



中华人民共和国国家标准

GB/T 38504—2020

喷雾消毒效果评价方法

Evaluation method of disinfection effect of spray disinfection

2020-03-06 发布

2020-10-01 实施

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国国家卫生健康委员会提出并归口。

本标准起草单位：中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所、江苏省卫生监督所、湖南省疾病预防控制中心、江苏省疾病预防控制中心、山东省卫生健康委执法监督局。

本标准主要起草人：沈瑾、张流波、李炎、顾健、陈贵秋、李涛、徐燕、袁青春、段弘扬、张一凡、孙雯、朱斌、孙惠惠。

喷雾消毒效果评价方法

1 范围

本标准规定了喷雾消毒效果的评价方法。

本标准适用于使用喷雾方法的消毒剂和消毒器械的消毒效果评价。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

喷雾消毒 **spray disinfection**

通过机械力或其他作用方式,使消毒剂形成水雾状细小水滴或雾化成气溶胶,对物体表面或空气进行消毒的方式。

2.2

密闭小空间 **confined moving small space**

一个相对密闭、容积小于或等于 20 m³ 的小环境。

3 评价原则

3.1 试验分组

喷雾消毒效果评价分实验室试验、模拟现场试验和现场试验。实验室试验为必做项,模拟现场试验和现场试验可选做其一。

3.2 杀灭微生物指标

3.2.1 实验室试验杀灭微生物指标

实验室试验杀灭微生物指标见表 1。

表 1 实验室试验杀灭微生物指标

使用范围	指示菌株	杀灭对数值
物体表面消毒	金黄色葡萄球菌(ATCC 6538)	≥3.00
	大肠杆菌(8099)	≥3.00
	铜绿假单胞菌(ATCC 15442)	≥3.00
空气消毒	白色葡萄球菌(8032)	≥3.00
标注对特定微生物有杀灭作用的,应做该微生物的杀灭试验,且杀灭对数值大于或等于 3.00。		

3.2.2 模拟现场试验杀灭微生物指标

模拟现场试验杀灭微生物指标见表 2。

表 2 模拟现场试验杀灭微生物指标

使用范围	指示菌株	杀灭对数值
物体表面消毒	金黄色葡萄球菌(ATCC 6538) 或铜绿假单胞菌(ATCC 15442)	≥ 3.00
应选择实验室试验中抵抗力最强的菌作为模拟现场的指示菌株。		

3.2.3 现场试验杀灭微生物指标

3.2.3.1 物体表面消毒

对物体表面自然菌的杀灭对数值大于或等于 1.00,相应的目标微生物不得检出。

3.2.3.2 空气消毒

对空气中自然菌的消亡对数值大于或等于 1.00, β -溶血性链球菌不得检出。

4 试验方法

4.1 物体表面喷雾消毒效果的试验方法

4.1.1 实验室试验

试验方法见附录 A。

4.1.2 模拟现场试验

试验方法见附录 B。

4.1.3 现场试验

试验方法见附录 C。

4.2 密闭小空间空气消毒效果的试验方法

4.2.1 实验室试验

实验室试验在 1 m³ 空气舱进行;消毒设备过大,无法在 1 m³ 空气舱进行试验时,可用 20 m³ 空气舱进行实验室试验。试验方法参见附录 D。

4.2.2 现场试验

试验方法参见附录 D。

4.3 密闭空间空气消毒效果的试验方法

4.3.1 实验室试验

实验室试验在 20 m³ 空气舱进行,试验方法参见附录 D。

4.3.2 现场试验(多个点)

试验方法参见附录 D。

附录 A

(规范性附录)

物体表面喷雾消毒效果实验室试验方法

A.1 目的

用于鉴定喷雾消毒对实验室指标菌的杀灭作用,以验证该喷雾消毒在实验室内的消毒效果。

A.2 试剂或材料

A.2.1 试验菌株

金黄色葡萄球菌(ATCC 6538)、铜绿假单胞菌(ATCC 15442)、大肠杆菌(8099),在上述规定的菌株基础上,标注对特定微生物有杀灭作用的,应选该微生物进行杀灭试验。

A.2.2 试验试剂

A.2.2.1 磷酸盐缓冲液(PBS,0.03 mol/L,pH 7.2)(稀释液)。

A.2.2.2 牛血清白蛋白(BSA)。

A.2.2.3 标准硬水(硬度 342 mg/L)。

A.2.2.4 中和剂溶液(经 A.5 中和剂鉴定试验鉴定合格)。

A.2.2.5 胰蛋白胨大豆琼脂培养基(TSA)。

A.2.2.6 胰蛋白胨生理盐水(TPS)。

A.3 设备与耗材

A.3.1 电动混匀器。

A.3.2 恒温培养箱。

A.3.3 恒温水浴箱。

A.3.4 刻度吸管。

A.3.5 浊度计。

A.3.6 培养皿。

A.3.7 试管。

A.3.8 移液器及配套的塑料吸头。

A.4 菌片(染菌载体)的制备程序

A.4.1 菌片一般用金属载体,也可根据消毒对象选择相应载体,常用的材料有金属、玻璃、定性滤纸、棉布、聚四氟乙烯等。金属载体一般用直径 12 mm、厚 0.5 mm 的圆形金属片,其他材质载体一般为方形,大小 10 mm×10 mm,特定用途的消毒产品可使用其他材质、形状的载体。

A.4.2 所用载体(除定性滤纸片外)于染菌前,应严格按照如下步骤进行脱脂处理:将载体放在含洗涤剂的水中煮沸 30 min;以自来水洗净;用蒸馏水煮沸 10 min;再用蒸馏水漂洗至 pH 呈中性;晾干、熨平备用。

A.4.3 布片用 40 织纱的白平纹棉布制作。将脱脂后的布块按载体规定的大小抽去边缘一周的经纬纱各一根,按抽纱痕剪切。金属片以不锈钢制作,纸片以定性滤纸制作。

A.4.4 载体经压力蒸汽灭菌后,使用滴染法染菌。

A.4.5 染菌用菌悬液:取第 3 代~第 6 代的营养琼脂培养基培养 18 h~24 h 的新鲜斜面培养物,用 5.0 mL 吸管吸取 3.0 mL~5.0 mL 稀释液(一般用 TPS)加入斜面试管内,反复吹吸,洗下菌苔。随后,用 5.0 mL 吸管将洗下的菌液移至另一无菌试管中,用电动混匀器混合 20 s,或在手掌上振打 80 次,以使细菌悬浮均匀,该菌悬液的含菌量约为 10^9 CFU/mL,可使用浊度计调整菌液浓度。然后加入等量 30.0 g/L 或 3.0 g/L 的牛血清白蛋白,使菌液的浓度约为 5×10^8 CFU/mL。

A.4.6 滴染法染菌时,将经灭菌的载体片平铺于无菌平皿内,用移液器逐片滴加菌液 10.0 μ L,必要时用接种环涂匀整个载体表面。置 $36 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温培养箱或室温干燥备用。

A.4.7 每个菌片(载体)的回收菌数应为 1×10^6 CFU/片~ 5×10^6 CFU/片。

A.5 中和剂鉴定试验

A.5.1 中和剂载体定量鉴定试验操作程序

根据试验分组,准备足量试管和平皿,依次编号。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。将适宜浓度的菌悬液用等量适合浓度的有机干扰物稀释作为试验菌悬液,载体试验用菌量应保证其回收菌量在 2.5×10^2 CFU/片~ 1.5×10^3 CFU/片之间。

鉴定试验包括 4 组:

- a) 第 1 组:吸取中和剂 5.0 mL 于无菌试管中,将其置 $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中 5 min 后,用无菌镊子夹入 1 菌片,并使浸透于中和剂内,作用 10 min 后,用电动混匀器混合 20 s,或将试管振打 80 次,混匀,分别吸取 1.0 mL 接种于两个平皿中,置 $36 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中培养 48 h,做活菌培养计数。
- b) 第 2 组:吸取中和产物溶液(按每片浸有消毒剂的载体加入含 5.0 mL 中和剂的量制备中和产物) 5.0 mL 于无菌试管内,将其置 $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中 5 min 后,用无菌镊子夹入 1 菌片,并使浸透于中和产物溶液中,作用 10 min 后,用电动混匀器混合 20 s,或将试管振打 80 次,混匀。分别吸取 1.0 mL 接种于两个平皿中,置 $36 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中培养 48 h,做活菌培养计数。
- c) 第 3 组:吸取稀释液 5.0 mL 于无菌试管内,将其置 $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中 5 min 后,用无菌镊子夹入 1 菌片,并使浸透于稀释液中,作用 10 min 后,用电动混匀器混合 20 s,或将试管振打 80 次,混匀,分别吸取 1.0 mL 接种于两个平皿中,置 $36 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中培养 48 h,做活菌培养计数。
- d) 第 4 组:分别吸取稀释液与中和剂各 1.0 mL 于无菌平皿内,倒入上述试验同批次的培养基 15 mL~20 mL,置 $36 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中培养 48 h,观察最终结果。

A.5.2 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:

- a) 第 1 组、第 2 组和第 3 组有相似量试验菌生长,载体回收菌量在 2.5×10^2 CFU/片~ 1.5×10^3 CFU/片之间。其组间菌落数误差率应不超过 15%。第 1 组、第 2 组和第 3 组间菌落数误差率计算见式(A.1):

$$P_z = \frac{\sum |X - X_i|}{\sum X_i} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (A.1)$$

式中：

P_z ——组间菌落数误差率，%；

X ——三组间菌落平均数；

X_i ——各组菌落平均数，单位为菌落形成单位每片(CFU/片)。

- b) 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。
c) 试验重复3次，每次试验均应符合a)、b)的要求。

A.6 载体喷雾定量杀菌试验

A.6.1 根据所试菌种和消毒剂对该菌的杀灭能力，选定1个消毒剂浓度(即产品使用说明书中指定的最低浓度)和3个作用时间(说明书指定最短作用时间的0.5倍，指定最短作用时间，指定最短作用时间的1.5倍)。

A.6.2 选定消毒剂的浓度与作用时间。每种菌所染菌片应分开进行试验。试验时，每种载体菌片各取3片，以等边三角形或三角形阵列，均匀排布于一未沾有任何消毒剂的清洁无菌玻璃板上(如无菌平皿内)。

A.6.3 每批试验以同一浓度消毒剂溶液对A.6.2中排列的菌片进行均匀喷雾。每次喷雾的距离和压力保持一致，以尽量使喷到菌片上的雾粒大小和数量一致。喷雾量以不使菌片湿透、流液为度。

A.6.4 待试验菌与消毒剂相互作用至各规定时间，取每种载体菌片1片，各放入一含5.0 mL中和剂的无菌试管中。将试管用电动混合器混合20 s，或在手掌上振80次，使菌片上细菌被洗脱进入中和剂中。

A.6.5 吸取1.0 mL上述洗液，按活菌培养计数方法测定存活菌数，每管接种两个平皿。

A.6.6 每批试验均应换一块未沾有任何消毒剂的清洁无菌玻璃板。喷雾器换装新浓度消毒剂前，应将原残留消毒剂洗净，再换装新浓度消毒剂。

A.6.7 用硬水代替消毒液，取两片菌片按同样的喷雾方法进行处理，作为阳性对照组。如为压力罐装自动喷雾式气雾消毒剂，可直接用染菌载体做活菌计数，作为处理前阳性对照组。

A.6.8 所有试验样本均在 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养，对细菌繁殖体培养48 h观察最终结果。

A.6.9 试验重复3次，计算各组的活菌数(CFU/片)，并换算为对数值(N)，按式(A.2)计算杀灭对数值：

$$KL = N_0 - N_x \quad \dots\dots\dots (A.2)$$

式中：

KL ——杀灭对数值；

N_0 ——对照组平均活菌浓度的对数值；

N_x ——试验组活菌浓度对数值。

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

A.6.10 评价规定：试验各次的杀灭对数值均大于或等于3.00，可判定消毒合格。在产品指定浓度与最短作用时间的0.5倍时，可允许对不同细菌或在部分重复次数中，出现不合格结果。

在杀菌试验中，每次均应设置阳性对照；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，则全部试验应换用未污染试剂或培养基重做。

附录 B

(规范性附录)

物体表面喷雾消毒效果模拟现场试验方法

B.1 目的

用于鉴定喷雾消毒对人工污染于物体表面的细菌的杀灭作用,以验证该喷雾消毒对物体表面的消毒效果。

B.2 试剂或材料

B.2.1 试验菌株

金黄色葡萄球菌(ATCC 6538)或铜绿假单胞菌(ATCC 15442),有特定目标微生物的选择实验室试验中抵抗力最强的菌作为指示菌株。

B.2.2 试验试剂

B.2.2.1 磷酸盐缓冲液(PBS,0.03 mol/L,pH 7.2)(稀释液)。

B.2.2.2 标准硬水(硬度 342 mg/L)。

B.2.2.3 中和剂溶液(经 A.5 中和剂鉴定试验鉴定合格)。

B.2.2.4 胰蛋白胨大豆琼脂培养基(TSA)。

B.2.2.5 胰蛋白胨生理盐水(TPS)。

B.3 设备与耗材

B.3.1 电动混匀器。

B.3.2 恒温培养箱。

B.3.3 刻度吸管。

B.3.4 浊度计。

B.3.5 移液器及配套的塑料吸头。

B.3.6 试管。

B.3.7 平皿。

B.3.8 规格板(用不锈钢材料制备,中央留一 5.00 cm×5.00 cm 的空格作为采样部位)。

B.3.9 无菌棉拭。

B.4 试验步骤

B.4.1 一般以木制桌面为代表进行人工染菌,也可以特定的实物为染菌对象。

B.4.2 菌悬液的制备按 A.4.5 进行。染菌时,选物品较平的部位,于规格板中央空格,用无菌棉拭沾取菌悬液均匀涂抹。待自然干燥后进行试验。每次试验设两个区块作为阳性对照区,10 个区块为试验区。

B.4.3 将无菌棉拭在含 10.0 mL 稀释液试管中浸湿,于管壁上挤干,对阳性对照区涂抹采样,每区块横竖往返各 8 次。以无菌操作方式将棉拭采样端剪入原稀释液试管内,电动混匀器混合 20 s,或者在手掌上振敲 200 次,用稀释液做适当稀释后,作为阳性对照组样本。

B.4.4 按说明书中的方法和最低使用剂量对试验区物体表面进行喷雾消毒。将无菌棉拭在含 10.0 mL 中和剂溶液试管中浸湿,于管壁上挤干,消毒作用至设定时间时,分别对试验区进行涂抹采样,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,电动混匀器混合 20 s,或者在手掌上振敲 200 次,作为试验组样本。

B.4.5 将阳性对照组和试验组样本做适当稀释,选取适宜稀释度,分别取 1.0 mL,以倾注法接种平皿,每个样本接种两个平皿,置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 48 h,观察最终结果。

B.4.6 将每次试验未用完的同批次中和剂溶液、稀释液、棉拭、培养基等设为阴性对照。

B.4.7 试验重复 3 次。计算各组的活菌浓度(CFU/mL),并换算为对数值(N),然后按式(A.2)计算杀灭对数值。

B.5 评价规定

阴性对照组无菌生长,阳性对照组检测菌量为 2.5×10^7 CFU/样本 $\sim 1.25\times 10^8$ CFU/样本,30 个样本的杀灭对数值大于或等于 3.00,判定为消毒合格。

B.6 注意事项

B.6.1 阳性对照组和试验组应在相邻的区域,但不得在同一区内进行试验。

B.6.2 棉拭涂抹采样较难标准化,宜使棉拭的大小,用力的均匀,吸取采样液的量,洗菌时敲打的轻重等先后一致。

现场样本应及时检测。室温存放不得超过 2 h,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱存放不得超过 4 h。

化 委 C
(员标会化委)
场理监总中华人民共和国督管准市国家

C.1 目局

用于鉴定喷雾消毒对一般物体表面自然菌果消毒效果,以验证该喷雾消毒对物体表面果消毒效果。

C.2 准剂或材料

C.2.1 磷酸盐缓冲液(PBS,0.03 mol/L,pH 7.2)(稀释液)。

C.2.2 雾消硬水(硬度 342 mg/L)。

C.2.3 价方剂溶液(经 A.5 价方剂鉴定试验鉴定合格)。

C.2.4 胰蛋白胨大豆琼脂培养基(TSA)。

C.2.5 胰蛋白胨法理盐水(TPS)。

C.3 设备与耗材

C.3.1 电动混匀器。

C.3.2 恒温培养箱。

C.3.3 刻度吸管。

C.3.4 移液器及配套果塑料吸头。

C.3.5 试管。

C.3.6 平皿。

C.3.7 评格板(用不锈钢材料布备,价央留一 5.00 cm× 5.00 cm 果空格作为采样部发)。

C.3.8 无菌棉拭。

C.4 准市步骤

C.4.1 在使用现场,毒说明书介绍果使用浓度、作用时间方消毒方施消毒物体表面,检测样喷数应大于或等于 30 份。

C.4.2 在物体表面(桌面、台面、门等)用评格板雾定两块实邻果面积各为 25 cm² 果区块,一块为阳性对效区,供消毒前采样,另一块为试验区,供消毒后采样。

C.4.3 将无菌棉拭在含 10.0 mL 稀释液试管价浸湿,于管壁上挤干,对对效区块涂抹采样,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,电动混匀器混合 20 s 或者在手掌振敲 200 次,做适当稀释后,作为阳性对效组样喷。

C.4.4 毒说明书价果方施方剂量对试验区物体表面进行消毒。将无菌棉拭在含 10.0 mL 价方剂溶液试管价浸湿,于管壁上挤干,消毒作用至设定时间,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价方剂溶液试管内,电动混匀器混合 20 s 或者在手掌振敲 200 次,作为试验组样喷。

C.4.5 将阳性对效组方试验组样喷,分别取 1.0 mL,以琼脂倾注施接种平皿,每个样喷接种两个平皿,

置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱培养 48 h, 每日观察一记分进终结果。

C.4.6 将本次式他未方完生同批次境相于语液、稀释液、棉拭、培养基或其别验阴等义规。

C.4.7 的械(A.2)计算每次式他生细小义溶胶相平均细小义溶胶。

C.5 评价规定

阴等义规组表室气法长, 阳等义规组表体较多下气法长, 毒效样本生平均细小义溶胶对适器或适 1.00, 判消水毒效合格。

C.6 注意事项

C.6.1 实形成式他境, 行个气生种类复杂, 平板上常和形对件力霉气法长, 导致室喷计溶气落。实两机平过生平板境如体雾机平板状溶清气落溶试, 即的面平板气落溶计算结果。如两平板均体对件力霉气法长, 表重新通过式他。

C.6.2 阳等义规区相式他区表实定邻生区域, 但闭容实同雾区内通过式他。

C.6.3 棉拭涂抹采样较难标准术, 宜用棉拭生对列, 方剂生均匀, 吸取采样液生量, 洗气试敲打生轻重或先后雾致。

C.6.4 形成样本表及试积测。作温存放闭容超使 2 h, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱存放闭容超使 4 h。

C.6.5 若毒效义象水物消密标滴法文, 环形成式他试表义面物消密标滴法文通过积测, 积测价喷模考了标准单化; 结果评消试, 义行个气生平均细小义溶胶对适器或适 1.00, 空面物消密标滴法文闭积和, 环判消水毒效合格。

附录 D

(资料性附录)

空气喷雾消毒效果试验方法

D.1 目的

用于验证消毒剂或消毒器械使用喷雾消毒边对空气中细菌的消毒效果。

D.2 试剂或材料

D.2.1 试验菌株

白色葡萄球菌(8032)。

D.2.2 试验试剂

D.2.2.1 采入清[非化学因随杀菌试验时,用块抗泡沫剂(辛醇或者橄榄油)的剪恒肉汤匀恒述;消毒剂杀菌试验时,用块相应中和剂的剪恒肉汤匀恒述]。

D.2.2.2 基液稀释牛清(PBS,0.03 mol/L,pH 7.2)(蛋度清)。

D.2.2.3 中和剂溶清(格 D.4 中和剂鉴定试验鉴定琼脂)。

D.2.2.4 培经白养大电动混匀恒述(TSA)(消毒剂杀菌试验时,应在其中压汽相应的中和剂)。

D.2.2.5 血动混去板(块相应中和剂)等。

D.3 设备仪器

D.3.1 相邻的一对空气舱,一个用于消毒试验,一个用于试验对照。一对空气舱所后环境(吹苔浊合、湿合、光照、密闭性和通风另件等)应一致。舱加以不周纬或者铝琼金和脱将构建。应安装浊合和湿合新节装斜以根通风机过含干菌或者其他消毒装斜和相应片道,此平,还应开启喷雾织菌、给消毒剂、采入、袖滤操作和入本传递等窗口。

D.3.2 喷雾织菌装斜,吹苔:空气各缩机、各力表、气体流营属、气溶胶喷雾器等。喷出细菌气溶胶微粒的蒸至应 90%以上在 1.0 μm ~10.0 μm 反复。

D.3.3 空气微生物采入装斜,吹苔:六级筛孔空气撞击式采入器、清体撞击式采入器、缘气设备、气体流营属等。

D.3.4 环境监手器染,纱浊合属、湿合属等。

D.3.5 温箱浴吸器、管浊匀恒计、皿合移片、般合属、载清器根据滤的纸棉移布。

D.4 中和剂鉴定试验

D.4.1 液体冲击式采样法

D.4.1.1 配制菌悬液

痕白色葡萄球菌的剪恒动混匀恒述钢面切锈匀恒物(18 h~24 h),用 5.0 mL 移片移痕 3.0 mL~5.0 mL.剪恒肉汤压汽钢面试片内,悬取第移,抽下菌代,用无菌纹混洗过含边,用剪恒肉汤蛋度成鲜合

为 5×10^3 CFU/mL ~ 3×10^4 CFU/mL 的试验用菌悬液。

D.4.1.2 试验分组

分为 4 组：

- a) 第 1 组：按说明书要求的消毒剂用量，在 1 m^3 空气舱中喷无菌水，作用至消毒时间，立即用含 10 mL 中和剂的液体冲击式采样器采样（采样体积与预设消毒效果鉴定试验采样体积相同），作用 10 min。取 0.1 mL 试验用菌悬液加入上述中和剂中，做活菌培养计数。观察中和剂对试验菌生长有无抑制作用。
- b) 第 2 组：按说明书要求的消毒剂用量，在 1 m^3 空气舱中喷消毒剂，作用至消毒时间，立即用含 10 mL 中和剂的液体冲击式采样器采样（采样体积与预设消毒效果鉴定试验采样体积相同），作用 10 min。取 0.1 mL 试验用菌悬液加入上述中和产物溶液中，做活菌培养计数。观察中和产物对试验菌生长有无抑制作用。
- c) 第 3 组：按说明书要求的消毒剂用量，在 1 m^3 空气舱中喷无菌水，作用至消毒时间，立即用含 10 mL 稀释液的液体冲击式采样器采样（采样体积与预设消毒效果鉴定试验采样体积相同），作用 10 min。取 0.1 mL 试验用菌悬液加入上述稀释液中，做活菌培养计数，作为菌数对照。
- d) 第 4 组：分别吸取稀释液、中和剂各 1.0 mL，做活菌培养计数，作为阴性对照组。

D.4.2 六级筛孔空气撞击式采样法

D.4.2.1 配制菌悬液

菌悬液配制方法同 D.4.1.1，用营养肉汤稀释成浓度为 5×10^2 CFU/mL ~ 3×10^3 CFU/mL 的试验用菌悬液。

D.4.2.2 试验分组

分为 4 组：

- a) 第 1 组：分别吸取试验用菌悬液 0.1 mL，均匀涂抹于两块含中和剂的营养琼脂平板，做活菌培养计数。观察中和剂对试验菌生长有无抑制作用。
- b) 第 2 组：按说明书要求的消毒剂用量，在 20 m^3 空气舱中进行喷雾，作用至消毒时间，立即用含中和剂营养琼脂平板的六级筛孔空气撞击式采样器采样（采样体积与预设消毒效果鉴定试验采样体积相同），作用 10 min。分别吸取 0.1 mL 试验用菌悬液，涂抹于上述采样器中的 6 块平板上，做活菌培养计数。观察中和产物对试验菌生长有无抑制作用。
- c) 第 3 组：分别吸取试验用菌悬液 0.1 mL，均匀涂抹于两块普通营养琼脂平板表面，做活菌培养计数，作为菌数对照。
- d) 第 4 组：分别吸取稀释液 0.1 mL，均匀涂抹于两块含中和剂的营养琼脂平板上，做活菌培养计数，作为阴性对照组。

D.4.3 评价规定

试验结果符合以下全部条件，中和剂可判为合格：

- a) 第 1 组 ~ 第 3 组菌量在 50 CFU/平板 ~ 300 CFU/平板之间，三组间菌落数误差率不超过 15%。三组间菌落数误差率计算见式(D.1)：

$$\text{组间菌落数误差率} = \frac{(\text{三组间菌落平均数} - \text{各组菌落平均数}) \text{的绝对值之和}}{\text{三组菌落数平均数之和}} \times 100\% \quad \dots\dots (D.1)$$

- b) 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。

c) 字修 3 次白假取时合格溶对。

D.5 试验阶段

D.5.1 实验室试验

D.5.1.1 取白假最悬液,体无最脱脂棉实滤后,再体营养被存培养基稀释选消但浓度。

D.5.1.2 同时调原两葡金微舱的温度、品指未度至白假效求的温度(20 °C ~ 25 °C)人品指未度(50%~70%)。

D.5.1.3 将面体的进材于次放入金微舱内,将待一球。板后,于切致为人是进设备的致此均在舱外个实允目苟许残套的留生试尽查位进黄色。直至白假结发,物该将待打倍。

D.5.1.4 按单备白假确剂的压室、微示果量及器力时间器力染最。边器力染最,边体装扇搅拌。器力染最到毕,继修搅拌 5 min,而后静置 5 min,同时指指照组人白假组金微舱铜别黄色或作前离样,为特指照组白假倍始前人白假组或作处理前的洁性指照(即污染最量)。金微舱内金微杀最浓度不达 5×10^4 CFU/m³ ~ 5×10^6 CFU/m³(按或作处理前洁性指照样标鉴别测结细计)。

D.5.1.5 在 20 m³ 金微舱绿假胞白假时,体替阳罐繁金微殖点可离样进离样,离样时,将替阳罐繁金微殖点可离样进放在舱中距排地 1 m 高处(离样物毒按离样进面体说明书黄色)。在 1 m³ 金微舱绿假胞白假时,金微舱内体离样量持灭的液示殖点可离样进离样,离样进置柜内中距处。

D.5.1.6 按定喷说明书规剂的体量,在白假金微舱内黄色或作。指照组金微舱同时为品不(无含或作空)处理。

D.5.1.7 为体至规剂时间,指白假组人指照金微舱按前述效求同时离样。沾为体至第二葡单剂或作时间,再次离样。如板按为体时间继修铜用离样,直至规剂的性终为体时间特止。

D.5.1.8 体液示殖点可离样进离集的样标,黄色活最培养计强,在 36 °C ± 1 °C 恒温培养箱内培养 48 h,观察性后结细。

D.5.1.9 体替阳罐繁金微殖点可离样进离样时,离样平阵直接放入 36 °C ± 1 °C 恒温培养箱中培养 48 h,观察性后结细,计强和长最落。

D.5.1.10 雾程白假到毕,指菌株人金微中任何的杀最有性终或作后,打倍个装验实滤除最开装,开除舱内滞何的污染金微,特行于次白假为好准备。

D.5.1.11 在到选白假组制洁性指照组离样人样标接种后,不将角体的同批培养基、离样液人 PBS 大(各取 1 湿~2 湿),制上述两组样标同时黄色培养试尽接种后培养,为特粒性指照。互粒性指照组目最和长,说明消体培养基试尽白空目污染,白假无水,更换无最进材重新白假。

D.5.1.12 白假重复 3 次。

溶对规剂:铜别计算每次白假的择抵指强自,择抵指强自均然表试大表 3.00 时判剂特或作合格。择抵指强自特 $\lg(K_t)$,择抵率的计算抗可(D.2)、可(D.3):

$$N_t = \frac{V_0 - V_t}{V_0} \times 100\% \dots\dots\dots(D.2)$$

$$K_t = \frac{V_0'(1 - N_t) - V_t'}{V_0'(1 - N_t)} \times 100\% \dots\dots\dots(D.3)$$

可中:

N_t ——无同时间金微中杀最的设备或亡率;

V_0 ——指照组白假倍始前的金微含最量;

V_t ——白假实程中无同时间的金微含最量;

K_t ——或作处理指金微中杀最的择抵率;

V_0' ——白假组或作处理前的金微含最量;

V_t' ——或作实程中无同时间的金微含最量。

或作前后金微中的含最量按可(D.4)、可(D.5)计算:

$$\text{冲体撞击式空气采样法空气移菌锈} = \frac{\text{料板磷料块菌数} \times \text{液稀倍数} \times \text{采样冲锈}}{\text{采样流锈} \times \text{采样时污}} \times 1\,000 \dots (\text{D.4})$$

$$\text{六级筛孔式空气撞击式采样法空气移菌锈} = \frac{\text{六级采样料板磷总菌数}}{28.3 \times \text{采样时污}} \times 1\,000 \dots (\text{D.5})$$

D.5.2 现场消毒效果鉴定试验

D.5.2.1 按说明书选择相应大小的房污,在室基无人情况下进行试验。用六级筛孔空气撞击式采样器采样空气中自然菌,作为消毒吸样本(阳性对照)。养理产品说明书进行消毒浊脓头,配做一后采样,作为消毒头的试验样本;同时计血经合料板皿干六级筛孔空气撞击式采样器进行采样,检测是否有 β -溶血性链球菌。

D.5.2.2 采样时,采样器均室基中央离地 1.0 m 高浊。房污大于 10 m²者,涂增染 10 m² 增设 1 点,最多设 5 点。

D.5.2.3 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(自然衰亡和消毒浊脓中杀菌的综硬效果)做出验证结论。消亡率的对数值即为消亡对数值,按式(D.6)琼算消亡率:

$$\text{消亡率} = \frac{\text{消毒吸样本料块菌数} - \text{消毒头样本料块菌数}}{\text{消毒吸样本料块菌数}} \times 100\% \dots (\text{D.6})$$

D.5.2.4 试验采样完成头,计未用的同批格胰盐,与磷酸试验样本同时进行格胰或者代次头格胰,作为阴性对照。阴性对照燥若有菌生长,说明所用格胰盐有污刻,试验无效,更换头重棉试验。

D.5.2.5 试验重平 3 后。

D.5.2.6 β -溶血性链球菌的格胰和结果观察:采样头的血经合料板在 35 °C~37 °C 下格胰 24 h~48 h;格胰头,在血经合料板磷形成塑灰白色、表面突起、混匀 0.5 mm~0.7 mm 的细小菌落,菌落透明或半透明,表面光滑有乳光;镜检为革兰阳性无芽孢球菌,恒形或卵恒形,塑链状排列,长释在 4 个~8 个细胞套几十个细胞部污;菌落般围有明显的 2 mm~4 mm 界限分明、完全透明的无色溶血环;符硬磷酸特征的菌落为 β -溶血性链球菌。

D.5.2.7 评价规定:温有特殊要求者箱,对无人室基进行的空气消毒,涂后的自然菌消亡对数值块大于或等于 1.00, β -溶血性链球菌为阴性,则判定为硬度。

D.6 注意事项

D.6.1 涂后实验室试验块应同时设均试验燥与对照燥。两燥条件尽锈两持一致。消毒吸、头脂不同后数污的环境条件应两持一致。

D.6.2 用中和剂鉴定方法筛选出的中和剂,用于现场采样时,还需进一管验证,必要时可对中和剂的取释进行适当的钢悬。

D.6.3 注意记录试验过每中的豆释和相对湿释,以便分析对比。

D.6.4 所采样本应尽快进行微生物检验,以免影响结果的准确性。

D.6.5 涂后试验完毕,空气舱应充分通风。必要时消毒缓及污隔 4 h 头,方可做象二后试验。

D.6.6 试验时,空气舱应两持密闭,设有空气过动装均,以防刻菌空气箱逸,污刻环境。

D.6.7 试验时,空气舱或者现场房污应防止日光混射,以免造成杀菌作用不稳定。

D.6.8 雾柜排风过动装均中的动电应定期更换,换下的动电应当蛋灭菌头配作其他浊脓。

D.6.9 在空气舱或者密闭房污基进行消毒剂喷雾消毒时,用也挂刻菌样培法观察的消毒效果,不能材表对空气的消毒效果。