2.8.4. 评价规定

阴性对组无菌生长, 阳性对照组回收菌落数为 2×10^6 cfu/试验区 $\sim 1 \times 10^7$ cfu/试验区, 且对每一人次皮肤表面人工污染的大肠杆菌的杀灭对数值均 ≥ 3.00 , 可判为消毒合格。

2.2.8.5 注意事项

(1) 受试者录用标准

- 1) 年龄介于 18 岁至 65 岁的男性或女性;
- 2) 受试者应身体健康;
- 3) 前臂皮肤应完好无损且没有皮肤病及其它皮肤问题。

(2) 排除受试者的标准, 如果受试者有下列情况之一, 不能被录用参加试验

- 1) 怀孕妇女;
- 2) 诊断患有糖尿病、肝炎、艾滋病 (HIV 阳性)、器官移植者。

(3) 试验采样结束后, 先用 70% 的酒精对受试者前臂进行消毒, 然后用皮肤消毒剂 (如: 4% 葡萄糖酸洗必泰) 对两只前臂进行消毒处理, 处理后清水冲洗, 擦干, 再涂少量的抗生素软膏于试验区, 以防皮肤感染。

(4) 在试验完成后的 48h 至 72h 内, 受试者如发现前臂上有小脓疱、水疱, 隆起的红色痒疱, 应及时通知检验单位。

2.2.9 消毒剂对皮肤消毒现场试验

2.2.9.1 目的

测定消毒剂对皮肤表面自然菌消毒所需使用的剂量, 以作为确定该消毒剂对皮肤消毒实用剂量的参考。

2.2.9.2 实验器材

- (1) 中和剂溶液: 经中和剂经鉴定合格
- (2) 培养基: 胰蛋白胨大豆琼脂培养基 (TSA)
- (3) 稀释液: 见附录 A
- (4) 标准硬水: 见附录 A
- (5) 无菌纱布巾
- (6) 规格板 (用牛皮纸制备, 中央留一 $3.00\text{cm} \times 10.0\text{cm}$ 的空格作为采样部位) $121^\circ\text{C} 15\text{min}$

灭菌备用

- (7) 无菌棉拭
- (8) 振荡混合器
- (9) 吸管、试管、平皿若干

2.2.9.3 试验步骤

- (1) 在使用现场,随机选定受试者。试验不少于 30 人次。
- (2) 消毒前,让受试者将左右前臂内侧中段相互充分对搓后,将规格板放于受试者左前臂内侧中段表面,用无菌棉拭在含 10ml 稀释液试管中浸湿,于管壁上挤干后,在规格板框定的区域内,横向往返涂擦 3 遍,纵向往返涂擦 10 遍,每涂擦一遍,将棉拭转动一次。采样后,以无菌操作方式将棉拭采样端剪入原稀释液试管内,振荡混合器振荡混匀 20s,或在手掌振打 200 次,用稀释液作适当稀释,取适宜稀释度作为阳性对照组样本。
- (3) 根据消毒剂使用说明书规定的方法对右前臂内侧进行消毒,一般设定作用时间为 1~3min。消毒作用至规定时间用中和剂溶液代替稀释液,与阳性对照组同样的方法对受试者右前臂内侧表面残留的自然菌采样一次,作为实验组样本。
- (4) 将阳性对照组和实验组样本,分别取 1.0ml,以琼脂倾注法接种平皿,每个样本接种 2 个平皿,放 37℃ 恒温培养箱中培养 48h,观察最终结果。
- (5) 将本次试验未用完的同批次中和剂溶液、稀释液、棉拭、培养基等分别设阴性对照。
- (6) 计算杀灭对数值

2.2.9.4 评价规定

阴性对照组应无菌生长,阳性对照组有较多细菌生长时,以对 30 人次批皮肤表面自然菌的平均杀灭对数值 ≥ 1.00 ,可判为消毒合格。

2.2.9.5 注意事项

- (1) 本试验需有志愿者参与,重复人次较多,一人可多次受试,但不得在一批试验或同日反复参与,否则可影响结果的准确性。
- (2) 受试者接受试验时,不得触摸任何表面,以免使试验部位沾染杂菌。
- (3) 棉拭涂抹采样,较难标准化,为此应尽量使棉拭的大小,用力的均匀,吸取采样液的量,以及洗菌时敲打的轻重等先后保持一致。
- (4) 擦拭消毒时,涂药量要适宜,涂抹要均匀。
- (5) 现场样本须及时检测,室温存放不得超过 2h。否则应放 4℃ 冰箱内,但亦不得超过 4h。

2.2.10 消毒剂对其他表面消毒模拟现场鉴定试验

2.2.10.1 目的

用于鉴定消毒剂对人工污染于一般物体(指除本规范已有专门规定如食(饮)具、医疗器械等以外的物体)表面细菌的杀灭作用,作为确定消毒剂对上述表面消毒实用剂量的参考。其他方法对一般物体表面消毒效果的鉴定,亦可参照本试验的原则进行。

2.2.10.2 实验器材

(1) 实验菌株：大肠杆菌(8099)。如需用于杀灭其特定微生物者，可增用该特定微生物进行试验。菌悬液制备，按 2.1.2 规定的方法和要求进行。

(2) 中和剂溶液：经中和剂鉴定试验合格

(3) 稀释液：见附录 A

(4) 培养基：胰蛋白胨大豆琼脂培养基，见附录 A

(5) 标准硬水：见附录 A

(6) 规格板(用不锈钢材料制备，中央留一 $5.00\text{cm} \times 5.00\text{cm}$ 的空格作为采样部位)

(7) 无菌棉拭

(8) 电动混匀器

2.2.10.3 试验步骤

(1) 以人工染菌实物为消毒对象。在无特殊要求情况下，可用木制桌面为代表，进行消毒效果观察。

(2) 每次试验，各类物品表面测试 30 个样本。

(3) 染菌时，选物品较平的部位，于规格板中央空格，用无菌棉拭沾以菌悬液均匀涂抹被试表面的 33 个区块(各为 25cm^2)。待自然干燥后进行试验。3 个区块作为阳性对照区，30 个区块为实验区。

(4) 消毒前，将无菌棉拭于含 10ml 稀释液试管中浸湿，于管壁上挤干后，对 3 个对照组区块涂抹采样，每区块横竖往返各 8 次。采样后，以无菌操作方式将棉拭采样端剪入原稀释液试管内，电动混匀器振荡 20s，或在手掌上振打 200 次，用稀释液做适当稀释后，作为阳性对照组样本。

(5) 根据说明书中规定的方法和使用剂量对物体表面进行消毒。消毒作用至规定时间，将无菌棉拭于含 10ml 中和剂溶液试管中浸湿，于管壁上挤干后，分别对 30 个消毒区块进行涂抹采样，每区块横竖往返各 8 次。采样后，以无菌操作方式将棉拭采样端剪入原中和剂溶液试管内，电动混匀器振荡 20s 或振打 200 次，作为消毒组样本。

(6) 将阳性对照组和实验组样本，分别取 1.0ml，以琼脂倾注法接种平皿，每个样本接种 2 个平皿，放 37°C 恒温培养箱中培养 48h，观察最终结果。

(7) 将本次试验未用完的同批次中和剂溶液、稀释液、棉拭、培养基等分别设阴性对照。

(8) 计算杀灭对数值。

2.2.10.4 评价规定

阴性对组无菌生长，阳性对照组检测菌量为 $2.5 \times 10^7 \text{cfu/样本} \sim 1.25 \times 10^8 \text{cfu/样本}$ (相当于 $1 \times 10^6 \text{cfu/cm}^2 \sim 5 \times 10^6 \text{cfu/cm}^2$) 时，所有 30 个样本的杀灭对数值均 ≥ 3.00 ，可判为消毒合格。

2.2.10.5 注意事项

(1) 试验操作必须采取严格的无菌技术。

(2) 每次试验均需设阳性和阴性对照, 绝不可省略。

(3) 消毒前后采样(阳性对照组和消毒实验组), 不得在同一区内进行。

(4) 棉拭涂抹采样较难标准化, 为此应尽量使棉拭的大小, 用力的均匀, 吸取采样液的量, 洗菌时敲打的轻重等等先后一致。

(5) 现场样本须及时检测。室温存放不得超过 2h, 否则应置 4℃冰箱内, 但亦不得超过 4h。

2.2.11 消毒剂对其他表面消毒现场鉴定试验

2.2.11.1 目的

用于鉴定消毒剂对一般物体[指除本规范已有专门规定如食(饮)具、医疗器械等以外的物体]表面自然菌的杀灭作用, 以作为确定消毒剂对上述表面消毒实用剂量的参考。

2.2.11.2 实验器材

(1) 中和剂溶液: 经中和剂鉴定试验合格

(2) 稀释液: 见附录 A

(3) 培养基: 胰蛋白胨大豆琼脂培养基 见附录 A

(4) 规格板(用不锈钢材料制备, 中央留一 5.00cm×5.00cm 的空格作为采样部位)

(5) 无菌棉拭

(6) 电动混匀器

2.2.11.3 操作程序

在使用现场, 按说明书介绍的用量、作用时间、使用频率和消毒方法消毒物体表面, 检测样本数应≥30 份。

(1) 随机取物体表面(桌面、台面、门等), 用规格板标定 2 块面积各为 25cm²的区块, 一供消毒前采样, 一供消毒后采样。

(2) 消毒前, 将无菌棉拭于含 10ml 稀释液试管中浸湿, 于管壁上挤干后, 对一区块涂抹采样, 横竖往返各 8 次。采样后, 以无菌操作方式将棉拭采样端剪入原稀释液试管内, 电动混匀器震荡 20s 或在手掌振打 200 次, 做适当稀释后, 作为阳性对照组样本。

(3) 根据说明书规定的方法和剂量, 对物体表面进行消毒。消毒作用至规定时间, 将无菌棉拭于含 10ml 中和剂溶液试管中浸湿, 于管壁上挤干后, 对消毒区块涂抹采样, 横竖往返各 8 次。采样后, 以无菌操作方式将棉拭采样端剪入原中和剂溶液试管内, 电动混匀器震荡 20s 或在手掌振打 200 次, 作为消毒组样本。

(4) 将阳性对照组和实验组样本, 分别取 1.0ml, 以琼脂倾注法接种平皿, 每个样本接种 2 个平皿, 放 37℃培养箱中培养 48h, 观察最终结果。

(5) 将本次试验未用完的同批次中和剂溶液、稀释液、棉拭、培养基等分别设阴性对照。

(6) 计算杀灭对数值。

2.2.11.4 评价规定

· 阴性对组应无菌生长, 阳性对照组应有较多细菌生长时, 消毒样本的平均杀灭对数值 ≥ 1.00 , 可判为消毒合格。

2.2.11.5 注意事项:

(1) 在现场试验中, 自然菌的种类较复杂, 平板上常出现大面积霉菌生长, 导致无法计数菌落。此时, 在两个平行的平板中如有一个平板可数清菌落数, 即按该平板菌落数计算结果。如两平板均有大面积霉菌生长, 应重新进行试验。

(2) 试验操作必须采取严格的无菌技术。

(3) 每次试验均需设阳性和阴性对照, 绝不可省略。

(4) 消毒前后采样(阳性对照组和消毒实验组), 不得在同一区块内进行。

(5) 棉拭涂抹采样较难标准化, 为此应尽量使棉拭的大小, 用力的均匀, 吸取采样液的量, 洗菌时敲打的轻重等等先后一致。

(6) 现场样本须及时检测。室温存放不得超过 2h, 否则应置 4℃ 冰箱内, 但亦不得超过 4h。

2.2.12 消毒剂对织物表面消毒模拟现场鉴定试验

2.2.12.1 目的

用于鉴定消毒剂对人工污染于织物细菌的杀灭作用, 作为确定消毒剂对织物消毒实用剂量的参考。本方法适用于对织物进行浸泡消毒的消毒剂。

2.2.12.2 实验器材

(1) 实验菌株: 金黄色葡萄球菌 ATCC 6538。如需用于杀灭其特定微生物者, 可增用该特定微生物进行试验。菌悬液制备, 按 2.2.2 规定的方法和要求进行。

(2) 中和剂溶液: 经中和剂鉴定试验合格

(3) 稀释液: 见附录 A

(4) 培养基: 胰蛋白胨大豆琼脂培养基

(5) 载体: 布片, 规格 10mm×10mm

(6) 标准硬水: 见附录 A

(7) 小布袋: 规格 50mm×50mm

(8) 电动混匀器

2.2.12.3 试验步骤

(1) 菌片的制备见 2.1.2.4, 每次试验, 需测试 30 个样本。

(2) 将菌片放入小布袋中, 每袋放入三个菌片, 分别将 10 个放有菌片的小布袋放入 5 件白大衣的左右口袋内。

(3) 根据说明书中介绍的使用浓度将白大衣浸没于消毒剂溶液中, 浸泡至规定的消毒作用时间后, 以无菌操作方式用镊子将菌片放入含 5ml 中和剂溶液的试管内, 电动混匀器振荡 20s 或在手掌振打 80 次, 作为实验组样本。

(4) 另将三个菌片放入一小布袋中, 将其浸泡于标准硬水中, 浸泡至与消毒组同样的时间,

以无菌操作方式用镊子将染菌布片放入含 5ml 中和剂溶液的试管内，在电动混匀器上振荡 20s 或在手掌振上打 80 次，作为阳性对照组样本。

(5) 将阳性对照组和实验组样本, 分别取 1.0ml, 以琼脂倾注法接种平皿, 每个样本接种 2 个平皿, 放 37℃ 恒温培养箱中培养 48h, 观察最终结果。

(6) 将本次试验未用完的同批次中和剂溶液、稀释液、培养基等分别设阴性对照。

(7) 计算杀灭对数值。

2.2.12.4 评价规定

阴性对组无菌生长, 阳性对照组回收菌落数为 1×10^6 cfu/片 $\sim 5 \times 10^6$ cfu/片时, 30 个样本的杀灭对数值均 ≥ 3.00 , 可判为消毒合格。

2.2.12.5 注意事项

(1) 试验操作必须采取严格的无菌技术。

(2) 每次试验均需设阳性和阴性对照, 绝不可省略。

2.2.13 消毒洗衣粉(剂)对织物表面消毒模拟现场鉴定试验

2.2.13.1 目的

用于鉴定消毒洗衣粉(剂)对人工污染于织物细菌的杀灭作用, 作为确定消毒洗衣粉(剂)对织物消毒实用剂量的参考。本方法适用于对织物进行机洗消毒的消毒洗衣粉(剂)。

2.2.13.2 试验器材

(1) 实验菌株: 金黄色葡萄球菌 ATCC 6538, 铜绿假单胞菌 ATCC15442

(2) 培养基: 营养琼脂 A (琼脂含量为 1.5%)

营养琼脂 B: 在营养琼脂 A 中另加入 1.5% 的琼脂

胰蛋白胍大豆肉汤培养基 (TSB)

胰蛋白胍大豆琼脂培养基 (TSA)

(3) 牛血清白蛋白 (过滤除菌)

(4) 烷基酚聚氧乙烯醚 (Tergitol)

(5) 碳酸钠

(6) 标准硬水: 见附录 A

(7) 非离子浸湿剂: 见测试棉布制备部分

(8) 冲洗溶液

(9) 中和剂 (经中和剂鉴定合格)

(10) 吐温 80 (过滤除菌)

(11) 灭菌去离子水或蒸馏水

(12) 不锈钢转轴 (由一条直径 0.16cm 不锈钢丝制成, 如图 2-2)

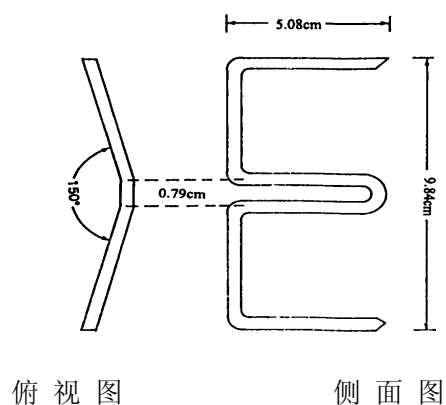


图2—2 缠绕测试布条的不锈钢转轴

(13) 有金属螺盖的玻璃罐（容积为470 ml，可高压灭菌，并可放入转轴的广口罐），将罐口覆盖牛皮纸，加盖，于121℃灭菌25 min 备用。

(14) 转动速度为45 r/min ~ 60 r/min 的滚动摇床

(15) 可调恒温水浴箱

(16) 吸管（1ml, 5ml, 和 10 ml）

(17) 培养皿

(18) 铺有滤纸的玻璃培养皿。

(19) 菌种保存管

(20) 细菌培养箱

(21) 涡流振荡器

(22) 细菌比浊仪

(23) 棉布 (32 织纱/cm × 32 织纱/cm 平织棉布)

(24) 别针、镊子、无菌手套、3mm~5 mm 玻璃珠、秒表、载体布片 2.5cm×3.75cm，见测试棉布准备。

(25) 磷酸盐缓冲液 (PBS 0.03mol/L pH7.2)

2.2.13.3 实验准备

(1) 测试棉布的制备

①非离子浸润剂的制备: 取5g烷基酚聚氧乙烯醚，5 g 碳酸钠加入到1 L 去离子水中。

②洗涤液的制备: 1.5g 非离子浸润剂，1.5 g 碳酸钠，加入到3 L 去离子水中。

将大约300g 测试棉布加入3L 洗涤溶液。加热煮沸1h。取出棉布在煮沸的去离子水中清洗 5min。然后放入凉去离子水中 5min。以去除残留的浸润剂。然后将棉布晾干。

(2)测试棉布和转动支架的准备: 取处理过的棉布, 剪成5cm 宽, 重量为15g ±1g 的布条, 将其一端插入固定在测试转动支架的水平方向的外边, 然后在三条水平支架间以足够的张力缠绕12个整圈, 将布条的另一端用不锈钢别针固定在前一圈布条上。最后以121℃ 压力蒸汽灭菌15 min, 备用。

(3) 细菌悬液的制备：取0.5 ml 营养肉汤溶解的冻干的菌种，然后吸取0.1ml 接种于含10ml 的营养肉汤的试管，于 $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 培养24h。然后，振荡混合均匀。用10 μl 接种环在营养琼脂平板上划线，置于 $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 培养24h。然后，从平板上挑取单个菌落种入菌种保藏管中，上下摇动10次，吸弃多余液体，置 -85°C 冰箱保存。试验前，从菌种保藏管中取出一粒带菌小粒珠，放入营养琼脂斜面，晃动斜面。将斜面至 35°C 培养24h。每天转种1次，连续传三代。

第四天，用5 ml PBS洗脱斜面上的菌苔，取0.5 ml加入到含9.5 ml PBS的试管中，混匀，取1 ml~2 ml 加入含有20 ml 营养琼脂B的细胞培养瓶中，晃动培养瓶使菌液覆盖整个琼脂表面。吸弃多余菌液，然后将培养瓶倒置平放在 35°C 培养箱中，培养24小时。

用5 ml PBS和3 g 灭菌玻璃珠洗脱细胞瓶中的菌体，用PBS调整浓度至 $1 \times 10^8 \text{ cfu/ml}$ ~ $5 \times 10^8 \text{ cfu/ml}$ ，然后加入3%的牛血清白蛋白。

(4) 染菌载体的制备：每片载体接种20 μl 菌悬液，放回培养皿中，加盖，于 $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 在培养箱中干燥20 min。

(5) 测试样品的制备：至少在实验开始前20 min，将盛有265 ml 硬水的玻璃罐在水浴箱中恒温至测试温度($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$)。加入被测试样品混合溶解。

2.2.13.4 试验步骤

(1)将两片染菌载体放入转动支架的第6和7层布条之间，将第3片放入第7和8层布条之间。

(2)以无菌操作方式将转动单元(支架、布条和染菌载体)放入含有测试产品的玻璃罐中，加盖。

(3)玻璃罐固定在摇床上，滚动旋转洗涤20 min，取下玻璃罐。

(4)以无菌操作方式，取出转动单元，取出3片染菌载体，放入到含有30 ml中和剂的试管中，在振荡器中混合10s。然后振打80次，用PBS做10倍系列稀释，并选择适宜稀释度样液接种TSA平板。每个稀释度接种两个平板。

(5)对照组除用0.5% (V/V) 的吐温80替代测试产品外，其它实验条件和步骤均与试验组相同。

(6)将试验组、对照组和菌数对照组平板倒置于 $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 培养箱中，培养 $48 \text{ h} \pm 4 \text{ h}$ ，计数菌落数。

(7)结果计算

试验重复3次。记录并计算测试样品的细菌总数，求其平均值。

2.2.13.5 评价规定

按2.1.7.4 (8) 方法计算杀灭对数值。杀灭对数值 ≥ 3.00 ，可判定该产品为消毒合格。

2.2.13.6 注意事项

(1) 将旋转单元放入玻璃罐后应将盖子盖紧，以防转动时漏水。

(2) 试验时应严格无菌操作，以防止杂菌污染。

2.2.14 消毒剂对果蔬消毒模拟现场试验

2.2.14.1 目的

用于验证消毒剂对瓜果蔬菜上细菌的杀灭作用，作为确定该消毒剂对瓜果蔬菜消毒实用剂量的参考。

2.2.14.2 实验器材

(1) 实验菌株：大肠杆菌（8099）。菌悬液制备按 2.1.2 规定的方法和要求进行。

(2) 标准硬水：见附录 A

(3) 中和剂溶液：经中和剂鉴定合格

(4) 稀释液：见附录 A

(5) 培养基：胰蛋白胨大豆琼脂培养基

(6) 无菌棉拭

(7) 灭菌剪刀

(8) 试验用果蔬：首选粗细均匀、新鲜、普通品种黄瓜（黄瓜周长约 10.0cm），试验前标出染菌区，即取中间段，每段长度约 2.5cm，使染菌区表面积为 25.0cm^2 。

(9) 电动混匀器

2.2.14.3 操作程序

(1) 按产品使用说明书规定的用法，选定本试验拟用浓度和作用时间，进行大肠杆菌杀灭试验。

(2) 取 13 件样本进行试验。用流动的生活饮用水清洗 15s，去除黄瓜表面污渍，然后用无菌纱布擦干。

(3) 试验样本的制备 用棉签蘸取菌悬液均匀涂布在标出的染菌区，置 37°C 恒温箱或室温干燥，使回收菌量均为 2.5×10^7 cfu/样本 $\sim 1.25 \times 10^8$ cfu/样本

(4) 按照每件试验样本 400ml 配制试验浓度消毒液。将 10 件试验样本顺序依次轻轻放入含消毒剂溶液的容器中，使其完全浸没。待浸泡至规定时间，按放入顺序依次将试验样本轻轻取出，将无菌棉拭于含 10ml 中和剂溶液试管中沾湿分别在试验样本染菌区涂抹采样，然后将棉拭棉花端剪入原中和剂溶液试管内，电动混匀器振荡 20s 或在手掌振打 200 次，作用 10min，作为实验组样本。

(5) 按照每件试验样本 400ml 配制标准硬水。将 3 件试验样本顺序依次缓缓放入含标准硬水的容器中，使其完全浸没，浸泡时间和其余步骤与实验组相同，作为阳性对照组样本。

(6) 将阳性对照组和实验组样本，分别取 1.0ml，以琼脂倾注法接种平皿，每个样本接种 2 个平皿，放 37°C 恒温培养箱中培养 48h，观察最终结果。

(7) 将本次试验未用完的同批次中和剂溶液、稀释液、培养基等分别设阴性对照。

(8) 按下式计算每件试验样本上的生长菌落数。

每件试验样本生长菌落数 (cfu/样本) = 平板上平均菌落数 $\times 10 \times$ 检测时样本稀释倍数

(9) 按 2.1.7.4 (8) 的公式计算杀灭对数值。

(10) 以上试验重复 3 次。

2.2.14.4 评价规定

3 次试验阴性对照均无菌生长, 阳性对照组回收菌量均为 2.5×10^7 cfu/样本 $\sim 1.25 \times 10^8$ cfu/样本 (相当于 1×10^6 cfu/cm² $\sim 5 \times 10^6$ cfu/cm²) 时, 30 个样本的杀灭对数值均 ≥ 3.00 , 所用消毒剂的浓度和作用时间为消毒合格剂量。

2.2.14.5 注意事项

(1) 试验操作过程必须采取严格的无菌技术。直接或间接接触样本的器材必须经灭菌使用。

(2) 每次试验必须设置阳性和阴性对照, 绝不可省略。

(3) 棉拭涂抹采样较难标准化, 为此应注意使棉拭的大小, 用力的均匀, 吸取采样液的量, 洗菌时敲打的轻重等应先后一致。

(4) 阴性对照组若有菌生长, 应更换培养基、PBS 或中和剂, 重新进行试验。

2.3 空气消毒效果鉴定试验

2.3.1 目的

检测消毒器械或消毒剂对空气中细菌的杀灭和 (或) 清除作用, 以评价其对空气的消毒效果, 并测出所需使用剂量。其他方法对空气的消毒效果, 亦可参照本试验的有关原则进行。

2.3.2 试验设备和器材

(1) 实验菌株: 白色葡萄球菌 8032, 其菌悬液的制备方法见 2.1.2。

(2) 采样液: 用于液体撞击式采样器采样。非化学因子杀菌试验时, 用含抗泡沫剂 (辛醇或橄榄油) 的营养肉汤培养基; 消毒剂杀菌试验时, 用含相应中和剂的营养肉汤培养基。

(3) 中和剂: 经中和剂鉴定合格

(4) 磷酸盐缓冲液 (PBS, 0.03 mol/L, pH 7.2)

(5) 普通营养肉汤培养基。

(6) 普通营养琼脂培养基。消毒剂杀菌试验时, 尚需在其中加入相应的中和剂。

(7) 相邻的一对气雾柜或气雾室, 一个用于消毒试验, 一个用于试验对照。一对气雾柜或气雾室所处环境 (包括温度、湿度、光照、密闭性、和通风条件等) 应一致。柜 (或室) 宜以不锈钢或铝合金和玻璃构建。应安装温度和湿度调节装置以及通风机过滤除菌或其它消毒装置和相应管道, 此外, 还应开启喷雾染菌、给消毒剂、采样、袖套操作和样本传递等窗口。

(8) 喷雾染菌装置, 包括: 空气压缩机、压力表、气体流量计、气溶胶喷雾器等。喷出细菌气溶胶微粒的直径 90% 以上应在 $1 \mu\text{m} \sim 10 \mu\text{m}$ 之间。

(9) 空气微生物采样装置, 包括: 六级筛孔空气撞击式采样器、液体撞击式采样器、抽气设备、气体流量计等。

(10) 环境监测器材, 如温度计、湿度计等。

2.3.3 实验阶段

在进行正式空气消毒前, 应先进行预备试验, 了解所测消毒剂或消毒器械是否对实验菌具有杀灭作用(悬液定量杀菌试验法, 见 2.1.7.4), 以便设定正式试验的剂量分组。

当预备试验证明拟测试的消毒剂或消毒器械有可能用于空气消毒时, 即可依次进行随后的正式试验。由于空气消毒试验操作难度大, 且其消毒空间愈大, 难度愈大, 故最好由小到大逐步进行, 以免造成试验的反复, 耗费人力、物力和时间。空气消毒试验分为实验室试验、模拟现场试验与现场试验。三个阶段试验的特点见表 2-2。

表 2-2 各阶段空气消毒试验的特点

项 目	实验室试验	模拟现场试验	现场试验
目 的	测定最低有效剂量	测定最低有效剂量	验证实用消毒效果
试验柜(室)	$\geq 1\text{m}^3$ 柜	$10\text{m}^3 \sim 20\text{m}^3$ 柜	$\geq 20\text{m}^3$ 房间
采样器	液体撞击式	六级筛孔空气撞击式	六级筛孔空气撞击式
菌 株	白色葡萄球菌	白色葡萄球菌	空气中自然菌
实验菌雾粒	$< 10\mu\text{m}$	$< 10\mu\text{m}$	不 定
温 度	$20^\circ\text{C} \sim 25^\circ\text{C}$	$20^\circ\text{C} \sim 25^\circ\text{C}$	自然条件
相对湿度	50%~70%	50%~70%	自然条件
中和剂	加于采样液中	加于采样培养基中	加于采样培养基中
对 照	需有自然消亡对照 (衰亡率 $< 50\%$)	需有自然消亡对照 (衰亡率 $< 50\%$)	不需自然消亡对照
结果计算	杀灭率	杀灭率	消亡率

2.3.4 实验室试验与模拟现场试验操作程序

(1) 取实验菌悬液, 用无菌脱脂棉过滤后, 再用营养肉汤培养基稀释成所需浓度。

(2) 同时调节两个气雾柜(或室)的温度、相对湿度至试验要求的温度和相对湿度。

(3) 将使用的器材一次放入气雾柜(或室)内, 将门关闭。此后, 一切操作和仪器设备的操纵均在柜(或室)外通过带有密封袖套的窗口或摇控器进行。直至试验结束, 始可将门打开。

(4) 按预备试验确定的压力、气体流量及喷雾时间喷雾染菌。边喷雾染菌, 边用风扇搅拌。喷雾染菌完毕, 继续搅拌 5 min, 而后静置 5 min, 同时对对照组和实验组气雾柜(或室)分别进行消毒前采样, 作为对照组试验开始前和实验组消毒处理前的阳性对照(即污染菌量)。气雾柜(或室)内空气细菌浓度应达 $5 \times 10^4 \text{ cfu/m}^3 \sim 5 \times 10^6 \text{ cfu/m}^3$ (按消毒处理前阳性对照样本检测结果计)。

(5) 在模拟现场试验时, 用六级筛孔空气撞击式采样器采样, 采样时, 将六级筛孔空气

撞击式采样器放在柜室中央 1 m 高处（采样方法按采样器使用说明书进行）。在实验室试验时，气雾柜内用采样量较小的液体撞击式采样器采样，采样器置柜内中央处。

（6）按产品说明书规定方法和根据预备试验结果所设计的用量，在试验气雾柜（或室）内进行消毒。对照组气雾柜室同时作相应（不含消毒剂）处理。

（7）作用至规定时间，对实验组和对照气雾柜（或室）按前述要求同时进行采样。待作用至第二个预定消毒时间，再次进行采样。如此按作用时间继续分段采样，直至规定的最终作用时间为止。

（8）在实验室试验阶段，用液体撞击式采样器采集的样本，按 2.1.3 所示方法进行活菌培养计数，在 37℃ 培养箱内培养 48h，观察最后结果。

（9）在模拟现场试验阶段，用六级筛孔空气撞击式采样器采样时，采样平板直接放入 37℃ 培养箱中培养 48 h，观察最后结果，计数生长菌落。

（10）全程试验完毕，对表面和空气中残留的细菌做最终消毒后，打开通风机过滤除菌排风，排除柜（或室）内滞留的污染空气，为下一次试验作好准备。

（11）在完成实验组与阳性对照组采样和样本接种后，应将未用的同批培养基、采样液和 PBS 等（各取 1 份~2 份），与上述两组样本同时进行培养或接种后培养，作为阴性对照。若阴性对照组有菌生长，说明所用培养基或试剂有污染，试验无效，更换无菌器材重新进行。

（12）同一条件试验重复 3 次，每次均分别计算其杀灭率。3 次结果的杀灭率均 $\geq 99.90\%$ 时，可判为消毒合格。杀灭率的计算方法如下：

$$N_t = \frac{V_0 - V_t}{V_0} \times 100\%$$

$$K_t = \frac{V_0'(1 - N_t) - V_t'}{V_0'(1 - N_t)} \times 100\%$$

[N_t ：不同时间空气中细菌的自然消亡率；

V_0 与 V_t ：分别为对照组试验开始前和试验过程中不同时间的空气含菌量；

K_t ：消毒处理对空气中细菌的杀灭率；

V_0' 与 V_t' ：分别为实验组消毒处理前、和消毒过程中不同时间的空气含菌量。]

消毒前后空气中的含菌量按下列公式计算：

（1）液体撞击式空气采样法空气中含菌量

$$\text{空气含菌量 (cfu / m}^3\text{)} = \frac{\text{平板上平均菌数 (cfu / ml)} \times \text{稀释倍数} \times \text{采样液量 (ml)}}{\text{采样流量 (L / min)} \times \text{采样时间 (min)}} \times 1000$$

（2）六级筛孔式空气撞击式采样法空气中含菌量

$$\text{空气含菌量 (cfu/m}^3\text{)} = \frac{\text{六级采样平板上总菌数 (cfu)}}{28.3\text{L/min} \times \text{采样时间 (min)}} \times 1000$$

[举例：用某消毒剂对气雾柜内空气消毒 10 min，实验组消毒前空气含菌量为 100 000 cfu/m³，消毒后为 100 cfu/m³；对照组处理前空气含菌量为 90000 cfu/m³，处理后为 50000 cfu/m³。该消毒剂作用 10 min 对空气中微生物的杀灭率按下法计算：

① 细菌在空气中 10 min 的自然消亡率为：

$$N_t = \frac{90000 - 50000}{90000} \times 100\% = 44.44\%$$

② 对空气中微生物的杀灭率为：

$$K_t = \frac{100000(1 - 44.44\%) - 100}{100000(1 - 44.44\%)} \times 100\%$$

$$= \frac{55560 - 100}{55560} \times 100\% = 99.82\%$$

该次试验，消毒剂作用 10min，可将空气中细菌杀灭 99.82%。]

2.3.5 现场试验

(1) 根据使用时的实际情况，选择有代表性的房间并在室内无人情况下进行消毒效果观察。观察时，在消毒处理前用六级筛孔空气撞击式采样器进行空气中自然菌采样，作为消毒前样本（阳性对照）。消毒处理后，再作一次采样，作为消毒后的试验样本。

(2) 采样时，采样器置室内中央 1.0m 高处。房间大 10m² 者，每增加 10m² 增设一点。

(3) 因现场试验环境条件变化较多，难以统一，无法测定准确的自然沉降率，故只按所得消亡率（自然衰亡和消毒处理中杀菌的综合效果）做出验证结论。消亡率的计算按下式进行：

$$\text{消亡率} = \frac{\text{消毒前样本平均菌数} - \text{消毒后样本平均菌数}}{\text{消毒前样本平均菌数}} \times 100\%$$

[举例：一无人手术室，消毒前采样，空气中的平均含菌量为 5000 cfu/m³。用某消毒剂喷雾对室内空气消毒 30 min 后采样，含菌量减至 50 cfu/m³。该消毒剂处理 30 min 后，室内空气中自然菌的消亡率可按下法计算：

$$\text{消亡率} = \frac{5000 - 50}{5000} \times 100\% = 99.00\%$$

该消毒剂作用 30 min，可使房间内空气中自然菌的消亡率达 99.00%。]

(4) 试验采样完成后，应将未用的同批培养基，与上述试验样本同时进行培养或接种后培养，作为阴性对照。阴性对照组若有菌生长，说明所用培养基有污染，试验无效，更换后重新进行。

(5) 试验重复 3 次或以上。计算出每次的消亡率。除有特殊要求者外，对无人室内进行的空气消毒，每次的自然菌消亡率均 $\geq 90\%$ 者为合格。

2.3.6 注意事项

(1) 试验中，因控制统一的条件较难，故每次均需同时设置实验组与对照组。两组条件尽量保持一致。消毒前、后及不同次数间的环境条件亦应尽量保持一致。

(2) 用中和剂鉴定方法筛选出的中和剂，用于现场采样时，还需进一步验证，必要时可对中和剂的浓度进行适当的调整。

(3) 注意记录试验过程中的温度和相对湿度，以便分析对比。

(4) 所采样本应尽快进行微生物检验，以免影响结果的准确性。

(5) 每次试验完毕，气雾柜、气雾室应充分通风。必要时消毒冲洗间隔 4 h 后始可做第二次试验。

(6) 试验时，气雾柜（室）必须保持密闭，设有空气过滤装置，以防染菌空气外逸，污染环境。

(7) 试验时，气雾柜、气雾室或现场房间应防止日光直射，以免造成杀菌作用不稳定。

(8) 雾柜排风过滤装置中的滤材应定期更换，换下的滤材应经灭菌后再作其他处理。

(9) 在气雾柜或密闭房间内进行消毒剂喷雾消毒时，用悬挂染菌样片法观察的消毒效果，不能代表对空气的消毒效果。

2.4 水消毒效果鉴定试验

2.4.1 疫区生活饮用水消毒效果鉴定试验

2.4.1.1 目的

检测生活饮用水消毒剂与消毒器械的杀菌效果，以作为评价消毒剂与消毒器械对生活饮用水消毒能否达到卫生合格标准的参考。

2.4.1.2 实验器材

(1) 实验菌株：大肠杆菌（8099）悬液。取 37℃ 培养 18h~24 h 的新鲜大肠杆菌斜面，用生理盐水洗下菌苔，混匀后再用生理盐水适当稀释，配制成试验用大肠杆菌悬液

(2) 微孔滤膜滤器和滤膜（滤膜孔径为 0.45 μm~0.65 μm，滤膜大小示滤器型号确定，目前常用有直径为 35 mm 和 47 mm 两种）

- (3) 抽滤水泵或气泵
- (4) 恒温水浴箱
- (5) 秒表
- (6) 三角烧瓶
- (7) 广口玻璃瓶 (500 ml)
- (8) 无齿镊子
- (9) 品红亚硫酸钠培养基: 见附录 A
- (10) 中和剂 (经中和剂鉴定合格)
- (11) 细菌定量杀灭试验用其他器材 (见 2.1.7)
- (12) 天然水样
- (13) 模拟现场消毒装置 (见 2.4.1.8)
- (14) 磁力搅拌器

2.4.1.3 试验阶段

疫区饮用水消毒效果的鉴定应经过实验室杀菌试验, 天然水样消毒试验两个阶段的检测。实验室试验的目的是以大肠杆菌为实验菌, 用悬液定量杀菌试验法测出在试管中消毒所需的剂量。天然水样消毒试验是由自然水体取样, 进一步验证受试消毒剂或方法对成分较复杂的天然水的消毒效果。对用于较大水体 (如人工游泳池水、高层建筑二次供水) 消毒的设备和方法, 必要时尚需进行模拟现场或现场试验, 以进一步验证其消毒效果。

由于生活饮用水卫生标准, 除微生物外还需考虑化学污染等方面, 因此对其安全评价尚需由有关专业单位对其他条件, 例如化学物质含量和 pH 值等, 进行检测和判定, 以对所鉴定的消毒剂或器械做出合格与否的综合评价。

2.4.1.4 实验菌污染水样的配制

将用生理盐水配制的大肠杆菌悬液加入脱氯的自来水或蒸馏水中, 使其含菌量达到 5×10^4 cfu/100ml $\sim 5 \times 10^5$ cfu/100ml。

2.4.1.5 实验菌污染水样中活菌的培养计数

(1) 将纤维滤膜在蒸馏水中煮沸消毒 3 次, 每次 15 min。每次煮沸后需更换蒸馏水洗涤 2 $\sim$ 3 次, 以除去残留溶剂。

(2) 滤器用压力蒸汽灭菌 (121℃, 20 min), 也可用酒精火焰灭菌。

(3) 用无菌镊子夹取无菌的滤膜边缘, 将粗糙面向上, 贴放在已灭菌滤器的滤床上, 稳妥地固定好滤器。取一定量待检水样 (稀释或不稀释) 注入滤器中, 加盖, 打开抽气阀门, 在负压 0.05 Mpa 下抽滤。

(4) 水样滤完后, 再抽气约 5s, 关上滤器阀门, 取下滤器。用无菌镊子夹取滤膜边缘, 移放在品红亚硫酸钠琼脂培养基平板上, 滤膜截留细菌面向上。滤膜应与琼脂培养基完全紧贴, 当中不得留有气泡, 然后将平板倒置, 放入 37℃ 恒温培养箱内培养 22h $\sim$ 24h。

(5) 观察结果和计数:计数滤膜上生长带有金属光泽的黑紫色大肠杆菌菌落,并计算出染菌水样中含有的大肠杆菌数 (cfu/100ml)。

$$\text{大肠杆菌数 (cfu /100 ml)} = \frac{\text{滤膜上菌落数} \times \text{稀释倍数}}{\text{被检水样体积 (ml)}}$$

2.4.1.6 实验室杀菌试验操作程序

(1) 饮水消毒剂杀菌试验

1) 实验分组

①实验组 申请消毒产品卫生许可证时,按使用说明书规定的最低剂量,设定 1 个浓度,3 个作用时间(使用说明书规定的最低作用时间,规定最短作用时间的 1.5 倍和规定最短作用时间的一半),测定其对大肠杆菌的杀菌效果。进行消毒产品监督检测时,按使用说明书规定的最低剂量,设定 1 个浓度,1 个作用时间(使用说明书规定的最短作用时间),测定其对大肠杆菌的杀菌效果。

② 阳性对照组,以未经消毒的实验菌污染水样进行活菌培养计数;

③阴性对照组,以试验所用同批次未经使用的培养基进行培养,观察有无细菌生长。

2) 操作程序

①按 2.4.1.4 所示方法配制实验菌污染水样。

②将装有实验菌污染水样的三角烧瓶放入恒温水浴箱(20℃±2℃)中,开动磁力搅拌器,使细菌在水中分布均匀。先取 2 份实验菌污染水样,按 2.4.1.5 所示方法进行大肠杆菌活菌计数(阳性对照组)。

③待水样的温度恒定后加入消毒剂,迅速搅拌均匀。从开始加消毒剂起计时,按规定时间吸取水样,注入装有中和剂的无菌三角烧瓶中,以终止消毒作用。

④将中和后水样,分别取 100 ml,10 ml,1 ml 各 2 份,按 2.4.1.5 所示方法进行大肠杆菌的活菌培养计数。

⑤将未接种大肠杆菌的试验用同批培养基平板 2 个,置温箱中培养(阴性对照组)。

⑥试验重复 3 次。

3) 评价规定

当阳性对照组平均菌量在 5×10^4 cfu/100 ml~ 5×10^5 cfu/100 ml,阴性对照组均无菌生长时。在 3 次试验中均使大肠杆菌下降至 0cfu/100 ml 的最低剂量,可判定为实验室试验中饮水消毒最低有效剂量。若阳性对照和阴性对照未达上述要求,应寻找原因,纠正后重做试验。

(2) 饮水消毒器杀菌试验

本节饮水消毒器械指能产生消毒液并用于饮水消毒的饮水消毒装置。

1) 实验分组

①实验组。申请消毒产品卫生许可证时,按使用说明书规定的最低剂量,设定 1 个作用浓度(使用说明书规定的最低作用浓度)和 3 个作用时间(使用说明书规定的最短作用时间,最短作用时间的 1.5 倍和最短作用时间的 0.5 倍),测定其对大肠杆菌的杀菌效果。进行消毒产品监督检测时,按使用说明书规定的最低剂量,设定 1 个浓度(使用说明书规定的最低作用浓度)和 1 个作用时间(使用说明书规定的最短作用时间),测定其对大肠杆菌的杀菌效果。

②阳性对照组,以未经消毒的实验菌污染水样进行活菌培养计数;

③阴性对照组,以试验所用同批次未经使用的培养基进行培养,观察有无细菌生长。

2) 操作程序

①按 2.4.1.4 所示方法配制实验菌污染水样。

②取 2 份实验菌污染水样,按 2.4.1.5 所示方法进行大肠杆菌活菌计数(阳性对照组)。

③应用气压法或水泵法进行消毒处理。应用气压法时,按要求联接高压($2\text{ kg/cm}^2\sim 3\text{ kg/cm}^2$)气源、耐压水样贮水器($3\text{ kg/cm}^2\sim 5\text{ kg/cm}^2$)、流量计和饮水消毒器。应用水泵法时,则按要求联接耐压水样贮水器($3\text{ kg/cm}^2\sim 5\text{ kg/cm}^2$)、水泵、流量计和饮水消毒器。然后将加有实验菌的水样通过消毒器,取消毒过的水样置含中和剂的灭菌三角瓶中,混匀。分别吸取中和后水样 100ml, 10ml, 1ml 各 2 份,按 2.4.1.5 所示方法进行大肠杆菌的活菌计数。

④将未接种大肠杆菌的试验用同批培养基平板 2 个,置培养箱中培养(阴性对照组)。

⑤试验重复 3 次。

3) 评价规定

当阳性对照组平均含菌量在 $5\times 10^4\text{ cfu}/100\text{ ml}\sim 5\times 10^5\text{ cfu}/100\text{ ml}$ 。阴性对照组均无菌生长时。在 3 次试验中使大肠杆菌均下降至 $0\text{ cfu}/100\text{ ml}$ 的最低剂量,可判定为实验室试验中饮水消毒最低有效剂量。

若阳性对照组和阴性对照组含菌量未达上述要求,应寻找原因,纠正后重做试验。

(3) 饮水过滤器除菌试验

1) 实验分组

①实验组。申请消毒产品卫生许可证时,按使用说明书规定的最大流量,测定其对大肠杆菌的除菌效果。

②阳性对照组,以未经消毒的实验菌污染水样进行活菌培养计数;

③阴性对照组,以试验所用同批次未经使用的培养基进行培养,观察有无细菌生长。

2) 操作程序

①按 2.4.1.4 所示方法配制实验菌污染水样。

②取 2 份实验菌污染水样,按 2.4.1.5 所示方法进行大肠杆菌活菌计数(阳性对照组)。

③按过滤器产品规定的最大流量,将实验菌污染水样(见 2.4.1.4)分段通过饮水过滤除菌装置。按规定过滤的水量,用无菌三角瓶分段采集:初始、1/4、2/4、3/4、4/4 等各段流

出的水样（不需加中和剂）。

④对过滤后各段水样,分别取 100ml、10ml、1ml 各 2 份,进行大肠杆菌活菌培养计数（见 2.4.1.5）。

⑤将未接种大肠杆菌的试验用同批培养基平板 2 个,置培养箱中培养（阴性对照组）。

⑥试验重复 3 次。

3) 评价规定

当阳性对照组平均含菌量在 5×10^4 cfu/100 ml~ 5×10^5 cfu/100 ml。阴性对照组均无菌生长时。在 3 次试验所有流量段水样中大肠杆菌下降至 0cfu/100 ml 时,可判为实验室试验中饮水消毒效果合格。若阳性对照组和阴性对照组含菌量未达上述要求,应寻找原因,纠正后重做试验。

2.4.1.7 杀菌效果影响因素测定试验操作程序（用于饮用水化学消毒试验）

（1）水温影响试验:将人工染有大肠杆菌的水样,温度分别调控在 $5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、 $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、 $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 条件下,对不同温度的水样,按说明书上规定的最低使用剂量（1 个浓度,1 个作用时间）进行杀菌试验,观察水温的影响。试验程序同 2.4.1.5 或 2.4.1.6。试验重复 3 次。3 次试验中,三个温度组杀菌效果均达合格标准,判为温度对该消毒剂杀菌效果影响不明显,所试剂量可在 $5^{\circ}\text{C} \sim 30^{\circ}\text{C}$ 条件下使用。否则应依据杀菌效果确定仅可在杀菌效果均达合格标准的温度区间内使用。试验中应设阳性对照和阴性对照组。两对照组结果未达要求见 2.4.1.6（1）3),应寻找原因,纠正后重做试验。

（2）有机物影响试验

①腐殖酸配制:取 0.1g 腐殖酸（分析纯）用少许 2.0 mol/L 氢氧化钠溶液溶解,加蒸馏水 50 ml,用滤纸过滤至 100 ml 容量瓶中,用 2.0 mol/L HCl 溶液调节 pH 值至中性,并定容至 100 ml,比色测定实际色度。

②水样制备:在水样中加入腐殖酸,比照标准色度管,使色度各为 0 度、10 度、15 度,然后分别加入大肠杆菌悬液,配成不同色度的人工染有大肠杆菌水样。

③消毒处理:按说明书上推荐的最低使用剂量（1 个浓度,1 个作用时间）进行杀菌试验,观察有机物的影响。试验程序同 2.4.1.6（1）或 2.4.1.6（2）。试验重复 3 次。

④ 3 次试验中,3 个浓度的有机物组杀菌效果均达合格标准,判为有机物对该消毒剂杀菌效果影响不明显,所试剂量可用于色度低于 15 度水的处理。否则应依据杀菌效果确定仅可用于低于杀菌效果均达合格标准色度水的处理。试验中应设阳性对照和阴性对照组。两对照组结果未达要求见 2.4.1.6（1）3),应寻找原因,纠正后重做试验。

3) 水中 pH 值的影响试验

①水样制备:用氢氧化钠（分析纯）或盐酸（分析纯）调水样 pH 值分别调为 6.5,7.0 和 8.5,然后加入大肠杆菌悬液,配成不同 pH 值的实验菌污染水样。

②消毒处理:按说明书上推荐的最低使用剂量（1 个浓度,1 个作用时间）进行杀菌试

验, 观察 pH 值的影响。试验程序同 2.4.1.6 (1) 或 2.4.1.6 (2)。试验重复 3 次。

③ 3 次试验中, 3 种 pH 值的消毒剂浓度杀菌效果均达合格标准, 判为 pH 值对该消毒剂杀菌效果影响不明显, 所试剂量可用于 pH 值 6.5~8.5 水的处理。否则应依据杀菌效果确定仅可在杀菌效果均达合格标准的 pH 值区间内使用。试验中应设阳性对照和阴性对照组。两对照组结果未达要求见 2.4.1.6 (1) 3), 应寻找原因, 纠正后重做试验。

2.4.1.8 模拟现场试验和现场试验

考虑到实用情况下各种水质对消毒效果的影响, 根据产品申报的使用范围, 选用某些未做实验菌污染水样的天然水样, 如井水、河水、湖水或高层建筑贮水箱的水等进行消毒试验。

(1) 饮水消毒剂对天然水样杀菌试验

① 根据说明书的最低使用剂量选择 1 个浓度, 1 个作用时间, 对天然水样进行杀菌试验。同时设置阳性对照组与阴性对照组。

② 将装有天然水样的三角烧瓶放入恒温水浴箱 ($20^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$) 中, 开动磁力搅拌器, 使细菌在水中分布均匀。取 2 份同批同类天然水样, 每份 100 ml, 按 2.4.1.5 所示方法计数大肠菌群数 (阳性对照组)。

③ 待水样的温度恒定后, 加入消毒剂, 迅速搅拌均匀。从开始加消毒剂起计时, 按规定时间吸取水样, 注入装有中和剂的无菌三角烧瓶中, 以终止消毒作用。

④ 将中和后水样, 分别取 100 ml 2 份, 按 2.4.1.5 所示方法进行大肠菌菌群的活菌培养计数。

⑤ 将未接种水样的试验用同批培养基平板 2 个, 置培养箱中培养 (阴性对照组)。

⑥ 试验重复 3 次。当阳性对照组均有菌生长。阴性对照组均无菌生长时, 可判定在 3 次试验中均使大肠菌菌群下降至 0cfu/100ml, 可判定为对天然水样消毒合格。

⑦ 如阳性对照组和阴性对照组含菌量未达上述要求, 应寻找原因, 纠正后重做试验。

(2) 饮水消毒器对天然水样杀菌试验

① 根据使用说明书的最低使用剂量选择 1 个浓度, 1 个作用时间, 对天然水样进行杀菌试验。

② 试验前, 先取 2 份试验用天然水样, 每份 100 ml, 按 2.4.1.5 所示方法进行大肠菌菌群的活菌培养计数 (阳性对照组)。然后, 将天然水样本按 2.4.1.6 (2) 2) 要求通过消毒器进行消毒处理, 将处理后水样移到含中和剂的三角烧瓶中, 混匀。

③ 将中和的水样 2 份, 每份 100ml, 按 2.4.1.5 所示方法进行大肠菌菌群的活菌培养计数。

④ 大肠菌菌群的活菌培养计数量, 按 2.4.1.5 所示方法检测。用滤膜过滤法检测时, 所用水量应一致, 约数毫升。污染严重的天然水, 检测时可适当稀释。

⑤ 将未接种水样的试验用同批培养基平板 2 个, 置培养箱中培养 (阴性对照组)。

⑥ 试验重复 3 次。当阳性对照组均有大肠菌群生长, 阴性对照组均无菌生长时, 在 3 次

试验中均使大肠菌群下降至 0cfu/100ml，可判定为对天然水样消毒合格。

⑦如阳性对照组和阴性对照组含菌量未达上述要求，应寻找原因，纠正后重做试验。

(3) 饮水过滤器对天然水样的除菌试验

①取 2 份试验用天然水样，每份 100ml，按 2.4.1.5 所示方法进行大肠菌菌群的活菌培养计数。所得结果作为过滤前含菌量（阳性对照组）。

②按过滤器产品规定流量，将天然水样分段通过过滤器。按规定过滤的水量，用无菌三角瓶分段采集：初始、1/4、2/4、3/4、4/4 等各段流出的水（不需加中和剂）。

③对过滤后各段水样，分别取 100ml、10ml、1ml 各 2 份，按 2.4.1.5 所示方法进行大肠菌菌群的活菌培养计数。

④将未接种水样的试验用同批培养基平板 2 个，置培养箱中培养（阴性对照组）。

⑤试验重复 3 次。当阳性对照组均有菌生长，阴性对照组均无菌生长，3 次试验中所有流量段水样大肠菌群均降至 0cfu/100ml，可判为对天然水样的消毒效果合格。

⑥如阳性对照组和阴性对照组含菌量未达上述要求，应寻找原因，纠正后重做试验。

(4) 高层建筑二次供水消毒设备和方法

对较大水体消毒设备和方法的鉴定，在模拟现场和现场试验中选做其一即可，但首先应考虑后者，只有在无法进行现场试验时，才做模拟现场试验。大水体现场消毒试验的操作程序，随当时当地情况，设备大小和所采取的消毒方法而定。

①高层建筑二次供水消毒有两种主要方式，一是直接对贮水池中的水用物理或化学法消毒，一是将贮水池水引出通过消毒装置（如紫外线照射装置、过滤装置或消毒剂添加和搅拌装置等）进行消毒，遂后再输送到用户。

②直接对水池中水进行消毒的设备和方法的鉴定，可参照游泳池水消毒设备和方法鉴定的有关要求，进行消毒和采样检测（见 2.4.2）。试验剂量选用使用说明书中规定者。样本按 2.4.1.5 所示方法进行活菌培养计数。检测中阴性对照组的设置和结果的评价，与天然水样杀菌试验相同[见 2.4.1.8 (1); 2.4.1.8 (2); 2.4.1.8 (3)]。但检测需重复 5 次，结果均符合要求者（使用含氯消毒剂消毒的水样，剩余氯量为 0.3 mg/L~0.5 mg/L）可判为合格。

③将水引出后消毒的设备和方法的鉴定，可在进入消毒器和消毒后出水口管道上各加一个三通阀门，分别采集消毒前和消毒后水样。将样本按 2.4.1.5 所示方法进行活菌培养计数。试验剂量选用使用说明书规定者。检测中阴性对照组的设置和结果的评价，与天然水样杀菌试验相同[见 2.4.1.8 (1); 2.4.1.8 (2); 2.4.1.8 (3)]。但检测需重复 5 次，结果均符合要求者（使用含氯消毒剂消毒的水样，剩余氯量为 0.3 mg/L~0.5 mg/L）可判为合格。

④对条件不容许加装三通阀门时，可进行模拟现场试验。先设一大型水箱（大小根据鉴定的消毒设备流量和试验时间计算），在其出水口下游用管道依次连接水箱出口阀门、排水泵、三通阀门（一端接下面的流量计，另一端接一回流管，必备需要时可将菌悬液送回水箱）、流量计和所鉴定的消毒装置。消毒装置的进水口前装一三通阀门，以备采集阳性对照水样。

试验时,水箱内盛装含大肠杆菌悬液(大肠杆菌浓度在 5×10^4 cfu/100ml $\sim 5 \times 10^5$ cfu/100ml, 见 2.4.1.4)的水样。打开水箱出口阀门,根据流量计所示,用阀门和水泵控制流出水样的量和压力,并使按规定流量进入消毒装置。当水流按规定流量稳定地由消毒装置出水口流出后,先采阳性对照水样,而后由消毒装置出水口采集消毒后水样。将水样按 2.4.1.5 所示方法进行活菌培养计数。试验剂量选用使用说明书规定者,检测中,阴性对照组的设置和结果的评价,与天然水样杀菌试验相同[见 2.4.1.8 (1); 2.4.1.8 (2); 2.4.1.8 (3)]。但检测需重复 5 次,结果均符合要求者(使用含氯消毒剂消毒的水样,剩余氯量为 0.3 mg/L $\sim$ 0.5 mg/L)可判为合格。

其他类似设备和方法亦可参照有关原则进行。

2.4.2 人工游泳池水消毒效果鉴定试验

2.4.2.1 试验方法

(1) 水样在现场采集。游泳池水面 $\leq 1000 \text{ m}^2$, 设 2 个采样点,超过 1000 m^2 的,设 3 个采样点。

(2) 鉴定时应在暑季游泳人员处于高峰期时进行。室内游泳池可根据情况在其他季节进行,但亦应在游泳人员的高峰期。

(3) 采样时,使用无菌玻璃瓶在水面下 30 cm 深处采集。瓶内加有适量鉴定合格的中和剂溶液(见 2.1.5)。每点采 1 个样本。每日采 2 次,一次在清晨消毒前(作为阳性对照),一次在消毒后当日游泳人员高峰时,作为消毒后样本。

(4) 试验剂量选用说明书规定者。对样本,应检测细菌总数和大肠菌群数。使用含氯消毒剂时,还应测定水中的剩余氯含量。检测方法按《公共场所卫生标准监测检验方法》中的规定进行。

2.4.2.2 评价规定

消毒后样本检测结果,细菌总数应 $\leq 1000 \text{ cfu/ml}$, 大肠菌群 $\leq 18 \text{ cfu/L}$ (见游泳场所卫生标准)。检测按日重复 5 次。5 次全部符合上述要求者可判为合格。

2.4.2.3 注意事项

(1) 在消毒前,对饮水消毒器与饮水过滤器,应用无菌水冲洗和通过 5 min $\sim$ 10min,以消除内表面污垢并证明管路通畅。

(2) 水处理中,极易遭污染,故试验材料、采样口和操作应严格保持无菌要求,否则可造成较大误差。

(3) 模拟试验所用多余的菌悬液、水样等,应消毒后方可排放。所用设备与物品亦须进行彻底消毒后再进行下一次试验。

2.4.3 医疗机构污水(污泥)现场消毒试验

2.4.3.1 目的:通过现场试验确认消毒剂(器械)对医疗机构污水(污泥)消毒的效果。

2.4.3.2 实验器材：

- (1) 比色管、天平、邻联甲苯胺溶液
- (2) 乳糖胆盐培养基、伊红美兰培养基、乳糖蛋白胨培养基
- (3) 革兰氏染色液
- (4) 吸管、试管、平皿、量筒若干

2.4.3.3 试验步骤

- (1) 按产品说明书使用的浓度和作用时间进行污水处理。
- (2) 未进行消毒的污水做阳性对照，对照组只做粪大肠菌群试验, MPN/L 值 ≥ 9200 。
- (3) 测总余氯（含氯、二氧化氯产品）按 GB18466—2001 附录 A 方法进行检测。
- (4) 粪大肠菌群检验方法。按 GB18466—2005 附录 B 方法进行检测。
- (5) 污水中致病菌检验方法，致病菌：主要检测沙门氏菌、志贺氏菌、结核杆菌。

按 GB18466—2001 附录 D、E、G 方法进行检测。

(6) 如消毒产品说明书中对医疗机构有消毒污泥使用范围时，按 GB18466—2001 附录 C、D、E、G 方法进行检测。

2.4.3.4. 试验次数和采样量

每次采样量为 500ml，每次做 2 个平行样，连续循环消毒时，隔天采样检测，测三次；间隙式消毒，测三次。

2.4.3.5. 评价规定

- (1) 按 GB18466—2001 中医疗机构污水排污标准评价消毒效果（见表 2-3）。

表 2-3 医疗机构污水排放标准值

医疗机构 类别	粪大肠 菌群 MPN/L	肠道 致病菌	结 核 杆 菌	消毒接触时间 h		总余氯 mg/L	
				氯化法	二氧化氯法	氯化法	二氧化氯法
综合性医疗机 构	≤ 900	不得检 出	—	≥ 1.0	≥ 0.5	≥ 3.5	≥ 2.5
传染病医疗机 构	≤ 900	不得检 出	—	≥ 1.5	≥ 0.5	≥ 6.5	≥ 4.00
结核病医疗机 构	≤ 900	—	不得检 出	≥ 1.5	≥ 0.5	≥ 6.5	≥ 4.00
其他医疗机构	≤ 900	不得检 出	—	≥ 1.0	≥ 0.5	≥ 3.5	≥ 2.5

- (2) 如做医疗单位污泥现场消毒试验，判定合格标准应符合表 2-4 要求。

表 2-4 医疗机构污泥排放标准值

医疗机构类别	粪大肠菌群	肠道致病菌	结核杆菌	蛔虫卵死亡率 %
综合性医疗机构	$\geq 10^{-2}$	不得检出	—	>95
传染病医疗机构	$\geq 10^{-2}$	不得检出	—	>95
结核病医疗机构	$\geq 10^{-2}$	—	不得检出	>95
其他医疗机构	$\geq 10^{-2}$	—	—	>95

(3) 三次试验检测结果各项指标均符合 GB18466—2001 标准为合格。

2.4.3.6. 注意事项

(1) 采集污水样液后，测总余氯最好在采样现场测，避免总余氯损耗。其它试验应尽快回到实验室做相应试验。

(2) 消毒接触时间，按 GB18466—2001 标准要求，

综合医院、其他医院：氯化法 ≥ 1.0 h。

传染病院、结核病院：氯化法 ≥ 1.5 h。

(3) 粪大肠菌群 (MPN/L 值) 必须按 GB18466—2001 中检索表检索。

(4) 结核医院污水必须做结核杆菌检测试验，其它医疗机构污水不做结核杆菌。

(5) 用二溴海因、臭氧等消毒产品消毒污水时，不测总余氯，需测相应成分含量。

(6) 采样玻璃器材需先灭菌。

2.5 灭菌与消毒器械杀灭微生物效果鉴定试验

2.5.1 压力蒸汽灭菌柜灭菌试验

2.5.1.1 目的

测定压力蒸汽灭菌柜 (下简称灭菌柜) 对细菌芽孢的杀灭效果, 以作为评价其灭菌性能是否符合设计规定的参考。

2.5.1.2 实验器材

(1) 指示菌株: 耐热的嗜热脂肪杆菌芽孢 (ATCC 7953 或 SSIK 31 株), 菌片含菌量为 1.0×10^6 cfu/片 $\sim 5.0 \times 10^6$ cfu/片, 或嗜热脂肪杆菌 ATCC 7953 芽孢灭菌指示物, $121^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ 条件下, 存活时间 ≥ 3.9 min, 杀灭时间 ≤ 19 min, D 值为 1.3 min $\sim$ 1.9min。

(2) 使用说明书中规定灭菌柜可以处理的物品 (装填灭菌柜, 使达满载要求)。

(3) 培养基: 试验用培养基为溴甲酚紫葡萄糖蛋白胨水培养基。

(4) $56^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 恒温培养箱

2.5.1.3 实验步骤

(1) 将两个嗜热脂肪杆菌芽孢菌片分别装入灭菌小纸袋内或两个嗜热脂肪杆菌 ATCC 7953

芽孢灭菌指示物置于标准试验包中心部位。

(2) 对下排气式压力蒸汽灭菌柜, 在灭菌柜室内, 排气口上方放置一个标准试验包(由 3 件平纹长袖手术衣, 4 块小手术巾, 2 块中手术巾, 1 块大毛巾, 30 块 10cm×10cm 8 层纱布敷料包裹成25cm×30cm×30cm 大小)。对预真空和脉动真空式压力蒸汽灭菌柜, 应在灭菌柜内每层各放置一个标准测试包。小型压力蒸汽灭菌器用通气贮物盒(22cm×13cm×6cm) 代替标准试验包, 盒内盛满中试管, 指示菌片放于中心部位的两只灭菌试管内(试管口用灭菌牛皮纸包封), 将贮物盒平放于小型压力蒸汽灭菌器底部。

(3) 按灭菌柜设计程序时间的一半时间进行灭菌后, 在无菌条件下, 取出标准试验包或通气贮物盒中的指示菌片, 投入溴甲酚紫葡萄糖蛋白胨水培养基中, 经 56℃±1℃培养 7d (自含式生物指示物的培养按说明书执行), 观察培养基颜色变化。检测时设阴性对照和阳性对照。试验重复 5 次

2.5.1.4 评价规定

在 5 次试验中, 每次试验中阳性对照管, 溴甲酚紫葡萄糖蛋白胨水培养基变黄, 对照菌片的回收菌量均应达 1×10^6 cfu/片~ 5×10^6 cfu/片; 阴性对照应无菌生长(溴甲酚紫葡萄糖蛋白胨水培养基颜色不变), 每个指示菌片接种的溴甲酚紫蛋白胨水培养基或生物指示物颜色不变(紫色), 判定为灭菌柜灭菌效果合格。

2.5.1.5 注意事项:

(1) 所用生物指示物和菌片须经卫生部认可, 并在有效期内使用。

(2) 灭菌效果观察, 样本检测稍有污染即可将灭菌成功的结果全部否定, 故试验时必须注意防止环境的污染和严格遵守无菌操作技术规定。

(3) 柜室内满载与非满载, 结果差别较大, 故正式试验时必须在满载条件下进行。

2.5.2 干热灭菌柜灭菌试验

2.5.2.1 目的

测定干热灭菌柜(下简称灭菌柜)对细菌芽孢的杀灭效果, 以作为评价其灭菌性能是否符合设计规定的参考。

2.5.2.2 实验器材

(1) 枯草杆菌黑色变种(ATCC 9372)芽孢菌片

(2) 染菌载体(10mm × 10mm, 以玻片为代表, 必要时可随灭菌对象, 增用或改用其他载体)。菌片上细菌芽孢在 160℃±2℃ 条件下, 存活时间 ≥3.9 min, 杀灭时间 ≤19 min, D 值为 1.3 min~1.9min。

(3) 营养肉汤培养基(见: 附 A)

(4) 活菌培养计数所需器材(见 2.1.3)

(5) 使用说明书中规定灭菌柜可以处理的物品（装填灭菌柜，使达满载要求）

(6) 多点温度测定仪

2.5.2.3 柜内温度测定

将温度测定仪的多个探头，分别放于灭菌柜的各层内、中、外不同部位。在柜内摆放模拟的常规处理物品，至使用说明书规定灭菌时的最高量（满载）。关闭柜门，开启电源，按灭菌柜设计程序进行灭菌。每 3 min，记录各点的温度。试验重复 3 次，计算各点不同时间的平均温度，并在试验报告中以图表列出。

2.5.2.4 灭菌试验步骤

(1) 根据试验要求，制备枯草杆菌黑色变种芽孢悬液和芽孢样片。

(2) 每次试验取 2 个菌片为一组，平放于无菌平皿内，勿重叠。加盖，分置于灭菌柜的各层，内、中、外不同部位。试验时，灭菌柜内除菌片样本外，还应满载以模拟的常规处理物品。

(3) 关闭柜门，开启电源，按灭菌柜设计程序时间的一半时间进行灭菌。灭菌完毕，取出平皿，将菌片取出接种于含 5.0ml 营养肉汤培养基试管中，置 37℃ 培养箱内作定性培养。72 h 后观察结果。

肉汤管混浊者表示有菌生长，判为阳性；肉汤管澄清者表示无菌生长，继续培养至第 7 d，若仍无菌生长，判为阴性。

对难以判定的肉汤管，取其中 0.2ml 悬液接种营养琼脂平板，用灭菌 L 棒涂布均匀，置 37℃ 培养箱中培养。48 h 后涂片染色，在显微镜下观察菌落形态，或进一步做其他试验，以判断生长者是否为实验菌。若有非实验菌污染，应查找原因重新进行试验。

(4) 测试中，应同时设立定性和定量阳性对照组（菌片对照）与阴性对照组（培养基对照）。

(5) 定量阳性对照组，以同批试验用菌片放在室温下，待实验组灭菌接种后，立即将该菌片 2 片分别移入含 5.0ml PBS 试管中，各振荡 80 次，按 2.1.3 所示方法进行活菌培养计数。

(6) 定性阳性对照组，以同批试验用菌片放在室温下，待实验组灭菌接种后，立即将实验菌片 2 片，分别接种于 5.0ml 营养肉汤培养基，放入培养箱中作定性培养，观察有细菌生长情况。

(7) 阴性对照组，以空白样片 2 片，分别接种于 5.0ml 营养肉汤培养基，同时将未接种过的营养肉汤培养基放入培养箱中作定性培养，观察有无细菌生长。

(8) 试验重复 5 次。

2.5.2.5 评价规定

(1) 在 3 次测定温度的试验中，各点平均温度均达设计要求。

(2) 在 5 次灭菌试验中，各次试验定量阳性对照的回收菌量均达 1×10^6 cfu/片 $\sim 5 \times 10^6$ cfu/片；定性阳性对照组，细菌生长良好；阴性对照组样本应无菌生长。所有实验菌片均无细菌生长时，可判为干热灭菌合格。

2.5.2.6 注意事项

(1) 干热灭菌效果检测, 应使用枯草杆菌黑色变种芽孢, 不得使用嗜热脂肪杆菌芽孢, 因在干热条件下, 前者对干热的抗力较后者为强。

(2) 灭菌柜柜室容积和加热装置的变化, 均可影响消毒效果, 故在这方面的设计有所变动时, 杀菌效果应重新测定。

(3) 灭菌效果观察, 样本检测稍有污染即可将灭菌成功的结果全部否定, 故试验时必须注意防止环境的污染和严格遵守无菌操作技术规定。

(4) 柜室内满载与非满载, 结果差别较大, 故正式试验时必须在满载条件下进行。

2.5.3 红外线消毒碗柜消毒试验

2.5.3.1 目的

检测红外线消毒碗柜 (下简称消毒碗柜) 对餐 (饮) 具的消毒效果, 作为评价其杀灭微生物性能是否符合设计规定的参考。

2.5.3.2 实验器材

- (1) 实验菌株: 大肠杆菌 (8099) 悬液。
- (2) 脊髓灰质炎病毒悬液。
- (3) 载体: 玻片 规格 10mm x 10mm, 必要时可随消毒对象, 增用或改用其他载体。
- (4) 活菌培养计数所需器材 (见 2.1.3)。
- (5) 病毒灭活试验所需试液、培养基与器材 (见 2.1.10.2)。
- (6) 食 (饮) 具 (种类与数量按生产单位使用说明书规定, 用于装填消毒碗柜进行满载试验)
- (7) 多点温度测定仪

2.5.3.3 柜内温度测定

将温度测定仪的多个探头, 分别放于消毒碗柜每层的内、外两点 (大型碗柜可在内、中、外 3 点放置), 摆放食 (饮) 具至使用说明书规定的最高装载量 (满载)。关闭柜门, 开启电源, 按消毒碗柜规定程序进行消毒。每 3 min, 记录各点的温度。试验重复 3 次, 计算各点不同时间的平均温度, 并以表列出。

2.5.3.4 大肠杆菌杀灭试验

- (1) 按 2.1.2 所示方法制备大肠杆菌菌片 (载体为玻片)。
- (2) 在消毒碗柜满载的情况下, 将干燥大肠杆菌菌片置无菌平皿内, 每平皿放 2 片, 勿重叠。在消毒碗柜每层的内、外两个点各放一含菌片的平皿 (大型碗柜可在内、中、外各放一平皿), 打开平皿盖。
- (3) 关闭柜门, 开启电源, 按消毒碗柜原设计程序进行消毒。消毒完毕, 按说明书规定的时间打开柜门, 取出平皿。将菌片移入含 5ml PBS 试管内, 按 2.1.3 所示方法进行活菌培养计数。

(4) 在上述消毒试验时, 将未消毒菌片, 放置室温下, 当消毒组试验完毕后, 取该菌片进行活菌培养计数, 作为阳性对照。另将同批培养基与 PBS 等培养, 作为阴性对照。

(5) 试验重复 3 次, 其平均杀灭率应按 2.1.7 的规定进行计算和表达。

(6) 在 3 次试验中, 每次阳性对照回收菌数均达 1×10^6 cfu/片 $\sim 5 \times 10^6$ cfu/片, 阴性对照无菌生长, 阳性和阴性对照组结果若不符上述要求, 试验作废, 重新进行。

2.5.3.5 脊髓灰质炎病毒灭活试验

(1) 按 2.1.10.3 所示方法制备脊髓灰质炎病毒悬液。若无特殊要求, 用玻片为载体。

(2) 在消毒碗柜满载的情况下, 将干燥的染有脊髓灰质炎病毒的载体置无菌平皿内, 每平皿放 2 片, 勿重叠。在消毒碗柜每层的内、外两个点各放一含染有脊髓灰质炎病毒载体的平皿 (大型碗柜可在内、中、外各放一平皿), 打开平皿盖。

(3) 关闭柜门, 开启电源, 按原规定程序进行消毒。消毒完毕, 按说明书规定的时间, 打开柜门, 取出平皿。将载体移入含 1ml 细胞维持液的试管中。振荡洗涤后, 取样按 2.1.10.4 所示方法检测残留脊髓灰质炎病毒的感染滴度。

(4) 阳性对照, 将未消毒的染有脊髓灰质炎病毒的载体 2 片, 分别移入含 1ml 细胞维持液的试管中。振打后, 取样按 2.1.10.7 (6) 所示方法检测残留脊髓灰质炎病毒的感染滴度。脊髓灰质炎病毒的感染滴度对数值应为 4~6。

(5) 阴性对照, 用不含脊髓灰质炎病毒的完全培养基作为阴性对照, 以观察培养基无污染, 细胞是否生长良好。

(6) 试验重复 3 次。

(7) 根据各组的平均病毒感染滴度 (TCID₅₀), 分别计算其对病毒的灭活指数, 病毒的灭活对数值应 ≥ 3.00 。

2.5.3.6 评价规定

对消毒碗柜实验室试验所得消毒效果的评价, 应以对微生物的杀灭效果为准。当所测结果均达到以下要求者可判为合格:

(1) 柜内最低温度点达到 120℃, 并可持续 15min 以上。

(2) 对大肠杆菌, 每次试验, 阳性对照组回收菌数均达 1×10^6 cfu/片 $\sim 5 \times 10^6$ cfu/片, 阴性对照无菌生长, 对大肠杆菌的杀灭对数值, 各点均 ≥ 3 为消毒合格。

(3) 对脊髓灰质炎病毒, 每次试验, 培养基无污染, 细胞生长良好。阳性对照组病毒对数值应为 $10^4 \sim 10^6$, 灭活对数值 ≥ 3.00 , 可判为消毒合格。

2.5.3.7 注意事项

(1) 消毒碗柜内满载与非满载, 结果可有相当大差别, 故正式试验必须在满载条件下进行。

(2) 不同大小的消毒碗柜, 柜内装有红外线灯的功率或安装支数, 均可影响消毒效果, 故在这方面的设计有所变动时, 应重新测定。

(3) 大肠杆菌杀灭试验注意事项见 2.1.7.9。

(4) 脊髓灰质炎病毒灭活试验注意事项见 2.1.10.7 (9)。

2.5.4 微波灭菌柜消毒和灭菌试验

2.5.4.1 目的

测定微波灭菌柜(下简称灭菌柜)对微生物的杀灭效果,以作为评价其消毒或(和)灭菌性能是否符合原设计规定的参考。

2.5.4.2 实验器材

(1) 实验菌株: 金黄色葡萄球菌(ATCC 6538)、大肠杆菌(8099)、铜绿假单胞菌(ATCC 15442)、龟分支杆菌(ATCC 19977)、枯草杆菌黑色变种(ATCC 9372)芽孢等细菌或芽孢悬液。

(2) 载体: 10mm×10mm, 以布片或玻片为代表, 必要时可随灭菌对象, 增用或改用其他载体。

(3) 微波漏能测试仪(检测灭菌柜微波有无泄漏)。

(4) 营养肉汤培养基: 见附录 A

(5) 细菌培养计数所用器材(见 2.1.3)

(6) 使用说明书中规定的处理的物品(装填灭菌柜, 使达满载)

2.5.4.3 细菌及其芽孢和真菌杀灭试验操作程序

(1) 按 2.1.2.4 所示相关方法制备试验用细菌及其芽孢和真菌菌片。若无特殊要求, 菌片以布片为载体(10mm×10mm)。每一牛皮纸小袋装 2 个菌片。

(2) 按实用情况, 在灭菌柜内模拟摆放常规处理物品至使用说明书中规定的最高装载量(满载)。将实验菌片放于柜室各层中央和四角的物品中间, 每层共放置 5 袋。放入实验菌片前, 按使用方法, 做预湿处理。柜室容量小者可适当减少放置菌片数量。

(3) 菌片布放完以后, 关闭柜门, 按说明书的消毒程序进行消毒试验, 按说明书的灭菌程序的半周期进行灭菌试验。消毒或灭菌完毕后, 打开柜门, 取出物品和实验菌片。

(4) 消毒试验时, 按 2.1.7 要求的方法, 作定量杀菌效果的检测。灭菌试验时, 将取出的实验菌片移种于营养肉汤中, 置温箱内作定性培养(37℃)。培养 7d, 若仍无菌生长, 判为阴性。对难以判断的肉汤管, 取其中 0.2 ml 悬液接种营养琼脂平板, 用灭菌 L 棒涂匀, 置 37℃ 培养箱培养。48 h 后涂片染色显微镜下观察菌落形态, 或进一步做其他试验, 判断生长的是否为实验菌。若为非实验菌, 应重新进行试验。

(5) 测试中, 应同时设立定性和定量阳性对照组(菌片对照)与阴性对照组(培养基对照)。

(6) 定量阳性对照组, 将同批试验用的菌片放在室温下, 待消毒或灭菌实验组达规定作用时间后, 立即将该菌片 2 片分别移入含 5.0ml PBS 试管中, 各振荡 80 下。取洗液按 2.1.3 所示方法进行活菌培养计数。

(7) 定性阳性对照组, 将同批试验用的菌片放在室温下, 待灭菌实验组达规定作用时间后, 立即将该批试验用的菌片 2 片, 分别接种于 5.0ml 营养肉汤培养基, 放入培养箱中作定性培养, 观察有细菌生长情况。

(8) 阴性对照组, 在灭菌试验中, 将同批试验用的菌片 2 片, 分别接种于 5.0ml 营养肉汤培养基, 同时将未接种过的营养肉汤培养基放入培养箱中作定性培养, 观察有无细菌生长。在消毒试验中, 则应对所用中和剂、稀释液和培养基进行无菌检测, 观察有无细菌污染。

(9) 试验重复 5 次。

2.5.4.4 评价规定

(1) 在 5 次消毒试验中, 对细菌及其芽孢和真菌, 每次试验中的阳性对照菌片, 检测回收菌量均应达 1×10^6 cfu/片 $\sim 5 \times 10^6$ cfu/片, 定性阳性对照组, 细菌生长良好; 阴性对照组应无菌生长, 各次试验的杀灭对数值均 ≥ 3.00 , 可判为消毒合格。

(2) 在 5 次灭菌试验中, 每次试验中的定量阳性对照组, 检测回收菌量均达 1×10^6 cfu/片 $\sim 5 \times 10^6$ cfu/片; 定性阳性对照组, 细菌生长良好。阴性对照组样本应无菌生长。所有实验菌片均无细菌生长时, 可判为灭菌合格。

2.5.4.5 注意事项

(1) 微波强弱受电压影响很大。试验时, 应注意电压是否符合说明书规定值。波动较大时, 应使用稳压电源。

(2) 灭菌柜在消毒棉织品、金属、橡胶管等物品时, 一定事先摸索被消毒物品适宜的预湿水量, 一方面可防止棉织品烧焦, 金属物品对磁控管的破坏; 一方面可提高其杀菌效果。

(3) 微波杀菌效果与样本的含水量密切相关。在使用中规定需预湿者, 试验时亦必须预湿, 不可省略。

(4) 微波消毒金属物品时, 需用湿布将其包裹, 特别是对金属器械的尖端部分, 以防因尖端放电损坏磁控管。

(5) 测试人员长时间受微波照射, 对健康有害。试验时必须穿戴专用的防护用具。测试的灭菌柜应先用微波漏能测试仪检测有无微波泄漏。

2.5.5 紫外线灯辐射照度和杀微生物效果鉴定试验

2.5.5.1 目的

测定紫外线灯(包括双灯管组合灯具) 辐射照度及对微生物的杀灭作用, 以验证其杀菌性能是否达到合格标准。

2.5.5.2 实验器材

(1) 实验菌株: 金黄色葡萄球菌(ATCC 6538)、大肠杆菌(8099)、铜绿假单胞菌(ATCC 15442)、枯草杆菌黑色变种(ATCC 9372)芽孢、白色葡萄球菌(8032, 空气消毒时用)等细菌及其芽孢和真菌, 根据消毒对象选择上述相应的实验菌株。

(2) 载体: 玻片 规格 10mm $\times$ 10mm

(3) 紫外线照度计（在计量标定有效期内，下简称照度计）。

(4) 紫外线灯测定架（测定时，紫外线灯固定于测定架顶端。顶端高 2 m，可上下移动。下简称测定架）。

(5) 稳压器（220V）

(6) 细菌及其芽孢和真菌杀灭试验所需器材（见 2.1.7，2.1.9）

2.5.5.3 辐射照度测定

(1) 将待测紫外线灯管固定于测定架，调节距离使灯管距其下方垂直中心放置照度计处 1m。

(2) 开启紫外线灯稳定 5min 后，用照度计在灯管下方垂直距离 1m 的中心处测量其辐射照度值（ $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ）。

(3) 测量时，电压应稳定在 220V。

(4) 普通型或低臭氧型直管紫外线灯，在灯管下方垂直 1m 的中心处，新灯管的辐射照度值应符合附表 2-5 和附表 2-6 的要求。

(5) 使用中的灯管，可在原装置处进行测定。测定位置仍在灯管下方垂直距离 1m 的中心处。使用中灯管的辐射照度值应不低于附表 1 和附表 2 的要求，低于此值者应予更换。

(6) 多灯管组合灯具的测定方法和合格标准，同单支灯管。

(7) 对异型（非直管型）、高照度型或非 30W 功率等灯管的检测距离和辐射照度值合格标准，随产品用途和使用方法而定。原则上，应不低于产品使用说明书注明的辐照度值，并按其推荐剂量[即辐射照度值乘以照射时间(s)]进行杀菌试验，证明能满足应用所需效果者可判为实验室测试合格。

(8) 辐射照度检测，每次鉴定抽查 10 支灯管，每支灯管重复测定 3 次。各次数据均达标准可判辐射照度合格。

2.5.5.4 细菌及其芽孢和真菌杀灭效果的测定

(1) 按 2.1.2 所示方法制备细菌及其芽孢和真菌菌片。菌片以玻片为载体。

(2) 试验时，确定菌片照射位置。若无特殊要求，灯管应在灯管下方垂直距离 1m 的中心处。

(3) 将菌片平置于无菌平皿中，勿重叠。平皿放于测定架预先确定的照射位置上进行照射。

(4) 按产品使用说明书规定的作用时间的 0.5 倍、1.0 倍和 1.5 倍设置 3 个作用时间进行试验。

(5) 将照射后样本送实验室进行活菌培养计数（见 2.1.3）的测定。

(6) 测试中，应同时设立阳性对照组（菌片对照）与阴性对照组（培养基对照）。

(7) 阳性对照组，以试验用的同批菌片置室温下，待实验组消毒完毕后，立即将该批菌片 2 片分别放入含 5.0ml PBS 试管中，电动混匀器震荡 20s 或各振敲 80 次。取洗液按

2.1.3 所示方法进行活菌培养计数。

(8) 阴性对照组，以同次实验用培养基或 PBS 接种培养基培养，观察有无细菌生长。

(9) 试验重复 3 次。每次试验中的阳性对照菌片，检测回收菌量均应在 $1 \times 10^6 \text{cfu/片} \sim 5 \times 10^6 \text{cfu/片}$ ，阴性对照组应无菌生长，各次试验对细菌及其芽孢和真菌的杀灭对数值均 ≥ 3.00 。该照射时间可判为消毒合格所需照射的时间。阳性或阴性对照组结果若不符上述要求，该次试验作废，重新进行。

(10) 对异型（非直管型）、高照度型，或非 30W 功率等灯管的照射距离，随产品用途和使用方法而定。

2.5.5.5 评价规定

在 3 次消毒试验中，对细菌及其芽孢和真菌，每次试验中的阳性对照菌片，检测回收菌量均应达 $1 \times 10^6 \text{cfu/片} \sim 5 \times 10^6 \text{cfu/片}$ ，阴性对照应无菌生长，各次试验的杀灭对数值均 ≥ 3.00 。可判为消毒合格。

2.5.5.6 臭氧产生量的测定

紫外线灯产生的臭氧量不同可影响杀菌效果和使用的安全，故应测定臭氧浓度以便进行综合考虑。臭氧浓度测定方法见本规范理化鉴定技术。检测条件应以产品使用说明中规定的使用方法、面积（或容积）和时间为准，进行现场（或模拟现场）测定。臭氧浓度应写明于使用说明书中，低臭氧紫外线灯产生的臭氧浓度，应不超过国家规定的工作场所安全浓度（ 0.16mg/m^3 ）。

2.5.5.7 有效使用期的测定

将灯管装设于测试架上，通电 2h 45min 后，关闭 15min 再启动。每周测试一次辐射照度值，直至低于下限值（见附表 1、表 2）为止。该样本连续照射的时间（不包括关闭时间），即为其有效使用时间（h）。随机抽样，重复测试 3—5 支灯管，取其最低值为有效使用时间。

附表 2-5 双端紫外线杀菌灯辐射照度标准

标准功率（W）	4	6	8	13	15	18	20	30	36	40
额定值（ $\mu \text{W/cm}^2$ ）	12	18	28	41	44	66	75	107	110	117
禁用下限值（ $\mu \text{W/cm}^2$ ）	8	12	18	27	29	43	49	70	72	76

附表 2-6 单端紫外线杀菌灯辐射照度标准

标准功率（W）	7	9	11	18	24	36	55(T5)
额定值（ $\mu \text{W/cm}^2$ ）	16	23	8	57	94	147	170
禁用下限值（ $\mu \text{W/cm}^2$ ）	10	15	25	37	61	96	111

2.5.5.8 注意事项

- (1) 测试前应先用酒精棉球擦除灯管上的灰尘和油垢, 以免影响紫外线的照射强度。
- (2) 杀菌试验时, 应使紫外线直接照射拟消毒表面, 否则不能反映该剂量真实的杀菌效果。
- (3) 在紫外线灯下工作时, 勿直视灯管, 并穿戴防护眼镜、防护服、手套等, 以减少对测试人员的伤害。在有人工作环境中, 空气中臭氧浓度不得超过 $0.16\text{mg}/\text{m}^3$ 。
- (4) 测定辐照度值或进行杀菌试验时, 应保持室内洁净无尘。

2.5.6 紫外线消毒箱

2.5.6.1 目的

测定紫外线消毒箱(下简称消毒箱)对物体表面微生物的杀灭效果, 以验证其杀菌性能是否符合原设计规定。

2.5.6.2 实验器材

- (1) 实验菌株: 金黄色葡萄球菌(ATCC 6538)、大肠杆菌(8099)、铜绿假单胞菌(ATCC 15442)、枯草杆菌黑色变种(ATCC 9372)芽孢、白色念珠菌(ATCC 10231)、龟分枝杆菌脓肿亚种(ATCC19977)等和脊髓灰质炎病毒。根据消毒对象选择上述相应的实验菌株。
- (2) 载体: 玻璃片 规格 $10\text{mm} \times 10\text{mm}$, 必要时可随消毒对象增用或改用其他载体。
- (3) 紫外线照度计(在计量标定有效期内, 下简称照度计)。
- (4) 紫外线灯测定架[见 2.5.5.2 (4)]
- (5) 细菌及其芽孢、龟分枝杆菌和真菌杀灭试验所需器材(见 2.1.7, 2.1.8, 2.1.9)。
- (6) 脊髓灰质炎病毒灭活试验所需试液、培养基和器材(见 2.1.10)
- (7) 使用说明书中规定消毒箱可处理的物品(装放于消毒箱, 使达满载要求)。

2.5.6.3 紫外线辐射照度测定

打开消毒箱的盖或门, 将内装紫外线灯管取下, 在紫外线灯测定架上按 2.5.5.3 测定其照射强度的辐照度值, 以确定是否与产品质量标准或企业标准中规定的相同。必要时, 以与箱门(或盖)一样大小的铝板, 用胶带固定于消毒箱的门框(或消毒箱盖)上。铝板中央处钻一直径为 15mm 小圆孔, 开启箱内紫外线灯, 照射 5min , 待稳定后, 通过铝板上小圆孔用照度计测定射出紫外线的辐照度值($\mu\text{W}/\text{cm}^2$)。

2.5.6.4 对微生物杀灭效果的测定

(1) 细菌及其芽孢、龟分枝杆菌和真菌杀灭效果的测定

- ①按 2.1.2 所示相关方法制备细菌及其芽孢和真菌菌片。菌片以玻片为载体。
- ②每次试验只测试一种微生物, 以防交叉污染。试验用样片每 2 片为一组, 平放于无菌平皿中, 勿重叠。箱内容积过小时, 可将试验细菌及其芽孢和真菌直接涂染于所设计消毒的物品表面进行试验, 每 2 件为一组。

③根据消毒箱容积的大小，放入一定数量装有样片的平皿，或直接涂染的样本，但消毒箱内应同时将所设计消毒的物品摆放至使用说明书中规定的最高装载量（满载）。

④关闭消毒箱门（或盖），打开紫外线灯，照射至规定时间。

⑤取出样本，按 2.1.3 所示方法进行活菌计数。对白色念珠菌的杀灭试验，用沙堡琼脂培养基，对黑曲霉菌的杀灭试验，使用麦芽浸膏琼脂培养基，其他方法和步骤均与细菌杀灭试验相同。

⑥阳性对照组，以试验用的同批菌片置室温下，待实验组菌片消毒达规定作用时间后，立即将该批菌片 2 片分别放入含 5.0ml PBS 试管中，各振打 80 下。取样液按 2.1.3 所示方法进行活菌培养计数。

⑦阴性对照组，用同批次试验用培养基或 PBS 接种培养基培养，观察有无细菌生长。

⑧试验重复 3 次。阳性对照菌片每次试验回收的含菌量均应在 1×10^6 cfu/片 $\sim 5 \times 10^6$ cfu/片，阴性对照组样本应无菌生长，各次试验对细菌及其芽孢和真菌的杀灭对数值均 ≥ 3.00 。该照射时间可判为消毒合格所需照射的时间。阳性或阴性对照组结果若不符上述要求，该次试验作废，重新进行。

（2）脊髓灰质炎病毒灭活试验

①按 2.1.10.3 所示方法制备脊髓灰质炎病毒悬液。若无特殊要求，用玻片为载体。

②每次试验 2 片脊髓灰质炎病毒样片为一组，平放于无菌平皿中，勿重叠。箱内容积过小时，可将脊髓灰质炎病毒直接涂染于所设计消毒的物品表面进行试验，每 2 件为一组。

③根据消毒箱容积的大小，放入一定数量装有样片的平皿，或直接涂染的样本，但消毒箱箱内应同时将所设计消毒的物品摆放至使用说明书中规定的最高装载量（满载）。

④关闭消毒箱的门（或盖），打开紫外线灯，照射至规定时间。

⑤照射后将脊髓灰质炎病毒样片移入含 1ml 细胞维持液的试管中。振打后，取样按 2.1.10 所示方法检测残留脊髓灰质炎病毒的滴度。

⑥将未消毒的脊髓灰质炎病毒样片 2 片，分别移入含 1ml 细胞维持液的试管中。振荡后，取样按 2.1.10.4 所示方法检测残留脊髓灰质炎病毒的感染滴度，作为阳性对照。

⑦阴性对照，用不含脊髓灰质炎病毒的完全培养基作为阴性对照，以观察培养基有无污染，细胞是否生长良好。

⑧试验重复 3 次。

⑨根据各组的平均病毒的感染滴度（TCID₅₀），分别计算其对病毒的灭活对数值。

（3）评价规定

在 3 次消毒试验中，对细菌及其芽孢和真菌，每次试验中的阳性对照菌片，检测回收菌量均应达 1×10^6 cfu/片 $\sim 5 \times 10^6$ cfu/片，阴性对照组样本应无菌生长，各次试验的杀灭对数值均 ≥ 3.00 。对脊髓灰质炎病毒，培养基无污染，细胞生长良好，阳性对照组病毒滴度对数值应为 4~6，灭活对数值 ≥ 3.00 ，可判为消毒合格。

2.5.6.5 注意事项

(1) 试验时, 应注意箱内物品有无未被紫外线直接照到处(如被箱内支架遮挡)。如实用中拟消毒物品有可能处于该位置, 在染菌样片布点时应考虑观察该部位的消毒效果。

(2) 其他同 2.5.5.7。

2.5.7 环氧乙烷灭菌器灭菌效果鉴定试验

2.5.7.1 目的

测定环氧乙烷灭菌器(下简称灭菌器)对细菌芽孢的杀灭能力, 作为评价其灭菌性能及应用中常规监测的参考。

2.5.7.2 实验器材

(1) 枯草杆菌黑色变种(ATCC 9372)芽孢菌片。

含菌量要求为 1×10^6 cfu/片 $\sim 5 \times 10^6$ cfu/片(按活菌培养计数结果计)。在环氧乙烷量为 $600\text{mg/L} \pm 30\text{mg/L}$, 温度为 $54^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, 相对湿度为 $60\% \pm 10\%$ 条件下, 菌片上芽孢存活时间(ST)应 $\geq 7.8\text{min}$, 杀灭时间(KT) $\leq 58\text{min}$, D 值为 $2.6\text{min} \sim 5.8\text{min}$ 。

(2) 染菌载体($10\text{mm} \times 10\text{mm}$, 以布片为代表, 必要时可随灭菌对象, 增用或改用其他载体)。

(3) 聚乙烯塑料袋(封装菌片用, 大小为 $60\text{mm} \times 40\text{mm}$, 厚 $0.15\text{mm} \sim 0.25\text{mm}$)。

(4) 活菌培养计数所需器材(见 2.1.3)。

(5) 使用说明书中规定灭菌器可处理的灭菌物品(装填灭菌器, 达受检灭菌器允许最大承载要求)。

2.5.7.3 环氧乙烷灭菌器灭菌确认试验操作程序(半周期法)

(1) 根据试验要求, 制备枯草杆菌黑色变种芽孢悬液和菌片。菌片放入聚乙烯塑料袋内密封包装, 每袋 2 片。每次试验需用多少袋菌片应依据灭菌柜室可用体积大小确定: a) 体积 $\leq 5\text{m}^3$ 时, 用 10 袋(20 个菌片); b) $5\text{m}^3 < \text{体积} \leq 10\text{m}^3$ 时, 每增加 1m^3 , 应增加 1 袋(10 袋 ~ 15 袋); c) 体积 $> 10\text{m}^3$ 时, 每增加 2m^3 , 应增加 1 袋(≥ 16 袋)。

(2) 将装有菌片的聚乙烯塑料袋先放置可被灭菌物品中, 然后再放入灭菌柜。放置点的选择首先应考虑最难灭菌位置(可根据产品设计参数或温湿度监测数据, 如靠近柜室不受热的位置或柜门处等), 其余再均匀分布于灭菌柜室中。另将一袋(2 片)菌片放置在室温条件下作为阳性对照。

(3) 按使用说明书所规定的环氧乙烷浓度、作用时间、柜内的温度和相对湿度, 如产品提供的这些参数不是一个固定值, 而是允许范围, 鉴定时则应将各参数设定在可能最难实现灭菌要求之状态下进行试验。在满载条件下进行环氧乙烷灭菌处理。满载用物品, 随灭菌器用途而定。

(4) 灭菌时间设定: 设灭菌时间为 T。灭菌周期一般包括: a) 排除空气; b) 处理(使被灭菌物品内达到规定温度和相对湿度); c) 加入灭菌剂(单次或数次); d) 在作用时间内

保持规定的条件；e) 去除灭菌剂；f) 换气（若采用）；g) 加入空气至大气压。

(5) 在所有其他过程参数不变情况下，设灭菌时间为 0.5T，重新进行灭菌处理。

(6) 灭菌完毕，取出菌片，分别移种于 5 ml 营养肉汤培养基中，置 37℃ 培养箱内培养，7 d 后观察最终结果（定性培养检测）。

对难以判断结果的营养肉汤管，取其中 0.2ml 悬液接种营养琼脂平板，用无菌 L 棒涂抹均匀，置 37℃ 培养箱内培养。48h 后涂片染色，显微镜下观察菌落形态，或进一步做其他试验，判断有无生长或生长的是否为实验菌。若为非实验菌，则应重新进行试验。

(7) 测试中，应同时设立定性和定量阳性对照组（菌片对照）与阴性对照组（培养基对照）。

(8) 定量阳性对照组，以同批试验用菌片置室温下，待灭菌实验组达规定作用时间后，立即将该菌片 2 片分别放入含 5.0ml PBS 试管中，各振敲 80 下，充分洗脱后取洗液按 2.1.3 所示方法进行活菌培养计数。

(9) 定性阳性对照组，以同批试验用菌片置室温下，待灭菌实验组达规定作用时间后，立即将该菌片 2 片，分别接种于 5.0ml 营养肉汤培养基，放入温箱中作定性培养，观察有细菌生长情况。

(10) 阴性对照组，以同批次试验用未染菌样片 2 片，分别接种于 5.0ml 营养肉汤培养基，放入培养箱中作定性培养，观察有无细菌生长。

(11) 重复 T 时间与 0.5T 时间灭菌各 3 次试验。

2.5.7.4 评价规定

在 5 次试验中，每次试验中的阳性对照菌片，回收菌量均应在 $1 \times 10^6 \text{cfu/片} \sim 5 \times 10^6 \text{cfu/片}$ ；定性阳性对照组，细菌生长良好；阴性对照应无菌生长。0.5T 时间灭菌至少应有一次枯草杆菌芽孢灭菌失败；T 时间灭菌 3 次试验所有菌片均应无菌生长。则 T 时间为最短灭菌时间，判定该灭菌器在所设定的灭菌工艺条件下灭菌时间应至少为 2T。

阳性或阴性对照若有不符合上述要求的结果，试验作废，重新进行。若设定的灭菌过程完成后发现产品及其包装发生损坏，也应重新设定灭菌参数，重新试验。

2.5.7.5 环氧乙烷灭菌器常规监测操作程序

(1) 制备菌片及所需菌片袋数按 2.5.7.3.1 (1) 进行。

(2) 菌袋布放位置按 2.5.7.3 (2) 要求。

(3) 按灭菌器使用说明书规定的灭菌参数在满载条件下进行环氧乙烷灭菌处理。灭菌完毕，取出菌片，其余操作步骤按 2.5.7.3 (6) 进行。

(4) 试验应同时设定定性和定量阳性对照组（菌片对照）与阴性对照组。具体操作按 2.5.7.3 (8)、(9)、(10) 进行。

2.5.7.6 常规灭菌效果监测结果判定

阳性对照组回收菌量应达 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ cfu/片；定性阳性对照组细菌生长更好；所有实验菌片全部无菌生长，判定该次灭菌合格。

2.5.7.7 注意事项

(1) 温度和相对湿度对环氧乙烷气体杀菌效果影响较大, 故应严格控制试验中的有关条件。

(2) 环氧乙烷液体可溶解聚乙烯、聚氯乙烯等, 不可将其液体滴落于此类物品上。环氧乙烷不论液体或气体, 均可损坏赛璐璐制品, 试验时应予注意。

(3) 环氧乙烷是一种易燃易爆并具有中等毒性的药品为保证试验安全进行, 操作及试验人员应事先熟悉环氧乙烷性能和设备操作规程, 并严格遵守安全守则。投药时, 应徐徐打开钢瓶阀门, 勿使药液突然喷出。操作现场应采取防火防爆措施, 不得有明火作业及电火花发生, 严禁穿着有钉的鞋进入现场, 以防摩擦产生火花而引发安全事故。

(4) 工作环境中应有良好的通风。灭菌结束, 打开容器, 在排放环氧乙烷气体时, 必须开窗。工作现场空气中环氧乙烷最高容许浓度为 $2\text{mg}/\text{m}^3$ 。如人员吸入过多环氧乙烷气体, 可引起头痛, 呕吐等中毒症状, 严重者可致肺水肿等。如出现中毒症状, 需迅速离开现场至通风良好处休息。轻者呼吸新鲜空气, 直到症状消除; 重者应及时送医院治疗。

2.5.8 臭氧消毒柜消毒试验

2.5.8.1 目的

测定臭氧消毒柜(下简称消毒柜)对物体表面上微生物的杀灭效果, 作为评价其杀菌性能是否符合原设计规定的参考。

2.5.8.2 实验器材

(1) 实验菌株: 金黄色葡萄球菌(ATCC 6538)、大肠杆菌(8099)、铜绿假单胞菌(ATCC 15442)、白色念珠菌(ATCC 10231)和脊髓灰质炎病毒。根据消毒对象选择上述相应的实验菌株

(2) 载体: 布片或玻璃片 规格 $10\text{mm} \times 10\text{mm}$, 必要时可随消毒对象, 增用或改用其他载体

(3) 臭氧采样装置和浓度分析仪

(4) 细菌定量杀灭试验用器材(见 2.1.7, 2.1.9)

(5) 脊髓灰质炎病毒灭活试验用试液、培养基和器材(见 2.1.10)

(6) 温度与湿度计

2.5.8.3 臭氧浓度测定

(1) 仪器测定: 臭氧浓度可用臭氧分析仪测定。操作按仪器使用说明书规定进行。

(2) 化学滴定法测定: 参考本规范理化鉴定实验技术。

2.5.8.4 杀灭微生物试验操作程序

臭氧消毒柜的臭氧发生器臭氧发生量一般不可调, 故试验时设 3 个作用时间组, 或按

使用说明书中的额定参数即可,但试验结果应测出将细菌及其芽孢和真菌杀灭对数值 ≥ 3.00 或脊髓灰质炎病毒感染滴度下降 3 个对数值以上所需的最短有效时间。若第一次未测出最短有效作用时间,应调整所设时间,重新试验,直至测出为止。

(1) 细菌和真菌杀灭试验

①按 2.1.2 所示相关方法制备金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌、黑曲霉孢子的菌片。必要时,可增设其他试验微生物。

②因臭氧在柜内扩散慢,分布不易均匀,故物品在柜内应摆放至使用说明书中规定的最高装载量(满载),以尽量接近实际应用时的情况。

③以 2 片菌片一组,置一无菌平皿中,勿重叠。试验时,将放有菌片的平皿盖打开,分层布放,每层内、中、外各点分别放一组样本。

④按照使用说明书要求,调节柜内温度与相对湿度,并记录备查,然后开启臭氧发生器进行消毒。

⑤消毒至规定时间,取出菌片,按 2.1.3 所示方法进行活菌培养计数。对白色念珠菌的杀灭试验,用沙堡琼脂培养基,对黑曲霉菌的杀灭试验,用麦芽浸膏琼脂培养基,其他方法和步骤均与细菌杀灭试验相同。因臭氧气体熏蒸,载体吸收的量少、分解快,可不必进行去除残留臭氧的处理。每组试验重复 3 次。

⑥将未消毒的菌片 2 片,放置于消毒碗柜外室温下。待实验组消毒完毕后,取阳性对照菌片 2 片,同时进行活菌培养计数检测。取本次试验同批的 PBS 和培养基接种培养基培养,作为阴性对照。

[对未固定装于消毒箱内的臭氧发生器(如冰箱臭氧消毒器),其杀菌效果鉴定,可按其用途,在相应的密闭柜内进行。柜的大小应与所设计的杀菌有效范围相近。]

(2) 脊髓灰质炎病毒灭活试验

①按 2.1.10.3 所示方法制备脊髓灰质炎病毒悬液。若无特殊要求,用玻片为载体。

②在消毒碗柜满载的情况下,将干燥的染有脊髓灰质炎病毒的载体置灭菌平皿内,每平皿放 2 片,勿重叠。在消毒碗柜每层的内、外两个点各放一含染有脊髓灰质炎病毒载体的平皿(大型碗柜可在内、中、外各放一平皿),平皿盖打开。

③关闭柜门,开启电源,按原规定程序进行消毒。消毒完毕,按说明书规定的时间,打开柜门,取出平皿。将载体移入含 1ml 细胞维持液的试管中。振打后,取样按 2.1.10.4 所示方法检测残留脊髓灰质炎病毒滴度。

④将未消毒的染有脊髓灰质炎病毒的载体 2 片,分别移入含 1ml 细胞维持液的试管中。振打后,取样按 2.1.10.7(6) 所示方法检测残留脊髓灰质炎病毒滴度,作为阳性对照。

⑤阴性对照,用不含脊髓灰质炎病毒的完全培养基作为阴性对照,以观察培养基无污染,细胞是否生长良好。

⑥试验重复 3 次。

⑦根据各组的平均病毒感染滴度 (TCID₅₀), 分别计算其对病毒的灭活对数值。

2.5.8.5 评价规定

(5) 对细菌及其芽孢和真菌, 在 3 次试验中, 所设阳性对照组回收菌量在 1×10^6 cfu/片~ 5×10^6 cfu/片, 阴性对照无菌生长, 实验组中每次试验细菌及其芽孢和真菌的杀灭对数值均 ≥ 3.00 ; 对脊髓灰质炎病毒, 在 3 次试验中, 阳性对照组病毒对数值应为 4~6, 灭活对数值 ≥ 3.00 , 可判为消毒合格。若阳性或阴性对照组的结果与上述要求不符, 试验作废, 重新进行。

2.5.8.6 注意事项

(1) 对试验结果有怀疑时, 可在试验时同步进行臭氧浓度测定, 以便作进一步的分析。

(2) 每次试验完毕, 应充分排消毒柜内的臭氧气体, 勿使有臭氧残留, 以免影响随后的试验。

(3) 空气中臭氧浓度不得超过 $0.16\text{mg}/\text{m}^3$, 臭氧吸入过多, 可使人中毒, 试验场所应保持通风良好。

(4) 温度和相对湿度均可影响臭氧气体对细菌的杀灭效果, 试验时必须控制好这些条件, 使其前后一致。

2.5.9 臭氧水消毒器物品表面消毒试验

2.5.9.1 目的

检测臭氧水消毒器发生的臭氧水的消毒效果, 以作为评价臭氧水对各种物品消毒能否达合格要求的参考。

臭氧水指应用臭氧消毒设备制备的含臭氧的水溶液, 并以其作为消毒剂, 用于对物品表面等的消毒。

2.5.9.2 实验器材

(1) 实验微生物: 金黄色葡萄球菌 (ATCC 6538)、大肠杆菌 (8099)、铜绿假单胞菌 (ATCC 15442)、白色念珠菌 (ATCC 10231) 和脊髓灰质炎病毒。根据消毒对象选择上述相应的实验菌株。

(2) 载体: 布片 规格 $10\text{mm} \times 10\text{mm}$, 必要时可随消毒对象, 增用或改用其他载体

(3) 臭氧采样装置和浓度分析仪

(4) 细菌定量杀灭试验用器材与培养基 (见 2.1.7.2)

(5) 脊髓灰质炎病毒灭活试验用试液、培养基和器材 (见 2.1.10)

(6) 温度与湿度计

(7) 500ml 塑料杯

(8) 水流量计 ($1\text{L}/\text{min} \sim 10\text{L}/\text{min}$)

(9) 不锈钢网

(10) 臭氧浓度测定用臭氧分析仪 (操作按仪器使用说明书) 和化学滴定法用试剂、器

材等

2.5.9.3 臭氧浓度测定

臭氧浓度的测定方法分为化学滴定法和仪器测定法，仪器测定法按仪器使用说明书要求进行。

(1) 通过式臭氧消毒设备

测定水样流出消毒设备后臭氧浓度由高到低的衰变曲线。测定时，若出水流量可调，设 3 个流量（流量大小不同臭氧含量不同），若出水流量不可调，则按说明书要求设 1 个流量，各流量水样流出消毒设备后，即刻测定水样中臭氧含量，然后再将水样放 20℃ 水浴中，设 5 个~6 个时间段，分别测定水样中臭氧含量，并绘制臭氧浓度衰变曲线。

(2) 曝气式臭氧消毒设备

测定一定容量的水体中臭氧浓度由低到高，直到臭氧浓度达饱和时的浓度变化曲线。测定时，无专用容器者，设 3 L 和 6 L 两个容量的水样，若无专用容器但需在更大容量的水样中进行试验者，示消毒设备状况，按使用说明书要求调整水样用量。有专用容器者，按说明书要求，加入规定容量的水样，通入臭氧气体，设 5 个~6 个时间段（应测出臭氧浓度达饱和时的最短时间），分别测定水样中臭氧含量，并绘制臭氧浓度变化曲线。

2.5.9.4 杀灭微生物试验操作程序

按臭氧设备制备臭氧水消毒剂的方式分为曝气式与通过式两类。

(1) 曝气方式臭氧设备制备臭氧水的杀灭微生物试验

①按 2.1.2 所示相关方法制备金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌、枯草杆菌黑色变种芽孢、白色念珠菌、黑曲霉孢子的菌片。必要时，可增设其他试验微生物。

②有专用容器者，按说明书要求向专用容器内加入规定容量的无菌蒸馏水无专用容器者，用容量 $\geq 3000\text{ml}$ 的烧杯，盛装 3000ml 无菌蒸馏水样，调水温至 $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

若无专用容器但需在更大容量的水样中进行试验者，示消毒设备状况，按使用说明书要求调整水样用量，并调水温至 $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

③将不锈钢网放盛水容器底部中央，染菌布片放不锈钢网表面，染菌布片上再盖一不锈钢网片。

④连接微孔扩散装置与臭氧气源出口，开启臭氧消毒设备，开始消毒处理。

⑤待臭氧曝气浸泡消毒至说明书中规定作用时间，0.5倍和1.5倍的作用时间，分别以无菌操作方法取出样片，移入含5 ml中和剂溶液的试管中，中和10 min，进行活菌计菌。

⑥试验同时设阳性对照和阴性对照组，阳性对照用无臭氧气体代替臭氧气体，在水样体积和曝气量等相同条件下，将染菌样片曝气浸泡至最长作用时间，取出样片，进行活菌计数。

⑦试验重复3次。

⑧根据各组杀灭对数值计算结果，在说明书规定的作用时间，以杀灭细菌繁殖体，真菌或细菌芽孢的杀灭对数值 ≥ 3.00 为消毒合格。

(2) 通过式臭氧水杀灭微生物试验按流动载体浸泡试验

①按 2.1.2 所示相关方法制备金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌、枯草杆菌黑色变种芽孢、白色念珠菌、黑曲霉孢子的菌片。必要时,可增设其他试验微生物。

②将臭氧水消毒设备开机5min,使臭氧水中臭氧含量稳定。

③微生物试验按流动载体浸泡试验 (见 2.1.7.6)

④试验重复3次。

⑤根据各组杀灭对数值计算结果,在说明书规定的作用时间,以杀灭细菌繁殖体,真菌或细菌芽孢的杀灭对数值 ≥ 3.00 为消毒合格。

2.5.9.5 脊髓灰质炎病毒灭活试验

(1) 按 2.1.10.3 所示方法制备脊髓灰质炎病毒悬液。若无特殊要求,用玻片为载体。

(2) 将制备的脊髓灰质炎病毒玻片加到无菌试管中,使带有病毒的一面向上。

(3) 将臭氧水消毒设备开机5min,使臭氧水中臭氧含量稳定。

(4) 向含有脊髓灰质炎病毒玻片的试管中加入 5.0ml 的臭氧水消毒剂,浸泡消毒至规定作用时间,取出玻片载体,移入含 1ml 细胞维持液的试管中。振打后,取样按 2.1.10.7

(6) 所示方法检测残留脊髓灰质炎病毒滴度。

(5) 阳性对照,将染有脊髓灰质炎病毒的载体 2 片,分别移入含 1ml 细胞维持液的试管中。振打后,取样按 2.1.10.7 (6) 所示方法检测残留脊髓灰质炎病毒滴度,作为阳性对照。

(6) 阴性对照,用不含脊髓灰质炎病毒的完全培养基作为阴性对照,以观察培养基无污染,细胞是否生长良好。

(7) 试验重复 3 次。

(8) 根据各组的平均病毒感染滴度 ($TCID_{50}$),分别计算其对病毒的灭活对数值。

2.5.9.6 评价规定

对细菌及其芽孢和真菌,在 3 次试验中,所设阳性对照组的回收菌量在 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ cfu/片,阴性对照无菌生长,实验组中每次试验细菌及其芽孢和真菌的杀灭对数值均 ≥ 3.00 ;对脊髓灰质炎病毒,在 3 次试验中,阳性对照组病毒对数值应为 4~6,灭活对数值 ≥ 3.00 ,可判为消毒合格。

若阳性或阴性对照组的结果与上述要求不符,试验作废,重新进行。

2.5.9.7 注意事项

对试验结果有怀疑时,可在试验时同步进行臭氧浓度测定,以便作进一步的分析。

2.5.10 酸性氧化电位水生成器鉴定试验

2.5.10.1 目的

检测酸性氧化电位水生成器发生的酸性氧化电位水的消毒效果,以作为评价酸性氧化电位水对各种物品消毒能否达合格要求的依据。

2.5.10.2 实验器材

(1) 实验微生物: 金黄色葡萄球菌(ATCC 6538)、大肠杆菌(8099)、铜绿假单胞菌(ATCC 15442)、白色念珠菌(ATCC 10231)、黑曲霉菌(ATCC16404)孢子、枯草杆菌黑色变种(ATCC9372)芽孢和脊髓灰质炎病毒等。根据消毒对象选择上述相应的实验菌株。

(2) 细菌定量杀灭试验用器材与培养基(见 2.1.7, 2.1.9)

(3) 中和剂: 对细菌采用 0.1%硫代硫酸钠、0.1%吐温 80 的生理盐水
对病毒采用 0.1%硫代硫酸钠的 PBS

(4) pH 测定仪和 ORP 测定仪

(5) 脊髓灰质炎病毒灭活试验用试液、培养基和器材(见 2.1.10)

2.5.10.3 杀灭微生物试验操作程序

(1) 菌悬液的制备

按 2.1.2 所示相关方法制备金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌、枯草杆菌黑色变种芽孢、白色念珠菌、黑曲霉菌孢子的菌悬液。必要时,可增设其他试验微生物。用5.0ml吸管吸取3.0ml~5.0ml稀释液加入斜面试管内,反复吹吸,洗下菌苔。随后,用5.0ml吸管将洗液移至另一无菌试管中,用电动混合器混合(振荡)20s,或在手掌上振敲80次,以使细菌悬浮均匀,然后用稀释液将其制成细菌浓度为 2×10^9 cfu/ml~ 9×10^9 cfu/ml的试验用菌悬液(对白色念珠菌、黑曲霉菌孢子菌悬液浓度为 2×10^8 cfu/ml~ 9×10^8 cfu/ml)。

(2) 悬液定量杀菌试验操作程序

开启生成器,待产生的酸性氧化电位水中有效成分处于稳定状态时,用 250ml 磨口三角瓶接取满瓶后,盖好瓶盖,置 $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 水浴备用。

取消毒试验用无菌大试管,先加入0.05ml试验用菌悬液,再加入0.05ml有机干扰物质,混匀,置 $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 水浴中 5min后,用无菌吸管吸取酸性氧化电位水9.9 ml 注入其中,迅速混匀并立即记时。

待实验菌与消毒剂相互作用至各规定时间,分别吸取0.5ml实验菌与酸性氧化电位水混合液加于含 4.5ml中和剂试管中,混匀,作用 10min 后,分别吸取 1.0ml样液,按活菌培养计数方法测定存活菌数,每管样液接种2个平皿,进行活菌培养计数。

同时用标准硬水代替酸性氧化电位水,进行平行试验,作为阳性对照。

所有试验样本均在 37°C 温箱中培养,对细菌繁殖体培养48h 观察最终结果;对细菌芽孢和白色念珠菌需培养72h 观察最终结果;对其他微生物应按相应的要求进行培养和观察结果。

试验重复3次(包括对照),计算各组的活菌量(cfu/ml),并换算为对数值,然后按2.1.7.4 (8)中的公式计算杀灭对数值。

(3) 评价规定

在3次试验中,对细菌繁殖体和细菌芽孢,所设阳性对照组的回收菌量在 $2 \times 10^9 \sim 9 \times 10^9$ cfu/ml, 阴性对照无菌生长,实验组中每次试验对细菌繁殖体和细菌芽孢的杀灭对数值均

≥5.00; 对白色念珠菌和黑曲霉菌孢子, 所设阳性对照组的回收菌量在 $2 \times 10^8 \sim 9 \times 10^8$ cfu/ml, 阴性对照无菌生长, 实验组中每次试验对白色念珠菌和黑曲霉菌孢子的杀灭对数值均≥4.00, 可判为消毒合格。

2.5.10.5 脊髓灰质炎病毒灭活试验

(1) 按 2.1.10.3 所示方法制备脊髓灰质炎病毒悬液。

(2) 取脊髓灰质炎病毒悬液0.05ml加入到无菌试管中, 再加入0.05ml有机干扰物, 然后加入4.9ml酸性氧化电位水, 混匀, 至20℃水域中作用之规定时间。

(3) 取0.1ml病毒与酸性氧化电位水混合液, 加入到含0.9ml中和剂的试管中。振打混合后, 取样按 2.1.10.7 (6) 所示方法检测残留脊髓灰质炎病毒滴度。

(4) 阳性对照, 用细胞维持液代替酸性氧化电位水。其余步骤与实验组相同。

(5) 阴性对照, 用不含脊髓灰质炎病毒的完全培养基作为阴性对照, 以观察培养基无污染, 细胞是否生长良好。

(6) 试验重复 3 次。

(7) 根据各组的平均病毒感染滴度 (TCID₅₀), 分别计算其对病毒的灭活对数值。

(8) 评价规定

对脊髓灰质炎病毒, 在 3 次试验中, 阳性对照组病毒对数值应为 5~7, 灭活对数值≥4.00, 可判为消毒合格。

2.5.10.6. 现场和模拟现场试验

酸性氧化电位水现场和模拟现场试验所用实验器材, 染菌方法, 采样方法, 培养方法和评价方法与 (2.2 消毒剂模拟现场和现场消毒鉴定试验) 相同。消毒方法视消毒对象而定, 对瓜果蔬菜、餐饮具、医疗器械、较小的物体表面 (如塑料玩具) 卫生手、皮肤粘膜的消毒时采用流动冲洗浸泡的方法, 对环境物地面和物体表面 (如桌、台面) 可采用无纺布等在酸性氧化电位水中浸湿后擦洗消毒的方法。

2.5.11 甲醛低温蒸汽灭菌柜灭菌试验

2.5.11.1 目的

测定甲醛低温蒸汽灭菌柜对物体表面污染细菌芽孢的杀灭效果, 以验证其灭菌性能是否符合原设计的规定。

2.5.11.2 实验器材

(1) 实验菌株: 嗜热脂肪杆菌 (ATCC 7953) 芽孢菌片

含菌量要求为 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ cfu/片 (按活菌培养计数结果计)

(2) 载体 滤纸片 规格 16mm×6.2mm

(3) 放置菌片的测试器 (以下简称测试器), 由聚四氟乙烯软管 (内直径 2mm, 长 1.5m), 连接放置菌片的塑料装置。

- (4) 嗜热脂肪杆菌恢复培养基, 溴甲酚紫蛋白胨培养液, 中和剂
- (5) 活菌培养计数所需器材
- (6) 使用说明书中规定灭菌器可处理的物品 (装填灭菌器, 使达满载要求)
- (7) 甲醛气体浓度测定仪
- (8) 气相色谱仪

2.5.11.3 工作环境中甲醛浓度测定

(1) 测定灭菌前、灭菌过程中、灭菌结束开启灭菌器门时, 距灭菌器 1m 内甲醛浓度及排气时排水口的甲醛浓度。

(2) 测定方法, 按甲醛浓度测定仪使用说明书规定进行。

(3) 测定结果应符合国家有关规定要求。

在 5 次灭菌试验中, 每次试验中的定量阳性对照组, 检测回收菌量均达 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ cfu/片; 定性阳性对照组, 细菌生长良好。阴性对照应无菌生长。所有实验菌片全部无细菌生长时, 可判为灭菌合格。

2.5.11.4 注意事项

- (1) 实验应该在满载条件下进行。菌片应该放入标准的测试器中。
- (2) 接种菌片时, 应严格无菌操作, 以免污染。
- (3) 灭菌器的每个程序都必须进行相应的灭菌效果检测, 否则不能使用。

2.5.11.5 物品中甲醛残留量测定

(1) 测定方法, 参照 GB15980-1995 一次性使用医疗用品卫生标准, 物品中环氧乙烷残留量测定方法。

(2) 灭菌后物品中甲醛残留量, 处理后物品上甲醛残留量均在标准以下, 物品方可马上使用。

2.5.12 过氧化氢等离子体灭菌效果鉴定试验

2.5.12.1 目的: 测定 H_2O_2 低温等离子灭菌柜对物体表面污染细菌芽孢的杀灭效果, 以验证其灭菌性能是否符合原设计的规定。

2.5.12.2 实验器材

- (1) 实验菌株: 枯草杆菌黑色变种 (ATCC9372) 芽孢悬液, 菌量为 $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$
嗜热脂肪杆菌 (ATCC 7953 SSIK31) 芽孢悬液, 菌量为 $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$
- (2) 培养基: 胰蛋白胨大豆肉汤培养基, 见附录 A
营养肉汤, 见附录 A
溴甲酚紫蛋白胨培养液, 见附录 A
- (3) 中和剂: 经中和剂鉴定试验合格

(4) 含中和剂的胰蛋白胨大豆肉汤培养基

(5) 磷酸盐缓冲液 (PBS, 0.03mol/L, pH 7.2)

(6) 载体 : 根据被消毒对象的不同, 可选择使用聚四氟乙烯片, 面积为 10mm×10mm, 不锈钢丝, 直径 0.5mm, 长度 20mm 至 30mm。

(7) 模拟医疗器械管腔: 材质、内径和长短应与厂家提供的说明书中最难灭菌的消毒对象相一致。

(8) 不锈钢管腔: 内径约为 1.2cm~1.5cm, 长度为 3cm~5cm, 两端有接口, 可与模拟医疗器械管腔连接, 不锈钢管腔内体积应小于或等于模拟医疗器械管腔内体积, 管腔一端应有可密封的接口, 便于放置染菌载体。

(9) 将 (2) - (8) 项准备好后, 压力蒸汽灭菌 121℃, 20min 后备用。

2.5.12.3 过氧化氢等离子体强度的相关指标按有关规定进行。

2.5.12.4 染菌载体的制备

将载体不锈钢丝浸入芽孢悬液中, 取出放于支架上, 将聚四氟乙烯片载体平放于无菌平皿内, 取 0.01ml 芽孢悬液滴染于载体表面, 用接种环涂匀, 放置 37℃ 培养箱内或放于室温至干燥备用。

2.5.12.5 灭菌效果测定操作程序

(1) 将染菌后的载体放入模拟医疗器械管腔中间位置, 或不锈钢管腔内, 两端分别连接模拟医疗器械管腔, 使总长度和内径与厂家提供的说明书中最难灭菌的消毒对象的相一致。放入专用等离子体灭菌包装袋内。

(2) 灭菌于满载条件下进行, 满载所用物品, 随灭菌器用途而定。

(3) 将放有染菌载体的专用包装袋分别置于灭菌柜各层最难灭菌的位置, 关闭柜门。

(4) 按说明书的要求加入规定量及规格的 H_2O_2 。

(5) 设定半周期灭菌程序, 取作用时间为 T, 并启动该灭菌程序, 进行灭菌处理。

(6) 灭菌程序结束后, 在无菌条件下取出染菌载体, 用灭菌剪刀剪成 3 段, 对枯草杆菌黑色变种芽孢放入含中和剂的 TSB 培养液, 37℃ 培养 7 天后观察结果, 对嗜热脂肪杆菌芽孢放入溴甲酚紫蛋白胨培养液, 56℃ 培养 7 天后观察结果。

(7) 测试中, 应同时设立定性和定量阳性对照组 (染菌载体对照) 与阴性对照组 (培养基对照)。

(8) 定量阳性对照组, 以同批试验用 2 个染菌后的载体置室温下, 待灭菌实验组达规定作用时间后, 立即将该染菌载体剪成 3 段, 分别放入含 5.0ml PBS 试管中, 各振敲 200 下。取洗液按 2.1.3 所示方法进行活菌培养计数。

(9) 定性阳性对照组, 以同批试验用染菌载体置室温下, 待灭菌实验组达规定作用时间后, 立即以无菌操作方式将该染菌载体剪成 3 段, 放入含 5.0ml TSB 培养液试管中, 至 37℃ 培养箱中作定性培养, 观察细菌生长情况。

(10) 阴性对照组, 以同批次试验用未染载体 2 个, 分别接种于 5.0ml TSB 培养液, 同时将未接种过的 TSB 培养液, 放入培养箱中作定性培养, 观察有无细菌生长。

(11) 试验重复 5 次。

2.5.12.6 评价规定

在 5 次试验中, 每次试验的定量阳性对照组, 回收菌量均应在 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ cfu/载体; 定性阳性对照组, 细菌生长良好; 阴性对照组应无菌生长。所有实验菌片全部无细菌生长时, 可判为灭菌合格。则 T 时间为最短灭菌时间, 判定该灭菌器在所设定的灭菌工艺条件下灭菌时间应至少为 2T。

2.5.12.7 注意事项

(1) 如灭菌柜设有多个灭菌程序, 应对每个程序进行相应的半周期法灭菌效果检测, 否则不能使用。

(2) 试验应该在满载条件下进行。

(3) 接种菌片时, 应严格无菌操作, 以免污染。

2.5.13 内镜消毒机消毒效果鉴定试验

2.5.13.1 目的: 测定内镜消毒机对模拟内镜内表面污染细菌芽孢的杀灭效果, 以验证其灭菌性能是否符合原设计的规定。

2.5.13.2 实验器材

(1) 实验菌株: 枯草杆菌黑色变种 (ATCC9372) 芽孢悬液

(2) 培养基: 胰蛋白胨大豆琼脂培养基 (TSA)

(3) 中和剂: 经中和剂鉴定试验合格

(4) 磷酸盐缓冲液 (PBS, 0.03mol/L, pH 7.2)

(5) 模拟内窥镜: 聚四氟乙烯管, 外径 10mm~12mm, 内径 6mm, 总长度 1000 mm, 分别在 50mm、500mm、950mm 处剪断, 共分为 4 截。其内壁能与载体外壁紧密相套连接。

(6) 载体: 聚四氟乙烯管 (外径 6mm, 内径 4mm, 长度 30mm), 经脱脂处理, 121℃, 15min 灭菌后备用。

2.5.13.3 试验方法

(1) 样本的制备

取 0.03 ml 芽孢悬液 ($1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$ cfu/ml) 滴染于载体内壁, 涂抹均匀, 置 37℃ 培养箱中至干燥, 制成染菌载体。然后将 3 个染菌载体两端依次与各截模拟内窥镜紧密相套连接, 使其完全套入到模拟内窥镜管内。

(2) 消毒处理

按说明书描述的方法将模拟内镜装放于消毒机内规定的位置，按说明书描述的消毒程序进行消毒处理。

（3）采样、检测

消毒处理完毕后，以无菌操作方式取出各载体，分别加入到含有 10 ml 中和剂溶液的试管内，敲打 200 次，做 10 倍系列稀释后选适宜稀释度的液体，分别吸取 1.0 ml 洗脱液，各接种两个平皿，然后倾注 15ml~20ml TSA，置 37℃ 培养箱内培养 72 h，计数菌落数。

（4）对照组

阳性对照组，取 2 个染菌载体，放置在室温环境中，不作消毒处理，待试验样本消毒处理结束后，与试验组载体按同样方法处理。

阴性对照组，分别取中和剂和稀释液各 1.0 ml，各接种两个平皿。

试验重复 3 次。计算各次试验各载体的消除对数值。

（5）效果评价

阳性对照组有菌生长，且每载体回收的菌落总数达 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ cfu，阴性对照均无菌生长，三次试验对各载体上人工污染的枯草杆菌黑色变种芽孢的消除对数值均 ≥ 4.00 时，可判为消毒合格。

2.6 灭菌与消毒指示物鉴定试验

2.6.1 压力蒸汽灭菌生物鉴定试验

2.6.1.1 目的

测定压力蒸汽灭菌生物指示物所含菌量，以及在 $121^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ 饱和蒸汽作用下的存活时间、杀灭时间与 D 值是否达到要求指标。

2.6.1.2 实验器材

（1）压力蒸汽灭菌生物指示器材抗力检测器（biological indicator evaluator resistometer, pressured steam sterilization, BIER, 下简称抗力检测器）。对抗力检测器要求的技术指标：时间控制以秒为单位；温度控制以 0.1°C 为单位；加热至预定温度时间应 $\leq 10\text{s}$ ；排气时间 $\leq 5\text{s}$ ；试验期间柜室内温度误差 $\leq \pm 0.5^\circ\text{C}$ 。

（2） $56^\circ\text{C} \sim 60^\circ\text{C}$ 温箱

（3）溴甲酚紫蛋白胨培养液（嗜热脂肪杆菌恢复培养基，见附录A）

（4）嗜热脂肪杆菌恢复琼脂培养基（见附录A）

（5）眼科镊子（夹取菌片用）

（6）磷酸盐缓冲液（PBS， 0.03 mol/L ，pH 7.2）

（7）回收液（含 0.1% 吐温 80 的 PBS 液）

2.6.1.3 生物指示物微生物含量与抗力标准

（1）菌株应使用嗜热脂肪杆菌（*Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953或SSI K31）芽孢。芽孢量为 5×10^5 cfu/片 $\sim 5 \times 10^6$ cfu/片（菌片），或 5×10^5 cfu/ml $\sim 5 \times 10^6$ cfu/ml（菌悬液）

(2) 在 $121^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 饱和蒸汽条件下, 存活时间 $\geq 3.9\text{min}$, 杀灭时间 $\leq 19.0\text{min}$ 。

(3) 在 $121^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 饱和蒸汽条件下, D值为 $1.3\text{min} \sim 1.9\text{min}$ 。

2.6.1.4 生物指示物含菌量的测定

随机抽取 3 个生物指示物样本。样本如为菌悬液式指示, 直接用 PBS 作适当稀释后, 按 2.1.3 规定进行活菌培养计数即可; 样本如为含菌载体式指示物 (如菌片), 应先置回收液中洗下所载芽孢, 并以 PBS 稀释至适当浓度, 再进行活菌计数培养。培养温度为 $56^{\circ}\text{C} \sim 60^{\circ}\text{C}$, 24h 观察结果。培养基仍用营养琼脂培养基。检测菌量符合 2.6.1.3 者为合格。

2.6.1.5 存活时间和杀灭时间的测定

下以生物指示管的测定为例:

(1) 试验按作用时间分为 3.9min 和 19.0min 两组, 各组测定 20 个样本。

(2) 先将抗力检测器的电热蒸汽发生器加满蒸馏水, 以不超过最高水位为度。

(3) 接通检测器电源, 预热, 使达到预定蒸汽压。

(4) 设定灭菌温度 ($121^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$) 和作用时间。

(5) 启动抗力检测器工作程序, 使自动运行两个循环, 以保证柜室等得到充分的预热。

(6) 将生物指示管 (每批放 20 个样本) 放专用载物架上并置抗力检测器柜室中, 保证每个样本都可充分暴露于蒸汽中。

(7) 关闭柜门, 先设定一组所规定的灭菌时间。

(8) 启动抗力检测器工作程序, 使自动进行抽真空 $\rightarrow$ 柜室加热 $\rightarrow$ 灭菌处理 $\rightarrow$ 排气。

(9) 打开柜门, 取出生物指示管。

(10) 紧接着重复 (5) $\sim$ (9) 的程序进行另一组的测定。

(11) 取出的生物指示管应尽快 (勿超过 2h) 放入 $56^{\circ}\text{C} \sim 60^{\circ}\text{C}$ 温箱, 培养 7d 或按产品使用说明书规定的时间培养, 观察最终结果。

(12) 测定结果, 3.9min 组 (存活时间组) 20 个生物指示管均有菌生长; 19min 组 (杀灭时间组) 20 个生物指示管均无菌生长时, 可判为合格。其中一个组或两组各有一个样本未达规定要求, 可再用 4 组样本重复试验 (3.9min 和 19.0min 组各测试 2 次)。重复试验中, 如各样本均达规定要求, 仍可认为是合格的。

(对生物指示菌片测定时, 操作程序与判断标准与上述生物指示管基本相同, 只是将单片菌片装于牛皮纸袋中, 以防灭菌时被冷凝水浸湿。此外灭菌完毕, 需将样本分别接种于溴甲酚紫蛋白胨培养液中培养, 7d 或按产品使用说明书规定的时间观察最终结果。)

2.6.1.6 D 值的测定

(1) 随机抽取 50 个样本, 在 $0\text{min} \sim 20\text{min}$ 范围内分成 10 个作用时间组进行试验。每组 5 个样本。作用时间递增幅度, 可根据预备试验结果适当变动 (最长时间必须达到使菌全部死亡的作用时间)。

(2) 将各组样本按 2.6.1.5 (2) $\sim$ (10) 所示程序, 分次进行灭菌处理。

(3) 灭菌完毕, 按 2.6.1.4 所示对各组样本随机抽取3个进行活菌培养计数。

(4) 计算每个作用时间样本上平均存活芽孢数的对数值。以作用时间为横坐标(X), 存活芽孢数的对数值为纵坐标(Y), 算出芽孢存活与作用时间的回归方程($Y = a + bX$)。

(5) 计算各实际测定值与直线回归方程的相关程度(相关系数)。

(6) 根据所得直线回归方程式, 计算出减少90%芽孢数所需的作用时间(D 值)。D值符合 2.6.1.3 者为合格。

2.6.1.7 稳定性试验

(1) 取包装完好并在产品使用说明书规定的储存条件下, 存放足量产品。

(2) 达到规定的储存期限(至少一年)后进行检测。检测时, 先观察外观, 特别注意指示剂中的培养液颜色有无变化。

(3) 在外观正常情况下, 进一步按 2.6.1.4、2.6.1.5 所示方法测定活菌数量、存活时间、杀灭时间。菌量数下降<50%, 存活时间和杀灭时间又在规定合格范围内(见 2.6.1.3)者, 该贮存期可视为产品的有效保存期。

2.6.1.8 注意事项

(1) 测定生物指示剂的抗力时, 必须用压力蒸汽灭菌生物指示剂检测器进行, 不能用普通压力蒸汽灭菌器代替。

(2) 使用抗力检测器进行测定时, 为确保每次加热时间的一致, 每次间隔时间不宜超过100s。如时间过长, 柜室必须重新预热。

(3) 培养基性能对热损伤后的芽孢恢复有一定影响, 试验时不能用普通培养基代替恢复培养基。

(4) 严格无菌操作, 尤其是对生物指示菌片进行存活和杀灭时间测定时。

2.6.2 压力蒸汽灭菌化学指示卡鉴定试验

2.6.2.1 目的

测定下排气式、预真空式和脉动真空式压力蒸汽灭菌化学指示卡(下简称化学指示卡)产品在饱和蒸汽作用下所产生的颜色变化, 与拟代表的温度、杀菌作用时间的吻合情况, 以作为判断该指示卡是否合格的依据。对其他相似类型化学指示物的鉴定, 可参照本试验的有关原则进行。

2.6.2.2 实验器材

(1) 压力蒸汽灭菌生物指示物抗力检测器[见 2.6.1.2 (1), 下简称抗力检测器]

(2) 生物指示物: 所用生物指示物或菌片须经卫生部认可, 并在有效期内使用

(3) 留点温度计(60℃~140℃, 应经检定合格)

2.6.2.3 实验分组

试验根据作用温度和时间分组, 一般情况下, 以使用说明书标明的变色温度和作用时间为第1组, 而后温度不变, 作用时间缩短5min为第2组, 再缩短5min为第3组; 另外, 作用时间不变, 仍为20min, 温度下降2℃为第4组, 再下降2℃为第5组。预真空和脉动真

空式压力蒸汽灭菌，因所需作用时间很短，故第 2 组和第 3 组，每组只降低 1min 即可。

例如，某一下排气式压力蒸汽灭菌化学指示卡使用说明书写明，在温度为 121℃，作用 20 min 可全部达到变色完全（与标准合格色块相同）。对该指示卡鉴定试验时，可分组如下：

第 1 组 121℃，20min；

第 2 组 121℃，15min；

第 3 组 121℃，10min；

第 4 组 119℃，20min；

第 5 组 117℃，20min。

又如，某一预真空式压力蒸汽灭菌化学指示卡使用说明书写明，在温度为 132℃，作用 3min 可全部达到变色完全。对该指示卡鉴定试验时，可分组如下：

第 1 组 132℃，3min；

第 2 组 132℃，2min；

第 3 组 132℃，1min；

第 4 组 130℃，3min；

第 5 组 128℃，3min。

[分组测试的目的是：① 验证使用说明书所表明的温度和作用时间，能否使指示卡变色完全；②测试灭菌不完全温度或时间条件下，化学指示变色不完全（未达到与标准合格色块深度相同）的比例。]

2.6.2.4 实验室试验操作程序

（1）每组试验，取 10 片化学指示卡、1 件生物指示器材和 1 支留点温度计，同时放入抗力检测器中。

（2）操作抗力检测器，将各组样本按 2.6.1.5（2）～（10）所示程序分次进行处理（各实验组要求的温度和作用时间，见 2.6.2.3）。

（3）立即打开柜门，取出上述物品，进行检测。

（4）检测时，观察留点温度计所示温度；对比化学指示卡上变色色块与标准合格色块的颜色，确认是否达到合格要求；将生物指示物放入 56℃ 温箱中培养 7 d或按产品使用说明书规定的时间，并观察是否有菌生长。

（5）系统记录各组留点温度计、化学指示卡和生物指示物的结果。

（6）各组试验均重复 3 次。

（7）3 次测定结果均符合以下全部情况者可判为合格：① 第 1 组指示卡 100% 变色完全，第 2 与第 4 组指示卡 $\geq 50\%$ 变色完全，第 3 与第 5 组指示卡 $\leq 20\%$ 变色完全；② 各组生物指示物结果与指示卡基本同步；③ 留点温度计读数与试验规定的温度，相差不超过 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。

2.6.2.5 稳定性试验

取包装完好并在产品使用说明书规定的储存条件下，保存至一定时间（至少一年）的化学

指示卡，用实验室试验（2.6.2.4）方法进行检测。若结果符合上述要求，可视为指示卡在该保存期内性能稳定。

2.6.2.6 注意事项

（1）化学指示卡的鉴定，除注意其在到达灭菌要求温度和时间时可变为合格颜色外，还必须观察其在未达到灭菌要求温度和时间时是否不会变成合格颜色。从防止灭菌不合格角度看，后者更为重要。因此，在试验中低于灭菌要求温度和时间组绝不可省略。

（2）测定时应使用饱和蒸汽，否则可影响结果的准确性。

（3）留点温度计检定时所观测到的误差，在记录试验温度时，应将读数校正。

（4）压力蒸汽灭菌生物指示物抗力检测器为一专用设备，国外和我国均有生产。由于试验要求的精密度较高，不宜用一般压力蒸汽灭菌器代替。

（5）试验中所用化学指示卡和生物指示物均应为同批产品。

（6）下排气式和预真空（包括脉动真空）式压力蒸汽灭菌对温度和作用时间的精确度要求不同，故在两类化学指示卡实验分组中温度和作用时间的组距亦不同，两者不宜混用。

（7）对所要求的重复性试验，不可只在同次试验中增加一些化学指示卡，而应每重复一次试验即应进行一次压力蒸汽灭菌处理，以防产生系统性误差。

2.6.3 压力蒸汽灭菌化学指示胶带与化学指示标签的鉴定试验

2.6.3.1 目的

测定压力蒸汽灭菌用化学指示胶带与化学指示标签在规定温度的饱和蒸汽和作用时间下的变色情况，以作为判断该指示胶带和标签是否适用于作为经压力蒸汽灭菌处理标志的依据。

2.6.3.2 实验器材

（1）压力蒸汽灭菌生物指示物抗力检测器 [见 2.6.1.2 （1），下简称抗力检测器]

（2）留点温度计（60℃～140℃，经鉴定合格）

2.6.3.3 实验分组

试验根据作用温度和时间分组，一般情况下化学指示胶带和标签所要求的准确度较化学指示卡类产品为宽松。分组时，以使用说明书表明的变色温度和作用时间为第 1 组；而后，温度不变，作用时间缩短10min 为第 2 组；另外，时间不变，温度下降 10℃ 为第 3 组。

预真空和脉动真空压力蒸汽灭菌，因所需时间很短，故第 2 组缩短至 1 min 即可。

例如，使用说明书表明，某种用于下排气式压力蒸汽灭菌的化学指示胶带，在温度为121℃，作用 20 min 可全部达到变色完全（与标准合格色块相同）。试验时，可分组如下：

第 1 组 121℃， 20min；

第 2 组 121℃， 10min；

第 3 组 111℃， 20min。

又如，某一用于预真空与脉动真空式压力蒸汽灭菌的化学指示胶带，说明书写明，在温度为 132℃，作用 3min 可全部达到变色完全。试验时，可分组如下：

第 1 组 132℃, 3min;

第 2 组 132℃, 1min;

第 3 组 122℃, 3min。

[分组测试的目的是: ① 验证使用说明书所表明的温度和作用时间, 能否使样本变色完全; ②测试灭菌不完全温度或时间条件下, 化学指示胶带与化学指示标签变色不完全 (未达到与标准合格色块深度相同) 的比例。]

2.6.3.4 试验操作程序

(1) 每组试验取 5 个标签或来自不同卷的 5 段胶带, 粘贴于厚纸片上, 随同一留点温度计放入抗力检测器中。

(2) 操作抗力检测器, 待达到要求的温度及其相应的压力, 持续至规定的时间, 排空柜室内蒸汽使成常压。

(3) 打开柜门, 取出样本。

(4) 观察、记录化学指示胶带、标签, 是否变色和留点温度计显示的温度。

(5) 各组试验重复 3 次。

(6) 3 次试验均符合以下条件者为合格: ① 第 1 组全部样本变色完全, ② 第 2 和第 3 组变色完全的样本比例不超过 20%。③ 留点温度计所示温度与设定的温度相差不超过 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。

[对未印有变色完全的标准色块的指示胶带和标签, 可依据生产者另外提供的完全变色样本, 对变色完全与否进行判断。]

2.6.3.5 稳定性试验

取包装完好并在产品使用说明书规定的储存条件下, 保存至一定时间 (至少一年) 的指示胶带与标签样本, 用 2.6.3.4 规定的方法进行检测, 若结果符合要求, 所测指示胶带与标签可视为在该保存期内性能稳定。

2.6.3.6 注意事项

(1) 于 121℃ 条件下检测合格者, 只能于 121℃ 灭菌时使用, 于 132℃ 条件下检测合格者, 只能于 132℃ 灭菌时使用。只有两组检测均合格者, 才能兼用于上述两种温度灭菌的监测。

(2) 其他注意事项见 2.6.2.6 中的有关内容。

2.6.4 紫外线灯管照射强度化学指示卡鉴定试验

2.6.4.1 目的

测定紫外线灯管照射强度化学指示卡 (下简称指示卡) 在照射后颜色的变化与所受照射剂量的相关情况, 从而确定是否可用于使用单位对紫外线灯管照射强度的自检。

2.6.4.2 实验器材

(1) 紫外线照度计 (在计量标定有效期内, 下简称照度计)。

(2) 低臭氧直管紫外线灯 [30 W, 紫外线强度 (辐照度值) $\geq 90 \mu\text{W}/\text{cm}^2$]。

(3) 紫外线灯测定架 [测定时, 紫外线灯固定于测定架顶端。顶端高 2m, 可上下移动,

附稳压器（220 V）。下简称测定架]。

2.6.4.3 试验操作程序

（1）将紫外线灯装于测定架上，指示卡置灯管下方垂直中心位置的照射台上（灯管与照射台距离可上下调整，以使达检测时规定的照射强度）。

（2）开启紫外线灯，待 5 min 后灯管工作稳定，按指示卡上各标准色块注明的强度，分别调整好灯管下照射台中心测试点处的紫外线照射强度（用照度计测定），以进行随后的照射试验。

（3）照射试验时，在测定架上对指示卡变色区进行照射。每 10 张指示卡为一组，每组照射 1 min，每个强度照射 3 组（共 30 张指示卡）。

（4）照射后，即刻用肉眼观察照射过的指示卡，比较其变色区色块与相应标准色块的颜色。

（5）同时用照度计测定紫外线照射强度，以便与指示卡结果核对。

（6）变色区色块与标准色块，以及指示卡检测结果与照度计测定结果的符合率均 $\geq 90\%$ 者，可判定为合格。

2.6.4.4 稳定性试验

（1）在产品使用说明书规定的条件下，存放足量指示卡。

（2）达到规定的储存期限（至少一年）后，按 2.6.4.3 方法进行检测。

（3）实验结果符合合格要求 [2.6.4.3（6）]，可认为该存放时间即为其贮存有效期。

2.6.4.5 注意事项

（1）为防失准，所用照度计必须定期检测校正，并在计量标定有效期内者。

（2）试验中所用指示卡必须为同一批产品。

（3）测试时，对指示卡照射 1min，时间应准确，过长或过短均可影响结果。

（4）光敏指示卡反应变色后，久存可能颜色有所改变，为此检测结果应即时观察并用文字记录。

（5）大量样本的测试，应分多次进行，否则易发生系统误差。

（6）电压波动可影响灯管放射的紫外线强度，试验时应予注意。

2.6.5 消毒剂浓度试纸鉴定试验

2.6.5.1 目的

通过检测消毒剂浓度试纸（下简称试纸）颜色反应情况与溶液中消毒剂浓度相关程度，以作为对其应用做出评价的参考。

2.6.5.2 实验器材

消毒剂有效成分化学分析器材。

2.6.5.3 测定分组

鉴定中，应根据试纸使用说明书所列可测试消毒剂种类分别进行测试。测试中，取比色卡上所示标准色块中的高、中、低 3 个浓度作为 3 个组。对每种消毒剂，每组浓度测试 30 个样本（取

自 3 个以上最小包装)。3 组的主要有效成分浓度, 均应分别用化学滴定法测定。

2.6.5.4 试验操作程序

(1) 配制各种消毒剂的高、中、低 3 组浓度溶液, 并按本规范中有关方法测定其主要有效成分浓度。

(2) 对各消毒剂浓度组, 分别用试纸浸于溶液中, 润湿即取出。达到使用说明书规定的作用时间后与标准色块比较, 确定所测浓度。每条试纸作为一个样本, 逐个样本分别进行测定。

(3) 将试纸测得的浓度与化学滴定法测得的浓度比较, 该组样本总符合率 $\geq 90\%$ 者为合格。

2.6.5.5 稳定性试验

(1) 取包装完好并在产品使用说明书规定的储存条件下, 存放足量产品。

(2) 达到规定的储存期限(至少一年)后进行检测。检测时, 先观察外观, 然后按 2.6.5.4 所示方法进行检测。

(3) 试验结果符合合格要求[2.6.5.4 (3)]者, 可认为该存放时间即为其贮存有效期。

2.6.5.6 注意事项

(1) 有效成分不稳定的消毒剂, 应在试纸检测后尽快以化学法滴定其浓度。

(2) 对于反应后颜色可消退的产品, 应及时观察结果, 并用文字记录。

2.7 抗(抑)菌试验

2.7.1 目的

测定抗(抑)菌产品对细菌和真菌的抗(抑)菌作用。

常使用的方法有抑菌环试验、最小抑制浓度测定试验、滞留抑菌效果测定试验、洗衣粉抗菌效果测定试验、振荡烧瓶试验、浸渍试验与贴膜试验, 可视情况选用。

2.7.2 抑菌环试验

2.7.2.1 原理

利用抑菌剂不断溶解经琼脂扩散形成不同浓度梯度, 以显示其抑菌作用。试验通过抑菌环大小以判断其是否具有抑菌能力。本试验适用于抑菌剂与溶出性抗(抑)菌产品的抗(抑)菌效果鉴定。

2.7.2.2 实验器材

(1) 金黄色葡萄球菌 ATCC 6538、大肠杆菌 8099 或 ATCC 11229、白色念珠菌 ATCC 10231 菌悬液(见 2.1.2)及根据抑菌剂特定用途所用的其他菌悬液。

(2) 抑菌剂载体(5mm 直径圆形新华一号定性滤纸片, 经压力蒸汽灭菌处理后, 置 120℃ 烘干 2h, 保存备用)。

(3) 活菌培养计数所需器材(见 2.1.3)。

(4) 微量移液器(5 μ l~50 μ l, 可调式)。

(5) 游标卡尺。

(6) 营养琼脂培养基、胰蛋白胨大豆琼脂培养基与沙堡琼脂培养基

2.7.2.3 操作程序

(1) 抑菌片的制备:对液体抑菌剂, 取无菌并干燥的滤纸片。每片滴加实际使用浓度抑菌剂溶液 $5\mu\text{l}$, 然后将滤纸片平放于清洁的无菌平皿内, 开盖置温箱 (37°C) 中烤干, 或置室温下自然干燥后备用。

溶出性抗(抑)菌产品, 可直接制成直径为 5mm , 厚不超过 4mm 圆片(块), 每 4 片(块)一组。

(2) 阴性对照样片的制备:取无菌干燥滤纸片, 每片滴加无菌蒸馏水 $5\mu\text{l}$, 干燥后备用。

溶出性抗(抑)菌产品的阴性对照样本, 应取同种材质不含抑菌成份的样品, 制成与实验组大小相同的样片(块)。

(3) 实验菌的接种:用无菌棉拭子蘸取浓度为 $5\times 10^5\text{cfu/ml}\sim 5\times 10^6\text{cfu/ml}$ 实验菌悬液, 在适宜的培养基平板表面均匀涂抹 3 次。每涂抹 1 次, 平板应转动 60° , 最后将棉拭子绕平板边缘涂抹一周。盖好平皿, 置室温干燥 5min 。

(4) 抑菌剂样片贴放:每次试验贴放 1 个染菌平板, 每个平板贴放 4 片试验样片, 1 片阴性对照样片, 共 5 片。用无菌镊子取样片贴放于平板表面。各样片中心之间相距 25mm 以上, 与平板的周缘相距 15mm 以上。贴放好后, 用无菌镊子轻压样片, 使其紧贴于平板表面。盖好平皿, 置 37°C 温箱, 培养 $16\text{h}\sim 18\text{h}$ 观察结果。用游标卡尺测量抑菌环的直径(包括贴片)并记录。试验重复 3 次。

测量抑菌环时, 应选均匀而完全无菌生长的抑菌环进行。测量其直径应以抑菌环外沿为界。

2.7.2.4 评价规定

(1) 抑菌作用的判断:

抑菌环直径大于 7mm 者, 判为有抑菌作用。

抑菌环直径小于或等于 7mm 者, 判为无抑菌作用。

(2) 3 次重复试验(共 12 个样片)均有抑菌作用结果者, 判为合格。

(3) 阴性对照组应无抑菌环产生。否则试验无效。

2.7.2.5 注意事项

(1) 每次试验均应设置阴性对照, 不可省略。在报告中亦必须将对照组的结果列出。

(2) 接种用细菌悬液的浓度应符合要求。浓度过低, 接种菌量少, 抑菌环常因之增大; 浓度过高, 接种量过多, 抑菌环则可减小。

(3) 应保持琼脂浓度的准确性, 否则可影响抑菌环的大小。

(4) 培养时间不得超过 18h 。培养过久, 部分细菌可恢复生长, 抑菌环变小。

(5) 抑菌环直径可受抑菌剂的量、抑菌性能和干湿度影响。故抑菌剂滤纸片应在试验当天制备。

2.7.3 最小抑菌浓度测定试验(琼脂稀释法)

2.7.3.1原理

本试验采用琼脂稀释法将不同浓度的抑菌剂混合溶解在琼脂培养基中，然后点种细菌，通过细菌的生长与否，确定抗（抑）菌物质抑制受试菌生长的最低浓度，即最小抑菌浓度（Minimal Inhibitory Concentration, MIC）。本方法适用于非溶出性抗（抑）菌产品抗（抑）菌效果的鉴定。

2.7.3.2 实验器材

（1）菌株

金黄色葡萄球菌 ATCC 6538 ， 大肠杆菌 8099或ATCC 11229。

可根据抑菌剂的用途，选择特定的菌株。

（2）营养琼脂培养基，制备后经高压灭菌后，置45℃～50℃水浴备用，此培养基将用于对照试验。

（3）0.03mol/L磷酸盐缓冲液pH7.2

（4）灭菌蒸馏水

（5）加样器（1 μl～10 μl）

（6）45℃～50℃水浴恒温箱

（7）吸管、试管、平皿

（8）37℃培养箱

2.7.3.3 操作步骤

（1）抗（抑）菌溶液的配制：以无菌操作取5ml或5g（固体研磨后）样品，放入45ml灭菌蒸馏水中，充分震荡溶解，配成10%的均匀分散的溶液或悬液。

（2）抗菌剂稀释液配制：将已配成10%的抗（抑）菌溶液或悬液用蒸馏水做对倍系列稀释成不同浓度的受试液，置45℃～50℃水浴恒温备用。

（3）双倍浓度营养琼脂培养基：制备后经高压灭菌后，置45℃～50℃水浴备用，此培养基将用于稀释抗（抑）菌溶液或悬液。

（4）含抗（抑）菌液培养基的配制：分别取10ml系列稀释的抗菌液加入平皿内。将在45℃～50℃水浴中的双倍浓度营养琼脂培养基10ml，加进平皿内，边加边摇晃平板，使抗（抑）菌液和培养基充分混匀。

（5）用加样器取1 μl～2 μl（含菌量约为 10^7 cfu/ml的PBS溶液）菌悬液点种于含抗（抑）菌液培养基的平皿，接种后所形成的菌液圈直径约5mm～8mm（每个点菌量约为 10^4 cfu）。

（6）以同样方法接种不含抗（抑）菌成分的营养琼脂平板，作为阳性对照。

（7）将接种后的平板放置35℃培养箱中，倒置培养18h～24h，观察结果。

2.7.3.4 评判规定

菌落生长被完全抑制的最低抗（抑）菌液浓度为该样品对受试菌的MIC。单一菌落生长可忽略不计。

2.7.3.5 注意事项

(1) 接种时，应由低抗（抑）菌剂浓度向高浓度平板依次接种，最后接种对照平板。

(2) 为了保证平板受热均匀，培养时平板堆放不得超过4个。

2.7.4 最小抑菌浓度测定试验（营养肉汤稀释法）

2.7.4.1 原理

本试验将不同浓度的抑菌剂混合溶解于营养肉汤培养基中，然后接种细菌，通过细菌的生长与否，确定抑菌剂抑制受试菌生长的最低浓度，即最小抑菌浓度（MIC）。本方法适用于溶出性抑菌产品最低抑菌浓度的测定。

2.7.4.2 实验器材

(1) 实验菌株：金黄色葡萄球菌 ATCC 6538，大肠杆菌 8099或ATCC 11229。

可根据抑菌剂的用途，选择特定的菌株。

(2) 营养肉汤培养基，见附录 A。

(3) 稀释液，见附录A。

(4) 吸管、试管

(5) 37℃培养箱。

2.7.4.3 操作步骤

(1) 按 2.1.2 所示方法制备金黄色葡萄球菌、大肠杆菌悬液

(2) 含抗菌剂培养基配制：将抗（抑）菌溶液用蒸馏水做对倍系列稀释成不同浓度的受试液，取各稀释度受试液2.5ml加入到含2.5ml双倍浓度营养肉汤的试管中。

(3) 取0.1ml含菌量约为 10^8 cfu/ml菌悬液接种于含抗（抑）菌剂的营养肉汤的试管中，作为实验组样本。

(4) 以同样方法接种不含抗（抑）菌剂的营养肉汤的试管中，作为阳性对照组样本。

(5) 取2支含营养肉汤的试管，作为阴性对照组样本。

(6) 将实验组样本、阳性对照组样本及阴性对照组样本放置37℃培养箱中，培养48h，观察结果。

(7) 试验中应将试验用菌悬液进行活菌培养计数，其作用浓度应为 5×10^5 cfu/ml $\sim 5 \times 10^6$ cfu/ml。

2.7.4.4 评判规定

当阳性对照管有细菌生长（混浊），阴性对照管无菌生长（透明），试验用菌悬液的作用浓度为 5×10^5 cfu/ml $\sim 5 \times 10^6$ cfu/ml时，实验组无菌生长的最高稀释度所对应的抗（抑）菌剂浓度，为该样品对受试菌的MIC。

2.7.4.5 注意事项

接种时，应由低抗（抑）菌剂浓度向高浓度依次接种。

2.7.5 滞留抑菌效果试验

2.7.5.1 原 理

本试验通过模拟适合细菌生长、繁殖和可能产生感染的皮肤条件下,使用随机性、双盲的、配对比较的方法,检测抗(抑)菌香皂和抗菌沐浴露 12h 或 24h 的滞留抑菌效果。

2.7.5.2 实验器材

(1) 试验产品: 试验品为 25 套按顺序编号的香皂样品。每套 2 块,一块为测试样品皂,另一块为不含抑菌剂的对照皂。

(2) 不含抑菌剂的洗发水 25 瓶(200ml/瓶)

(3) 不含抑菌剂的香皂 25 块

(4) 胰蛋白酶大豆肉汤培养基(TSB)

(5) 胰蛋白酶大豆琼脂培养基(TSA)

(6) 0.075mol/L 的磷酸盐缓冲液

(7) 70%酒精

(8) 恒温培养箱

(9) 金属筒(直径 2.2cm、高度 3cm)

(10) 一次性接种环(直径 4mm)

(11) 小塑料碗(直径 2.2cm,高 2.5mm,)

(12) 胶带(Darapore, 3M 公司生产)

(13) 尼龙刮菌棒

(14) Triton-X 100 500ml

(15) 外用抗生素软膏(例如:百多邦莫匹罗星软膏)

(16) 玻璃弯棒

(17) 羊血 经脱纤维处理

(18) 金黄色葡萄球菌 ATCC 27217(此株金黄色葡萄球菌是一种低毒性、对青霉素敏感、对四环素有抗药性的色素株,曾用于许多试验研究,没有任何严重副作用)。

(19) 皮肤消毒剂

2.7.5.3 试验步骤

(1) 调整阶段

试验开始前 7d 至 14d,受试者使用不含抗(抑)菌成分的香皂、洗发水和沐浴液进行日常的洗手、洗澡。此阶段持续至少 7d,但不超过 14d。

(2) 清洗阶段

清洗阶段共 3d,受试者每天用抑菌皂清洗一侧前臂,用对照皂清洗另一侧前臂,清洗过程如下:

- ① 先清洗左臂,用流动水(水温应保持在 35℃~37℃)打湿前臂内侧;
- ② 用香皂从手腕至臂肘上下摩擦 15s;
- ③ 用手在涂有香皂的手臂上上下下摩擦泡沫 45s;

④ 用流动的清水冲洗前臂 15s, 不要搓擦;

⑤ 用纸巾沾干前臂. 不要搓擦;

⑥ 重复以上步骤清洗右臂;

⑦ 按上面所描述的试验步骤每日清洗前臂 3 次, 每次间隔至少一个小时, 在最后一次清洗之后, 需记录好时间, 在 12h 之后, 进行滞留效果检测。在第 9 次清洗前臂以后, 受试者不能洗澡、淋浴或洗净前臂, 直到试验结束。清洗前后的两块香皂的重量及受试者完成清洗的情况, 须记录下来。

(3) 试验阶段

清洗阶段的第四天(最后一次清洗后 12h 或 24h), 将在受试者每只前臂上划出一个试验区, 对试验区进行接种、封包和回收存活细菌, 具体步骤如下:

① 将金黄色葡萄球菌(ATCC 27217)连续转种 3 代, 取第 3 代培养物接种于胰蛋白大豆肉汤培养基(TSB)中, 在 $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 的条件下培养 $20\text{h} \pm 2\text{h}$ 。然后用胰蛋白酶大豆肉汤适当稀释菌悬液, 使菌悬液浓度约为 $10^8\text{cfu/ml} \sim 10^9\text{cfu/ml}$ 。

② 细菌接种: 在受试者的每只前臂中间部位(不要在手腕和肘皱褶处), 用带有印墨直径为 3.00cm 的玻璃量筒扣在皮肤上, 划分出一个试验区。使用加样器取 $10\mu\text{l}$ 上述菌悬液, 接种于前臂试验区(菌落数为 $10^6\text{cfu/试验区} \sim 10^7\text{cfu/试验区}$), 用一次性接种环, 把接种物涂成一圆形, 使其与试验区边缘应有 4mm~5mm 的距离。

③ 封包: 细菌接种后立即用小塑料碗扣于染菌区上面, 再用胶带将小塑料碗固定在皮肤上, 记录封包的时间。

④ 回收存活细菌: 接种后 $2\text{h} \pm 5\text{min}$ 对前臂上接种的区域进行取样。将金属筒放置于试验区中间部位, 不要接触到盖有印墨的边缘。将 1ml 含 0.1% triton-X100 的 0.075mol/L 磷酸盐缓冲液吸移至金属筒内, 用尼龙刮菌棒刮洗金属筒罩住区域内的皮肤 60s, 将筒内液体吸移至试管内, 再加 1ml 含 0.1% triton X-100 的 0.075mol/L 磷酸盐缓冲液, 对该区域内的皮肤进行第二次刮洗 30s, 将第二次擦洗的液体, 注入含第一次刮洗液体的试管中。

⑤ 实验区试验后的消毒处理: 一个实验区采样之后, 需用 70% 的酒精对实验区进行消毒。然后对另一个实验区以同样方法进行采样, 采样结束后, 先用 70% 的酒精对实验区进行消毒, 然后用皮肤消毒剂对两只前臂进行消毒处理, 处理后清水冲洗, 擦干, 再涂少量的抗生素软膏。

⑥ 平皿接种与培养: 对每一个取样进行平皿接种, 以 0.0375mol/L 磷酸盐缓冲液对样品进行 10 倍系列稀释, 选适当稀释度取 0.1ml 接种于 2 个含 5% 羊血的 TSA 平板表面, 用玻璃弯棒涂匀, 在 $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中培养 $48\text{h} \pm 4\text{h}$, 计数菌落数。

⑦ 以试验同批次的稀释液、培养基等分别设阴性对照。

⑧ 抑菌率的计算

抑菌率 = $\left[\frac{\text{对照平均菌落数} - \text{试验平均菌落数}}{\text{对照平均菌落数}} \right] \times 100\%$

2.7.5.4 判定标准

(1) 各次试验阴性对照菌无菌生长。

(2) 实验不得少于 16 人次，抑菌率均 $\geq 50\%$ ，可判定该产品在规定的时间内有滞留抑菌作用。

2.7.5.5 注意事项

(1) 受试者录用标准

① 年龄介于 18 岁至 65 岁的男性或女性；

② 受试者应身体健康；

③ 前臂应完好无损且没有皮肤病及其它皮肤问题；

④ 同意在整个试验期间，避免使用抗（抑）菌洗液和乳膏、局部类固醇类药和全身或局部使用抗生素，除非因为并发症医生要求使用；

⑤ 同意在清洗阶段使用非药物香皂或洗液洗澡和淋浴，但受试者不能清洗前臂。在第 9 次洗完前臂以后，不洗澡，淋浴或洗净前臂，直到试验结束。

(2) 排除受试者的标准 如果受试者有下列情况之一，不能被录用参加试验

① 同时参加另外一个临床试验

② 在过去的 14d 中，参加过任何一种形式的关于清洁手或手臂的试验

③ 对香皂、去污剂、香水或青霉素过敏

④ 怀孕妇女

⑤ 诊断患有糖尿病、肝炎、艾滋病（HIV 阳性）、器官移植者，

(3) 其它试验限制

① 受试者不得使用其它清洁用品；

② 受试者应避免洗热水盆浴和游泳；

③ 受试者应避免接触未干的油漆、涂料或者其它溶剂；

④ 受试者应避免在手腕处和前臂上喷洒香水。

(4) 在试验完成后的 48h~72h 内，需检查前臂上有无小脓疱、水疱，隆起的红色痒疱。出现这些情况的受试者应尽快通知检验单位。

2.7.6 洗衣粉抗（抑）菌效果鉴定试验

2.7.6.1 原理

本方法通过模拟洗衣机的洗衣过程，检测除（杀）菌洗衣粉（剂）的抗菌作用。

2.7.6.2 试验器材

(1) 实验菌株

大肠杆菌 8099 或 ATCC 11229，金黄色葡萄球菌 ATCC 6538。

(2) 培养基

营养琼脂 A（琼脂含量为 1.5%）

营养琼脂 B：在营养琼脂 A 中另加入 1.5% 的琼脂

营养肉汤

胰蛋白胍大豆琼脂培养基 (TSA)

(3) 牛血清白蛋白 (过滤除菌)

(4) 烷基酚聚氧乙烯醚 (Tergitol)

(5) 碳酸钠

(6) 标准硬水

(7) 非离子浸湿剂: 见2.7.6.3 (1) 测试棉布制备部分

(8) 冲洗溶液

(9) 含0.5%吐温的磷酸盐缓冲液 (见附录A)

(10) 吐温80 (过滤除菌)

(11) 无菌去离子水或蒸馏水

(12) 不锈钢转轴 (由一条直径0.16 cm不锈钢丝制成, 如图2-2)

(13) 有金属螺盖的玻璃罐 (容积为470 ml, 可高压灭菌, 并可放入转轴的广口罐), 将罐口覆盖牛皮纸, 加盖, 于121°C灭菌25 min 备用。

(14) 转动速度为45 r/min ~ 60 r/min 的滚动摇床

(15) 可调恒温水浴箱

(16) 吸管 (1ml, 5ml, 和10 ml)

(17) 培养皿

(18) 铺有滤纸的玻璃培养皿。

(19) 菌种保存管

(20) 细菌培养箱

(21) 涡流振荡器

(22) 细菌比浊仪

(23) 棉布 (32 织纱/cm × 32 织纱/cm 平织棉布)

(24) 别针、镊子、无菌手套、3mm~5mm玻璃珠、秒表、载体布片2.5cm×3.75cm, 见测试棉布准备。

2.7.6.3 实验准备

(1) 测试棉布的制备

①非离子浸润剂的制备: 取5 g烷基酚聚氧乙烯醚, 5 g碳酸钠加入到1 L去离子水中。

②洗涤液的制备: 1.5g 非离子浸润剂, 1.5g 碳酸钠, 加入到3 L去离子水中。

将大约300g 测试棉布加入3L洗涤溶液。加热煮沸1h。取出棉布在煮沸的去离子水中清洗5min。然后放入凉去离子水中5min。以去除残留的浸润剂。然后将棉布晾干。

②测试棉布和转动支架的准备: 取处理过的棉布, 剪成5cm宽, 重量为15g±1g的布条, 将其一端插入固定在测试转动支架的水平方向的外边, 然后在三条水平支架间以足够的

张力缠绕12个整圈,将布条的另一端用不锈钢别针固定在前一圈布条上。最后以121℃压力蒸汽灭菌15 min,备用。

(3) 细菌悬液的制备:取0.5ml营养肉汤冻干的菌种溶解,接种于含10ml的营养肉汤的试管,于 $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 培养24h。然后,振荡混合均匀。用10 μl 接种环在营养琼脂平板上划线,置于 $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 培养24h。然后,从平板上挑取单个菌落种入菌种保藏管中,上下摇动10次,吸弃多余液体,置 -85°C 冰箱保存。试验前,从菌种保藏管中取出一粒带菌小颗粒放入营养琼脂斜面,晃动斜面。将斜面至 35°C 培养24h。每天转种1次,连续传三代。

第四天,用5ml PBS洗脱斜面上的菌苔,取0.5ml加入到含9.5ml PBS的试管中,混匀,取1ml~2ml加入含有20ml营养琼脂B的细胞培养瓶中,晃动培养瓶使菌液覆盖整个琼脂表面。吸弃多余菌液,然后将培养瓶倒置平放在 35°C 培养箱中,培养24小时。

用5ml PBS和3g灭菌玻璃珠洗脱细胞瓶中的菌体,用PBS调整浓度至 $1 \times 10^8 \text{ cfu/ml} \sim 5 \times 10^8 \text{ cfu/ml}$,然后加入等量3%的牛血清白蛋白。

(4) 染菌载体的制备:每片载体接种20 μl 菌悬液,放回培养皿中,加盖,于 $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 在培养箱中干燥20 min。

(5) 测试样品的制备:至少在实验开始前20 min,将盛有265ml硬水的玻璃罐在水浴箱中恒温至测试温度($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$)。加入被测试样品混合溶解。

2.7.6.4 实验步骤

(1) 将2片染菌载体放入转动支架的第6和7层布条之间,将第3片放入第7和8层布条之间。

(2) 以无菌操作方式将转动单元(支架、布条和染菌载体)放入含有测试产品的玻璃罐中,加盖。

(3) 玻璃罐固定在摇床上,滚动旋转洗涤20 min,取下玻璃罐。

(4) 以无菌操作方式,取出转动单元,取出3片染菌载体放入到含有30ml含0.5%吐温80的PBS的试管中,在振荡器中混合10s。然后振打200次,用PBS做10倍系列稀释,并选择适宜稀释度样液接种TSA平板。每个稀释度接种两个平板。

(5) 对照组除用0.5%吐温80替代测试产品外,其它实验条件和步骤均与实验组相同。

(6) 菌数对照:将3片染菌载体加入含有30ml 0.5%吐温80的PBS试管中,在振荡器振荡10s,然后振打80次,用PBS做10倍系列稀释,并取适宜稀释度样液1.0ml,以倾注法接种TSA平板,每个稀释度接种两个平板。

(7) 将实验组、对照组和菌数对照组平板倒置于 $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 培养箱中,培养 $48 \pm 4 \text{ h}$,计数菌落数。

(8) 以试验同批次的稀释液、培养基等分别设阴性对照。

(9) 结果计算

试验重复3次。记录并计算测试样品的细菌总数，求其平均值。

用下列公式计算除菌率

抑菌率(%) = (A-B) / A × 100% 其中 A 为实验前对照样品的菌落数；B 为实验后实验样品的菌落数。

2.7.6.5 评价规定

各次阴性对照均无菌生长，对照组回收菌数应为 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ cfu/片，抑菌率达到 50%者，可判为有抗菌作用。

2.7.6.6 注意事项

(1) 将旋转单元放入玻璃罐后应将盖子盖紧，以防转动时漏水。

(2) 试验时应严格无菌操作，以防止杂菌污染。

2.7.7 振荡烧瓶试验

2.7.7.1 原理

在液体中通过快速长时间振荡，增加微生物与抗（抑）菌产品内抑菌剂的接触以显示其抑菌作用。试验根据抑菌率大小判断其是否具有抑菌能力。本试验适用于对非溶出性抗（抑）菌织物的抗（抑）菌效果鉴定。

2.7.7.2 实验器材

(1) 金黄色葡萄球菌 ATCC 6538、大肠杆菌 8099 白色念珠菌 ATCC 10231 菌悬液的制备方法见 2.1.2。根据抑菌剂特定用途也可用其他菌悬液。

(2) 磷酸盐缓冲液 (PBS, 0.03mol/L, pH 值 7.2)

(3) 振荡摇床 (300r/min)

(4) 三角烧瓶

(5) 营养琼脂培养基、胰蛋白胨大豆琼脂培养基 (TSA) 与沙堡琼脂培养基

2.7.7.3 操作程序

(1) 将抗菌物品剪切成10mm×10mm样片，称取0.75g2份分别置入250ml的三角烧瓶中。

(2) 在上述三角烧瓶中加入 70ml PBS 和 5ml 菌悬液，使菌悬液在 PBS 中的浓度为 1×10^4 cfu/ml $\sim 5 \times 10^4$ cfu/ml。

(3) 将三角烧瓶固定于振荡摇床上，在作用温度为 20℃ $\sim$ 25℃的条件下，以 300r/min 分别振摇 2min、1h。吸取 1.0 ml 用 PBS 作适当稀释至 10^{-2} ，作为实验组震荡前、震荡前样液。

(4) 分别吸取振荡前和振荡后样液及适当稀释度的稀释液各 1.0ml，以琼脂倾注法接种平皿，每个样液接种两个平皿，按照 2.1.3 规定的方法进行活菌培养计数。

(5) 试验同时设阴性对照片和不加样片组。对照片组以不含抗菌剂的材质、大小相同的样片代替抗菌样片外，其它操作程序均与实验组相同。不加样片组分别取 5ml 菌悬液 和 70ml PBS 加入 250ml 三角烧瓶中，混匀，分别于振荡前和振荡后 1h，各取 1.0ml 菌悬液与 PBS 的混合

液做适当稀释。同上 按 2.1.3 法进行活菌培养计数。

(6) 以试验同批次的稀释液、培养基分别设阴性对照。

(7) 试验重复3次,按下式计算抑菌率

抑菌率= (样品振荡前平均菌落数-样品振荡后平均菌落数) /样品振荡前平均菌落数×100%

2.7.7.4 评价规定

(1) 各次试验阴性对照均应无菌生长。

(2) 不加样片组活菌计数在 1×10^4 cfu/ml ~ 5×10^4 cfu/ml 之间, 且样本振荡前后平均菌落数差值在 10% 以内, 试验有效。

(3) 各次试验中, 试验样片抑菌率与对照样片抑菌率的差值菌>26%, 即可认定该产品具有抗菌作用。

2.7.7.5 注意事项

(1) 振荡前须将振荡摇床上的三角烧瓶固定牢, 以免碰破。

(2) 试验中, 在实验误差允许的范围内, 如果实验组和对照组出现振荡后菌落数高于振荡前菌落数的情况, 其抑菌率可按“0”计算。

2.7.8 浸渍试验

2.7.8.1 原理

将试样和对照织物分别放于三角瓶中, 用含有肉汤培养基的实验菌悬液接种于试样和对照织物上, 经培养后, 分别将培养前后试样上的细菌洗下, 测定细菌的数量, 可计算出试样上细菌减少的百分率。该方法适用于溶出性抗菌织物抗(抑)效果的检测。

2.7.8.2 实验器材

(1) 实验菌株 金黄色葡萄球菌 ATCC 6538、

(2) 试样: 在距试样布边 10cm 以上、离布端 1m 以上部位, 剪取直径为 5cm 的圆形试样若干, (需用试样数量要根据纤维类别及织物织法而定, 以能吸收 1ml 菌液且三角瓶中不留残液为度)。另同法剪取对照织物若干, 取 3 份试样和 2 份对照织物分别装于三角瓶中, 盖好瓶口, 121℃ 15min 灭菌备用。

(3) 肉汤培养基

(4) 胰蛋白胨大豆琼脂培养基

(5) 磷酸盐缓冲液 (PBS, 0.03mol/L, pH为7.2~7.4)。

(6) 恒温水浴箱

(7) 37℃培养箱

2.7.8.3 菌悬液的制备

用接种环将保存的菌种以划线法接种到营养琼脂平皿上, 在 37℃培养箱中培养 24h, 取平皿上典型的菌落移种到含肉汤培养基的三角瓶中, 在 37℃条件下培养 24h, 用肉汤对培养液进行系列稀释, 使菌悬液的含菌量为 1×10^5 cfu/ml ~ 5×10^5 cfu/ml。

2.7.8.4 试验步骤

(1) 分别取 1ml 菌悬液加在 3 份准备好的三角瓶内的织物上, 确保其均匀分布, 且三角瓶中不留多余液, 封好瓶口, 以防蒸发。

(2) 分别在一个盛有试样和对照织物的三角瓶中加入 100ml 缓冲液, 剧烈摇晃 1min 洗涤细菌, 取 1ml 做 10 倍系列稀释, 选适当稀释度以倾注法接种平皿, 作为“0”接触时间样品和对照织物上的细菌数。

(3) 将另一个装有接种试样的三角瓶在 37℃培养箱中培养 20h±2h, 然后加入 100ml 缓冲液, 剧烈摇晃 1min 洗涤细菌, 取 1ml 做 10 倍系列稀释, 选适当稀释度以倾注法接种平皿, 作为实验组。

(4) 阴性对照 试样不接种菌悬液, 在“0”接触时间加入 100ml 缓冲液, 剧烈摇晃 1min 取样, 接种平皿。

(5) 阳性对照 另取 1 个装有对照织物的三角烧瓶, 接种 1ml 菌悬液后, 在 37℃培养箱中培养 20h±2h, 然后加入 100ml 缓冲液, 剧烈摇晃 1min 洗涤细菌, 取 1ml 做 10 倍系列稀释, 选适当稀释度以倾注法接种平皿。

(6) 将阴性和阳性对照样本与实验组样本一并放入 37℃培养箱中, 培养 48h, 计数菌落数。

(7) 试验重复 3 次。

(8) 结果计算

$$\text{抑菌率 (\%)} = \frac{\text{B 或 C 或 (B+C) / 2 - A}}{\text{B 或 C 或 (B+C) / 2}} \times 100$$

A-实验组试样上的细菌数;

B-“0”接触时间试样上的细菌数;

C-“0”接触时间对照织物上的细菌数;

如果“B”和“C”差别较大时, 取较大值; 如果“B”和“C”差别不大时, 取平均值。

2.7.8.5 评判规定

(1) “0”接触时间对照织物的平均菌落数应在 $1 \times 10^3 \text{cfu/ml} \sim 5 \times 10^3 \text{cfu/ml}$ 。

(2) 阴性对照应无菌生长, 阳性对照菌数比 0 接触时间的菌数明显增加。

(3) 各次试验的抑菌率均 $\geq 50\%$, 即可认定该样片具有抗菌作用。

2.7.8.6 注意事项

(1) 对织物进行染菌操作时, 应确保其均匀分布, 且三角瓶中不沾染或存留多余菌液。

(2) 三角瓶内的织物染菌后, 应将瓶口封好, 以防液体蒸发, 造成细菌死亡。

2.7.9 贴膜试验

2.7.9.1 原理

本方法是通过将细菌污染于抗菌制品表面，然后用塑料薄膜覆盖，使细菌与抗菌制品表面充分接触，以测定其抗菌效果。适用于抗菌塑料、抗菌地板、抗菌瓷砖等产品的抗（抑）菌效果测定。

2.7.9.2 实验器材

（1）金黄色葡萄球菌 ATCC 6538、大肠杆菌 8099、白色念珠菌 ATCC 10231 菌悬液（见 2.1.2）。也可根据抑菌剂特定用途选用其他菌悬液。

（2）磷酸盐缓冲液（PBS, 0.03mol/L, pH为7.2）。

（3）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）与沙堡琼脂培养基

（4）薄膜 不影响细菌生长和不吸水的材料，厚度不规定，使用一面应有较好的粘合性，面积为 $40 \pm 2\text{mm}$ 的正方形。

（5）无菌塑料袋

（6）恒温水浴箱

（7）37℃培养箱

（8）样片：将试样及对照试样（与试样同质不含抗菌组分）分别制成边长为 $50\text{mm} \pm 2\text{mm}$ 的正方形，其中抗菌样片 3 个，对照样片 6 个。试验前，以脱脂棉蘸取酒精轻轻擦拭样片 2～3 次，充分干燥。

2.7.9.3 操作程序

（1）倾注琼脂培养基平板。

（2）将菌悬液用 1 / 500 的营养肉汤稀释成 $2.5 \times 10^5\text{cfu/ml} \sim 1.0 \times 10^6\text{cfu/ml}$ 实验用菌悬液。

（3）将样片试验面朝上放于无菌平皿中，取 0.4 ml 菌悬液滴染于样片中央，涂匀。按图表示的方法用薄膜覆盖，小心触压薄膜，使菌液均匀散开，盖上平皿盖。如图 2-3

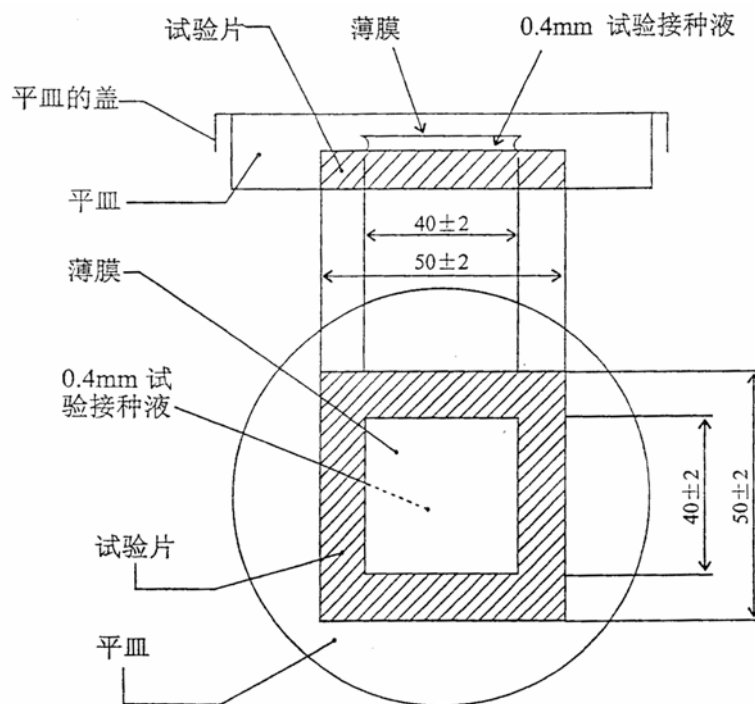


图 2-3 菌液接种到试验片和用薄膜覆盖示意图

(4) 将装有接种过菌液的试验样片的平皿（3 个抗菌样片和 3 个对照样片），置 $(35 \pm 1)^\circ\text{C}$ ，相对湿度不低于 90% 的条件下，培养箱内培养 (24 ± 1) h。

(5) 洗脱 以无菌操作方式用镊子将覆盖膜和试验样片放入塑料袋中，然后加入 10 ml 肉汤培养液，用手充分揉搓袋中的试验样片和覆盖薄膜，将细菌洗下。

(6) 吸取 1 ml 洗下的菌液，至含 9 ml PBS 的试管中，做 10 倍系列稀释，取适当稀释度接种 2 个平皿，以倾注法加入 15~20 ml TSA，置 $(35 \pm 1)^\circ\text{C}$ 培养箱内培养 $(40 \sim 48)$ h。

(7) 将另 3 个对照样片接种后立即用镊子将覆盖膜和试验样片放入塑料袋中，洗脱和接种方法与试验样片相同。

(8) 以试验用同批次稀释液、培养基等分别设阴性对照。

(9) 试验重复 3 次。

2.7.9.4 活菌数的计算

$$N = C \times D \times V$$

N：为活菌数

C：为 2 个平板的平均菌落数

D：为稀释倍数

V：为洗脱用肉汤培养基的液体的 ml 数

2.7.9.5 结果的计算与判定

(1) 试验成立应符合的条件

①各次试验阴性对照均无菌生长

②对照样片接种后直接求出活菌数的对数值符合下列公式

$$(L_{\text{最大值}} - L_{\text{最小值}}) / L_{\text{平均值}} \leq 0.2$$

公式中, $L_{\text{最大值}}$ 最大活菌数的对数值

$L_{\text{最小值}}$ 最小活菌数的对数值

$L_{\text{平均值}}$ 平均活菌数的对数值

③对照样片接种后的活菌数平均值应为 $1.0 \times 10^5 \text{cfu/样片} \sim 4.00 \times 10^5 \text{cfu/样片}$

④覆盖了薄膜的对照样片培养 24h 后的活菌数, 每样片均不少于 $1.0 \times 10^4 \text{cfu}$ 。

(2) 抗菌活性值的计算:

$$R = \log (B/A) - \log (C/A) = \log (B/C)$$

R: 抗菌活性值

A: 对照样片在接种后的活菌数的平均值

B: 对照样片在接种后培养 24h 的活菌数的平均值

C: 抗菌样片在接种后培养 24h 的活菌数的平均值

(3) 结果的判定

各次试验抗菌活性值均 ≥ 2.0 , 可判定该试样具有抗菌作用。

2.7.9.6 注意事项

(1) 用薄膜覆盖, 小心触压薄膜, 以免菌液溢出薄膜外。

(2) 试验时应严格无菌操作, 以防杂菌污染。

3 消毒产品理化检验技术规范

3.1 消毒产品原料或单方制剂的测定方法

3.1.1 常用器材

- (1) 移液管 (1 mL、5 mL、10 mL、25 mL); 移液器 (200 μ L, 1000 μ L)
- (2) 滴定管 (5mL、10 mL、25 mL、50 mL, 酸式与碱式)
- (3) 毛细滴管
- (4) 碘量瓶 (100 mL、250 mL)
- (5) 容量瓶 (50 mL、100 mL、250 mL、1000 mL)
- (6) 锥形瓶 (100 mL、250 mL、500 mL)
- (7) 称量杯 (瓶)
- (8) 吸球
- (9) 分液漏斗 (250 mL)
- (10) 研钵
- (11) 量筒
- (12) 烧杯
- (13) 注射器 (1 mL、5 mL、100 mL); 微量注射器 (10 μ L、25 μ L、100 μ L)
- (14) 垂熔玻璃滤器
- (15) 比色皿
- (16) 酒精比重计
- (17) 大气采样器
- (18) 天平 (感量 0.1 mg)
- (19) 分光光度计
- (20) 酸度计
- (21) 臭氧分析仪
- (22) 气相色谱仪
- (23) 高效液相色谱仪
- (24) 原子荧光分光光度计
- (25) 原子吸收分光光度计

3.1.2 含量测定方法

3.1.2.1 有效氯含量的测定

(1) 原理 在酸性溶液中，含氯消毒剂中的有效氯氧化溶液中的碘化钾产生等摩尔的碘，用硫代硫酸钠标准溶液滴定释放出的碘，根据硫代硫酸钠标准溶液的用量，计算有效氯的含量。

(2) 试剂配制 2 mol/L 硫酸、100 g/L 碘化钾与 5 g/L 淀粉等溶液。配制并标定 0.1 mol/L 硫代硫酸钠滴定液（见 3.1.3.1）。

(3) 样品测定 精密吸取液体含氯消毒剂适量，使其相当于有效氯约 0.6 g，置 100mL 容量瓶中，加蒸馏水至刻度，混匀。对固体含氯消毒剂，精密称取适量使其相当于有效氯约 0.6 g，置烧杯中以蒸馏水溶解，转入 100 mL 容量瓶中。称量杯及烧杯需用蒸馏水洗 3 次，洗液全部转入容量瓶。

向 100 mL 碘量瓶中加 2 mol/L 硫酸 10 mL，100 g/L 碘化钾溶液 10 mL 和混匀的消毒剂稀释液 10.0 mL。此时，溶液出现棕色。盖上盖并振摇混匀后加蒸馏水数滴于碘量瓶盖缘，置暗处 5 min。打开盖，让盖缘蒸馏水流入瓶内。用硫代硫酸钠滴定液（装于 25 mL 滴定管中）滴定游离碘，边滴边摇匀。待溶液呈淡黄色时加入 5 g/L 淀粉溶液 10 滴，溶液立即变蓝色。继续滴定至蓝色消失，记录用去的硫代硫酸钠滴定液总量，必要时将滴定结果用空白试验校正。重复测 2 次，取 2 次平均值进行以下计算。

(4) 计算公式 因 1 mol/L 硫代硫酸钠滴定液 1 mL 相当于 0.03545 g 有效氯，按下式计算有效氯含量：

$$\text{固体样品} \quad \omega (\%) = \frac{c \times V_{st} \times 0.03545}{m} \times 100 \% \quad (1)$$

$$\text{液体样品} \quad \rho (g/L) = \frac{c \times V_{st} \times 0.03545}{V} \times 1000 \quad (2)$$

式中： ω 、 ρ 为有效氯含量，%或 g/L； c 为硫代硫酸钠滴定液浓度，mol/L； V_{st} 为滴定用去硫代硫酸钠滴定液体积（减空白），mL； m 为碘量瓶中所含消毒剂原药质量，g； V 为碘量瓶中含液体消毒剂原液体积，mL。

(5) 注意事项 本方法适合测定各种含氯消毒剂中的有效氯。液体样品及可溶性样品可按产品标示的有效氯含量，吸取或称取适量于 100 mL 容量瓶中用水稀释至刻度，混匀。对于固体样品，将具有代表性的固体样品于研钵中研匀，用减量法称取 1~2 g，置于 100mL 烧杯中，加少量水，将样品调成糊状。将样品全部转移至 100 mL 容量瓶中，稀释到刻度，混匀。固体样

品的取样量一般指常用的漂粉精（有效氯含量 60 % ~70 %）和漂白粉（有效氯含量 25 % ~30 %）的取样量，其它含氯消毒剂的取样量可据此计算。

3.1.2.2 有效碘含量的测定

（1）原理 在弱酸性溶液中，含碘消毒剂中的游离碘定量的与硫代硫酸钠发生反应，根据硫代硫酸钠标准溶液的用量，计算有效碘的含量。

（2）试剂配制 5 g/L 淀粉溶液。冰醋酸（36 %）。配制并标定 0.1 mol/L 硫代硫酸钠滴定液（见 3.1.3.1）。

（3）样品测定 精密取含碘消毒剂适量，使其相当于有效碘约 0.25 g，置 100 mL 容量瓶中并加入醋酸 5 滴。用 0.1 mol/L 硫代硫酸钠滴定液滴定，边滴边摇匀。待溶液呈淡黄色时加入 5 g/L 淀粉溶液 10 滴（溶液立即变蓝色），继续滴定至蓝色消失，记录用去的硫代硫酸钠滴定液总量，必要时将滴定结果用空白试验校正。重复测 2 次，取 2 次平均值进行以下计算。

（4）计算公式 因 1 mol/L 硫代硫酸钠滴定液 1 mL 相当于 0.1269 g 有效碘，按下式计算有效碘含量：

固体样品

$$\omega (\%) = \frac{c \times V_{st} \times 0.1269}{m} \times 100\% \quad (1)$$

液体样品

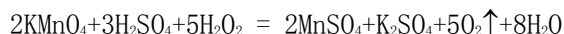
$$\rho (g/L) = \frac{c \times V_{st} \times 0.1269}{V} \times 1000 \quad (2)$$

式中： ω 、 ρ 为有效碘含量，%或 g/L； c 为硫代硫酸钠滴定液浓度，mol/L； V_{st} 为滴定用去硫代硫酸钠滴定液体积（减空白），mL； m 为碘量瓶中所含消毒剂原药的质量，g； V 为碘量瓶中含液体消毒剂原液体积，mL。

（5）注意事项 本方法适用于测定含碘消毒剂中的有效碘。当消毒剂的酸性很强或含醇量较高时，不宜使用淀粉指示剂。此时，可直接观察碘的黄色消失以判断终点（如测定碘酊、碘甘油等碘制剂时，直接用硫代硫酸钠滴定至溶液无色即可认为到达终点）。

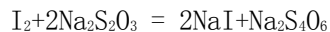
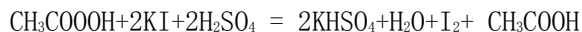
3.1.2.3 过氧乙酸（C₂H₄O₃）含量的测定

（1）原理 由于反应不完全或放置期间的分解，过氧乙酸溶液中含有部分过氧化氢。在酸性条件下，高锰酸钾不与过氧乙酸作用，仅与过氧化氢起氧化还原反应，使其分解掉，反应式为：



故在加入碘化钾前，先滴加高锰酸钾溶液至微粉色，以消除过氧化氢的干扰。上述氧化还原反应进行较慢，可用硫酸锰为催化剂，以加速反应的进行。碘化钾与过氧乙酸反应产生

等摩尔碘，用硫代硫酸钠标准溶液滴定释放出的碘，根据硫代硫酸钠的用量，计算过氧化物的含量。反应式为：



(2) 试剂配制 2 mol/L 硫酸、100 g/L 碘化钾、0.01 mol/L 高锰酸钾、100 g/L 硫酸锰、30 g/L 钼酸铵与 5 g/L 淀粉。配制并标定 0.05 mol/L 硫代硫酸钠滴定液（见 3.1.3.1）。

(3) 样品测定 精密吸取样品适量，使其相当于过氧乙酸约 0.7 g，于 100 mL 容量瓶用蒸馏水稀释至刻度，混匀。向 100 mL 碘量瓶中加入 2 mol/L 硫酸 5 mL，100 g/L 硫酸锰 3 滴，精密加入混匀的过氧乙酸稀释液 5.0 mL，摇匀并用 0.01 mol/L 高锰酸钾溶液滴定至溶液呈粉红色。随即加 100 g/L 碘化钾溶液 10 mL 与 30 g/L 钼酸铵 3 滴，摇匀并用 0.05 mol/L 硫代硫酸钠滴定液（装于 25 mL 滴定管中）滴定至淡黄色。加入 5 g/L 淀粉溶液 3 滴（溶液立即变蓝色），继续用硫代硫酸钠滴定至蓝色消失，记录硫代硫酸钠滴定液的总用量。重复测 2 次，取 2 次平均值进行以下计算。

(4) 计算公式 因 1 mol/L 硫代硫酸钠 1 mL 相当于 0.03803 g 过氧乙酸，按下式计算过氧乙酸含量：

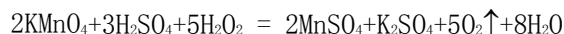
$$\rho (\text{g/L}) = \frac{c \times V_{st} \times 0.03803}{V} \times 1000$$

式中： ρ 为过氧乙酸含量，g/L； c 为硫代硫酸钠滴定液的浓度，mol/L； V_{st} 为滴定中用去的硫代硫酸钠滴定液的体积，mL； V 为碘量瓶中所含过氧乙酸样液体积，mL。

(5) 注意事项 本方法适用于测定过氧化物类消毒剂中的过氧乙酸有效成分。方法表明需滴加高锰酸钾溶液至微粉色，以消除过氧化氢的干扰。实验时可根据实际浓度，先用高浓度的高锰酸钾溶液滴定，再用低浓度高锰酸钾滴定，否则消耗高锰酸钾溶液的量过多。实验中，加碘化钾和钼酸铵后放置 8 分钟后，实验平行结果较好。过氧乙酸性质不稳定，易分解，高温保存时间短，应贮存在阴凉通风处。贮存容器应以聚乙烯桶或瓶为宜。过氧乙酸切勿与其他药品、有机物质随意混合，以免剧烈分解甚至爆炸。

3.1.2.4 过氧化氢（H₂O₂）含量的测定

(1) 原理 在酸性溶液中，高锰酸钾可氧化消毒剂中的过氧化氢，根据高锰酸钾标准溶液的用量，计算过氧化氢的含量。其反应式为：



(2) 试剂配制 2 mol/L 硫酸与 100 g/L 硫酸锰等溶液。另外配制并标定 0.02 mol/L 高

锰酸钾滴定液（见 3.1.3.3）。

（3）样品测定 精密吸取样品适量，使其相当于过氧化氢约 0.3 g，于 100 mL 容量瓶
中用蒸馏水稀释至刻度，混匀。取过氧化氢稀释液 10.0 mL，置 100 mL 碘量瓶中，加入 2 mol/L 硫
酸 20 mL 与 100 g/L 硫酸锰 3 滴，摇匀。用 0.02 mol/L 高锰酸钾滴定液（装于 25 mL 滴定管
中）滴定至溶液呈粉红色，记录高锰酸钾滴定液用量。重复测 2 次，取 2 次平均值进行以下计算。

（4）计算公式 因 1 mol/L 高锰酸钾滴定液 1 mL 相当于 0.08505 g 过氧化氢，故可按
下式计算过氧化氢含量：

$$\rho(\text{g/L}) = \frac{c \times V_{st} \times 0.08505}{V} \times 1000$$

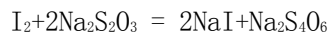
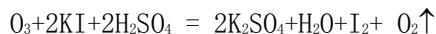
式中： ρ 为过氧化氢含量，g/L； c 为高锰酸钾滴定液的浓度，mol/L； V_{st} 为高锰酸钾滴定
液体积，mL； V 为碘量瓶中所含过氧化氢样液体积，mL。

（5）注意事项 本方法适用于测定过氧化物类消毒剂中的过氧化氢有效成分。

3.1.2.5 臭氧（O₃）含量的测定

第一法 碘量法

（1）原理 在酸性溶液中，臭氧与碘化钾反应，产生等摩尔的碘，用硫代硫酸钠标准溶液滴
定释放出的碘，根据硫代硫酸钠标准溶液的用量，计算样品中臭氧的含量。反应式为：



（2）试剂配制 3 mol/L 硫酸、200 g/L 碘化钾与 5 g/L 淀粉等溶液。配制并标定 0.05 mol/L
硫代硫酸钠滴定液（见 3.2.1.3.1）。

（3）采样 检测臭氧水（臭氧水溶液）浓度时，精密吸取样本 100.0 mL~300.0 mL（浓
度较低，但不低于 10 mg/L 时，取 400.0 mL）置于 500 mL 带塞锥形瓶中，加 200 g/L 碘化钾溶
液 20 mL，混匀。再加 3 mol/L 硫酸 5 mL，瓶口加塞，静置 5 min。取样涉及到水流量时，水流
量应按企业使用说明书设定。

检测臭氧气体浓度时，将采集的样品吸收液（蒸馏水 350 mL 与 200 g/L 碘化钾溶液 20 mL）
装于 500 mL 带塞锥形瓶中，从臭氧发生器排气管处采臭氧气体 5 L 以上，加 3 mol/L 硫酸 5 mL，
瓶口加塞，静置 5 min。

（4）样品测定 上述两种样品均用 0.05 mol/L 硫代硫酸钠滴定液滴定至溶液呈淡黄色时
加 5 g/L 淀粉溶液数滴，继续滴定至无色。记录用去硫代硫酸钠滴定液总量，并将滴定结果用空
白试验校正。重复测定 2 次。

(5) 计算公式 取 2 次测试平均值计算臭氧浓度。因 1 mol/L 硫代硫酸钠滴定液 1 mL 相当于 24.00 mg 臭氧，故臭氧含量可按式计算

$$\rho \text{ (mg/L)} = \frac{c \times V_{st} \times 24.00}{V}$$

式中： ρ 为臭氧含量，mg/L； c 为硫代硫酸钠滴定液的浓度，mol/L； V_{st} 为硫代硫酸钠滴定液消耗体积（减空白），mL； V 为臭氧水升数或其气体采样体积，L。

(6) 注意事项 本方法适用于测定过氧化物类消毒剂中的臭氧有效成分或臭氧发生器产生的臭氧气体的含量。

第二法 紫外光度法

(1) 原理 当空气样品以恒定的流速进入仪器的气路系统，样品空气交替地或直接进入吸收池或经过臭氧涤去器再进入吸收池，臭氧对 254 nm 波长的紫外光有特征吸收。零空气样品，通过吸收池时被光检测器检测的光强度为 I_0 ；臭氧样品通过吸收池时被光检测器检测的光强度为 I ， I/I_0 为透光率。每经过一个循环周期，仪器的微处理系统根据郎伯一比耳定律求出臭氧的浓度。关系式如下：

$$I/I_0 = e^{-ac1}$$

式中： a 为吸光系数； c 为臭氧浓度； 1 为吸收池厚度。

(2) 仪器设备与实验材料 紫外臭氧分析仪；采样管线（采用玻璃、聚四氟乙烯等不与臭氧起化学反应的惰性材料）；颗粒物滤膜（孔径为 5 μm 滤膜及其支撑物应由聚四氟乙烯等不与臭氧起化学反应的惰性材料制成。新滤膜需要在工作环境中适应 5~15 min 后再使用。应能去除可改变分析器性能、影响臭氧测定的所有颗粒物）；零空气（来源不同的零空气可能含有不同的残余物质。因此，在测定 I_0 时，向光度计提供零气的气源与发生臭氧所用的气源相同）。

(3) 样品测定

按臭氧分析仪使用说明校准仪器。接通电源，打开仪器电源开关，仪器至少预热一小时。待仪器稳定后，连接气体采样管线进行现场测定。

(4) 计算公式 按以下公式计算臭氧浓度

$$C = 2.141 \times A$$

式中： C —— 样品气体中臭氧浓度， mg/m^3 ；

A —— 仪器显示的臭氧读数，ppm；

2.141 —— 臭氧换算成标准状态下（20 $^{\circ}\text{C}$ ，101.3 kPa）的 mg/m^3 换算系数。

(5) 注意事项 本方法适用于臭氧及臭氧残留量的测定。根据比尔吸收定律原理早期紫外光度法只适用于 O_3 低浓度测定,但随着仪器技术的进步,适用范围增大。本方法不受常见气体的干扰,但少数有机物如苯及苯胺等,在 254 nm 处吸收紫外光,对测定产生正干扰。紫外臭氧测定方法干扰物质(1ppm 计)的响应(以%浓度计)分别为:苯乙烯=20;反式-甲基苯=乙烯>100;苯甲醛 =5;0-甲氧甲酚=12;硝基甲酚=100。下列物质在浓度低于 1ppm 时不产生反应:甲苯、过氧硝酸乙酰酯、丁二酮一(2,3)、过氧硝酸苯酰酯、硝酸钾酯、硝酸正丙酯、硝酸正丁酯。当被测空气中颗粒物浓度超过 $100\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ 时也对臭氧的测定产生影响。为此,当空气中存在有机物和颗粒物浓度较大时,应去除后再进行测定。

3.1.2.6 二氧化氯 (ClO_2) 含量的测定(用国标替换)

第一法 五步碘量法

(1) 制备无氯二次蒸馏水(蒸馏水中加入亚硫酸钠,将余氯还原为氯离子,并以 DPD 检查不显色,再进行蒸馏,即得)。配制并标定 0.1 mol/L 硫代硫酸钠滴定液(见 3.2.1.3.1)。配制并标定 0.01 mol/L 硫代硫酸钠滴定液(临用时现配)。配制 5 g/L 淀粉溶液,2.5 mol/L 盐酸溶液,100 g/L 碘化钾溶液(称取 10 g 碘化钾溶于 100 mL 蒸馏水中,储于棕色瓶中,避光保存于冰箱中,若溶液变黄需重新配制),饱和磷酸氢二钠溶液, pH = 7 磷酸盐缓冲溶液(溶解 25.4 g 无水 KH_2PO_4 和 86.0 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 于 800 mL 蒸馏水中,用水稀释成 1000 mL),50 g/L 溴化钾溶液(溶解 5 g 溴化钾于 100 mL 水中,储于棕色瓶中,每周重配一次)。

(2) 在 500 mL 的碘量瓶中加 200 mL 蒸馏水,吸取 1.0 mL~10.0 mL 二氧化氯溶液或稀释液于碘量瓶中,加 1 mL 磷酸盐缓冲液,再加入 10 mL 碘化钾溶液,混匀。用 0.01 mol/L 硫代硫酸钠滴定液滴定至淡黄色时,加 1 mL 淀粉溶液,继续滴至蓝色刚好消失为止,记录读数为 A。

(3) 在上述滴定出 A 值的溶液中再加入 2.5 mol/L 盐酸溶液 2.5 mL,并放置暗处 5 min。用 0.01 mol/L 硫代硫酸钠滴定液滴定至蓝色消失,记录读数为 B。

(4) 在 500 mL 碘量瓶中加 200 mL 蒸馏水、1 mL 磷酸盐缓冲液,吸取 1.0 mL~10.0 mL 二氧化氯溶液或稀释液加于碘量瓶中,然后通入高纯氮气吹至黄绿色消失,再加入 10 mL 碘化钾溶液,用硫代硫酸钠滴定液滴定至淡黄色时,加 1 mL 淀粉溶液,继续滴至蓝色刚好消失为止,记录读数为 C。

(5) 在上述滴定出 C 值的溶液中再加入 2.5 mol/L 盐酸溶液 2.5 mL,并放置暗处 5 min。用 0.01 mol/L 硫代硫酸钠滴定液滴定至蓝色消失,记录读数为 D。

(6) 在 50 mL 碘量瓶中加入 1 mL 溴化钾溶液和 10 mL 浓盐酸,混匀并再加 1.0 mL~10.0 mL 二氧化氯溶液,立即塞住瓶塞并混匀。置于暗处反应 20 min,然后加入 10 mL 碘化钾溶液,剧

烈震荡 5 s，立即转移至装有 25 mL 饱和磷酸氢二钠溶液的 500 mL 碘量瓶中，清洗 50 mL 碘量瓶并将洗液转移至 500 mL 碘量瓶中，使溶液最后体积在 200 mL~300 mL。用 0.01 mol/L 硫代硫酸钠滴定液滴定至淡黄色时，加 1 mL 淀粉溶液，继续滴至蓝色刚好消失为止。同时用蒸馏水作空白对照。得读数为 $E = \text{样品读数} - \text{空白读数}$ 。

重复测 2 次，取 2 次平均值进行以下计算。

(7) 计算

$$\text{ClO}_2 \text{ (mg/L)} = (B-D) \times c \times 16863 \div V$$

$$\text{ClO}_2^- \text{ (mg/L)} = D \times c \times 16863 \div V$$

$$\text{ClO}_3^- \text{ (mg/L)} = [E - (A+B)] \times c \times 13908 \div V$$

$$\text{Cl}_2 \text{ (mg/L)} = [A - (B-D) \div 4] \times c \times 35450 \div V$$

式中：A、B、C、D、E 为上述各步中硫代硫酸钠滴定液用量，mL；V 为二氧化氯溶液的样品体积，mL；c 为硫代硫酸钠滴定液的浓度，mol/L。

(8) 方法检出限为 0.1 mg/L，平均回收率 98.0 %，相对标准偏差 < 10 %。

(9) 注意事项 活化温度，活化时间及通氮气时间对测定结果有一定影响。做稳定性实验时，样品从恒温箱中取出后，应放置室温后再进行活化，活化过程应严格控制温度。其次，实验应严格按照样品活化时间进行活化，活化后应立即进行稀释（稀释液中二氧化氯浓度在 100 mg/L 内）。第三，实验表明，步骤（4）中通入高纯氮气的时间超过 5 分钟，溶液黄绿色完全消失，测定结果较好。

第二法 分光光度法

(1) 二氧化氯标准贮备溶液制备：

在 A 瓶中放入 300 mL 水，将 A 瓶一端玻璃管与空气压缩机相接，另一玻璃管与 B 瓶相连。B 瓶为高强度硼硅玻璃瓶，瓶口有三根玻璃管；第一根插至离玻璃瓶底 5 mm 处，用以引进空气；第二根上接滴液漏斗，漏斗下端伸至液面下；第三根下端离开液面，上端与 C 瓶相接。溶解 10 g 亚氯酸钠于 750 mL 水中并倒入 B 瓶中；在分液漏斗中装有 10 % 硫酸溶液 20 mL。C 瓶装有亚氯酸钠饱和溶液。D 瓶为 2 L 硼硅玻璃收集瓶，瓶中装有 1500 mL 水，用以吸收所发生的二氧化氯，余气由排气管排出。整套装置应放在通风橱内（见图 2-5）。

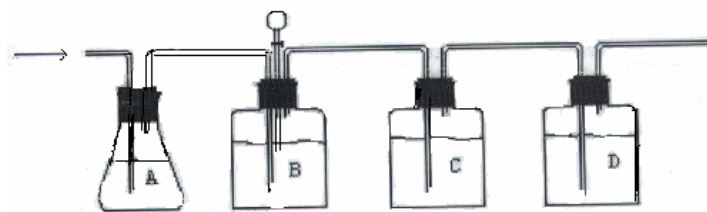


图 2-5 ClO₂ 发生吸收装置图

启动空气压缩机，使空气均恒通过整个装置。每隔 5 min 由分液漏斗加入 5 mL 硫酸溶液，加完最后一次硫酸溶液后，空气流量持续 30 min。所获得的黄色二氧化氯标准溶液放于棕色瓶中，4 ℃保存，其浓度应为 250 mg/L~600 mg/L。

(2) 二氧化氯标准溶液的制备：

临用前吸取一定量二氧化氯标准贮备液（按第一法准确标定），用二次蒸馏水稀释至浓度为 250 mg/L。

(3) 标准曲线的绘制

分别取 0.0、4.00、10.0、20.0、40.0、60.0、80.0、100.0 mL 二氧化氯标准溶液于 100 mL 容量瓶中，加二次蒸馏水至刻度，配成浓度为 0、10、25、50、100、150、200、250 mg/L 的二氧化氯溶液，以蒸馏水为空白于 360~430 nm 处测定吸光度值，以二氧化氯的质量（mg）对吸光度值进行线性回归，并绘制标准曲线。

(4) 样品测定

直接取消毒剂溶液或其稀释液以蒸馏水为空白于 360~430 nm 测定其吸光度值，根据标准曲线方程计算其中所含二氧化氯的浓度（mg/L）。

(5) 计算：

$$X \text{ (mg/L)} = \frac{\rho \times V_1}{V_2}$$

式中：X 为二氧化氯含量，mg/L；ρ 为标准曲线方程计算二氧化氯的浓度，mg/L；V₁ 为消毒剂稀释后体积，mL；V₂ 为消毒剂稀释前体积，mL。

方法检出限 10 mg/L, 标准曲线线性范围 10~250 mg/L, 方法平均回收率 103.3%, 相对标准偏差 <10 %。

3.1.2.7 有效溴含量的测定

(1) 原理 在酸性溶液中，含溴消毒剂中的有效溴氧化溶液中的碘化钾产生等摩尔的碘，用

硫代硫酸钠标准溶液滴定释放出的碘，根据硫代硫酸钠标准溶液的用量，计算有效溴的含量。

(2) 试剂配制 碘化钾，硫酸溶液 (1+8)，5 g/L 淀粉指示剂。配制并标定 0.1 mol/L 硫代硫酸钠滴定液 (见 3.1.3.1)。

(3) 样品测定 称取样品 0.15 g (精确至 0.0002 g)，置于先加有 125 mL 水、2 g 碘化钾的 250 mL 碘量瓶中，在电磁搅拌器上充分搅拌，使样品完全溶解，加硫酸溶液 (1+8) 20 mL。盖上盖并振摇混匀后加蒸馏水数滴于碘量瓶盖缘，置暗处 5 min。打开盖，让盖缘蒸馏水流入瓶内。用硫代硫酸钠标准液滴定游离碘，边滴边摇匀。待溶液呈淡黄色时加入 5 g/L 淀粉溶液 10 滴，溶液立即变蓝色。继续滴定至蓝色消失，记录用去的硫代硫酸钠滴定液总量，必要时将滴定结果用空白试验校正。重复测 2 次，取 2 次平均值进行以下计算。

(4) 计算公式 因 1 mol/L 硫代硫酸钠滴定液 1 mL 相当于 0.07991 g 有效溴，按下式计算有效溴含量：

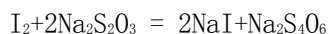
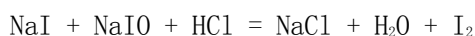
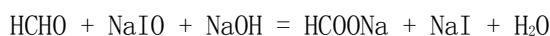
$$\omega (\%) = \frac{c \times V_{st} \times 0.07991}{m} \times 100\%$$

式中： ω 为有效溴含量，%； c 为硫代硫酸钠标准溶液浓度，mol/L； V_{st} 为滴定用去硫代硫酸钠滴定液体积 (减空白)，mL； m 为称取样品的质量，g；。

(5) 注意事项 本方法适用于测定单一含溴消毒剂中的有效溴。

3.1.2.7 甲醛 (CH₂O) 含量的测定

(1) 原理 在碱性溶液中，甲醛被碘氧化为相应的酸，而后调节溶液的酸碱度至弱酸性，用硫代硫酸钠标准溶液滴定剩余碘，根据加入的碘和消耗的硫代硫酸钠的量，计算甲醛含量。有关反应式为：



(2) 试剂配制 50 g/L 氢氧化钠溶液、稀盐酸溶液 (1+2) 与 5 g/L 淀粉溶液。配制并标定 0.05 mol/L 硫代硫酸钠滴定液 (见 3.1.3.1) 与 0.05 mol/L 碘滴定液 (见 3.1.3.2)。

(3) 样品测定 精密吸取样品适量，使其相当于甲醛约 0.30 g，置于 100 mL 容量瓶中，用蒸馏水稀释至刻度，混匀。向碘量瓶中加 50 g/L 氢氧化钠溶液 10 mL 和混匀的甲醛稀释液 5.0 mL，再自 50 mL 滴定管缓慢加入 0.05 mol/L 碘滴定液约 40 mL，边加边摇匀，至溶液呈鲜黄色，精确记下用去的碘滴定液毫升数。将碘量瓶盖上盖子并加蒸馏水于盖缘。放置 20 min 后再

加入 25 mL 稀盐酸，并用 0.05 mol/L 硫代硫酸钠滴定液（装入 25 mL 滴定管中）滴定至溶液呈淡黄色。加入 5 g/L 淀粉溶液 10 滴（溶液立即变蓝色），继续用硫代硫酸钠滴定液滴定至蓝色消失。记录硫代硫酸钠滴定液总用量。重复测 2 次，取 2 次的平均值进行以下计算。

（4） 计算公式 因 1 mol/L 碘滴定液 1 mL 相当于 0.01501 g 甲醛，故可按下式计算甲醛含量：

$$V_{IS} = \frac{c_{st} \times V_{st}}{c_I} \quad V_{IF} = V_I - V_{IS}$$

$$\rho (g/L) = \frac{c_I \times V_{IF} \times 0.01501}{V} \times 1000$$

式中：ρ 为甲醛含量，g/L； V_{IS} 为与硫代硫酸钠反应的碘滴定液体积，mL； c_{st} 为硫代硫酸钠滴定液的浓度，mol/L； V_{st} 为硫代硫酸钠滴定液的体积，mL； c_I 为碘滴定液浓度，mol/L； V_I 为碘滴定液滴定中用去的体积，mL； V_{IF} 为与甲醛反应消耗的碘滴定液，mL； V 为碘量瓶中所含甲醛样液体积，mL。

（5） 注意事项 本方法适用于测定单一甲醛消毒剂中的甲醛含量。

3.1.2.9 戊二醛（C₅H₈O₂）含量的测定

（1） 原理 戊二醛与三乙醇胺溶液反应，以盐酸羟胺中性溶液作指示剂，用硫酸标准溶液滴定剩余三乙醇胺溶液，根据硫酸标准溶液的用量计算戊二醛的含量。

（2） 试剂配制 65 g/L 三乙醇胺溶液、0.4 g/L 溴酚蓝乙醇溶液与盐酸羟胺中性溶液（17.5 g 盐酸羟胺加蒸馏水 75 mL 溶解，并加异丙醇稀释至 500 mL，摇匀。加 0.4 g/L 溴酚蓝乙醇溶液 15 mL，用 65 g/L 三乙醇胺溶液滴定至溶液显蓝绿色）。配制并标定 0.25 mol/L 硫酸滴定液（见 3.1.3.4）。

（3） 样品测定 精密吸取样品适量，使其相当于戊二醛约 0.2 g，置 250 mL 碘量瓶中，精确加 65 g/L 三乙醇胺溶液 20.0 mL 与盐酸羟胺中性溶液 25 mL，摇匀。静置反应 1 h 后，用 0.25 mol/L 硫酸滴定液（装于 25 mL 滴定管中）滴定。待溶液显蓝绿色，记录硫酸滴定液用量。同时，以不含戊二醛的三乙醇胺、盐酸羟胺中性溶液重复上述操作（空白对照）。重复测 2 次，取 2 次的平均值进行以下计算。

（4） 计算公式 因 1 mol/L 硫酸滴定液 1 mL 相当于 0.1001 g 戊二醛，按下式计算戊二醛含量：

$$\rho (g/L) = \frac{c \times (V_2 - V_1) \times 0.1001}{V} \times 1000$$

式中： ρ 为戊二醛含量，g/L； c 为硫酸滴定液浓度，mol/L； V_1 与 V_2 分别为样品与空白对照滴定中用去的硫酸滴定液体积，mL； V 为戊二醛样品体积，mL。]

(5) 注意事项 本方法适用于测定醛类消毒剂中戊二醛有效成分的含量。方法的关键是配制盐酸羟胺中性溶液时，应看准蓝绿色。对于高浓度的戊二醛，应预先稀释至质量浓度为 2 % 左右稀溶液后再进行测定。

3.1.2.10 环氧乙烷 (C₂H₄O) 含量的测定

第一法 容量分析法

(1) 原理 环氧乙烷用盐酸处理时，导致环的破裂，同时消耗等摩尔的盐酸。先用一定量的盐酸和环氧乙烷作用，然后再用氢氧化钠标准溶液滴定过量的盐酸。根据盐酸和氢氧化钠标准溶液的用量，计算环氧乙烷的含量。

(2) 试剂配制 5 g/L 甲基橙溶液及盐酸-氯化镁溶液(在 0.2 mol/L 盐酸中加入 MgCl₂ · 6H₂O 120 g，溶解并稀释至 100 mL)。配制并标定 0.1 mol/L 氢氧化钠滴定液 (见 3.1.3.5)。

(3) 样品测定 取 20 mL 盐酸-氯化镁溶液放入 40 mL 容量瓶中，盖上瓶盖，称重。于冰瓶中取出装有环氧乙烷样品的容器，取样品适量，使其相当于环氧乙烷约 40 mg~50 mg，尽快置于称量瓶中，重新盖上瓶盖，混匀，称重。两次重量差即为环氧乙烷样品重量。然后，加 5 g/L 甲基橙溶液 1 滴作为指示剂，用 0.1 mol/L 氢氧化钠滴定液 (装入 25 mL 滴定管中) 滴定。当红色溶液变成黄色时，记录氢氧化钠滴定液用量。同时以蒸馏水代替环氧乙烷重复上述操作 (空白对照)。重复测 2 次，取 2 次的平均值进行以下计算。

(4) 计算公式 因 1 mol/L 氢氧化钠滴定液 1 mL 相当于 0.04405 g 环氧乙烷，故可用下式计算其含量：

$$\omega (\%) = \frac{c \times (V_2 - V_1) \times 0.04405}{m} \times 100\%$$

式中： ω 为环氧乙烷含量，%； c 为氢氧化钠滴定液浓度，mol/L； V_1 与 V_2 分别为样品与空白对照滴定中用去的氢氧化钠滴定液体积，mL； m 为环氧乙烷样品的质量，g。

第二法 气相色谱法

(1) 原理 采用色谱柱分离, 氢火焰离子化检测器检测, 根据保留时间定性, 峰高或峰面积定量。

(2) 色谱参考条件与系统适用性试验 色谱柱: 2 m×4 mm 不锈钢柱; 固定相: 角鲨烷-吐温 80-101 白色硅烷化担体 (10:0.5:100); 柱温 60 °C; 气化室温度: 150 °C; 检测室温度 150 °C; 载气 (N₂) 流速 50 mL /min。理论塔板数按环氧乙烷峰计算, 应不低于 500, 环氧乙烷峰与其他杂质峰的分离度应大于 1.5。

(3) 标准曲线的绘制 用 5 mL 注射器取一定量的环氧乙烷纯气 (在标准状况下 1 mL 环氧乙烷气体重 1.965 mg), 注入 100 mL 注射器中, 用清洁空气稀释至 100 mL, 计算环氧乙烷浓度, 然后再用 100 mL 注射器适当稀释配成环氧乙烷浓度为 0.0025、0.005、0.01、0.05 mg/L 及 0.1 mg/L 的标准气体。分别进样 0.1 mL, 测量其峰高, 以环氧乙烷峰高对其质量 (μg) 进行线性回归, 计算线性回归方程。

(4) 样品测定 用大气采样器在现场采集一定量的空气, 取 0.1 mL 空气样品 (记录温度及气压) 直接进样, 测其峰高, 根据线性回归方程计算样品中环氧乙烷含量。

(5) 计算公式 按下式将换算成体积, 并计算环氧乙烷的含量。

$$V_0 = V \times \frac{273}{273+t} \times \frac{p}{101.3}$$

$$X \text{ (mg / m}^3\text{)} = \frac{m \times 1000}{V_0}$$

式中: X 为样品中环氧乙烷的含量, mg/m³; V 为进样体积, mL; p 为测定样品时的气压, kPa; t 为测定样品时的温度, °C; m 为样品中环氧乙烷的质量, μg; V_0 为换算为标准状况下的样品体积, mL。

3.1.2.11 乙醇 (C₂H₆O) 含量的测定

第一法 气相色谱法 (同样适用于异丙醇含量的测定):

(1) 原理 以聚乙二醇类色谱柱分离, 氢火焰离子化检测器检测, 根据保留时间定性, 峰高或峰面积定量。

(2) 色谱参考条件 色谱柱: 2.0 m×4 mm 玻璃柱; 固定相: GDX—102 (60–80 目); 柱温 180 °C; 进样口温度和检测器温度 230 °C; 载气 (N₂) 流速 45 mL/min; 氢气流速 45 mL /min; 空气流速 450 mL /min。

(3) 标准曲线的绘制 配制乙醇质量浓度分别为 0、100、300、500、1000 及 2000mg/L 的

乙醇标准系列，取 1 μL 标液进入气相色谱仪测其峰高，以乙醇峰高对其含量绘制标准曲线。

(4) 样品测定 直接取 1 μL 样品溶液或稀释液进入气相色谱仪测其峰高，与标准系列比较而定量。

(5) 计算公式

$$X = A \times \frac{V_1}{V_2}$$

式中：X 为样品中乙醇质量浓度，mg/L；A 为样品测定溶液中乙醇质量浓度，mg/L； V_1 为样品稀释后定容的体积，mL； V_2 为取样品原液的体积，mL。

本方法检出限 0.1 %，方法线性范围 0.0 %~2.0 %，加标回收率 99.5 %，相对标准偏差 < 10 %。

(6) 注意事项 用气相色谱法能完全分离甲醇、乙醇、异丙醇、正丁醇和异戊醇，因此这类脂肪醇不干扰测定。本方法适合测定基体较复杂时，消毒剂样品中的乙醇有效成分。本法也能用于其他醇类消毒剂，根据有效成分的不同，可适当调节色谱条件尤其是温度。

第二法 比重法：

(1) 原理 根据阿基米德定理，当酒精计在酒精溶液中平衡时，它所排开酒精溶液质量等于酒精计本身质量，根据酒精计的质量和排开酒精溶液的体积，可得出溶液的相对密度，再换算成体积分数。

(2) 样品测定 于约 20 °C 在量筒中加入适量乙醇样品溶液，其量以使酒精比重计放入后能充分浮起为准。将比重计下按后，缓慢松手，当其上浮静止且溶液无气泡时，读取液面处比重计刻度即为其百分含量。

(3) 注意事项 本方法操作简单，无需特殊仪器，适用于仅含乙醇和水的溶液。由于不能排除其他醇类的干扰，当存在甲醇、异丙醇、正丁醇、异戊醇等的干扰时，应以气相色谱法为准。

3.1.2.12 醋酸氯己定（醋酸洗必泰， $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10} \cdot 2C_2H_4O_2$ ）含量的测定

第一法 高效液相色谱法

(1) 原理 醋酸氯己定在 254 nm 处有紫外吸收，可用反相高效液相色谱（HPLC）分离，并根据保留时间定性，峰面积定量。

(2) 试剂配制 乙腈（色谱纯）；0.02 mol/L 磷酸二氢钾溶液：称取磷酸二氢钾 2.7 g 加蒸馏水溶解并定容至 1000 mL，用磷酸调节 pH 值至 2.5；醋酸氯己定标准溶液：称取醋酸氯己定标准品 0.1 g，用少量蒸馏水溶解后并定容至 100 mL，此溶液每 1 L 含醋酸氯己定 1 g。

(3) 色谱参考条件 色谱柱: C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm I.D., 5 μm); 流动相: 0.02 mol/L 磷酸二氢钾溶液和乙腈以 65:35 的体积比相混合, 分析前, 经 0.45 μm 滤膜过滤及真空脱气; 流量: 1.0 mL/min; 紫外检测波长: 254 nm; 柱温: 25 °C。在该色谱条件下, 醋酸氯己定的 t_R 约 3.1 min。

(4) 标准曲线的绘制 用醋酸氯己定标准溶液配制质量浓度分别为 0、0.05、0.2、0.4 和 0.5 g/L 的标准系列。在设定色谱条件下, 分别取 5 μL 进行分析。以标准系列质量浓度为横坐标 C, 峰面积为纵坐标 Y, 进行线性回归处理, 得到线性方程。

(5) 样品测定 若消毒剂中醋酸氯己定的标示浓度过高, 需适当稀释, 使其稀释后浓度在标准曲线线性范围内。对于固体或膏体样品应先用蒸馏水配制成水溶液。经 0.45 μm 滤膜过滤备用。在设定的色谱条件下, 进 5 μL 样品溶液进行分析。根据峰面积, 从线性方程计算出相应的醋酸氯己定浓度。根据取样量和稀释倍数, 换算出样品中醋酸氯己定的最终浓度。

(6) 注意事项 本方法适用于测定各种类型的双胍化合物中醋酸氯己定有效成分, 同样适用于测定葡萄糖酸氯己定, 但需要校正系数或采用同类标准溶液。如果遇到某些有干扰的复方消毒剂, 可适当调整流动相或在流动相中加入适量甲醇以达到最佳分离效果。

第二法 容量分析法

(1) 原理 在酸性溶液中, 醋酸氯己定与高氯酸标准溶液发生反应, 根据反应中所消耗的高氯酸量, 可计算醋酸氯己定的含量。

(2) 试剂配制 甲基橙的饱和丙酮溶液 (0.1 g 甲基橙加约 50 mL 丙酮, 振摇使其溶解为饱和溶液)。备丙酮和冰醋酸。配制并标定 0.1 mol/L 高氯酸滴定液 (见 3.1.3.6)。

(3) 样品测定 精密称取样品适量, 使其相当于醋酸氯己定约 0.15 g, 置于 100 mL 锥形瓶中, 加丙酮 30 mL 与冰醋酸 2 mL, 振摇使溶解后, 加甲基橙的饱和丙酮溶液 1.0 mL, 用高氯酸滴定液 (装入 25 mL 滴定管中) 滴定。待溶液显橙色, 记录高氯酸滴定液用量。同时以不含醋酸氯己定的丙酮与冰醋酸溶液重复上述操作 (空白对照)。重复测 2 次, 取其平均值进行以下计算。

(4) 计算公式 因 1 mL 的 1 mol/L 高氯酸滴定液相当于 0.3128 g 醋酸氯己定, 故可按下式计算醋酸氯己定含量:

$$\omega (\%) = \frac{c \times (V_1 - V_2) \times 0.3128}{m} \times 100\%$$

式中: ω 为醋酸氯己定含量, %; c 为高氯酸滴定液浓度, mol/L; V_1 与 V_2 分别为样品与空

白对照滴定中所用高氯酸滴定液体积, mL; m 为醋酸氯己定样品质量, g。

(5) 注意事项 本法仅适用于非水溶液的样品。若为醋酸氯己定水溶液样品, 则量取约含醋酸氯己定 0.15 g 的溶液, 置于预先称重的洁净蒸发皿(重量为 G_1) 中。置水浴上加热蒸干, 称重(G_2)。以 G_2 减去 G_1 即得醋酸氯己定重量。然后, 用 30 mL 丙酮加 2 mL 冰醋酸, 分 3 次将蒸发皿上不挥发物洗入碘量瓶中。待不挥发物全部溶解后, 按上述方法测定并计算其含量。亦可以水溶液毫升数代入公式中的 m , 计算醋酸氯己定的含量(g/L)。

葡萄糖酸氯己定含量的测定, 可参照上述测定步骤, 计算公式如下:

$$\omega(\%) = \frac{c \times (V_1 - V_2) \times 0.4489}{m} \times 100\%$$

3.1.2.13 季铵盐含量的测定

(1) 原理 季铵盐可与溴酚蓝等酸性染料形成有色盐, 在碱性水溶液中, 该有色盐很容易被含氯有机溶剂(如氯仿)提取。由于此盐的结合不及四苯硼钠与季铵盐的结合稳定, 所以可利用此盐的性质作为以四苯硼钠滴定季铵盐的指示剂。滴定开始时, 季铵盐与溴酚蓝结合, 生成蓝色络合物, 溶入氯仿层显蓝色。滴定至近终点时, 由于四苯硼钠和溴酚蓝结合, 并溶入氯仿层显蓝色。滴定接近终点时, 溴酚蓝指示剂逐渐从蓝色络合物中被四苯硼钠置换而游离出来, 因其不溶于氯仿而转入水层, 在剧烈振摇下, 氯仿层的蓝色消退而水层呈淡紫色, 即为终点。

(2) 试剂配制 氢氧化钠试液(4.3 g 氢氧化钠加蒸馏水溶解成 100 mL 溶液)、溴酚蓝指示液(0.1 g 溴酚蓝加 0.05 mol/L 氢氧化钠溶液 3 mL, 溶解, 再加蒸馏水至 200 mL)。备氯仿。配制并标定 0.02 mol/L 四苯硼钠滴定液(3.1.3.7)。

(3) 样品测定 精密称取样品适量(液体样品取适量体积), 使其相当于季铵盐约 0.25 g, 置 250 mL 碘量瓶中。加蒸馏水 50 mL 与氢氧化钠试液 1 mL, 摇匀。再加溴酚蓝指示液 0.4 mL 与氯仿 10 mL。用四苯硼钠滴定液(装入 50 mL 滴定管中)滴定, 边滴边摇匀, 接近终点时尚须强力振摇。待氯仿层的蓝色消失, 记录四苯硼钠滴定液用量。重复测 2 次, 取 2 次的平均值进行以下计算。同时做空白实验。

(4) 计算公式 若消毒剂中有效成分为苯扎溴铵, 因 1 mol/L 四苯硼钠滴定液 1 mL 相当于 0.3984 g 苯扎溴铵, 按下式计算其含量:

固体样品

$$\omega(\%) = \frac{c \times V_{st} \times 0.3984}{m} \times 100\% \quad (1)$$

$$\rho(g/L) = \frac{c \times V_{st} \times 0.3984}{V} \times 1000$$

液体样品

(2)

式中： ω 、 ρ 为苯扎溴铵含量，%或 g/L； c 为四苯硼钠滴定液的浓度，mol/L； V_{st} 为四苯硼钠滴定液样品与空白体积差，mL； m 为碘量瓶中苯扎溴铵质量，g； V 为碘量瓶中含苯扎溴铵原液体积，mL。

(5) 注意事项 本方法适用于测定消毒剂中季铵盐有效成分的总量。若消毒剂中有效成分为苯扎氯铵，则计算公式中，系数应为 0.3540。消毒剂中季铵盐有效成分不同，则系数不同。对于复方消毒剂，如含多种季铵盐成分，采用本方法只能测定季铵盐有效成分的总量，不能分别测定每种季铵盐成分，表示时可以其中一种季铵盐成分计。

3.1.2.14 甲酚皂（煤酚皂， C_7H_8O ）含量的测定

(1) 原理 采用色谱柱分离，氢火焰离子化检测器检测，根据保留时间定性，峰高或峰面积定量。

(2) 色谱参考条件与系统适用性试验 以含 2% 磷酸的己二酸乙二醇聚酯为固定相，涂布浓度为 4%~10%，氢火焰检测器，柱温为 145℃，进样口和检测器温度为 200℃。

(3) 校正因子测定 精密称取水杨醛约 1.3 g，置 50 mL 容量瓶中，加乙醚使溶解并稀释至刻度，摇匀，作为内标溶液。另精密称取邻位甲酚对照品约 0.65 g，至 25 mL 容量瓶中，加乙醚使溶解并稀释至刻度，摇匀，作为对照品溶液。精密量取对照品溶液和内标溶液各 5 mL，置具塞试管中，密塞，摇匀。取 1 μ L 注入气相色谱仪，计算邻位甲酚的校正因子，再乘以 1.042，即得，对位甲酚的校正因子。

(4) 样品测定 精密称取本品 1.0 g，置分液漏斗中，加盐酸 0.1 mL，摇匀，加水 3 mL，摇匀，精密加入乙醚 20 mL，轻轻振摇，静置分层，弃去水层，加水 5 mL，轻轻振摇，分层，弃去水层。精密量取乙醚提取液 5 mL 和内标溶液 5 mL，置具塞试管中，摇匀，取 1 μ L 注入气相色谱仪，测定。

(5) 计算公式

$$\omega (\%) = \frac{(A_1 \times f_1 + A_2 \times f_2) \times m_i}{A \times m} \times 100\%$$

式中： ω 为甲酚皂含量，%； A 为内标物质峰面积； A_1 为邻位甲酚峰面积； A_2 为间、对位甲酚峰面积； f_1 为邻位甲酚校正因子； f_2 为间、对位甲酚校正因子； m_i 为内标物质质量，g； m 样

品中甲酚质量, g。

3.1.2.15 苯甲酸、水杨酸和山梨酸含量的测定

(1) 原理 苯甲酸、水杨酸和山梨酸在 280 nm 处有紫外吸收, 可用高效液相色谱进行分离, 并根据保留时间定性, 峰面积定量。

(2) 色谱参考条件 色谱柱: C_{18} 柱; 流动相: 0.05 mol/L 磷酸二氢钾/甲醇/三乙胺 (500/500/1, 用磷酸调 pH 至 4.3~4.4)。分析前, 经 0.45 μm 滤膜过滤及真空脱气; 紫外检测波长: 280 nm。

(3) 标准溶液的制备 准确称取水杨酸、苯甲酸和山梨酸各 0.25 g, 置于 100 mL 棕色容量瓶中, 加甲醇使其溶解并定容至刻度, 摇匀。精密吸取 1.00 mL 于 50 mL 棕色容量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 此溶液各成分浓度为 0.05 g/L。

(4) 样品溶液的制备 精密称取样品约 0.5 g, 置于 50 mL 棕色容量瓶中, 加甲醇 40 mL, 超声处理 3 min, 加甲醇至刻度, 摇匀, 过滤, 弃去初滤液, 精密吸取滤液 1.00 mL 置另一棕色容量瓶中, 用流动相定容至刻度, 摇匀。

(5) 样品测定 吸取标准溶液和样品溶液各 10 μL , 分别注入液相色谱仪, 记录峰面积, 与标准溶液比较而定量。

(6) 计算公式

$$X(\%) = \frac{\rho_{\text{标}} \times A_{\text{样}} \times F \times V}{A_{\text{标}} \times m \times 1000} \times 100\%$$

式中: X 为样品中各成分含量, %; $\rho_{\text{标}}$ 为标准溶液质量浓度, g/L; $A_{\text{样}}$ 为样品测定峰面积; F 为样品溶液稀释倍数; V 为样品定容体积, mL; $A_{\text{标}}$ 为标准溶液峰面积; m 为样品质量, g。

3.1.2.16 2,4,4' - 三氯 - 2' - 羟基二苯醚 (DP300) 含量的测定

(1) 原理 2,4,4' - 三氯 - 2' - 羟基二苯醚在 280 nm 处有紫外吸收, 可用反相高效液相色谱 (HPLC) 分离, 并根据保留时间定性, 峰面积定量。

(2) 试剂配制 甲醇 (色谱纯); 2,4,4' - 三氯 - 2' - 羟基二苯醚标准溶液: 称取 2,4,4' - 三氯 - 2' - 羟基二苯醚标准品 0.1 g, 用少量甲醇溶解后并定容至 100 mL, 此溶液每 1 L 含 2,4,4' - 三氯 - 2' - 羟基二苯醚 1 g。

(3) 色谱参考条件 色谱柱: C_{18} 柱 (150 mm×4.6 mm I.D., 5 μm); 流动相: 甲醇/水 (80/20), 分析前, 经 0.45 μm 滤膜过滤及真空脱气; 流量: 1.5 mL/min; 紫外检测波长: 280 nm; 柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

(4) 标准曲线的绘制 用 2,4,4' - 三氯 - 2' - 羟基二苯醚标准溶液配制质量浓度

分别为 0、200、400、600 和 800mg/L 的标准系列。在设定色谱条件下，分别取 5 μ L 进行分析。以标准系列质量浓度为横坐标 C，峰面积为纵坐标 Y，进行线性回归处理，得到线性方程。

(5) 样品测定 若消毒剂中 2,4,4' - 三氯 - 2' - 羟基二苯醚的标示浓度过高，需适当稀释，使其稀释后浓度在标准曲线线性范围内。对于膏体样品应先用流动相配制成溶液。经 0.45 μ m 滤膜过滤备用。在设定的色谱条件下，进 5 μ L 样品溶液进行分析。根据峰面积，从线性方程计算出相应的 2,4,4' - 三氯 - 2' - 羟基二苯醚浓度。根据取样量和稀释倍数，换算出样品中 2,4,4' - 三氯 - 2' - 羟基二苯醚的最终浓度。

(6) 注意事项 本方法适用于测定消毒剂中的 2,4,4' - 三氯 - 2' - 羟基二苯醚有效成分。如果遇到某些有干扰的消毒剂，可适当调整流动相或在流动相中加入适当的添加剂以达到最佳分离效果。

3.1.2.17 对氯间二甲苯酚含量的测定

(1) 原理 对氯间二甲苯酚在 220 nm 处有紫外吸收，可用反相高效液相色谱 (HPLC) 分离，并根据保留时间定性，峰面积定量。

(2) 试剂配制 甲醇 (色谱纯)；对氯间二甲苯酚标准溶液：称取对氯间二甲苯酚标准品 0.1 g，用少量甲醇溶解后并定容至 100 mL，此溶液每 1 L 含对氯间二甲苯酚 1 g。

(3) 色谱参考条件 色谱柱：C₁₈ 柱 (150 mm $\times$ 4.6 mm I.D., 5 μ m)；流动相：甲醇/水 (70/30)，分析前，经 0.45 μ m 滤膜过滤及真空脱气；流量：1.00 mL/min；紫外检测波长：220 nm；柱温：25 $^{\circ}$ C。

(4) 标准曲线的绘制 用对氯间二甲苯酚标准溶液配制质量浓度分别为 0、200、400、600 和 800 mg/L 的标准系列。在设定色谱条件下，分别取 5 μ L 进行分析。以标准系列质量浓度为横坐标 C，峰面积为纵坐标 Y，进行线性回归处理，得到线性方程。

(5) 样品测定 若消毒剂中对氯间二甲苯酚的标示浓度过高，需适当稀释，使其稀释后浓度在标准曲线线性范围内。对于膏体样品应先用流动相配制成水溶液。经 0.45 μ m 滤膜过滤备用。在设定的色谱条件下，进 5 μ L 样品溶液进行分析。根据峰面积，从线性方程计算出相应的对氯间二甲苯酚浓度。根据取样量和稀释倍数，换算出样品中对氯间二甲苯酚的最终浓度。

(6) 注意事项 本方法适用于测定消毒剂中的对氯间二甲苯酚有效成分。如果遇到某些有干扰的消毒剂，可适当调整流动相或在流动相中加入适当的添加剂以达到最佳分离效果。

3.1.2.18 邻苯二甲醛 (O-phthalaldehyde, 简称 OPA) 含量的测定

(1) 原理 样品中邻苯二甲醛经预处理后，以气相色谱法 FID 检测器分析，保留时间定性，外标法峰面积定量。

(2) 试剂配制 乙醇溶液 (1+1): 用量筒量取 100 mL 无水乙醇 (优级纯) 于烧杯中, 加入 100 mL 纯水, 混匀。邻苯二甲醛储备液: 称取 0.3 g (精确至 0.1 mg) 邻苯二甲醛标准物质溶于 100 mL 容量瓶中, 用乙醇溶液 (1+1) 溶解、稀释、定容, 此储备液浓度为 3 000 mg/L。

(3) 色谱参考条件 色谱柱: Polyethylene Glycol, 30.0 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 mm; 检测器: 氢火焰离子化检测器 (FID); 温度: 柱温 180 $^{\circ}\text{C}$; 汽化室温度 250 $^{\circ}\text{C}$; 检测器温度 250 $^{\circ}\text{C}$; 柱流速: 1.0 mL/min; 分流比: 30: 1; 气体流量: 氢气 40 mL/min, 空气 450 mL/min, 氮气 40 mL/min, 进样量: 1 μL 。

(4) 标准曲线的绘制 从储备液中准确移取 0.20、0.50、1.00、3.00、5.00、10.0 mL 溶液于 25 mL 容量瓶中, 以乙醇溶液 (1+1) 定容, 则工作溶液浓度依次为 24.00、60.0、120、360、600、1200 mg/L。在规定的气相色谱条件下, 测定其响应值, 绘制浓度—峰面积校准曲线或计算线性回归方程。

(5) 样品的预处理 样品用乙醇溶液 (1+1) 稀释后, 直接用气相色谱仪测定。

(6) 样品测定 将处理好的样品依次进入气相色谱仪, 测得响应值, 根据其响应值从校正曲线或从线性回归方程中查出相应含量。根据取样量和稀释倍数, 换算出样品中邻苯二甲醛的最终浓度。

(7) 最低检出限 本方法的最低检出限 2.0 mg/L。

(8) 方法精密度和准确度 标准溶液和实际样品的相对标准偏差均小于 4.00 %, 加标回收率为 98.5 %~102 %。

3.1.3 滴定液的配制及其浓度标定

3.2.1.3.1 硫代硫酸钠 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 滴定液

(1) 配制 0.1 mol/L 硫代硫酸钠滴定液时, 称取 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 26 g, 加无水碳酸钠 0.20 g, 用蒸馏水溶解成 1000 mL, 摇匀。装于棕色玻璃瓶中, 置暗处, 30 d 后经过滤并标定其浓度。

(2) 标定浓度时, 称取经 120 $^{\circ}\text{C}$ 烘干至恒重的基准重铬酸钾 0.15 g (精确至 0.0001 g), 置于 250 mL 碘量瓶中, 加蒸馏水 50 mL 溶解。加 2 mol/L 硫酸 15 mL 和 200 g/L 碘化钾溶液 10 mL, 盖上盖并混匀, 加蒸馏水数滴于碘量瓶盖缘, 置暗处 10 min 后再加蒸馏水 90 mL。在室温 20 $^{\circ}\text{C}$ ~25 $^{\circ}\text{C}$, 用装于 50 mL 滴定管中的硫代硫酸钠滴定液滴定至溶液呈淡黄色, 加 5 g/L 淀粉溶液 10 滴 (溶液立即变蓝), 继续滴定到溶液由蓝色变成亮绿色。记录硫代硫酸钠滴定液总毫升数, 并将滴定结果用空白试验校正。若空白试验中有硫代硫酸钠消耗, 则将滴定用去的硫代硫酸钠滴定液毫升数减去空白试验中其用量, 得校正后的硫代硫酸钠滴定液毫升数。因为 1 mol/L 硫代硫酸钠滴定液 1 mL 相当于 0.04903 g 重铬酸钾, 故可按下式计算硫代硫酸钠滴定液浓度:

$$C(\text{mol/L}) = \frac{m}{0.04903 \times V}$$

式中： C 为硫代硫酸钠滴定液浓度，mol/L； m 为碘量瓶中重铬酸钾质量，g； V 为硫代硫酸钠滴定液（减空白）体积，mL。

用 0.05 mol/L 硫代硫酸钠滴定液时，在临用前于容量瓶中加蒸馏水稀释 0.1 mol/L 该液制成。必要时可标定其浓度。

（3）注意事项

① 配制的碘化钾溶液及所用碘化钾易被空气氧化，每次取后应及时加盖。一旦变成黄色即不可再用。

② 用硫代硫酸钠溶液滴定需加淀粉溶液时，一定待溶液至淡黄色再加。过早加淀粉，溶液中多量的游离碘易与淀粉生成过多的碘淀粉吸附产物，影响终点的准确。

3.1.3.2 碘（0.5I₂） 滴定液

（1）配制 0.1 mol/L 碘（0.5I₂）滴定液时，称取 13 g 碘片、36 g 碘化钾，加 100 mL 蒸馏水溶解后，再加浓盐酸 3 滴与蒸馏水使成 1000 mL。混匀，装于带玻璃塞的棕色玻璃瓶中，保存于暗处备用。

（2）标定浓度时，向 100 mL 碘量瓶中加已知浓度（0.05mol/L~0.09 mol/L）的硫代硫酸钠滴定液 25.0ml，5 g/L 淀粉溶液 2 mL，摇匀。用装于 25 mL 滴定管中的碘滴定液滴定至溶液变成蓝色，记录用去的碘滴定液毫升数。因 1 mol/L 碘滴定液相当于同容量的 1 mol/L 硫代硫酸钠滴定液，故可按下式计算碘滴定液浓度：

$$C(\text{mol/L}) = \frac{C_1 \times V_2}{V}$$

式中： C 为碘滴定液浓度，mol/L； C_1 为硫代硫酸钠滴定液浓度，mol/L； V_1 为硫代硫酸钠滴定液体积，mL； V 为碘滴定液体积，mL。

用 0.05 mol/L 碘滴定液时，在临用前于容量瓶中加蒸馏水稀释 0.1 mol/L 该液制成。必要时可标定其浓度。

3.1.3.3 高锰酸钾（KMnO₄） 滴定液

（1）配制 0.02 mol/L 高锰酸钾滴定液时，称取 3.2 g 高锰酸钾，溶于 1000 mL 蒸馏水中，煮沸 15 min。冷后装于玻璃瓶中，严密塞上塞子。静置 2 d 后，用垂熔玻璃滤器滤过，将滤液混匀，装瓶保存。

（2）标定浓度时，称取经 105 °C 烘干至恒重的基准草酸钠 0.2 g（精确至 0.0001 g），置烧杯中，加蒸馏水 250 mL 与硫酸 10 mL，搅拌使溶解。自 50 mL 滴定管中迅速加入高锰酸钾滴定

液约 25 mL, 待褪色后, 置水浴上加热至 65℃。继续用高锰酸钾滴定液滴定至溶液显微红色并持续 30 s 不褪色时 (此时液温仍 > 55℃), 记录用去的高锰酸钾滴定液毫升数。因 1 mol/L 高锰酸钾滴定液 1 mL 相当于 0.3350 g 草酸钠, 用下式计算其浓度:

$$C(\text{mol/L}) = \frac{m}{0.3350 \times V}$$

式中: C 为高锰酸钾滴定液浓度, mol/L; m 为草酸钠质量, g; V 为高锰酸钾滴定液体积, mL。

3.1.3.4 硫酸 (H₂SO₄) 滴定液

(1) 配制 0.25 mol/L 硫酸滴定液时, 取硫酸 15 mL, 沿盛有蒸馏水的烧杯壁缓缓注入水中。待溶液温度降至室温, 再加蒸馏水稀释至 1000 mL, 摇匀。

(2) 标定浓度时, 称取经 270℃~300℃ 烘干至恒重的基准无水碳酸钠 0.4 g (精确至 0.0001 g), 置 250 mL 碘量瓶中, 加蒸馏水 50 mL 使溶解。加甲基红-溴甲酚绿混合指示液 [1 g/L 甲基红乙醇溶液 20 mL 与 2 g/L 溴甲酚绿乙醇溶液 30 mL 混匀] 10 滴, 用配制的硫酸滴定液 (装入 50 mL 滴定管中) 滴定。待溶液由绿色转变为紫红色时, 煮沸 2 min。冷却至室温后, 继续滴定至溶液由绿色变为暗紫色, 记录用去的硫酸滴定液总毫升数。因 1 mol/L 硫酸滴定液 1 mL 相当于 0.1060 g 无水碳酸钠, 按下式计算硫酸滴定液浓度:

$$C(\text{mol/L}) = \frac{m}{0.1060 \times V}$$

式中: C 为硫酸滴定液浓度, mol/L; m 为无水碳酸钠质量, g; V 为硫酸滴定液体积, mL。

3.1.3.5 氢氧化钠 (NaOH) 滴定液

(1) 称取 37 g 氢氧化钠, 加蒸馏水振摇, 使溶解成 50 mL 饱和溶液。冷却后, 置聚乙烯塑料瓶中, 静置数日待澄清。配制 0.1 mol/L 氢氧化钠滴定液时, 取澄清的氢氧化钠饱和溶液 5.6 mL, 加蒸馏水成 1000 mL, 摇匀。

(2) 标定浓度时, 称取经 105℃ 烘干至恒重的基准邻苯二甲酸氢钾 0.4 g (精确至 0.0001 g), 置 250 mL 碘量瓶中。加蒸馏水 50 mL 溶解, 加 2 滴酚酞指示液 (1 g 酚酞, 加乙醇溶成 100 mL 溶液), 用氢氧化钠滴定液 (装于 50 mL 碱式滴定管中) 滴定。待溶液呈红色时, 记录用去的氢氧化钠滴定液毫升数。因 1 mol/L 氢氧化钠滴定液 1 mL 相当于 0.2042 g 邻苯二甲酸氢钾, 按下式计算其浓度:

$$C(\text{mol/L}) = \frac{m}{0.2042 \times V}$$

式中: C 为氢氧化钠滴定液浓度, mol/L; m 为邻苯二甲酸氢钾质量, g; V 为氢氧化钠滴定

液体积, mL。

3.1.3.6 高氯酸 (HClO₄) 滴定液

(1) 配制 0.1 mol/L 高氯酸滴定液时, 取冰醋酸 750 mL, 缓缓加入高氯酸 (浓度为 70 % ~ 72 % 者) 8.5 mL, 振摇使混匀。在室温下缓缓滴加醋酐 (边加边摇) 23 mL 后, 摇匀。待冷却后, 加冰醋酸使成 1000 mL 溶液, 摇匀, 放置 24 h 后标定其浓度。

(2) 标定浓度时, 称取经 105 °C 烘干至恒重的基准邻苯二甲酸氢钾 0.4 g (精确至 0.0001 g), 置 100 mL 碘量瓶中, 加冰醋酸 20 mL 使溶解, 加结晶紫指示液 (0.5 g 结晶紫用冰醋酸溶成 100 mL 溶液) 1 滴, 用配制的高氯酸滴定液 (装于 25 mL 滴定管中) 滴定。待溶液由紫色变成蓝色时, 记录用去的高氯酸滴定液毫升数。同时, 使用不含邻苯二甲酸氢钾的冰醋酸重复上述操作 (空白对照)。因 1 mol/L 高氯酸滴定液 1 mL 相当于 0.2042 g 邻苯二甲酸氢钾, 用下式计算其浓度:

$$C(\text{mol/L}) = \frac{m}{0.2042 \times (V_1 - V_2)}$$

式中: C 为高氯酸滴定液浓度, mol/L; m 为邻苯二甲酸氢钾质量, g; V_1 、 V_2 为样本组与空白组用去高氯酸滴定液体积, mL。

3.1.3.7 四苯硼钠 [(C₆H₅)₄BNa] 滴定液

(1) 配制 0.02 mol/L 四苯硼钠滴定液时, 称取四苯硼钠 7.0 g, 加蒸馏水 50 mL, 振摇使溶解。加入新配制的氢氧化铝凝胶 (取三氯化铝 1.0 g, 溶于 25 mL 蒸馏水中。在不断搅拌下缓缓滴加氢氧化钠试液至 pH 为 8~9) 与氯化钠 16.6 g, 充分搅拌均匀。然后, 加蒸馏水 250 mL, 振摇 15 min。静置 10 min, 过滤。取滤液, 并滴加氢氧化钠试液至 pH 为 8~9, 再加蒸馏水稀释至 1000 mL, 摇匀。

(2) 标定浓度时, 精确量取本液 10.0 mL, 加醋酸-醋酸钠缓冲液 (取无水醋酸钠 20 g, 加蒸馏水 300 mL 溶解。加溴酚蓝指示液 1 mL 与冰醋酸 60 ~ 80 mL, 至溶液从蓝色变为纯绿色, 再加水稀释至 1000 mL。pH 3.7) 10 mL 与溴酚蓝指示液 0.5 mL。用 0.01 mol/L 羟铵盐滴定液 (见 2.2.1.3.8) 滴定至蓝色。同时做不含本液的空白试验滴定。因 1 mol/L 四苯硼钠滴定液 1 mL 相当于 1 mol/L 羟铵盐滴定液 1 mL, 故可按式计算其浓度:

$$C(\text{mol/L}) = \frac{(V_1 - V_2) \times C}{V}$$

式中: C 为四苯硼钠滴定液浓度, mol/L; V_1 、 V_2 样本组与空白组用去羟铵盐体积, mL; C_1 为羟铵盐滴定液浓度, mol/L; V 为量取四苯硼钠滴定液的体积, mL。

3.1.3.8 烃铵盐 (C₂₂H₄₀ClN) 滴定液

(1) 配制 0.01 mol/L 烃铵盐滴定液时, 取氯化二甲基苄基烃铵 3.8 g, 加蒸馏水使溶解。再加醋酸-醋酸钠缓冲液 (pH 3.7) 10 mL, 并加蒸馏水稀释成 1000 mL, 摇匀。

(2) 标定浓度时, 称取经 150 °C 烘干 1 h 的分析纯氯化钾 0.18g (精确至 0.0001 g), 置 250 mL 容量瓶中, 加醋酸-醋酸钠缓冲液 (pH 3.7) 使溶解并稀释至刻度, 摇匀。精确吸取稀释液 20.0 mL, 置 50 mL 容量瓶中, 精确加 0.02 mol/L 四苯硼钠溶液 25.0mL, 再加蒸馏水至刻度, 摇匀后经干燥滤纸过滤。弃去初滤液, 精确取续滤液 25.0mL, 置 250 mL 碘量瓶中, 加溴酚蓝指示液 0.5 mL, 用配制的烃铵盐滴定液滴定。待溶液呈蓝色时, 记录用去的烃铵盐滴定液毫升数。同时, 用不含氯化钾的醋酸-醋酸钠缓冲液重复上述操作 (空白对照)。因 1 mol/L 烃铵盐滴定液 1 mL 相当于 0.07455 g 氯化钾, 故可用下式计算烃铵盐滴定液浓度:

$$C(\text{mol/L}) = \frac{m}{0.07455 \times (V_2 - V_1)}$$

式中: C 为烃铵盐滴定液浓度, mol/L; m 氯化钾质量, g; V_1 、 V_2 为样本组与空白组用去烃铵盐滴定液体积, mL。

3.1.4 pH 值的测定

(1) 样品处理: 原液直接测定 pH 值, 对于需调节 pH 后使用的消毒剂, 加入 pH 调节剂后, 再次测定 pH 值。固体样品按使用最高浓度, 测定其溶液的 pH 值。啫哩, 乳液, 强酸 (碱) 性样品按样品+纯水=1+9 (V/V 或 W/V) 比例准确称取放入 50 mL 烧杯中, 搅拌 5 min 或超声 1~2 min 使样品溶液混合均匀, 冷却至室温, 测定溶液的 pH 值。

(2) 测定方法: 水溶液样品经 pH 试纸确定溶液 pH 范围后, 用相应的 pH 校正液校正 pH 计, 再测定样品的 pH 值。以有机物为溶剂的样品采用 pH 试纸测定 pH 值。

(3) 仪器校正中常用的标准缓冲液: 应使用标准缓冲物质配制, 配制方法如下。

①邻苯二甲酸氢钾标准缓冲液 (pH4.00, 20 °C) 精密称取在 115 °C ± 5 °C 干燥 2 h~3 h 的邻苯二甲酸氢钾 (KHC₈H₄O₄) 10.12 g, 加水使溶解并稀释至 1000 mL。

②磷酸盐标准缓冲液 (pH6.88, 20 °C) 精密称取在 115 °C ± 5 °C 干燥 2 h~3 h 的无水磷酸氢二钠 3.533 g 与磷酸二氢钾 3.387 g, 加水使溶解并稀释至 1000 mL。

③硼砂标准缓冲液 (pH9.23, 20 °C) 精密称取硼砂 (Na₂B₄O₇·10H₂O) 3.80 g (注意避免风化), 加水使溶解并稀释至 1000 mL, 置聚乙烯塑料瓶中, 密塞, 避免与空气中二氧化碳接触。

3.1.5 氧化还原电位 (ORP) 的测定

样品一般为液体, 可采用铂电极, 在酸度计 “mV” 档上直接测定读数。

3.1.6 重金属（以铅计）检查

第一法：

具体检验方法参见 GB 9985。

第二法：石墨炉原子吸收法测定铅

（1）原理 样品注入石墨炉原子化器中经高温原子化，待测元素铅的基态原子吸收同种元素空心阴极灯发出的 283.3 nm 共振线，在一定范围内其吸收值与铅含量成正比。

（2）试剂配制 所用试剂均为优级纯； $\rho(\text{HNO}_3)=3\%$ ；铅标准溶液（100 mg/L）：国家标准物质中心购买。将此溶液用 $\rho(\text{HNO}_3)=3\%$ 稀释成 1000 $\mu\text{g/L}$ 铅的标准使用液；基体改进剂 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ （50 g/L）：称取 5.00 g 磷酸二氢铵，用水溶解稀释至 100 mL。

（3）仪器参考条件 波长：283.3 nm；狭缝：0.5 nm；灯电流：4 mA；测量模式：峰高；测量方式：标准曲线法；进样体积：标准溶液 10 μL ，样品溶液 10 μL ，基体改进剂 5 μL 。

石墨炉升温程序：

步骤	温度（℃）	时间（s）	流 量 (L/min)
干燥	85	10.0	3.00
	110	40.0	3.00
灰化	700	15.00	3.00
	700	10.0	3.00
	700	2.0	0.0
原子化	1800	1.0	0.0
	1800	4.00	0.0
烧尽	2200	2.0	3.00

（4）标准曲线的绘制 分别准确吸取铅标准使用液（1000 $\mu\text{g/L}$ ）0.00、0.50、1.00、3.00、5.00、7.00 mL 于 100 mL 容量瓶中，用 $\rho(\text{HNO}_3)=3\%$ 定容至刻度，配制成标准曲线的浓度为 0.00、5.00、10.0、30.0、50.0、70.0 $\mu\text{g/L}$ 。在给定的仪器条件下，分别将标准曲线溶液和基体改进剂上机测定绘制标准曲线。

（5）样品预处理 依照各消毒产品使用说明书中的使用方法稀释，取稀释后的使用液 25 mL 于锥形瓶中，放数粒玻璃珠置于电热板上加热赶氯气、氧气，待液体剩（2~3）mL 时取下稍冷，加入 5 mL 硝酸放置电热板上继续消解，直至冒白烟消解完全，消化液呈无色透明或略带

黄色取下冷却，冷却后用水将消化液转入 25 mL 容量瓶中定容。同时做空白试验

(6) 样品测定 在给定的仪器条件下，分别将样品溶液和基体改进剂上机测定，由标准曲线直接得出样品溶液的浓度。

(7) 计算公式

$$X = \frac{C_1 - C_2}{V_1} \times \frac{V_2}{1000}$$

式中：

X 为被测样品中铅含量，mg/L； C_1 为被测样品溶液的浓度， $\mu\text{g/L}$ ； C_2 为试剂空白液的浓度， $\mu\text{g/L}$ ； V_1 为样品体积，mL； V_2 为样品稀释体积，mL。

(8) 方法的检出限为 0.5 $\mu\text{g/L}$ ，精密度为 5%，回收率为 93 %—106%，线性范围 0.0—70 $\mu\text{g/L}$ 。

(9) 注意事项 本方法适用于测定消毒剂中铅的含量。对不含有机化合物及表面活性剂的消毒产品（如：次氯酸钠发生器生产的次氯酸钠消毒剂）可按其使用说明书中使用方法稀释后直接测定，对含有机化合物及表面活性剂的消毒产品按其方法稀释后经酸消解后测定。消毒剂中含有大量的氯化钠等钠盐，对铅的测定产生严重的干扰，为消除钠盐的干扰需加入基体改进剂。

3.1.7 砷盐检查

第一法：

具体检验方法参见 GB 9985。

第二法：氢化物发生原子荧光法

(1) 原理 样品经预处理后，加入硼氢化钾将砷生成砷化氢，用氩气做载气将砷化氢导入原子化器中进行原子化，以特制砷空心阴极灯做激发光源，使砷原子产生原子荧光，荧光强度与砷的含量成正比。

(2) 试剂配制 所用试剂均为优级纯；盐酸；氢氧化钾；硫脲（100 g/L）—抗坏血酸（100 g/L）溶液：分别称取硫脲、抗坏血酸各 10 g 溶于 100 mL 纯水中，用时现配；硼氢化钾（20 g/L）：称取 2 g 氢氧化钾溶于 200 mL 纯水中，加入 20 g 硼氢化钾并使之溶解，用水稀释至 1000 mL，用时现配；砷标准溶液（储备液 100 mg/L）：国家标准物质中心购买；砷标准使用液（1 mg /L）：吸取砷标准储备液 1.00 mL 于 100 mL 容量瓶中，加入 5 mL HCl，以水定容，混匀。

(3) 仪器参考条件 灯电流：56 mA；负高压：320 V；原子化器温度：200 ℃；原子化器高度：8 mm；载气流量：500 mL/min；屏蔽气流量：1000 mL/min；读数时间：10 s；延迟时

间：1 s。

(4) 标准曲线的绘制 吸取砷标准使用液（1 mg /L）0.00，0.50，1.00，3.00，5.00，7.00，10.0 mL 于 100 mL 容量瓶中，加入 20 mL 硫脲（100 g/L）—抗坏血酸（100 g/L）溶液，5 mL HCl，用水定容至刻度，摇匀，配制成含砷为 0.00，5.00，10.0，30.0，50.0，70.0，100 μg/L 的标准系列溶液。放置 30 分钟后，在给定的仪器条件下，依次测定标准溶液。

(5) 样品预处理 样品根据性状分为液体和固体。按各消毒产品使用说明书中使用方法稀释。取稀释后的样品使用液 50 mL 于锥形瓶中置电热板上加热，赶尽氯气或氧气等气体，待液体剩（5-10） mL 时稍冷后加入 5 mL 硝酸消解，直至冒白烟消解完全，消化液呈无色透明或略带黄色取下冷却，冷却后用少许水将消化液转入 50 mL 容量瓶中，加入 10 mL 硫脲（100g/L）—抗坏血酸（100g/L）溶液，2.5 mL HCl，再用水定容至刻度摇匀，放置 30 分钟后测定。同时做空白试验。

(6) 样品测定 在给定的仪器条件下，将样品溶液上机测定，由标准曲线直接得出样品溶液的浓度。

(7) 计算公式

$$X = \frac{C_1 - C_2}{V_1} \times \frac{V_2}{1000}$$

式中：X 为被测样品中砷含量，mg/L；C₁ 为被测样品溶液的浓度，μg/L；C₂ 为试剂空白液的浓度，μg/L；V₁ 为样品体积，mL；V₂ 为样品稀释体积，mL。

(8) 方法的检出限为 0.08 μg/L，相对标准偏差为 1.95 %，回收率为 96 %—99 %。

(9) 注意事项 本方法适用于测定消毒剂中砷的含量。对不含有机化合物及表面活性剂的消毒产品（如：次氯酸钠发生器生产的次氯酸钠消毒剂）可按其使用说明书中使用方法稀释后直接测定，对含有机化合物及表面活性剂的消毒产品，由于此类样品在仪器的反应池中反应强烈影响样品的气液分离，干扰测定，甚至有些样品反应生成的气体将反应池的连接管崩开，所以按其方法稀释后经酸消解后测定。

3.2 复方消毒剂有效成分含量测定的指导原则

3.2.1 分析方法的选择

首选仪器分析法，如色谱分析法、光学分析法以及电化学分析法等；化学分析法经证实可靠者，也可以采用。

3.2.2 分析方法的可靠性论证

(1) 专属性 经试验验证，除有效成分以外的其它成分均不得干扰有效成分的测定。

(2) 准确性 以加标回收百分率表示。回收百分率一般在平均值 $\bar{X} \pm 10.0\%$ 之间 ($n \geq 6$)。

(3) 重复性 某已知含量的模拟样品, 用该法连续测定 n 次, 其 RSD 应 $\leq 5.00\%$ ($n \geq 6$)。

(4) 回归方程的线性 配制一系列已知浓度的模拟样品五份(高、低浓度之间的倍数一般为 5 倍~10 倍), 用某法测定。以测定信号(如色谱峰面积或峰高、吸光度等)对其浓度(或质量)进行线性回归, 其相关系数应满足 $r \geq 0.999$ ($n \geq 5$)。

(5) 灵敏度 即用某法测定某样品的最低检出浓度 ($S/N=3$)。

3.3 消毒剂稳定性测定

3.3.1 外观检查

除测定有效成分含量或杀灭微生物效果外, 还应观察记录消毒剂有无颜色变化; 并且对液体消毒剂应观察记录有无沉淀或悬浮物产生, 对片剂应观察记录外观性状是否完好。性状变化的记录应写进检测报告。

3.3.2 化学测定法

3.3.2.1 加速试验法

(1) 取包装完好的消毒剂, 置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (对粉剂、片剂要求相对湿度 $>75\%$) 恒温箱内 3 个月, 或 $54\text{ }^{\circ}\text{C}$ (对粉剂、片剂要求相对湿度 $>75\%$) 恒温箱内 14 d。于放置前、后分别测定消毒剂杀菌有效成分含量(具体方法见 3.1)。

(2) 加速试验法结果评价以有效成分下降率超过 15% 为不符合要求。若经 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 存放 3 个月的样本, 其杀菌有效成分含量下降率 $\leq 15\%$, 可将贮存有效期定为 2 年; 经 $54\text{ }^{\circ}\text{C}$ 存放 14 天者, 杀菌有效成分下降率 $\leq 15\%$, 则贮存有效期可定为 1 年。

(3) 未通过本试验的消毒剂, 或欲观察 2 年以上储存有效期的消毒剂, 可按下述室温留样法(3.3.3.2)测定其储存有效期。

(4) 测定结果应对其性状变化进行描述, 若因有颜色等性状变化而无法进行有效成分经实验法测定时, 以室温留样法结果为准。

3.3.2.2 室温留样法

取已测有效成分含量并包装完好的消毒剂, 放置温度为 $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境(记录温度), 按产品保存期时限(企业提供), 取样测定有效成分含量, 有效成分含量下降率 $\leq 15\%$ 为合格。

3.3.3 微生物测定法

(1) 贮存方法和取样要求同化学测定法(3.3.2)。

(2) 在杀灭或抑制微生物试验中, 所用试验微生物应为使用说明书中拟杀灭或抑制微生物中抗力最强者。

(3) 对只使用原液消毒的消毒剂, 直接用其原液进行杀菌或抑菌试验。对需稀释后使用的消毒剂, 则以其使用说明书中杀菌合格最低浓度的溶液进行试验。

(4) 该实验作用时间、分组及其他试验条件均应与原杀灭试验相同。

(5) 贮存后样品增加 15 % 的浓度, 对微生物的杀灭效果仍能达到消毒要求的, 可判为合格, 比照 3.3.2.1 和 3.3.2.2 判定有效期是否合格。

3.4 消毒剂对金属腐蚀性的测定

3.4.1 目的

测定消毒剂对各种金属的腐蚀程度, 以能注明在使用时是否需给予应有的注意。

3.4.2 常用器材

(1) 金属片

圆形, 直径 24.00 mm, 厚 1.0 mm, 穿一直径为 2.0 mm 小孔, 表面积总值约为 9.80 cm² (包括上、下、周边表面与小孔侧面)。光洁度为 6。原料如下:

碳钢 (规格见 GB 700); 铜 (规格见 GB 2060);

铝 (规格见 GB 1173); 不锈钢 (规格见 GB 1220)。

碳钢易氧化生锈, 应保存于油中。

(2) 浸泡容器 (玻璃制, 带盖, 容积为 800 mL~1000 mL)。

(3) 砂纸 (120 号粒度水砂纸, GB 2477)。

(4) 称量杯。

(5) 天平 (感量 0.1 mg)。

3.4.3 操作程序

(1) 在有表面活性作用的清洁剂中浸泡 10 min, 充分去油, 洗净; 亦可用氧化镁糊剂涂抹除油后洗净; 以 120 号粒度水砂纸磨去金属片两面和周边表面的氧化层, 再用自来水冲净。测量片的直径、厚度、孔径 (精确至 0.1 mm)。用无水丙酮或无水乙醇再次脱脂。置 50 °C 恒温箱中干燥 1 h, 待其温度降至室温后称重 (每金属片待天平回零后称重 3 次, 精确至 0.1 mg, 取其平均值作为试验前重量。称重时, 应戴洁净手套, 勿以手直接接触样片。

(2) 按消毒剂最高使用浓度配制试验用消毒液, 用以浸泡试验样片。浸泡时, 每一金属片需浸泡在 200 mL 消毒液中。

(3) 金属样片用塑料线系以标签, 编号和注明日期, 悬挂于消毒液中。一次性浸泡 72 h。易挥发性或有效成分不稳定的消毒剂, 根据情况, 酌情定时更换消毒液, 直至浸泡 72 h。

(4) 每种金属每次试验放置 3 片样片。浸泡时, 若同种金属每一样片相隔 1 cm 以上, 可

在同一容器内（含 600 mL 消毒液）进行。

（5）浸泡到规定时间后，取出金属片，先用自来水冲洗，再用毛刷或其它软性器具去除腐蚀产物。如仍有清除不掉的腐蚀产物，可按 GB 10124 所介绍的下列方法清除：

铜片：在室温下浸泡于盐酸溶液（500 mL 36 %~38 % 盐酸加蒸馏水至 1000 mL，盐酸比重为 1.19）中 1 min~3 min。

碳钢片：置含锌粉 200 g/L 的氢氧化钠溶液中，煮沸 5 min~30 min。

铝片：浸泡于三氧化铬磷酸溶液（三氧化铬 20 g，磷酸 500 mL，加蒸馏水至 1000 mL。磷酸比重为 1.69）中，升温至 80 °C，持续 5 min~10 min。如还未清除干净，可在室温浸于硝酸（比重 1.42）溶液中 1 min。

不锈钢：浸泡于 60 °C 硝酸溶液（66 %~68 % 硝酸 100 mL 加蒸馏水至 1000 mL）20 min。或浸于 70 °C 柠檬酸铵溶液（柠檬酸铵 150 g 加蒸馏水至 1000 mL）中 10 min~60 min。

（6）金属样片除去腐蚀产物并清洗后，用粗滤纸吸干水分，置于垫有滤纸的平皿中，放入 50 °C 温箱，干燥 1 h，用镊子夹取，待其温度降至室温后分别在天平上称重。天平回零后称 3 次，以其平均值作为试验后重量。

称重时，与试验前相同，应戴洁净手套，勿以手直接接触样片（下同）。

（7）样片在用化学法去除腐蚀物时，需设相应空白对照以校正误差。空白对照样片与试验组样片同样进行表面处理、洗净和称重，但不经消毒剂浸泡。事后随同试验组样片用相同方法进行化学处理、水冲洗、干燥、称重，并计算其平均失重值。

（8）试验的全过程应同时设不锈钢片浸泡蒸馏水的对照，浸泡前后的重量差应 <0.3 mg。否则，在找出原因后，全部试验重做。

（9）试验结果，观察与纪录金属片颜色变化，并以金属腐蚀速率（R）平均值表达，在计算时应减去空白对照组样片的失重值。计算公式如下

$$R = \frac{8.76 \times 10^7 \times (m - m_t - m_k)}{S \times t \times d}$$

[R 为腐蚀速率，mm/a（毫米/年）；m 为试验前金属片重量，g；m_t 为试验后金属片重量，g；m_k 为化学处理去除腐蚀产物样片失重值，g，试验中未进行化学清除处理者，计算时在公式中删去 m_k 值；S 为金属片的表面积总值，cm²；t 为试验时间，h；d 为金属材料密度，kg/m³。]

3.4.4 腐蚀性分级标准

腐蚀速率 R (mm/a)	级 别
<0.0100	基本无腐蚀
0.0100~<0.100	轻度腐蚀
0.100~<1.00	中度腐蚀
≥1.00	重度腐蚀

3.4.5 注意事项

- (1) 每张砂纸只能磨一种金属材料。一个容器盛的消毒液只能浸泡同一种金属。
- (2) 称重关系到结果的准确性，必须认真进行。接触样片的器具不得带有油垢。
- (3) 所用金属片大小、厚薄应严格一致，表面需磨光。
- (4) 试验期间，需换消毒剂溶液时，操作应迅速，勿使样片暴露空气中过久。
- (5) 金属样片仅可使用一次，否则影响试验的准确性。
- (6) 试验在 20 ℃~25 ℃ 条件下进行。
- (7) 在报告其结果时，应对试验后金属样片的外观变化等现象进行描述。

4 消毒产品毒理学实验技术

4.1 急性经口毒性试验

4.1.1 目的

- (1) 检测消毒剂对实验动物的急性毒性作用和强度。
- (2) 为亚急（慢）性毒性等试验提供剂量选择的依据。

4.1.2 实验动物

小鼠或大鼠任选一种，雌雄各半。小鼠体重 18~22g，大鼠体重 180~220g，根据不同的计算 LD_{50} 方法，选用适当的动物数量，一般每组选用 10 只动物，动物总数不少于 40 只。

4.1.3 试验分组

如应用概率单位-对数图解法计算 LD_{50} ，随机分为 5~6 个剂量组。通常最高剂量组的动物死亡率应 $\geq 90\%$ ，最低剂量组动物死亡率应 $\leq 10\%$ 。可先以较大的组距较少量动物进行预试，找出其粗略致死剂量范围，然后再设计正式试验的剂量分组。

如应用霍恩法，则可先通过预试验找出其粗略致死剂量范围，然后按照 1.0、2.15、4.64 乘以 t^{10} ($t=0, \pm 1, \pm 2, \pm 3$)，或者按照 1.0、3.16 乘以 t^{10} ($t=0, \pm 1, \pm 2, \pm 3$) 的方法设 4~5 个剂量组。

4.1.4 操作程序

- (1) 动物的准备：试验前，一般禁食过夜，不限制饮水。
- (2) 受试物的配制：常以水或食用植物油为溶剂配制成溶液，或采用 0.5%羧甲基纤维素配制成混悬液。灌胃给予受试物的最大容量，小鼠不超过 0.2ml/10g 体重，大鼠不超过 1.0ml/100g 体重。
- (3) 染毒方法：用灌胃方式将受试物一次给予动物。若受试物毒性很低，一次灌胃容量太大，可在 24h 内分成 2~3 次给予，其总剂量作为一日剂量计算。
- (4) 染毒后观察动物的中毒表现和死亡数及死亡时间，并对死亡动物和观察期满处死动物进行尸体解剖，肉眼观察，发现有异常的组织或脏器，尚需进一步作组织病理学检查。观察时间 14 天。

4.1.5 LD_{50} 的计算方法

根据给受试物后 14 天内的各剂量组动物死亡率计算 LD_{50} （半数致死剂量）。

4.1.5.1 概率单位-对数图解法：

(1) 根据各剂量组动物死亡率，从表 4-8 中查各组的概率单位。因死亡率为 0% 和 100% 的概率单位，与所试动物数有关，故需另在表 4-9 中查找。

例如：对死亡率为 45% 的概率单位，可查表 4-8。先在表的左侧纵标目上找到 40，而后在表的上行横标目处找到 5，两者交叉点处的 4.87，即为 45% 的概率单位。

又如：某组用 10 只实验动物，如果全部存活（死亡率为 0%），查表 4-9，其概率单位为 3.004。

表 4-8 百分率-概率单位换算表

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	..	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.001	4.005	4.008	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.003	5.005	5.008	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33

注：横标目数字为死亡率的个位数，纵标目数字为死亡率的十位数。

表 4-9 相应于反应率为 0% 及 100% 的概率单位

该组动物数	反应率		该组动物数	反应率	
	0%	100%		0%	100%
...	...	...	11	3.00	7.00
2	3.85	6.15	12	2.97	7.03
3	3.62	6.38	13	2.93	7.07
4	3.47	6.53	14	2.90	7.10
5	3.36	6.64	15	2.87	7.13
6	3.27	6.73	16	2.85	7.15
7	3.20	6.80	17	2.82	7.18
8	3.13	6.87	18	2.80	7.20
9	3.009	6.91	19	2.78	7.22
10	3.004	6.96	20	2.76	7.24

(2) 用方格纸绘散点图，横轴表示剂量的对数值 (X)，纵轴为概率单位值 (Y)，将各组数值点在图上。

(3) 按各点的分布趋势，用直尺绘出一条最适合于各点的直线，使线上方的点到线的总距离与线下方的点到线的总距离相近，此线应尽量靠近概率单位为 5 的点及附近的点。

(4) 查出求概率单位 5 处的剂量对数，其反对数即为 LD_{50} 。

(5) 按下列公式计算 LD_{50} 的 95% 可信限。

$$S = (X_2 - X_1) / (Y_2 - Y_1)$$

$$S_m = S / (N' / 2)^{-1/2}$$

$$LD_{50} \text{ 对数值的 95\% 可信限} = \log LD_{50} \pm 1.96 S_m$$

(上式结果, 经反对数变换后, 可得 LD_{50} 的 95%可信限)

[Sm 为 LD_{50} 的标准误; S 为标准差; X_1 、 X_2 分别为机率单位等于 4 (Y_1) 和 6 (Y_2) 时相应的剂量对数值; N' 为 Y_1 (=4) 及 Y_2 (=6) 相应的死亡率间所用的动物数。]

4.1.5.2 霍恩 (Horn) 法:

根据各剂量组动物死亡率, 从表 A1 或 A2 查出其相应的 LD_{50} 值和 95%可信限。

表 A1 用于每组 5 只动物, 其剂量递增公比为 $\sqrt[3]{10}$, 意即 $10 \times \sqrt[3]{10} = 21.5$, $21.5 \times \sqrt[3]{10} = 46.4 \dots\dots$, 余此类推。此剂量系列排列如下:

$$\left. \begin{array}{l} 100 \\ 21.5 \\ 4.62 \end{array} \right\} \times 10^t \quad t = 0, \pm 1, \pm 2, \pm 3, \dots\dots$$

表 A1

组 1 组 2 组 3 组 4 或 组 1 组 3 组 2 组 4	剂量 1=0.464 剂量 2=1.00 剂量 3=2.15 剂量 4=4.64 } $\times 10^t$		剂量 1=1.00 剂量 2=2.15 剂量 3=4.64 剂量 4=10.0 } $\times 10^t$		剂量 1=2.15 剂量 2=4.64 剂量 3=10.0 剂量 4=21.5 } $\times 10^t$	
	LD_{50}	可信限	LD_{50}	可信限	LD_{50}	可信限
0 0 3 5	2.00	1.37~2.91	4.30	2.95~6.26	9.26	6.36~13.5
0 0 4 5	1.71	1.26~2.33	3.69		7.94	5.84~10.8
0 0 5 5	1.47	—	2.71~5.001		6.81	—
0 1 2 5	2.00	1.23~3.24	3.16	—	9.26	
0 1 3 5	1.71	1.05~2.78	4.30	2.65~6.98	5.70~15.00	
0 1 4 5	1.47	0.951~2.27	3.69	2.27~5.99	7.94	4.89~12.9
0 1 5 5	1.26	0.926~1.71	3.16	2.05~4.88	6.81	4.41~10.5
0 2 2 5	1.71	1.01~2.91	2.71	2.00~3.69	5.84	4.30~7.94
0 2 3 5	1.47	0.862~2.50	3.69	2.17~6.28	7.94	4.67~13.5
0 2 4 5	1.26	0.775~2.05	3.16	1.86~5.38	6.81	4.00~13.5
0 2 5 5	1.08	0.741~1.57	2.71	1.69~4.41	5.84	3.60~9.50
0 3 3 5	1.26	0.740~2.14	2.33	1.60~3.99	5.001	3.44~7.30
0 3 4 5	1.03	0.665~1.75	2.71	1.59~4.62	5.84	3.43~9.95
1 0 3 5	1.96	1.22~3.14	2.33	1.43~3.78	5.001	
1 0 4 5	1.62	1.07~2.43	4.22	2.63~6.76	3.008~8.14	
1 0 5 5	1.33	1.05~1.70	3.48	2.31~5.24	9.09	5.66~14.6
1 1 2 5	1.96	1.06~3.60	2.87	2.26~3.65	7.50	4.98~11.3
1 1 3 5	1.62	0.866~3.001	4.22	2.29~7.75	6.19	4.87~7.87
1 1 4 5	1.33	0.737~2.41	3.48	1.87~6.49	9.09	4.94~16.7
1 1 5 5	1.10	0.661~1.83	2.87	1.59~5.20	7.50	4.002~16.7
1 2 2 5	1.62	0.818~3.19	2.37	1.42~3.95	6.19	3.42~11.2

1	2	3	5	1.33	0.658~2.70	3.48	1.76~6.37	5.11	3.007~8.51
1	2	4	5	1.10	0.550~2.20	2.87	1.42~5.82	7.50	3.80~14.8
1	3	3	5	1.10	0.523~2.32	2.37	1.19~4.74	6.19	3.005~12.5
2	0	3	5	1.90	1.00~3.58	2.37	1.13~4.99	5.11	2.55~10.2
2	0	4	5	1.47	0.806~2.67	4.008	2.16~7.71	5.11	2.43~10.8
2	0	5	5	1.14	0.674~1.92	3.16	1.74~5.76	8.80	4.66~16.6
2	1	2	5	1.90	0.839~4.29	2.45	1.45~4.13	6.81	3.74~12.4
2	1	3	5	1.47	0.616~3.50	4.008	1.81~9.23	5.28	3.13~8.89
2	1	4	5	1.14	0.466~2.77	3.16	1.33~7.53	8.80	3.89~19.9
2	2	2	5	1.47	0.573~3.76	2.45	1.00~5.98	6.81	2.86~16.2
2	2	3	5	1.14	0.406~3.18	3.16	1.24~8.10	5.28	2.16~12.9
0	0	4	4	1.96	1.18~3.26	2.45	0.875~6.85	6.81	2.66~17.4
0	0	5	4	1.62	1.27~2.05	4.22	2.53~7.02	6.28	1.89~14.8
0	1	3	4	1.96	0.978~3.92	3.48	2.74~4.42	9.09	5.46~15.1
0	1	4	4	1.62	0.893~2.92	4.22	2.11~8.44	7.50	5.90~9.53
0	1	5	4	1.33	0.885~2.01	3.48	1.92~6.30	9.09	4.54~18.2
0	2	2	4	1.96	0.930~4.12	2.87	1.91~4.33	7.50	4.14~13.6
0	2	3	4	1.62	0.797~3.28	4.22	2.00~8.88	6.19	4.11~9.33
0	2	4	4	1.33	0.715~2.49	3.48	1.72~7.06	9.09	4.31~19.1
0	2	5	4	1.10	0.686~1.77	2.87	1.54~5.36	7.50	3.70~15.2
0	3	3	4	1.33	0.676~2.63	2.37	1.48~3.80	6.19	3.32~11.5
0	3	4	4	1.10	0.599~2.02	2.87	1.46~5.67	5.11	3.19~8.19
1	0	4	4	1.90	0.969~3.71	2.37	1.29~4.36	6.19	3.14~12.2
1	0	5	4	1.47	1.02~2.11	4.008	2.09~7.99	5.11	2.78~9.39
1	1	3	4	1.90	0.757~4.75	3.16	2.20~4.54	8.80	4.50~17.2
1	1	4	4	1.47	0.654~3.30	4.008	1.63~10.2	6.81	4.74~9.78
1	1	5	4	1.14	0.581~2.22	3.16	1.41~7.10	8.80	3.51~22.0
1	2	2	4	1.90	0.706~5.009	2.45	1.25~4.79	6.81	3.003~15.3
1	2	3	4	1.47	0.564~3.82	4.008	1.52~11.0	5.28	2.70~10.3
1	2	4	4	1.14	0.454~2.85	3.16	1.21~8.24	8.80	3.28~23.6
1	3	3	4	1.14	0.423~3.005	2.45	0.997~6.13	6.81	2.62~17.7
2	0	4	4	1.78	0.662~4.78	2.45	0.912~6.57	5.28	2.11~13.2
2	0	5	4	1.21	0.583~2.52	3.83	1.43~10.3	5.28	1.97~14.2
2	1	3	4	1.78	0.455~6.95	2.61	1.26~5.42	8.25	3.007~22.2
2	1	4	4	1.21	0.327~4.48	3.83		5.62	2.71~11.7
2	2	2	4	1.78	0.410~7.72	0.980~15.00		8.25	2.11~32.3
2	2	3	4	1.21	0.266~5.52	2.61	0.705~9.66	5.62	1.52~20.8
0	0	5	3	1.90	1.12~3.20	3.83	0.883~16.6	8.25	1.90~35.8
0	1	4	3	1.90	0.777~4.63	2.61	0.573~11.9	5.62	1.23~25.6
0	1	5	3	1.47	0.806~2.67	4.008	2.42~6.89	8.80	5.22~14.8

0	2	3	3	1.90	0.678~5.30	4.008	1.67~9.97	8.80	3.60~21.5
0	2	4	3	1.47	0.616~3.50	3.16	1.74~5.76	6.81	3.74~12.4
0	2	5	3	1.14	0.602~2.15	4.008	1.46~11.4	8.80	3.15~24.6
0	3	3	3	1.47	0.573~3.76	3.16	1.33~7.53	6.81	2.86~16.2
0	3	4	3	1.14	0.503~2.57	2.45	1.30~4.62	5.28	2.79~9.96
1	0	5	3	1.78	0.856~3.69	3.16	1.24~8.10	6.81	2.66~17.4
1	1	4	3	1.78	0.481~6.58	2.45	1.08~5.54	5.28	2.33~11.9
1	1	5	3	1.21	0.451~3.25	3.83	1.85~7.96	8.25	3.98~17.1
1	2	3	3	1.78	0.390~8.11	3.83	1.04~14.2	8.25	2.23~30.5
1	2	4	3	1.21	0.310~4.74	2.61	0.972~7.01	5.62	2.09~15.1
1	3	3	3	1.21	0.279~5.26	3.83	0.840~17.5	8.25	1.81~37.6
						2.61	0.668~10.2	5.62	1.44~22.0
						2.61	0.602~11.3	5.62	1.30~24.4

表 A2 用于每组 5 只动物，其剂量递增公比为 $\sqrt{10}$ ，意即 $10 \times \sqrt{10}=31.6$ ， $31.6 \times \sqrt{10}=100$ ……，余此类推。此剂量系列排列如下：

$$\left. \begin{array}{l} 1.00 \\ 3.16 \end{array} \right\} \times 10^t \quad t=0, \pm 1, \pm 2, \pm 3, \dots$$

表 A2

组 1 组 2 组 3 组 4 或 组 1 组 3 组 2 组 4				剂量 1=0.316 剂量 2=1.00 剂量 3=3.16 剂量 4=10.0 } $\times 10^t$		剂量 1=1.00 剂量 2=3.16 剂量 3=10.0 剂量 4=31.6 } $\times 10^t$	
				LD ₅₀	可信限	LD ₅₀	可信限
0	0	3	5	2.82	1.60~4.95	8.91	5.007~15.7
0	0	4	5	2.24	1.41~3.55	7.08	4.47~11.2
0	0	5	5	1.78	—	5.62	—
0	1	2	5	2.82	1.36~5.84	8.91	4.30~18.5
0	1	3	5	2.24	1.08~4.64	7.08	3.42~14.7
0	1	4	5	1.78	0.927~3.41	5.62	2.93~10.8
0	1	5	5	1.41	0.891~2.24	4.47	2.82~7.08
0	2	2	5	2.24	1.01~4.97	7.08	3.19~15.7
0	2	3	5	1.78	0.801~3.95	5.62	2.53~12.5
0	2	4	5	1.41	0.682~2.93	4.47	2.16~9.25
0	2	5	5	1.12	0.638~1.97	3.55	2.02~6.24
0	3	3	5	1.41	0.636~3.14	4.47	2.01~9.92
0	3	4	5	1.12	0.542~2.32	3.55	1.71~7.35

1	0	3	5	2.74	1.35~5.56	8.66	4.26~17.6
1	0	4	5	2.05	1.11~3.80	6.49	3.51~12.0
1	0	5	5	1.54	1.07~2.21	4.87	3.40~6.98
1	1	2	5	2.74	1.10~6.82	8.66	3.48~21.6
1	1	3	5	2.05	0.806~5.23	6.49	2.55~16.5
1	1	4	5	1.54	0.632~3.75	4.87	2.00~11.9
1	1	5	5	1.15	0.537~2.48	3.65	1.70~7.85
1	2	2	5	2.05	0.740~5.70	6.49	2.34~18.0
1	2	3	5	1.54	0.534~4.44	4.87	1.69~14.1
1	2	4	5	1.15	0.408~3.27	3.65	1.29~10.3
1	3	3	5	1.15	0.378~3.53	3.65	1.20~11.2
2	0	3	5	2.61	1.01~6.77	8.25	3.18~21.4
2	0	4	5	1.78	0.723~4.37	5.62	2.29~13.8
2	0	5	5	1.21	0.554~2.65	3.83	1.75~8.39
2	1	2	5	2.61	0.768~8.87	8.25	2.43~28.1
2	1	3	5	1.78	0.484~6.53	5.62	1.53~20.7
2	1	4	5	1.21	0.318~4.62	3.83	1.00~14.6
2	2	2	5	1.78	0.434~7.28	5.62	1.37~23.00
2	2	3	5	1.21	0.259~5.67	3.83	0.819~17.9
0	0	4	4	2.74	1.27~5.88	8.66	4.003~18.6
0	0	5	4	2.05	1.43~2.94	6.49	4.53~9.31
0	1	3	4	2.74	0.968~7.75	8.66	3.006~24.5
0	1	4	4	2.05	0.843~5.00	6.49	2.67~15.8
0	1	5	4	1.54	0.833~2.85	4.87	2.63~9.01
0	2	2	4	2.74	0.896~8.37	8.66	2.83~26.5
0	2	3	4	2.05	0.711~5.93	6.49	2.25~18.7
0	2	4	4	1.54	0.604~3.92	4.87	1.91~12.4
0	2	5	4	1.15	0.568~2.35	3.65	1.80~7.42
0	3	3	4	1.54	0.555~4.27	4.87	1.76~13.5
0	3	4	4	1.15	0.463~2.88	3.65	1.47~9.10
1	0	4	4	2.61	0.953~7.15	8.25	3.001~22.6
1	0	5	4	1.78	1.03~3.006	5.62	3.27~9.68
1	1	3	4	2.61	0.658~10.4	8.25	2.08~32.7
1	1	4	4	1.78	0.528~5.98	5.62	1.67~18.9
1	1	5	4	1.21	0.442~3.32	3.83	1.40~10.5
1	2	2	4	2.61	0.594~11.5	8.25	1.88~36.3
1	2	3	4	1.78	0.423~7.48	5.62	1.34~23.6
1	2	4	4	1.21	0.305~4.80	3.83	0.966~15.2
1	3	3	4	1.21	0.276~5.33	3.83	0.871~16.8
2	0	4	4	2.37	0.539~10.4	7.50	1.70~33.00

2	0	5	4	1.33	0.446~3.99	4.22	1.41~12.6
2	1	3	4	2.37	0.307~18.3	7.50	0.970~58.0
2	1	4	4	1.33	0.187~9.49	4.22	0.592~30.0
2	2	2	4	2.37	0.262~21.4	7.50	0.830~67.8
2	2	3	4	1.33	0.137~13.00	4.22	0.433~41.0
0	0	5	3	2.61	1.19~5.71	8.25	3.77~18.1
0	1	4	3	2.61	0.684~9.95	8.25	2.16~31.5
0	1	5	3	1.78	0.723~4.37	5.62	2.29~13.8
0	2	3	3	2.61	0.558~12.2	8.25	1.76~38.6
0	2	4	3	1.78	0.484~6.53	5.62	1.53~20.7
0	2	5	3	1.21	0.467~3.14	3.83	1.48~9.94
0	3	3	3	1.78	0.434~7.28	5.62	1.37~23.00
0	3	4	3	1.21	0.356~4.12	3.83	1.13~13.00
1	0	5	3	2.37	0.793~7.10	7.50	2.51~22.4
1	1	4	3	2.37	0.333~16.9	7.50	1.05~53.4
1	1	5	3	1.33	0.303~5.87	4.22	0.958~18.6
1	2	3	3	2.37	0.244~23.1	7.50	0.771~73.00
1	2	4	3	1.33	0.172~10.3	4.22	0.545~32.6
1	3	3	3	1.33	0.148~12.1	4.22	0.467~38.1

4.1.5.3 一次最大限度试验：

如 20 只动物（雌雄各半）一次灌胃剂量 5000mg/kg 体重，在 14 天内又无死亡，可判定 LD_{50} 大于 5000mg/kg 体重。

4.1.5.4 其他方法：也可采用其他方法如寇氏（Karber）法、固定剂量法（Fixed dose method）及上下法（Up and down procedure）等。

4.1.6 评价规定

消毒剂的毒性评价：

$LD_{50} > 5000\text{mg/kg}$ 体重者属实际无毒；

$LD_{50} > 500\text{mg/kg} \sim 5000\text{mg/kg}$ 体重者属低毒；

$LD_{50} > 50\text{mg/kg} \sim 500\text{mg/kg}$ 体重者属中等毒；

$LD_{50} \geq 1\text{mg/kg} \sim 50\text{mg/kg}$ 体重者属高毒；

$LD_{50} < 1\text{mg/kg}$ 体重者属剧毒。

注：为评价消毒剂在实际应用时对人的安全性，当产品原形 $LD_{50} \leq 5000\text{mg/kg}$ 体重时，需增做消毒剂最高应用液浓度 5 倍溶液的急性经口毒性试验，并计算其 LD_{50} 。

4.2 急性吸入毒性试验

4.2.1 目的

检测消毒剂对实验动物的急性吸入毒性作用和强度。

4.2.2 实验动物

小鼠或大鼠任选一种，雌雄各半。小鼠体重为 18~22g，大鼠体重为 180~200g。

4.2.3 操作程序

染毒可采用静式染毒法或动式染毒法。

4.2.3.1 静式染毒法

静式染毒是将实验动物放在一定体积的密闭容器（染毒柜）内，加入一定量的消毒剂，并使其挥发，造成实验需要消毒剂浓度的空气，一次吸入性染毒 2h。

（1）染毒柜的容积以每只染毒小鼠每小时不少于 3L 空气计，每只大鼠不少于 30L 计。

（2）染毒浓度的计算：染毒浓度一般应采用实际测定浓度。在染毒期间一般可测 4-5 次，求其平均浓度。在无适当测试方法时。可用下式计算染毒浓度

$$C = \frac{a \times d}{V} \times 10^6$$

式中：C— 染毒浓度（mg/m³）

a— 加入消毒剂量（ml）

d— 消毒剂比重

V— 染毒柜容积（L）

4.2.3.2 动式染毒法

动式染毒是采用机械通风装置，连续不断地将含有一定浓度消毒剂的空气均匀不断地送入染毒柜，并排出等量的染毒气体，维持相对稳定的染毒浓度。一次吸入性染毒 2h。

（1）消毒剂气化（雾化）和输入的常用方法

1）气体消毒剂，经流量计与空气混合成一定浓度后，直接输入染毒柜。

2）易挥发液体消毒剂，通过空气鼓泡或适当加热促使挥发后输入染毒柜。

3）若消毒剂现场使用采取喷雾法时，可采用喷雾器或超声雾化器使其雾化后输入染毒柜。

（2）染毒浓度计算 染毒浓度一般应采用动物呼吸带实际测定浓度，每半小时一次，取其平均值。若无适当的测试方法，也可采用以下公式计算染毒浓度：

$$C = \frac{a \times d}{V} \times 10^6$$

$$V_1 + V_2$$

式中： C— 染毒浓度 (mg/m³)

a— 气化或雾化消毒剂量 (ml)

d— 消毒剂比重

V₁— 输入染毒柜风量 (L)

V₂— 染毒柜容积 (L)

4.2.3.3 观察和记录染毒过程和观察期内的动物症状和死亡情况。关于染毒浓度的设计、动物分组、观察期限、观察指标和 LC₅₀ (半数致死浓度) 的计算等可参照急性经口毒性试验 (4.1)。

在预试验的基础上, 如 20 只动物 (雌雄各半) 一次 2h 吸入染毒浓度 10000mg/m³, 在 14 天内无死亡, 可判定 LC₅₀ 大于 10000mg/m³。

4.2.4 评价规定

消毒剂的毒性评价:

LC₅₀ 2h 大于 10000mg/m³ 者属实际无毒;

LC₅₀ 2h>1000~10000mg/m³ 者属低毒;

LC₅₀ 2h>100~1000mg/m³ 者属中等毒;

LC₅₀ 2h≥10~100mg/m³ 者属高毒;

LC₅₀ 2h<10mg/m³ 者属剧毒。

4.3 急性经皮毒性试验

4.3.1 目的

(1) 检测消毒剂能否经皮肤吸收及短期作用所产生的毒性反应和强度。

(2) 为亚急 (慢) 性经皮毒性等试验提供剂量选择的依据。

4.3.2 实验动物

首选大鼠, 雌雄各半。体重 200~300g, 根据不同的计算 LD₅₀ 方法, 选用适当的动物数量。

4.3.3 试验分组

根据不同的试验方法进行试验分组的设计。原则上应设 4~6 个剂量组, 每组 10 只动物, 雌雄各半。通常最高剂量组的动物死亡率应≥90%, 最低剂量组动物死亡率应≤10%。可先以较大的组距较少量动物进行预试, 找出其粗略致死剂量范围, 然后再设计正式试验的剂量分组。如果受试物毒性很低, 可采用一次限量法, 即用 20 只动物 (雌雄各半) 皮肤涂抹受试物, 剂量为 5000mg/kg 体重, 如未引起动物死亡, 可考虑不再进行多个剂量的急性经皮毒性试验。

4.3.4 操作程序

(1) 动物的准备：试验前 24h，剪去或剃除动物躯干背部拟染毒区域的被毛，去毛时应小心，避免损伤皮肤。涂皮面积约占动物体表面积的 10%，通常体重为 200~300g 的大鼠涂皮面积为 30~40cm²。

(2) 受试物的配制：常以水或食用植物油为溶剂配制成溶液。

(3) 染毒方法：将受试物均匀涂敷于动物背部皮肤染毒区，然后用一层玻璃纸覆盖，再以纱布和绷带进行固定。封闭接触 24h 后用水或其它适宜的溶液清洗残留受试物。

(4) 染毒后观察动物的中毒表现和死亡数及死亡时间，并对死亡动物和观察期满处死动物进行尸体解剖，肉眼观察，发现有异常的组织或脏器，尚需进一步作组织病理学检查。观察时间 14 天。

4.3.5 LD₅₀ 的计算方法

根据给受试物后 14 天内的各剂量组动物死亡率计算 LD₅₀（半数致死剂量）。计算方法同 4.1.5 的方法。

4.3.6 评价规定

消毒剂的毒性评价：

LD₅₀>5000mg/kg 体重者属实际无毒；

LD₅₀>2000mg/kg~5000mg/kg 体重者属低毒；

LD₅₀>200mg/kg~2000mg/kg 体重者属中等毒；

LD₅₀≤200mg/kg 体重者属高毒；

4.4 皮肤刺激试验

4.4.1 目的

检测消毒剂对实验动物皮肤的刺激/腐蚀作用和强度。

4.4.2 实验动物

每次试验至少需 3 只皮肤完好的健康家兔或豚鼠。

4.4.3 操作程序

4.4.3.1 一次完整皮肤刺激试验

(1) 在试验前 24h，用脱毛剂或剪刀将家兔或豚鼠背部脊柱两侧的毛去掉，不得损伤皮肤。去毛范围，左、右各约 3cm×3cm。

(2) 次日将受试物（浓度一般为皮肤消毒应用液的 5 倍或原液 0.5ml（g）直接滴于面积为 2.5cm×2.5cm 的一侧去毛完整皮肤上，或滴于同样大小的 2~4 层纱布上并敷贴在一侧去毛皮肤表面，然后用一层无刺激塑料膜或油纸覆盖，再用无刺激胶布固定。另一侧去毛皮肤作为空白对

照（或溶剂对照）。敷贴时间为 4h。对于用后清洗的消毒剂，敷用时间至 2h。试验结束后，用温水或无刺激性溶剂除去残留受试物。

（3）分别于去除受试物后 1h、24h 和 48h 观察皮肤局部反应，并按表 2-10 进行刺激反应评分。

4.4.3.2 一次破损皮肤刺激试验

（1）涂受试物前，在 2.5cm×2.5cm 的去毛皮肤上，用 75%酒精清洁、消毒暴露皮肤，待酒精挥发后，用灭菌刀片或注射针头在皮区内划一个“井”形的破损伤口，并在该破损皮区内染毒。注意皮肤破损仅达表皮，不要伤及真皮。

（2）手术前的皮肤准备，手术后受试物涂抹和局部皮肤反应的观察，评分方法同

4.4.3.1。注意鉴别感染和原发性刺激反应的区别，若有感染可疑，应进行重复测试。

4.4.3.3 多次完整皮肤刺激试验

（1）试验前动物皮肤准备同 4.5.3.1（1）。

（2）次日将受试物[浓度同 4.5.3.1（2）]0.5ml（g）涂在一侧皮肤上，另一侧涂溶剂作为对照，在涂抹后 4h，用水或无刺激的适宜溶剂清洗，除去残留物。每天涂抹一次，连续涂抹 14d。在每次涂抹后 24h 观察结果，按表 2-10 评分。为了便于受试物的涂抹和结果观察，必要时应剪毛。对照区的处理方法同试验区。

4.4.4 评价规定

4.4.4.1 一次皮肤刺激试验

在各个观察时间点，按照表 2-10 对动物的皮肤红斑与水肿形成情况进行评分，并分别按时间点将 3 只动物的评分相加，除以动物数，获得不同时间点的皮肤刺激反应积分均值（刺激指数）。取其中最高皮肤刺激指数，按表 2-11 评定该受试物对动物皮肤刺激强度的级别。

4.4.4.2 多次皮肤刺激试验

按下列公式计算每天每只动物平均积分（刺激指数），并以表 2-11 判定皮肤刺激强度。

$$\text{每天每只动物平均积分} = \frac{\Sigma (\text{每只动物 14 天的红斑和水肿总积分})}{\text{受试动物数} \times 14}$$

表 4-10 皮肤刺激反应的评分标准

皮肤刺激反应	皮肤刺激反应评分
红斑形成:	
无	0
勉强可见	1
明显	2
严重	3
紫红色红斑, 并有焦痂	4
水肿形成:	
无	0
勉强可见	1
皮肤隆起, 轮廓清楚	2
水肿隆起约 1mm	3
水肿隆起超过 1mm	4

表 4-11 皮肤刺激强度分级

皮肤刺激指数	刺激强度级别
0~<0.5	无刺激性
0.5~<2.0	轻刺激性
2.0~<6.0	中等刺激性
6.0~8.0	强刺激性

4.5 急性眼刺激试验

4.5.1 目的

检测消毒剂对实验动物眼睛的急性刺激和腐蚀作用。

4.5.2 实验动物

使用 3 只家兔。试验前检查家兔双眼, 有异常者不能用于试验。

4.5.3 操作程序

(1) 受试物一般为黏膜或空气消毒应用液的 5 倍浓度的溶液或原液。吸取受试物 0.1ml, 滴入家兔一侧眼结膜囊内。另一侧眼以生理盐水作为正常对照。

(2) 滴受试物后, 将眼被动闭合 4s, 30s 后用生理盐水冲洗。于滴眼后 1h、24h、48h、72h、7d、14d 和 21d, 肉眼观察家兔眼结膜、虹膜和角膜的损伤与恢复情况。如果 72h 内未出现刺激反应, 或第 7 天或第 14 天, 眼睛刺激反应完全恢复, 即可提前终止试验。必要时, 用 2% 荧光素钠溶液或裂隙灯、放大镜检查角膜及虹膜变化。

4.5.4 评价规定

按表 2-12 对家兔眼角膜、虹膜和结膜的急性刺激反应进行评分, 并分别计算每只动物在三个不同观察时间(24h、48h 和 72h)的角膜损害、虹膜损害、结膜充血和结膜水肿四方面的“平均评分”(即每只动物的 24h、48h 和 72h 评分之和除以观察数 3)。分别以动物眼角膜、虹膜和

结膜充血、水肿的平均评分和恢复时间，按表 2-13、2-14 眼刺激反应分级标准判定受试物对眼睛的刺激强度。

表 4-12 家兔急性眼刺激反应的评分标准

眼损害表现	评 分
角膜损害:	
无溃疡形成或混浊	0
散在或弥漫性混浊，虹膜清晰可见	1
半透明区易分辨，虹膜模糊不清	2
出现灰白色半透明区，虹膜细节不清，瞳孔大小勉强可见	3
角膜不混浊，虹膜无法辨认	4
虹膜损害:	
正常	0
皱褶明显加深，充血、肿胀、角膜周围有中度充血，瞳孔对光仍有反应	1
出血、肉眼可见破坏，或瞳孔对光无反应	2
结膜（睑结膜、球结膜）充血	
血管正常	0
血管充血呈鲜红色	1
血管充血呈深红色，血管不易分辨	2
弥漫性充血呈紫红色	3
结膜（睑结膜、球结膜）水肿	
无水肿	0
轻微水肿（包括瞬膜）	1
明显水肿，伴有部分眼睑外翻	2
水肿至眼睑近半闭合	3
水肿至眼睑大半闭合	4

表 4-13 眼刺激性反应分级标准

可逆性损伤	无刺激性	3 只动物的平均评分：角膜损害<1、虹膜损害<1、结膜充血<2 和结膜水肿<2 或 3 只动物中至少有 2 只动物的平均评分符合上述标准。另外 1 只动物的刺激反应在 21 天内完全恢复。
	轻刺激性	3 只动物中有 2 只动物的平均评分：角膜损害≥1；虹膜损害≥1；结膜充血≥2；结膜水肿≥2，且 7 天内全部动物的刺激反应完全恢复。
	刺激性**	3 只动物中有 2 只动物的平均评分：角膜损害≥1；虹膜损害≥1；结膜充血≥2；结膜水肿≥2，且 21 天内全部动物的刺激反应完全恢复。
不可逆性损伤	腐蚀性***	至少有 1 只动物的角膜、虹膜或结膜的刺激反应在 21 天的观察期内未完全恢复或/和在 3 只动物中有 2 只动物的平均评分：角膜损害≥3；虹膜损害≥1.5。

注：完全恢复是指动物的眼刺激反应评分：角膜损害=0，虹膜损害=0，结膜充血=0 或 1，
结膜水肿=0 或 1。

** 刺激性：接触受试物后所产生的可逆性炎性反应。

*** 腐蚀性：接触受试物后所产生的不可逆性组织损伤。

表 4-14 眼刺激性反应分级标准

平均评分	动物数（只）	恢复时间（天）*	损伤类型	
角膜损害<1 和 虹膜损害<1 和 结膜充血<2 和 结膜水肿<2	≥2	≤21	可 逆 性 损 伤	无刺激性
角膜损害≥1 或 虹膜损害≥1 或 结膜充血≥2 或 结膜水肿≥2	≥2	≤7		轻刺激性
		≤21		刺激性
角膜损害≥3 或 虹膜损害≥1.5	≥2		不 可 逆 性 损 伤	腐蚀性**
角膜损害≥1 或 虹膜损害≥1 或 结膜充血≥1 或 结膜水肿≥1	≥1	>21		

*:恢复时间:为动物刺激反应评分恢复至角膜损害=0,虹膜损害=0,结膜充血=0 或 1,结膜水肿=0 或 1 的时间。

**：腐蚀性：至少有 1 只动物于 21d 尚存在角膜粘连或血管翳，也可判为腐蚀性。

4.6 阴道黏膜刺激试验

4.6.1 目的

检测消毒剂对实验动物阴道黏膜的刺激作用和强度。

4.6.2 实验动物

选用健康、初成年的雌性白色家兔，同一品系，体重 2.0~2.5kg。试验前应检查动物阴道口有无分泌物、充血、水肿和其它损伤情况。如有炎症或（和）损伤，应弃用。最好选择未交配的动物的进行试验。

4.6.3 试验分组

分为染毒组和对照组，每组 3 只。

4.6.4 操作程序

（1）稀释使用的消毒剂采用黏膜消毒时应用液 5 倍浓度的溶液作为受试液。若应用液为原液的消毒剂则用原液作受试液。对照组采用生理盐水。

（2）将长度为 8cm 左右的钝头软管与 2ml 的注射器连接。注射器和导管注满受试液备用。每只动物各准备一套。

(3) 一次阴道黏膜刺激试验的染毒方法：将动物仰面固定，暴露出会阴和阴道口。将导管用受试液或对照液湿润后轻柔地插入阴道（4cm~5cm），并用注射器缓慢注入 2ml 受试液，抽出导管，完成染毒。对照组动物用生理盐水作同样处理。

(4) 多次阴道黏膜刺激试验的染毒方法：按上述 4.7.4 (3) 的染毒方法，每隔 24h 重复染毒一次，连续 5 天。对照组动物用生理盐水作同样处理。

(5) 由于动物阴道容积的个体差异，有时受试液注入后可能有溢出，可用消毒棉或软纸拭去。

(6) 末次染毒后 24h，采用气栓法处死动物，剖腹取出完整的阴道，纵向切开，肉眼观察是否有充血、水肿等表现，供病理取材时参考。然后将阴道放入 10%福尔马林溶液中固定 24h 以上，选取阴道的两端和中央三个部位的组织制片，HE 染色后，进行组织病理学检查。

4.6.5 结果评价

- (1) 组织病理学检查结果，按表 2-15 规定对阴道黏膜的刺激反应进行评分。
- (2) 将试验组 3 只动物三个部位的刺激反应积分相加后，再除以观察总数（动物数×3），得出试验组阴道黏膜刺激反应的平均积分，最大记分为 16（见表 4-15）。对照组评分方法同上。
- (3) 将试验组平均积分减去对照组平均积分得出刺激指数后，按表 4-16 进行刺激强度分级。
- (4) 当对照组动物阴道黏膜刺激反应平均积分大于 9 时，应采用 6 只动物进行复试，以鉴别是否与操作损伤有关。

表 4-15 阴道黏膜刺激反应评分标准

阴道组织反应	反应评分
A. 上皮组织	
完整—正常	0
细胞变性或变扁平	1
组织变形	2
局部糜烂	3
广泛糜烂或溃疡	4
B. 白细胞浸润（每个高倍视野）	
无	0
极少 <25 个	1
轻度 25~50 个	2
中度 51~100 个	3
重度 >100 个	4
C. 血管充血	
无	0
极少	1
轻度	2

中度	3
重度伴血管破裂	4
D. 水肿	
无	0
极少	1
轻度	2
中度	3
重度	4

刺激反应积分=A+B+C+D

表 4-16 阴道黏膜刺激强度分级

阴道黏膜刺激指数	阴道黏膜刺激反应强度
<1	无
1~<5	极轻
5~<9	轻度
9~<12	中度
≥12	重度

4.7 皮肤变态反应试验

4.7.1 目的

检测消毒剂重复接触后，实验动物产生皮肤变态反应的可能性及其强度。

4.7.2 实验动物

选用皮肤完好的健康白色豚鼠，雌雄各半，体重 200-300g。

4.7.3 试验分组

将豚鼠随机分为试验组、阴性对照组和阳性对照组，每组动物至少 16 只。

4.7.4 操作程序

(1) 对试验组豚鼠，给予受试物诱导和激发处理。阳性对照组给予阳性致敏物（如：2，4-二硝基氯苯）诱导和激发处理。阴性对照组仅给以受试物激发处理。

(2) 诱导处理浓度允许引起皮肤轻度刺激反应。激发浓度可低于诱导浓度，并不得引起原发性刺激反应。如果原液不引起皮肤刺激反应，诱导和激发均使用原液。

(3) 于试验前 24h 将豚鼠背部左侧 3cm×3cm 范围内去毛。取诱导浓度的消毒剂溶液（或原液）0.5ml（g），直接涂在 2cm×2cm 左侧去毛皮肤上或滴于同样大小的 2-4 层纱布上，再将其敷贴在左侧去毛区。用一层无刺激塑料膜或油纸复盖，再以无刺激胶布固定，持续 6h。第 7 天和第 14 天以同样方法重复一次。

(4) 在末次诱导后 14 天，将激发浓度的消毒剂溶液 0.5ml（g）直接涂在 2cm×2cm 右侧脱

毛皮肤上或滴于同样大小的 2-4 层纱布上，敷贴于豚鼠背部右侧 3cm×3cm 去毛区。然后，用一层塑料膜或油纸和无刺激胶布固定，6h 后将敷贴的受试物洗去。24h 和 48h 后观察皮肤反应，按表 4-17 对皮肤反应进行评分。

(5) 实验室开展皮肤变态反应试验初期，或使用新的动物种属或品系时，需同时设阳性对照组，阳性对照物可使用 2, 4-二硝基氯代苯。为保证试验方法的可靠性，在进行该类试验时，每隔半年应使用阳性对照物检查一次。若检测报告中需用非本次阳性对照组的实验数据时，应注明其实验日期。阳性对照组的操作程序同试验组，以阳性致敏物替代受试物。

(6) 阴性对照组，仅对动物给予受试物的激发接触，每次试验必须设置。

4.7.5 评价规定

化学物质引起的过敏性接触性皮炎，属迟发型变态反应。对于动物，仅见皮肤红斑和水肿。

根据表 2-17 标准，将出现皮肤反应（评分≥1）的动物数除以该组实验动物数，求得致敏率（%），按表 2-18 评定致敏强度。

表 4-17 皮肤反应的评分标准

皮肤反应	评分
A 红斑形成:	
无红斑	0
轻微红斑	1
中度红斑	2
严重红斑	3
水肿性红斑	4
B 水肿形成:	
无水肿	0
轻度水肿	1
中度水肿	2
严重水肿	3

表 2-18 致敏强度分级标准

致敏率 (%)	致敏强度
0~8	极轻度
9~28	轻度
29~64	中度
65~80	强度
81~100	极强度

注：致敏率为 0%时，可判为未见皮肤变态反应。

4.8 亚急性经口毒性试验

4.8.1 目的

(1) 检测消毒剂多次接触对实验动物的蓄积毒性作用及其靶器官，并确定其最大未观察到有害作用剂量和最小观察到有害作用剂量。

(2) 为亚慢性、慢性毒性或致癌试验的剂量设计提供依据。

4.8.2 实验动物

一般用啮齿类动物，经口染毒首选大鼠，所用大鼠应为 6~8 周龄，每组至少 10 只，雌雄各半。

4.8.3 试验分组

将实验动物随机分为 4 组（3 个剂量组和 1 个对照组）。选择受试物剂量时，高剂量组应出现明显的毒性反应，但不引起死亡，如果出现动物死亡应不超过 10%；中间剂量组应可观察到轻微的毒性效应；低剂量组应不引起任何毒性效应（属未观察到有害作用剂量）。至于具体的剂量设计，可考虑高剂量为 LD_{50} 的 $1/5 \sim 1/10$ ，高、中、低 3 个剂量间的组距以 3~5 倍为宜，最低不小于 2 倍。对于 $LD_{50} > 5000\text{mg/Kg}$ 的消毒剂，高剂量应用 1000mg/Kg 。另以受试物溶剂代替受试物进行试验，作为阴性（溶剂）对照组。

4.8.4 操作程序

- （1）采用灌胃方式经口染毒。
- （2）灌胃法每天灌胃一次，每周称体重，并按体重调整受试物的给予量。
- （3）试验期为 28 天，末次染毒后 24h 处死实验动物，检测各项观察指标。

4.8.5 观察指标

可因消毒剂毒理作用不同而有差异，一般应包括下列各方面。

- （1）临床检查。观察动物中毒表现，每周称量体重一次。
- （2）血液学检查。包括血红蛋白含量、红细胞数、白细胞数及其分类计数等。
- （3）血液生物化学检查。例如天冬氨酸氨基转移酶、丙氨酸氨基转移酶、尿素氮、肌酐、血清总蛋白和白蛋白、总胆固醇等。必要时，可根据所观察到的受试物毒性效应，或与受试物化学结构相似物质的毒性作用，选择其他一些生化指标。
- （4）脏器重量。测量肝、肾重量，并计算其脏器重量系数。
- （5）病理学检查。实验结束时，处死所有动物，进行全面的肉眼尸检，并将尸检发现的异常组织和主要脏器和组织（如心、肺、肝、肾、脾、脑、肾上腺、睾丸、卵巢和胃肠等）固定保存。当各剂量组动物尸检未发现明显病变，先进行高剂量组和阴性对照组动物的肝、肾、胃肠和其它可能受损的脏器的组织病理学检查。如大体解剖发现异常或高剂量组动物组织病理学检查发现病变，还应对中、低剂量组动物相应的器官进行组织病理学检查。

4.8.6 评价规定

将各试验组动物观察指标与阴性对照组加以比较，并对进行差异统计学检验，注意各剂量组间的剂量-反应（效应）关系。评定受试物的最小观察到有害作用剂量和最大未观察到有害作

用剂量及毒性作用的靶器官。

4.9 亚急性经皮毒性试验

4.9.1 目的

(1) 检测消毒剂多次接触对实验动物的蓄积毒性作用及其靶器官，并确定其最大未观察到有害作用剂量和最小观察到有害作用剂量。

(2) 为亚慢性、慢性皮肤毒性或致癌试验的剂量设计提供依据。

4.9.2 实验动物

一般用啮齿类动物，经皮染毒应选择与急性经口毒性试验同一品系的动物，首选大鼠，所用大鼠应为 6~8 周龄，每组至少 10 只，雌雄各半。

4.9.3 试验分组

将实验动物随机分为 4 组（3 个剂量组和 1 个对照组）。受试物剂量设计应参考急性经皮毒性试验的结果，高剂量组应出现明显的毒性反应，但不引起过多死亡，如果出现动物死亡应不超过 10%；中间剂量组应可观察到轻微的毒性效应；低剂量组应不引起任何毒性效应（属未观察到有害作用剂量）。至于具体的剂量设计，可考虑高剂量为经皮 LD_{50} 的 $1/5 \sim 1/10$ ，高、中、低 3 个剂量间的组距以 3~5 倍为宜，最低不小于 2 倍。如果受试物引起严重的皮肤刺激反应，则应降低受试物的浓度。对于经皮 $LD_{50} > 5000\text{mg/Kg}$ 的消毒剂，高剂量应用 1000mg/Kg 。另以受试物溶剂代替受试物进行试验，作为阴性（溶剂）对照组。

4.9.4 操作程序

(1) 染毒前 24h，将动物背部染毒区的被毛剪掉或剃除，面积不少于动物体表面积的 10%。剪毛时应注意避免损伤动物的皮肤。实验开始后，每周至少对染毒部位去毛一次。

(2) 受试物应均匀地涂敷于整个染毒区域，可以用玻璃纸和无刺激性胶带将受试物固定，以保证受试物与动物皮肤有良好的接触，并防止动物舔食。

(3) 染毒时间为连续 28 天，末次染毒后 24h 处死实验动物，检查各项观察指标。

4.9.5 观察指标

可因消毒剂毒理作用不同而有差异，一般应包括下列各方面。

(1) 临床检查。观察动物中毒表现，每周称量体重一次。对于经皮染毒的动物，应注意观察皮肤反应。

(2) 血液学检查。包括血红蛋白含量、红细胞数、白细胞数及其分类计数等。

(3) 血液生物化学检查。例如天冬氨酸氨基转移酶、丙氨酸氨基转移酶、尿素氮、肌酐、血清总蛋白和白蛋白、总胆固醇等。必要时，可根据所观察到的受试物毒性效应，或与受试物化学结构

相似物质的毒性作用，选择其他一些生化指标。

(4) 脏器重量。测量肝、肾重量，并计算其脏器重量系数。

(5) 病理学检查。实验结束时，处死所有动物，进行全面的肉眼尸检，并将尸检发现的异常组织和主要脏器和组织（如心、肺、肝、肾、脾、脑、肾上腺、睾丸、卵巢和胃肠等）固定保存。除上述脏器组织外，还应取染毒部位的皮肤组织进行固定。当各剂量组动物尸检未发现明显病变，先进行高剂量组和阴性对照组动物的肝、肾、胃肠和其它可能受损的脏器的组织病理学检查。如大体解剖发现异常或高剂量组动物组织病理学检查发现病变，还应对中、低剂量组动物相应的器官进行组织病理学检查。

4.9.6 评价规定

将各试验组动物观察指标与阴性对照组加以比较，并对进行差异统计学检验，注意各剂量组间的剂量-反应（效应）关系。评定受试物的最小观察到有害作用剂量和最大未观察到有害作用剂量及毒性作用的靶器官。

4.10 致突变试验

4.10.1 L5178Y 细胞基因突变试验

4.10.1.1 目的

检测消毒剂对体外培养的哺乳动物细胞的基因突变作用，以作为评价消毒剂致突变性的依据。

4.10.1.2 试剂

(1) F_{10P} 培养液：为完全培养液。以 Fischer 或 RPMI1640 培养液，加入马血清 10%，丙酮酸钠 $220 \mu\text{g/ml}$ ，青霉素 100IU/ml 和链霉素 $100 \mu\text{g/ml}$ 配制而成 ($\text{pH}7.2\sim7.4$)。于 4°C 冰箱中保存备用。

(2) F_0P 培养液：为无血清培养液。以 Fischer 或 RPMI1640 培养液，加入丙酮酸钠 $220 \mu\text{g/ml}$ ，青霉素 100IU/ml 和链霉素 $100 \mu\text{g/ml}$ 等配制而成 ($\text{pH}7.2\sim7.4$)。于 4°C 冰箱中保存备用。

(3) 马血清：将过滤除菌后的马血清，经 56°C 作用 30min 灭活补体。分装后，于 -20°C 保存备用。

(4) 集落用培养基：用 Fischer 或 RPMI1640 培养液，加入马血清 20%、丙酮酸钠 $220 \mu\text{g/ml}$ 、琼脂 0.37% 配制而成。

(5) 无钙镁磷酸盐缓冲液（无钙镁 PBS， $\text{pH}7.2\sim7.4$ ）：

磷酸二氢钾 (KH_2PO_4) 0.20g

磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 2.89g

氯化钾 (KCl)	0.20g
氯化钠 (NaCl)	8.00g
双蒸水 (压力蒸汽灭菌)	1000ml

(6) 受试物:最好能直接溶于 F_{10P} 与 F_{0P} 培养液中。否则需先溶于二甲基亚砜 (DMSO), 而后再加于上述培养液内。所加 DMSO 的量应低于 1% (V/V)。

(7) 阳性对照物:选用甲基磺酸乙酯(EMS), 丝裂霉素 C(MMC), 甲基硝基亚硝基胍 (MNNG), 苯并(a) 芘 (BaP) 等。

(8) 三氟胸苷 (TFT):用生理盐水配成 $100 \mu\text{g/ml}$ 溶液, 可冻存 3 个月。

(9) 肝微粒体酶混合液 (S9 混合液):取健康的雄性成年 SD 或 Wistar 大鼠, 体重 150g 左右, 约 5~6 周龄。将多氯联苯 (Aroclor 1254), 溶于玉米油中, 浓度 200mg/ml, 按 500mg/kg 体重一次腹腔注射。5 天后, 断头处死动物, 取出肝脏称重后, 用预冷的 0.15mol/L 氯化钾溶液冲洗肝脏数次。每克肝 (湿重) 加 0.15mol/L 氯化钾溶液 3ml。剪碎肝脏, 在冰浴中用玻璃匀浆器制成肝匀浆。以上操作需注意无菌和局部冷环境。

将肝匀浆用低温 ($0\sim4^{\circ}\text{C}$) 高速离心机, 以 9000g 离心 10min。取上清液即为 S9, 分装于无菌冷冻安瓿中。S9 制成后, 需进行无菌检查, 以及用间接致癌物鉴定其活性。合格者置 -80°C 或液氮中储存备用, 储存期不超过一年。

S9 混合液应以上述 S9 液在临用时按无菌要求配制。一般配成含 10% S9 的混合液。其配方如下:

S9	0.10ml
1.65mol/L 氯化钾 + 0.4 mol/L 氯化镁	0.04ml
葡萄糖-6-磷酸. 2Na	1.8mg
氧化型辅酶 II (NADP)	3.1mg
用 F_{0P} 培养液补足至	1.0ml

4.10.1.3 细胞

试验以小鼠淋巴瘤 L5178Y 细胞[胸苷激酶 (TK) 座位为杂合子 (tk^{+}/tk^{-})] 检测 TK 基因的突变。为减少细胞的自发突变率, 在制备该细胞试验用悬液时, 先将其在加有 THMG 的 F_{10P} 培养液中培养 24h, 杀灭培养液中所存在的自发突变细胞 (tk^{-}/tk^{-}), 然后将细胞悬浮于 THG 培养液 (不含氨甲喋呤的 THMG 培养液) 中培养 1~3 天。

[THMG 含下列 4 种成分, 各成分的终末浓度如下:

胸苷	$5 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$
----	----------------------------------

次黄嘌呤 5×10^{-5} mol/L

氨甲喋呤 4×10^{-7} mol/L

甘氨酸 1×10^{-4} mol/L]

4.10.1.4 试验分组

一般设 4 个剂量组。对有细胞毒性的受试物，最高剂量组的细胞存活率为 10~20%，无细胞毒性受试物最高剂量不超过 10mmol/L 或 5mg/ml。同时应有阴性（溶剂）对照组、未处理对照组和阳性对照组。除未处理对照组外，试验组和其它对照组，还均应包括有加 S9 混合液和不加 S9 混合液两大部分。

4.10.1.5 操作程序

（1）细胞准备：将新清除了自发突变体的细胞群体，用 F_{10P} 培养液制成悬液。以无菌烧瓶加入细胞悬液和 F_{10P} 培养液至 100 ml，细胞终末密度为 $7 \times 10^3 \sim 8 \times 10^3$ 个/ml。培养物以含 5%二氧化碳的空气充气后，加盖密闭，于 37℃ 进行培养。L5178Y 细胞的细胞殖周期约为 10~11h，在常规培养 24h 后，细胞数将增加约 5 倍。用稀释法维持生长，每天将细胞培养物用 F_{10P} 培养液作 4 倍稀释（或隔天用 F_{10P} 培养液作 24 倍稀释），继续培养。实验前一天用 F_{10P} 培养液和 F_{0P} 培养液各 50% 的对半混合液（马血清终末浓度为 5%）稀释。

（2）受试物处理：用上述 F_{10P} 和 F_{0P} 的对半混合液将细胞培养物稀释至 1×10^6 个/ml，并分种于 50ml 有盖试管中，每管 6ml，再加 S9 混合液 4ml（总量共 10ml）。不加 S9 混合液管，代之以 F_{0P} 培养液。在上述试管内加入一定浓度的受试物，并以含 5%二氧化碳的空气充气后加盖密闭，于 37℃ 培养 4h。

处理结束后，以 200g 离心 10min，除去含受试物的上清液，收集细胞。细胞用 Hanks 液洗涤，再加入 20ml F_{10P} 培养液充分混悬（细胞浓度为 0.3×10^6 个/ml），以含 5%二氧化碳的空气充气后，加盖密闭，于 37℃ 振荡培养，开始表达。

（3）表达：细胞的表现型表达时间为 2 天。表达开始后 24 和 48h 经计数后将细胞稀释至 3×10^5 个/ml。

（4）选择和集落化：表达结束后，取 10ml 培养物经离心后除去大部分上清液。并将细胞在留下的约 1ml F_{10P} 培养基中混悬。将细胞悬液移入含 100ml 集落培养基的烧瓶中。此时细胞密度为 3×10^4 个/ml。在 37℃ 振荡培养 30min。取出 0.5ml 后，向余下的细胞悬液中加入 1.0ml TFT 贮存液，继续振荡培养 15min。将样本取出，倒于 3 个 10cm 平皿中，每平皿 33ml，含 1×10^6 个细胞（称为 TFT 平板），作突变体的选择。将先前取出的 0.5ml 细胞悬液用集落培养基先作 1:100 稀释，细胞悬液浓度为 3×10^2 个/ml。振荡培养 15min 后，取出 2.0ml 再用集落培养基作 1:50

稀释（此时细胞悬液浓度为 6 个/ml）后振荡培养。经 15min 培养后，倒入 3 个直径为 100mm 的平皿中，每平皿 33ml，含细胞 200 个（称为 VC 平板）。待琼脂凝固后，置二氧化碳培养箱（37℃）中静置培养 10 天。计数各个平皿中出现的集落数，计算集落形成效率（CFE）。

（5）阳性与阴性对照组的操作程序同试验组，仅阳性对照组用阳性对照物代替受试物，阴性（溶剂）对照组用受试物溶剂代替受试物。另设一未处理对照组。

（6）按下列公式计算有关指标：

绝对 CFE = （形成集落数 / 接种细胞数）

相对 CFE = （试验组绝对 CFE / 溶剂对照组绝对 CFE）× 100%

突变频率（MF）= （TFT 平皿集落数 / VC 平皿集落数）× 稀释系数

[在此，稀释系数为 2×10^{-4} 。]

4.10.1.6 评价规定

（1）对 L5178Y 细胞，推荐可接受的自发突变频率范围为 $20 \sim 100/10^6$ 个存活细胞。

（2）用适当的显著性检验方法进行统计学处理，当各剂量组 MF 与阴性（溶剂）对照组者相比突变率，有显著性意义的增加，并呈剂量-反应关系时，或仅一个剂量组有统计学意义的增加并经重复试验证实者，均可判为阳性结果，即受试物对 L5178Y 细胞 TK 系统有致突变性。

4.10.2 V79 细胞基因突变试验

4.10.2.1 目的

检测消毒剂对体外培养的哺乳动物细胞可否引起基因突变，以对消毒剂的致突变性做出评价。

4.10.2.2 试剂

（1）完全培养液：以 Eagle 最低必需培养液（EMEM）或 RPMI1640 培养液加 10% 小牛血清、青霉素（100IU/ml）和链霉素（100 μg/ml）配制而成。

（2）小牛血清：将过滤除菌后的小牛血清放入 56℃ 水浴中，保温 30min 以灭活补体，而后分装，保存于 -20℃ 备用。

（3）无钙镁磷酸盐缓冲液（无钙镁 PBS）：见 4.10.1.2（5）。

（4）胰蛋白酶-EDTA 溶液：分别用无钙镁 PBS 配制胰蛋白酶与 EDTA 溶液，胰蛋白酶溶液浓度为 0.05%，EDTA 溶液浓度为 0.02%。两溶液按 1:1 混合。存放于 -20℃ 备用。

（5）受试物：最好能直接溶于无血清培养液内。否则，需先溶于二甲基亚砜（DMSO），而后加于无血清培养液内。所加 DMSO 溶液量为 0.5%（V/V）。

（6）阳性对照物：可根据受试物的性质和结构选用不同的阳性对照物，例如甲基磺酸乙酯

(EMS), 丝裂霉素 C (MMC), 甲基硝基亚硝基胍 (MNNG), 苯并 (α) 芘 (BaP) 等。

(7) 6-硫代鸟嘌呤 (6-TG): 用 0.5% 碳酸氢钠溶液配制为 1.0mg/mL 溶液, 保存于 4℃ 备用。

(8) 肝微粒体酶混合液 (S9 混合液): 见 4.10.1.2 (9)。

(9) 姬姆萨染液: 取姬姆萨染料 3.8g, 置玛瑙乳钵中, 加少量甲醇研磨。逐渐加甲醇至 375ml, 待完全溶解后, 再加 125ml 甘油, 放入 37℃ 温箱中保温 48h。保温期间振摇数次, 使充分溶解。取出过滤, 两周后使用, 作为姬姆萨染液原液。

使用时, 取 1 份姬姆萨染液原液, 与 9 份 1/15mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH6.8) 混合, 配成其应用液。

磷酸盐缓冲液 (1/15mol/L, pH6.8) 配制方法如下:

第一液: 取磷酸氢二钠 9.47g 溶于蒸馏水 1000ml 中, 配成 1/15mol/L 溶液。

第二液: 取磷酸二氢钾 49.07g 溶于蒸馏水 1000ml 中, 配成 1/15mol/L 溶液。

取第一液 49.5ml 加于第二液 50.5ml 中混匀, 即为 pH6.8 的 1/15mol/LPBS。

4.10.2.3 细胞

以中国仓鼠肺 (V79) 细胞株进行试验。为减少其自发突变, 正式试验前将野生型细胞接种于含 THMG (见 4.10.1.3) 的 MEM 培养液内并在二氧化碳培养箱中培养一周, 以杀灭自发 HGPRT 位点突变体。遂后重新接种于 MEM 培养液中。

4.10.2.4 试验分组

一般设 4 个试验剂量组。对有细胞毒性的受试物, 最高剂量组的细胞存活率为 10%~20%, 无细胞毒性受试物最高剂量不超过 10mmol/L (或 5mg/ml)。同时, 应设阴性 (溶剂) 对照组、未处理对照组和阳性对照组。除未处理对照组外, 各组均应包括加 S9 混合液和不加该液的样本。

4.10.2.5 操作程序

(1) 细胞准备: 将 5×10^5 个细胞接种于含完全培养液的直径为 100mm 的平皿中, 除未处理对照组外, 每组二皿共 13 皿。于二氧化碳培养箱中 (37℃) 培养 24h。

(2) 接触受试物: 吸去上述供试培养皿中的培养液, 用无钙镁 PBS 洗 2 次。将含有细胞的培养皿分为二大组, 一组加 S9 混合液, 另一组不加 S9 混合液。加 S9 混合液组, 在培养皿中加入 2ml S9 混合液, 对不加 S9 混合液组, 则用 2ml 无血清培养液代替, 再加一定量不同浓度受试物的供试液, 最后用不含血清的培养液补足至 10ml。并将培养皿置 CO₂ 培养箱中培养 5h, 处理结束后, 吸去培养皿中液体部分, 用无钙镁 PBS 洗涤细胞 2 次, 再加入完全培养液 10ml, 在 CO₂ 培养箱中培养 19~22h。阳性和阴性 (溶剂) 对照组也分加与不加 S9 混合液两大组, 操作方法同

上。

(3) 表达: 将培养物用胰蛋白酶-EDTA 消化。待细胞脱落后, 加入完全培养液, 终止消化。混匀、计数并进行表达和细胞毒性测定[见 4.10.2.5 (4)]。表达时, 以 5×10^5 个细胞接种于直径为 100mm 的平皿中。培养 3 天后, 分传一次, 仍接种 5×10^5 个细胞, 培养 3 天后再进行突变体的选择及集落形成效率 (CFE) 的测定。

(4) 细胞毒性测定: 将上述消化计数后的细胞, 每平皿接种 200 个, 每组 5 个平皿, 于二氧化碳培养箱内 (37°C) 培养 7d。取出样本, 固定并进行姬姆萨染色后, 计数各平皿的细胞集落数。以相对 CFE 值表示细胞的毒性。

(5) 突变体的选择及集落形成率的测定: 表达结束后, 消化细胞, 分别接种, 每组 5 个平皿, 每平皿种 2×10^5 个细胞。待细胞贴壁后加入 6-TG, 终末浓度为 $5 \mu\text{g/ml}$ 。放入二氧化碳培养箱培养 7~10 天。固定后进行姬姆萨染色, 计数平皿内集落数, 并计算其突变频率 (MF)。

(6) 阳性与阴性对照组的操作程序同试验组, 仅阳性对照组用阳性对照物代替受试物, 阴性 (溶剂) 对照组用受试物溶剂代替受试物。另设一阴性 (未处理) 对照组。

(7) 按下列公式计算有关指标:

绝对 CFE = (形成集落数/接种细胞数)

相对 CFE = (试验组绝对 CFE/溶剂对照组绝对 CFE) $\times$ 100%

突变频率 (MF) = (突变集落数/接种细胞数) $\times$ (1/绝对 CFE)

4.10.2.6 评价规定

(1) 对 V79 细胞, 推荐可接受的自发突变频率范围为 $10 \sim 100/10^6$ 个存活细胞。

(2) 用适当的显著性检验方法进行统计学处理, 当各剂量组 MF 与阴性 (溶剂) 对照组者相比, 突变率有显著性意义的增加, 并呈剂量-反应关系时, 或仅一个剂量组有统计学意义的增加并经重复试验证实者, 均可判为阳性结果, 即受试物对 V79 细胞 HGPRT 系统有致突变性。

4.10.3 体外哺乳动物细胞染色体畸变试验

4.10.3.1 目的

用细胞遗传学方法检测体外培养的哺乳动物细胞染色体畸变, 评价消毒剂的致突变性。

4.10.3.2 试剂

(1) 完全培养液: 采用 Eagle 最低必需培养液 (EMEM) 或 Dulbecco 最低必需培养液 (DMEM) 等, 并加入 10% 小牛血清以及青霉素 (100IU/ml) 和链霉素 ($100 \mu\text{g/ml}$)。

(2) 小牛血清: 将过滤除菌后的小牛血清, 放入 56°C 恒温水浴中, 保温 30min 灭活补体。处理后分装, 保存于 -20°C 备用。

(3) 无钙镁磷酸缓冲液[无钙镁 PBS, pH7.2~7.4。见 4.10.1.2 (5)]。

(4) 胰蛋白酶-EDTA: 见 4.10.2.2 (4)。

(5) 受试物: 最好能直接溶于无血清完全培养液内。否则, 需先溶于二甲基亚砷 (DMSO), 而后加于完全培养液内。所加 DMSO 溶液量应低于 1.0% (V/V)。

(6) 阳性对照物: 加 S9 时选用环磷酰胺等, 不加 S9 时选用丝裂霉素 C 等。

(7) 肝微粒体酶混合液 (S9 混合液): 见 4.10.1.2 (9)。

(8) 秋水仙素溶液 (0.04%): 取 40mg 秋水仙素溶解于 100ml 无菌 0.85%氯化钠溶液中, 过滤除菌。

(9) 氯化钾溶液 (0.075mol/L)。

(10) 甲醇/冰醋酸 (3:1, V/V) 固定液: 临用现配。

(11) 姬姆萨染液: 见 4.10.2.2 (9)。

4.10.3.3 细胞

可选用中国仓鼠肺 (CHL) 细胞、中国仓鼠肺 (V79) 细胞、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞, 或人外周血淋巴细胞等进行试验。

在一般情况下, 本试验推荐使用 CHL 细胞。使用 CHL 细胞时, 在试验前一天, 将其 1×10^6 个细胞接种于直径为 100mm 平皿中, 置 37℃二氧化碳培养箱内待用。

4.10.3.4 试验分组

所设试验剂量组应不少于 4 个。最高剂量组的细胞存活率应为 10%~20%, 无毒性受试物最高剂量组不超过 10mmol/L (或 5mg/ml)。同时, 应设阴性 (溶剂) 对照组、未处理对照组和阳性对照组。除未处理对照组外, 各组均应包括加 S9 混合液和不加该液的样本。

4.10.3.5 操作程序

(1) 试验时, 吸出细胞培养平皿中的培养液, 加入试验所规定浓度的受试物和 S9 混合物 (10%) 以及不含小牛血清的完全培养液, 放二氧化碳培养箱内作用 2h。结束后, 吸去完全培养液, 用 Hanks 液洗细胞 3 次。加完全培养液, 再置二氧化碳培养箱中培养, 于 24h 收获细胞。收获细胞之前 2~4h, 加入秋水仙素溶液 (终末浓度为 $1 \mu\text{g/ml}$), 阻断细胞于有丝分裂中期相。

(2) 收获细胞时, 用胰蛋白酶-EDTA 溶液消化细胞, 待细胞脱落, 加入培养液并混匀以终止胰蛋白酶作用。离心 (1000~1200r/min, 5~7min), 弃去上清液后, 加入 0.075mol/L 氯化钾溶液低渗处理 10~20min。离心后, 再以甲醇/冰醋酸液固定 2 次。按常规滴片干燥, 用姬姆萨应用液染色 15min 左右。

(3) 阳性与阴性对照组的操作程序同试验组, 只是阳性对照组用已知染色体断裂剂替代受

试物。阴性（溶剂）对照组用受试物的溶剂。另设一未处理对照组。

（4）观察：每组各选 100 个染色体分散良好的中期分裂相细胞，进行染色体畸变分析，观察和记录染色体结构的异常及数量异常。

染色体结构异常可有：断裂，微小体，有着丝点环，无着丝点环，单体互换，双微小体，裂隙，非特异性型变化（粉碎化等）。染色体数量异常可有：非整倍体，多倍体，内复制。

4.10.3.6 评价规定

用 χ^2 检验或其他适当的显著性检验方法，对所得试验数据进行统计学处理。当各剂量组与阴性（溶剂）对照组相比，畸变细胞率的增加有显著性意义，并有剂量-反应关系时；或仅一个剂量组有显著性意义的增加，并经重复试验证实时，可判为该受试物在本试验中具有致突变性。

4.10.4 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验

4.10.4.1 目的

检测消毒剂对小鼠骨髓嗜多染红细胞微核形成的影响，评价消毒剂的染色体损伤毒性。

4.10.4.2 试剂

（1）受试物：用水、植物油或用 0.5%羧甲基纤维素钠配制成溶液或混悬液。

（2）阳性对照物：常用环磷酰胺或丝裂霉素 C。

（3）小牛血清：见 4.10.3.2（2）。

（4）姬姆萨染液：见 4.10.2.2（9）。

4.10.4.3 实验动物

选用体重为 25~30g 的小鼠，雌雄各半，随机分组。

4.10.4.4 试验分组

受试物至少设 3 个剂量组，每个剂量组用 10 只动物，雌雄各半。另设阴性（溶剂）和阳性对照组。剂量组一般取受试物的 $1/2LD_{50}$ 、 $1/5LD_{50}$ 、 $1/20LD_{50}$ 等剂量，以得到剂量-反应关系。高剂量组应不引起动物死亡，不引起明显骨髓抑制。若采用一次最大限度试验测得 LD_{50} 大于 5000mg/kg 体重，即以 5000mg/kg 体重为高剂量。

4.10.4.5 操作程序

（1）动物染毒采用经口灌胃 30h 染毒法，即两次染毒间隔 24h，第二次染毒后 6h 取材。

（2）用颈椎脱臼法处死动物，取股骨或胸骨。剥除肌肉，擦净血污。切断股骨或胸骨两端，暴露骨髓腔。

（3）用注射器吸取 0.1ml 小牛血清，冲洗骨髓腔。用冲洗液常规涂片，晾干或热风吹干。

（4）将已干的涂片，在甲醇中固定 5~10min。用姬姆萨应用液染色 10~15min，然后用

pH6.8PBS 液冲洗，晾干。

(5) 阳性与阴性对照组的操作程序同试验组。阳性组选用环磷酰胺 (40 mg/kg 体重) 或丝裂霉素 (1~1.5mg/kg 体重)。阴性 (溶剂) 对照组用受试物溶剂。

(6) 选择细胞分布均匀、完整、着色适当的区域。在油镜下计数含微核的嗜多染红细胞 (PCE) 数。PCE 呈灰蓝色 [成熟红细胞 (NCE) 呈粉红色]，微核多呈圆形、边缘光滑、整齐，嗜色性与有核细胞核质一致，呈紫红色或蓝紫色。直径通常为红细胞的 1/20~1/5。

(7) 每只动物计数 1000 个 PCE。微核细胞率指含有微核的 PCE 数，以千分率表示。一个 PCE 中出现有两个或多个微核，仍按一个计数。此外，还应观察 PCE/NCE 比例，作为对细胞毒性的指标。一般计数 200 个 PCE，同时记数所见到的 NCE。当 PCE/NCE 小于 0.1 时，提示对骨髓具有明显抑制作用，应降低受试物剂量，重新进行试验。

4.10.4.6 评价规定

阴性对照组小鼠，微核细胞率一般不超过 0.3%。

用波松分布 χ^2 检验或其他适当的显著性试验方法，进行统计学处理。当各剂量组与溶剂对照组相比，微核细胞率的增加有显著性意义，并有剂量-反应关系，或仅一个剂量组微核细胞率增加有显著性意义，并经重复试验证实时，均可判为受试物具有体内染色体损伤作用。

4.10.5 哺乳动物骨髓细胞染色体畸变试验

4.10.5.1 目的

用细胞遗传学方法检测实验动物骨髓细胞染色体畸变率，以评价消毒剂的致突变性。

4.10.5.2 试剂

(1) 阳性对照物：常用环磷酰胺，丝裂霉素 C 等。

(2) 秋水仙素 (0.04%)：取 40mg 秋水仙素溶解于 100ml 无菌的 0.85% 氯化钠溶液中，过滤除菌。

(3) 氯化钾溶液 (0.075mol/L)。

(4) 甲醇/冰醋酸 (3:1, V/V) 固定液：临用现配。

(5) 姬姆萨染液 [见 4.10.2.2 (9)]。

(6) 磷酸盐缓冲液 (PBS, 1/15mol/L, pH7.4)。

4.10.5.3 实验动物

成年小鼠 (体重 25~30g)，或大鼠 (体重 180~220g)。动物总数不少于 30 只，雌雄各半。

4.10.5.4 试验分组

随机分为 5 组。至少 3 个受试物剂量组，为 1/2LD₅₀、1/5LD₅₀、1/20LD₅₀。若采用一次最大限

度试验，测得 LD₅₀ 大于 5000mg/kg 体重，即以 5000mg/kg 体重为高剂量。另设阳性对照组和阴性（溶剂）对照组，每组 6 只动物，雌雄各半。阳性对照组可用环磷酰胺（40mg/kg 体重）或丝裂霉素 C（1.5~2mg/kg 体重）。阴性（溶剂）对照组采用受试物溶剂。

4.10.5.5 操作程序

（1）用经口灌胃方式，共染毒两次，间隔 24h。于第二次染毒后 6h 处死动物。处死动物前 2~4h 腹腔注射 0.04%秋水仙素溶液，剂量为 4mg/kg 体重。

（2）用颈椎脱臼法处死动物，取出股骨，剔除肌肉等组织。

（3）剪去股骨两端，用注射器吸取 5ml 生理盐水，从股骨一端注入，用 10ml 离心管从股骨另一端接取流出的骨髓细胞悬液。

（4）将骨髓细胞悬液离心（1000r/min，5~7min），除上清液。加 0.075mol/L 氯化钾溶液 7ml，用滴管将细胞轻轻混匀，置 37℃水浴中低渗处理 7min。

（5）加入 2ml 甲醇/冰醋酸固定液，混匀。离心（1000r/min，5~7min），弃上清液。再加入 7ml 固定液，混匀，固定 7min。离心（1000r/min，7min），弃去上清液。

（6）用同法再固定 1~2 次，弃上清液，加入数滴新鲜固定液，混匀。

（7）用悬液滴片，晾干，以姬姆萨应用液染色。

（8）每组各选 100 个染色体分散良好的中期分裂相细胞，进行染色体畸变分析，观察和记录染色体结构的异常和数量的异常。染色体结构异常可有：断裂、微小体、有着丝点环、单体互换、双微小体、裂隙、粉碎化等。染色体数量的异常可有：非整倍体、多倍体、内复制等。

（9）计算畸变细胞率。畸变细胞率为 100 个中期分裂相细胞中有染色体畸变的细胞数。一个中期分裂相细胞出现两种或多种畸变，仍按一个有染色体畸变细胞计。

（10）阳性与阴性（溶液）对照组的操作程序同试验组。只是阳性组选用环磷酰胺（40mg/kg 体重）或丝裂霉素（1.5~2.0mg/kg 体重）作为受试物的替代物。阴性（溶剂）对照组用受试物溶剂作为受试物的替代物。

4.10.5.6 评价规定

用 χ^2 检验或其他适当的显著性检验方法对所得试验数据进行统计学处理。当各剂量组与阴性（溶剂）对照组相比，畸变细胞率的增加有显著性意义，并有剂量-反应关系时；或仅一个剂量组畸变细胞率增加有显著性意义，并经重复试验证实时，可判为该受试物在本试验中具有致突变性。

4.10.6 程序外 DNA 修复合成试验

4.10.6.1 目的

检测受试物是否可引起体外哺乳动物细胞的原发 DNA 损伤。推荐用放射自显影法进行测定。

4.10.6.2 试剂

(1) 完全培养液:用 Eagle 最低要求培养基 (EMEM) 85 份加小牛血清 15 份,青霉素 (终末浓度 100IU/ml) 与链霉素 (终末浓度 100 μ g/mL), pH7.2~7.4。过滤除菌后,保存于 4℃冰箱备用。

(2) 同步培养液:用不含精氨酸的 EMEM 培养基 98 份,加小牛血清 2 份,再加青霉素 (终末浓度 100IU/ml) 与链霉素 (终末浓度为 100 μ g/mL) 配制而成。

(3) 小牛血清:见 4.10.2.2 (2)。

(4) 无钙镁磷酸盐缓冲液 (无钙镁 PBS):见 4.10.1.2 (5)。

(5) 胰蛋白酶-EDTA 溶液:见 4.10.2.2 (4)。

(6) 甲醇/冰醋酸 (3:1, V/V) 固定液:临用现配。

(7) 羟基脲 (HU) 贮备液:250mmol/L。

(8) 1% 枸橼酸钠溶液。

(9) ^3H -胸腺嘧啶核苷

(10) NTB-2 核乳胶或国产核-4 乳胶。

(11) 肝微粒体酶混合液 (S-9 混合液):见 4.10.1.2 (9)。

(12) 显影液及定影液:包括柯达 (Kodak) D-196 显影液、停显液及 F-5 定影液。

4.10.6.3 细胞

可选用人成纤维细胞、大鼠原代肝细胞、外周血淋巴细胞等进行试验。本规范推荐使用人胚肺成纤维细胞 (2BS)。

4.10.6.4 试验分组

受试物可设 4 个剂量组。最高剂量组应使细胞存活率在 10%~20%之间。无毒性受试物最高剂量不超过 10mmol/ml。同时应有阴性 (未处理、溶剂) 对照组和阳性对照组。

4.10.6.5 操作程序

人胚肺成纤维细胞 (2BS) 放射自显影法操作程序。

(1) 将细胞增殖至所需数量后,用完全培养液制成单细胞悬液,浓度为 $0.5 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^5$ 个/ml。将细胞悬液接种置有小盖玻片的 6 孔细胞培养板中,在 37℃二氧化碳培养箱内培养 1~3 天,至细胞 50% 融合。每一剂量组和各对照组分别作 2~3 个平行样本。

(2) 换用同步培养液,培养 3 天。

(3) 在试验的前一日下午,加入羟基脲 (HU) 贮备液使 HU 的终末浓度为 10mmol/L。继续

在 37℃ 下培养 16h, 然后将上述长有细胞之盖片置于含有不同浓度的受试物、HU (10mmol/L) 及 ^3H -胸腺嘧啶核苷 (5~10 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$, 30Ci/mmol) 同步培养液中。在 37℃ 培养 5h。

(4) 阳性及阴性对照组的操作程序同试验组, 只是阳性对照组用阳性对照物代替受试物, 阴性 (溶剂) 对照组用受试物溶剂代替受试物。

(5) 处理结束后, 用 Hanks 液洗涤 3 次, 再用 1% 枸橼酸钠溶液处理 10min。将小盖玻片用甲醇-冰醋酸固定液固定 30min, 重复 2 次。干燥过夜, 将有细胞的盖玻片用少量中性树胶, 粘固于载玻片上, 长有细胞的一面朝上。

(6) 在暗室中, 将适量之 NTB-2 乳胶 (或核-4 乳胶) 移入浸渍用之玻璃器皿中, 置 40℃ 水浴中融化, 再加入等量 40℃ 蒸馏水, 继续在水浴中加温, 用玻璃棒轻轻搅拌 10~20 min, 使气泡逸出。同时将准备做自显影处理的载玻片, 置水浴箱平台上预热。而后, 将附有样本的载玻片垂直浸渍于乳胶液中约 5s。提出玻片, 拭去其背面乳胶并待其干固。

(7) 将干固的附有样本的载玻片置于有变色硅胶干燥剂袋的曝光盒中, 盒外包黑色避光纸, 于 4℃ 冰箱中曝光 10 天。曝光后, 将玻片在 D-19 显影液中显影 4min, 在停显液中漂洗 30s, 在 F-5 定影液中定影 10min, 再用水漂洗数小时。

(8) 细胞在显影后用姬姆萨染液染色, 脱水透明后, 用盖片封固。在油镜下, 计数各样本细胞核的显影银粒数, 每个样本计数 100 个细胞, 同时计数相当面积的本底银粒数, 两者之差为细胞核净银粒数。计算各试验组和对照组“银粒数/核”的均值及其标准差。

4.10.6.6 评价规定

用 t 检验或其他适当的显著性检验方法进行统计学处理。当各试验剂量组“银粒数/核”均值与阴性 (溶剂) 对照组者相比, 有显著性意义的增加, 并呈剂量-反应关系时; 或仅一个剂量组有统计学意义的增加, 但经重复试验证实者, 可判为该受试物诱导了 DNA 修复合成, 具有 DNA 损伤作用。

4.10.7 睾丸生殖细胞染色体畸变试验

4.10.7.1 目的

利用细胞遗传学方法, 以哺乳动物体内试验检测受试物引起的生殖细胞染色体损伤。试验有小鼠精原细胞染色体畸变试验和小鼠精母细胞染色体畸变试验, 可根据情况选做其一, 或两者均做。

4.10.7.2 试剂

(1) 受试物: 用水、植物油配成溶液, 或用 0.5% 羧甲基纤维素钠制成混悬液。

(2) 阳性对照物: 常用环磷酰胺, 或丝裂霉素。

(3) 秋水仙素 (0.04%) :取 40mg 秋水仙素, 溶于 100ml 0.85% 氯化钠溶液中, 过滤除菌。

(4) 甲醇/冰醋酸 (3:1, V/V) 固定液:临用现配。

(5) 枸橼酸三钠。

(6) 姬姆萨染液:见 4.10.2.2 (9))。

4.10.7.3 实验动物

选用 3~4 月龄, 体重 25~30g 的雄性小鼠。动物总数不少于 25 只。

4.10.7.4 试验分组

受试物至少设 3 个试验剂量组, 每个剂量组 5 只动物。另设阳性对照组和阴性 (溶剂) 对照组。阳性对照组用环磷酰胺 (40mg/kg 体重) 或丝裂霉素 C (1.5~2mg/kg 体重), 腹腔注射。

4.10.7.5 操作程序

(1) 小鼠精原细胞染色体畸变试验, 用经口灌胃方式, 共染毒两次, 间隔 24h。于第二次染毒后 6h 处死动物。处死动物前 3.5~5.00h 腹腔注射 0.04%秋水仙素溶液, 剂量为 4mg/kg 体重。

小鼠精母细胞染色体畸变试验, 灌胃染毒, 每天 1 次, 连续 5 天。于第 1 次染毒后的第 12~14 天将受试动物处死。处死动物前 3.5~5.00h, 腹腔注射 0.04% 秋水仙素溶液 (4mg/kg 体重)。

(2) 用颈椎脱臼法处死小鼠, 取睾丸, 去除脂肪。置含 2.2%枸橼酸三钠溶液平皿中去除睾丸被膜, 用针头使曲精小管松散。一个动物的 2 个睾丸可分别或合并处理。

(3) 用吸管尽可能去除 2.2% 枸橼酸三钠溶液, 将曲精小管置于含 3~4ml 低渗液 (1% 枸橼酸三钠) 的试管中。10min 后更换低渗液, 以去除碎片和精子。在室温下, 低渗时间总计不超过 25min。低渗结束后去除低渗液。加入预冷的固定液 (甲醇/冰醋酸), 固定 10min 后, 更换固定液, 再固定 10min。第 3 次固定至少 30min, 也可在冰箱中过夜。用镊子将已固定的曲精小管移到含 50%醋酸 5ml 的离心管中, 吸管吹打至不透光, 离心 (1000r/min, 5min)。

(4) 将固定液 1.0~1.5ml 加至离心所得细胞沉淀物中。滴管吹打后, 滴 2 滴至用 70% 乙醇浸湿的玻璃片, 分散后, 热风干燥。

(5) 用姬姆萨应用液在室温染色 10min, 自来水淋洗两次。

(6) 以油镜检查染色体结构的异常情况。每只动物做两个睾丸, 每个睾丸分析 50 个中期分裂相精原细胞 (或精母细胞)。记录观察染色体型和染色单体型染色体的结构异常。对精母细胞染色体还观察相互易位、X-Y 和常染色体的单价体。

检查染色体数目异常时, 记录非整倍体和多倍体。在小鼠精母细胞染色体畸变试验时, 只有当第一次减数分裂中, 四倍体生殖细胞有一个被确认为四价体时才有意义。

4.10.7.6 评价规定

用 χ^2 检验,或其他适当的显著性检验方法对所得试验数据进行统计学处理。当各剂量组与阴性(溶剂)对照组相比,畸变细胞率有显著性意义的增加,并有剂量-反应关系时;或仅一个剂量组有显著性意义的增加,经重复试验证实后,可判为该受试物对哺乳动物睾丸细胞具有致突变性。

4.11 亚慢性毒性试验

4.11.1 目的

(1) 检测消毒剂较长期染毒对实验动物的毒性作用及其靶器官,并确定其最大未观察到有害作用剂量。

(2) 为慢性毒性和致癌试验的剂量设计提供依据。

4.11.2 实验动物

一般用啮齿类动物,首选大鼠。所用大鼠应为 4~6 周龄者。全部试验至少需用 80 只动物。

4.11.3 试验分组

将实验动物随机分为 4 组(3 个剂量组和 1 个对照组),每组 20 只动物,雌雄各半。选择受试物剂量时,高剂量组应出现明显的毒性反应,但不引起死亡,如果出现动物死亡应不超过 10%;中间剂量组应可观察到轻微的毒性效应;低剂量组应不引起任何毒性效应(属未观察到有害作用剂量)。至于具体的剂量选择,可考虑高剂量为 LD_{50} 的 $1/20 \sim 1/5$,高、中、低 3 个剂量间的组距以 3~5 倍为宜,最低不小于 2 倍。另以受试物溶剂代替受试物进行试验,作为阴性对照组。

4.11.4 操作程序

(1) 采用灌胃方式或将受试物掺入饲料经口染毒。

(2) 灌胃法每天灌胃一次,每周称体重,并按体重调整受试物给予量。如受试物掺入饲料时,应定期称饲料消耗量,计算消毒剂摄入量。

(3) 试验期为 3 个月(90 天),末次染毒后 24h 处死实验动物,检测各项观察指标。

4.11.5 观察指标

观察指标,可因消毒剂毒理作用不同而异,一般至少包含以下方面。

(1) 临床观察:观察动物中毒表现,每周称量体重一次,食物消耗量至少 1~2 次。

(2) 血液学检查:包括血红蛋白含量、红细胞数、白细胞及其分类计数、血小板数、网织红细胞数等。

(3) 血液生物化学检查:例如天冬氨酸氨基转移酶、丙氨酸氨基转移酶、碱性磷酸酶、尿素氮、肌酐、血清总蛋白和白蛋白、总胆固醇、总胆红素等。必要时,可根据所观察到的受试物毒性效应,

或与受试物化学结构相似物质的毒性作用，选择其他一些 生化指标。

(4) 脏器重量：测量主要脏器（如肝、肾、肾上腺、睾丸等）的脏器重量和脏器系数（脏器重/体重×100%）。

(5) 病理学检查：实验结束时，处死所有动物，进行系统解剖和肉眼观察，并将主要器官和组织（如心、肺、肝、肾、脾、脑、肾上腺、睾丸、卵巢、胃肠和系统解剖时发现的异常组织等）固定、保存。当各剂量组动物尸检未发现明显病变时，先进行高剂量组和阴性对照组动物肝、肾、胃、肠及其它重要的和可能受损的脏器的组织病理学检查。如发现病变，还应对中、低剂量组动物相应的器官进行组织病理学检查。

4.11.6 评价规定

将各试验组动物观察指标与阴性对照组加以比较并进行统计学检验，注意各剂量组间的剂量-反应（效应）关系。评定受试物最小观察到有害作用剂量和最大未观察到有害作用剂量及毒性作用的靶器官。

4.12 致畸胎试验

4.12.1 目的

检测消毒剂对妊娠实验动物有无致畸胎性，确定其未观察到发育毒性的剂量。

4.12.2 试剂

(1) 1/1000 茜素红溶液：茜素红 0.1g，氢氧化钾 10g，加蒸馏水 1000ml。

(2) 透明液 A：甘油 200ml，氢氧化钾 10g，蒸馏水 790ml。

(3) 透明液 B：甘油与蒸馏水等量混合。

(4) 固定液（Bouins 液）：苦味酸饱和液 75 份，甲醛 20 份，冰醋酸 5 份。

4.12.3 实验动物

试验用大鼠或小鼠（必要时可用家兔）。用大鼠和小鼠试验时，取健康、性成熟、未交配过的体重为 200~250g 的大鼠，或体重为 25~30g 的小鼠。

4.12.4 试验分组

至少设 4 组，其中 3 个为试验组，1 个为阴性对照组。每组至少有 15 只孕鼠。高剂量组可用雌鼠的 1/10LD₅₀ 作为试验剂量；低剂量组，可用雌性动物的 1/100LD₅₀ 作为试验剂量。其间设中剂量组。阴性对照组以受试物的溶剂代替受试物进行试验。阳性对照组常用阿司匹林（300mg/kg 体重）、敌枯双（1mg/kg 体重）或维生素 A（40000IU）。对于实验室首次进行的动物品种或品系必需设阳性对照组。为了保证试验方法的可靠性，每隔半年需用阳性对照物检查一次。

4.12.5 操作程序

(1) 将雌鼠和雄鼠按 1:1 或 2:1 的比例同笼饲养。每日晨观察阴栓(或阴道涂片)。查出阴栓或精子的当天定为孕期零天。如 5 天内未交配, 调换雌鼠。查出的孕鼠按上述随机分组, 并进行称重和编号。

(2) 在大、小鼠孕期 6~15 天期间, 每天用灌胃法给予受试物。分别于孕期 0、6、10、15 和 20 天称重孕鼠, 并根据体重调整受试物给予量。注意观察并记录孕鼠的毒性反应。

(3) 大鼠于孕期第 20 天, 小鼠于孕期第 18 天, 用颈椎脱臼法处死。剖腹, 取出子宫称重, 检查活胎、吸收胎、早期死胎和晚期死胎数。

(4) 逐个记录活胎鼠的性别、体重、身长和尾长。外观检查头面部、躯干部、四肢等有无畸形, 诸如皮下出血、露脑、脑膨出、眼部畸形(无眼或开眼等)、鼻孔扩大、单鼻孔、唇裂、脊柱裂、四肢和尾畸形、肛门闭锁等。

(5) 每窝取约 1/2~2/3 活胎鼠, 用眼科镊剥皮。取出内脏(注意勿拉断肋骨), 去掉后颈和两肩胛骨之间的脂肪块。将胎鼠放入茜素红溶液染色。当天摇动玻璃瓶 2~3 次。待骨骼染成红色时为止。将胎鼠换入透明液 A 中 1~2 天, 换入透明液 B 中 2~3 天。待胎鼠骨骼已染红, 而软组织的紫红色基本褪去, 可换置甘油中。

(6) 将染好的标本连同甘油一并倒入含水平皿内, 在解剖显微镜下, 用透射光源, 先观察胎鼠全身, 然后逐步检查:①头骨、胸骨、脊椎骨、肋骨和四肢等有无骨化不全、骨化迟缓和其他缺陷。②观察脊椎骨有无缺失、融合、纵裂等畸形;③观察胸骨的发育和数目, 有无胸骨缺失等;④检查肋骨有无融合肋、分叉肋、肋骨中断、缺肋、短肋、波状肋、多肋畸形等;⑤最后检查四肢骨畸形。

(7) 每窝取约 1/3~1/2 活胎鼠浸入固定液 2 周, 作内脏检查。将已固定的胎鼠用水冲净, 仰放于石蜡板上。剪去四肢和尾, 用刀片在头颈部常规共切 4 刀, 再用剪刀剖开胸、腹腔。着重检查:①有无裂舌、双叉舌、裂腭及眼、鼻和脑部的畸形;②是否出现右位心、心脏过大、肺过大或过小等畸形;③消化系统和泌尿生殖系统各器官的大小、形状以及位置;④有无肾盂积水, 双侧有无睾丸, 以及子宫发育不全等畸形。

4.12.6 评价规定

主要观察动物畸胎出现率, 同时观察其他指标, 如着床数、活胎数、晚期死胎数、早期死亡数, 以及活胎体重、身长、尾长等。

观察全部结果的剂量-反应关系, 确定受试物的母体毒性、发育毒性及致畸性。求出受试物的最小致畸剂量和最大无致畸作用剂量。对致畸强度应以致畸指数表示。

致畸指数 = (雌鼠 LD₅₀) / (最小致畸剂量)

致畸指数小于或等于 10 为基本不致畸；大于 10 至 100 为致畸；大于 100 为强致畸。

4.13 慢性毒性试验

4.13.1 目的

检测受试物长期染毒对实验动物所产生的毒性作用，确定其最小观察到有害作用剂量，最大未观察到有害作用剂量及毒性作用的靶器官。

4.13.2 实验动物

试验选用刚离乳的大鼠。在试验结束时，每个剂量组每种性别的动物应不少于 10 只。中间需活杀动物检查时，需相应增加实验动物数量。

4.13.3 试验分组

将实验动物随机分在 3 个剂量组和 1 个阴性对照组。阴性对照组除不接触消毒剂外，其它与实验组相同，若在试验中对受试物使用溶剂或赋形剂时，阴性对照组应给予相应剂量的溶剂或赋形剂。试验剂量根据亚慢性试验结果选择。高剂量应引起明显的毒性效应甚至个别动物死亡，低剂量应不引起毒性效应。

4.13.4 操作程序

(1) 用灌胃法或将受试物掺入饲料或饮水中喂饲。掺入饲料的受试消毒剂的最高浓度一般不超过 5%。饲料中受试消毒剂应定期监测，观察其均匀性和稳定性。

(2) 灌胃法每天给药一次。

(3) 前三个月每周称量体重，三个月后每月称一次体重，调整受试物灌胃量。如受试物掺入饲料，应定期称饲料消耗量。如受试物溶于饮水中喂饲，需记录动物的饮水量。

(4) 试验期限一般为 6 个月，必要时可延长至 2 年。

4.13.5 观察指标

指标与亚慢性毒性试验基本相同，也可根据受试物对实验动物的亚慢性毒性作用和靶器官，可适当增加或更换一些针对性更强更灵敏的观察指标。

(1) 临床观察：观察中毒表现，体重前 3 个月每周一次，以后每月一次。

(2) 血液学检查：于试验的第 3、6 个月及以后每半年进行一次血液学检查。

(3) 血液生化检查：检查时间同血液学检查。

(4) 病理学检查：

系统解剖：所有实验动物包括试验过程中死亡的动物都应进行完整的系统解剖和详尽的肉眼观察。肉眼可见的异常组织都应留样作进一步组织病理学检查。

脏器重量：称取脑、肝、肾、肾上腺和睾丸重量并计算脏器系数。

组织学检查：对照组、高剂量组动物及系统解剖发现异常的组织均需作详尽的组织学检查。当高剂量组有异常发现时，其它剂量组才进行相应检查。检查脏器一般包括脑、心、肺、肝、脾、肾、胃、肠、肾上腺、甲状腺、垂体、睾丸（卵巢）和子宫等。

4.13.6 评价规定

比较各剂量组与对照组观察指标的变化。计算分析其剂量-反应关系，并确定受试物最小观察到有害剂量和最大未观察到有害作用剂量，及毒性作用靶器官。

4.14 致癌试验

4.14.1 目的

检测长期接触消毒剂后实验动物出现肿瘤的情况，评价其致癌性。也可将致癌试验和慢性毒性试验结合在一批动物中进行。

4.14.2 实验动物

以刚离乳的大鼠或小鼠进行试验。如与慢性毒性试验结合进行，通常选用大鼠。各剂量组和阴性对照组使用的有效动物数，至少雌雄各 50 只。如与慢性毒性结合进行，试验中间需处死动物进行检查时，需相应增加实验动物数。

4.14.3 试验分组

实验动物分组同慢性试验，一般设 3 个剂量组与 1 个阴性对照组（见 4.13.3）。根据亚慢性试验结果选择剂量。最高剂量组为最大耐受剂量，可引起轻度毒性效应，但不能因肿瘤以外因素明显缩短其生命期限。最低剂量组应不影响动物正常的生长、发育和寿命，即不引起任何毒性效应。中间剂量处于最高和最低剂量之间。若在试验中对受试物使用溶剂或赋形剂时，阴性对照组应以相应的溶剂或赋形剂进行试验。

4.14.4 操作程序

（1）将受试物灌胃或掺入饲料或饮水中喂饲。掺入饲料中的受试物最高浓度，不应超过 5%。如用灌胃法，每天给药一次。

（2）前三个月每周称体重，三个月后每月称体重，并调整受试物的灌胃量。每周称饲料消耗量一次。若受试物溶于饮水中喂饲，需记录饮水量。试验期应包括动物正常寿命期的大部分时间，大鼠为 2 年以上，小鼠为 18 个月以上。

（3）试验过程中，除观察一般临床症状外着重观察动物的肿瘤发生情况。对每一肉眼可见或可触及的肿瘤，其出现的时间、部位、大小、外形和发展情况均应有记录。

(4) 凡在试验过程中死亡或濒死而提前处死, 以及试验结束全部处死的动物, 均应进行完整的尸检及系统的、全面的、详细的器官和组织的病理学检查。对肉眼可见肿瘤或可疑病变组织, 对试验过程中死亡或濒死而提前处死的动物, 高剂量组和对照组的全部动物, 均需进行全面的病理组织学检查。如果高剂量组肿瘤、癌前病变或增生的发生率和阴性对照组者相比, 差别有显著性时, 则中、低剂量组所有动物的有关器官和组织均需进行病理组织学检查。若高剂量组存活动物数显著少于对照组或存在影响肿瘤发生的毒作用时, 则中剂量组也应按上述高剂量组的要求进行系统检查。

(5) 若致癌试验和慢性毒性试验结合在一起进行, 还应按慢性毒性试验的要求, 对有关指标进行观察和记录。

4.14.5 评价规定

(1) 肿瘤发生率: 肿瘤发生率是整个实验终了时, 患瘤动物总数在有效动物总数中所占的百分率, 有效动物总数是指最早出现肿瘤时的存活动物总数。

$$\text{肿瘤发生率} = \frac{\text{实验终了时患瘤动物总数}}{\text{有效动物总数}} \times 100\%$$

(2) 致癌试验阳性的判断标准

按世界卫生组织 (WHO, 1969) 提出的下列 4 条致癌试验阳性标准进行评价:

- ① 阴性对照组动物出现的一种或数种肿瘤, 试验组均有发生且发生率超过前者。
- ② 试验组发生阴性对照组未有的肿瘤。
- ③ 试验组肿瘤发生的时间早于阴性对照组者。
- ④ 试验组每个动物的平均肿瘤数超过阴性对照组者。

(3) 致癌试验阴性结果的确立

假如动物试验规模为两种种属、两种性别, 至少 3 个剂量, 其中一个接近最大耐受剂量, 每组动物至少 50 只, 实验组肿瘤发生率与对照组无差异。

(4) 试验报告: 在结果报告中, 应写明所发现肿瘤的部位、数量、性质、癌前病变, 其它毒性效应, 以及剂量-反应关系及统计学分析结果。

附录 A

试剂和培养基配方

1. 稀释液 本规范中的稀释液包括：胰蛋白胨生理盐水溶液（TPS）、磷酸盐缓冲液（PBS，0.03mol/L，pH7.2）、中和剂溶液、标准硬水（硬度 342mg/L）、生理盐水等

1.1 胰蛋白胨生理盐水溶液（TPS）

胰蛋白胨	1.0g
------	------

氯化钠	8.5g
-----	------

先用 900ml 以上蒸馏水溶解，并调节 pH 值在 7.0 ± 0.2 (20℃)，最终用蒸馏水加至 1000ml，分装后，经 121℃ 压力蒸汽灭菌后使用。

1.2 磷酸盐缓冲液（PBS，0.03mol/L，pH7.2）

无水磷酸氢二钠	2.83g
---------	-------

磷酸二氢钾	1.36g
-------	-------

蒸馏水加至	1000ml
-------	--------

将各成分加入到 1000ml 蒸馏水中，待完全溶解后，调 pH 至 7.2，于 121℃ 压力蒸汽灭菌 20min 备用。

1.3 标准硬水（硬度342mg/L）

氯化钙（CaCl ₂ ）	0.304g
-------------------------	--------

氯化镁（MgCl ₂ ·6H ₂ O）	0.139g
---	--------

蒸馏水加至	1000ml
-------	--------

将各成分加入到 1000ml 蒸馏水中，待完全溶解后，于 121℃ 压力蒸汽灭菌 20min 备用。

1.4 生理盐水

氯化钠	8.5 g
-----	-------

蒸馏水加至	1000ml
-------	--------

将氯化钠加入到 1000ml 蒸馏水中，待完全溶解后，于 121℃ 压力蒸汽灭菌 20min 备用。

2. 革兰染色液

第 1 液：结晶紫溶液

结晶紫乙醇饱和溶液	100ml
-----------	-------

结晶紫	4g~8g
-----	-------

95%乙醇	100ml
-------	-------

1%草酸胺溶液

第2液：卢戈碘液

碘化钾	2g
碘	1g
蒸馏水	200ml

第3液：脱色剂

(1) 95%乙醇	
(2) 丙酮乙醇溶液	100ml
95%乙醇	70ml
丙酮	30ml

第4液：稀释石炭酸复红液

碱性复红乙醇饱和溶液	10ml
碱性复红	5g~10g
5%石炭酸溶液	90ml
蒸馏水	900ml

3. 孔雀绿与沙黄芽孢染色液

第1液 5.00%孔雀绿水溶液

第2液 0.5%沙黄水溶液

4. 有机干扰物

牛血清白蛋白	30g 或 3g
蒸馏水	1000ml

溶解后用微孔滤膜（孔径为 $0.45\mu\text{m}$ ）滤过除菌，冰箱保存备用

5. 营养琼脂培养基

蛋白胨	10g
牛肉膏	5g
氯化钠	5g
琼脂	15g
蒸馏水	1000ml

除琼脂外其他成份溶解于蒸馏水中，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 20min备用。

7. 营养肉汤培养基

蛋白胨	10g
牛肉膏	5g
氯化钠	5g
蒸馏水	1000ml

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

8. 胰蛋白胨大豆肉汤培养基 (TSB)

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

用蒸馏水配制而成，调节pH为7.2±0.2，经121℃压力蒸汽灭菌后使用。

9. 胰蛋白胨大豆琼脂培养基 (TSA)

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

用蒸馏水配制而成，调节pH为7.2±0.2，经121℃压力蒸汽灭菌后使用。

10. 品红亚硫酸钠培养基

蛋白胨	10g
酵母浸膏	5g
牛肉膏	5g
乳糖	10g
琼脂	15g~20g
磷酸氢二钾	3.5g
无水亚硫酸钠	5g
5%碱性品红乙醇溶液	20ml
蒸馏水	1000mg

以上各成分蒸馏水溶解，调 pH 至 7.2~7.4，装瓶，经 121℃ 压力蒸汽灭菌后使用。

11. 溴甲酚紫蛋白胨培养液

蛋白胨	10g
葡萄糖	5g
可溶性淀粉	1g
溴甲酚紫乙醇溶液	10ml
蒸馏水	1000ml

将蛋白胨、葡萄糖溶解于蒸馏水中，调 pH 至 7.0~7.2，加入 2% 溴甲酚紫酒精溶液，摇匀后，分装（每管 5ml），并放入一个小倒管，于 115℃ 压力蒸汽灭菌30min。置 4℃ 冰箱备用。

12. 嗜热脂肪杆菌恢复琼脂培养基

蛋白胨	10g
牛肉膏	3g
可溶性淀粉	1g
葡萄糖	1g
琼脂	20g
蒸馏水	1000ml

以上各成分蒸馏水溶解，调 pH 至 7.0~7.2，装瓶，经 115℃压力蒸汽灭菌 30min 后使用。

13. 沙堡琼脂培养基

葡萄糖	40g
蛋白胨	10g
琼脂	20g
蒸馏水	1000ml

将上述成分混合后，加热至完全溶解，调 pH 至 5.6 ± 0.2 ，于 115℃压力蒸汽灭菌 30min 备用。

14. 沙堡液体培养基

葡萄糖	40g
蛋白胨	10g
蒸馏水	1000ml

将上述成分混合后，加热至完全溶解，调 pH 至 5.6 ± 0.2 ，于 115℃压力蒸汽灭菌 30min 备用。

15. 麦芽浸膏琼脂培养基(MEA)

麦芽浸膏	30g
大豆蛋白胨	3g

琼脂	15g
双蒸馏水	加至 1000ml

将上述成分制成溶液与 121℃, 15min 灭菌, 灭菌后无菌调节 pH 至 6.9 ± 0.2 备用。

16. 麦芽浸膏肉汤培养基(MEB)

麦芽浸膏	30g
双蒸馏水	加至 1000ml

将上述成分制成溶液与 121℃, 15min 灭菌, 灭菌后无菌调节 pH 至 5.6 ± 0.2 备用。

17. 人淋巴细胞维持培养基

1640 干粉培养基	$10 \times 10.4g$
L 谷氨酰胺	2.93g
丙酮酸钠	1.004g
青霉素 80 万单位	
链霉素 100 万单位	
碳酸氢钠	20.0g
Hepes	23.9g
去离子水加至	10000ml

除青霉素、链霉素外, 其余各成分溶于蒸馏水中, 调 pH 至 7.0~7.2, 115℃压力蒸汽灭菌 20min 备用。临用前加入青霉素、链霉素灭菌溶液。

18. 人淋巴细胞完全培养基

在人淋巴细胞维持培养基中加入 10%无菌小牛血清。