



中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 327—2011

消毒剂杀灭分枝杆菌实验评价要求

Requirements of mycobactericidal evaluation
for disinfectant in laboratory

2011-04-12 发布

2011-09-30 实施

中华人民共和国卫生部 发布

中 华 人 民 共 和 国 卫 生
行 业 标 准
消毒剂杀灭分枝杆菌实验评价要求
WS/T 327—2011

*

中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 16 千字
2011年5月第一版 2011年5月第一次印刷

*

书号: 155066·2-21583

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68533533

前 言

根据《中华人民共和国传染病防治法》制定本标准。

本标准为你推荐性标准。

本标准的附录 A 和附录 B 为规范性附录。

本标准由卫生部消毒标准专业委员会提出。

本标准由中华人民共和国卫生部批准。

本标准负责起草单位：四川大学华西公共卫生学院、中国疾病预防控制中心。

本标准主要起草人：张朝武、李新武、王国庆。

消毒剂杀灭分枝杆菌实验评价要求

1 范围

本标准规定了消毒剂杀灭分枝杆菌实验的试剂与仪器、菌悬液和菌片的制备、定量杀灭试验和评价方法。

本标准适用于评价各种消毒剂对分枝杆菌的消毒效果。

本标准不适用于评价临床使用的治疗性药物对分枝杆菌杀灭效果。

2 规范性引用文件

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

GB/T 4789.28 食品卫生微生物学检验 染色法、培养基和试剂

GB 15981 消毒与灭菌效果的评价方法与标准

消毒技术规范 中华人民共和国卫生部

3 术语和定义

《消毒技术规范》中确立的有关定义和术语适用于本文件。

4 试剂与仪器

4.1 试验菌株

龟分枝杆菌脓肿亚种 CMCC(B)93326(ATCC 19977)。

4.2 培养基

4.2.1 分枝杆菌干燥培养基。

4.2.2 改良罗氏培养基(见附录 A)。

4.2.3 苏通综合培养基(见附录 A)。

4.3 其他试剂

4.3.1 中和剂 根据消毒剂种类选择并经中和剂鉴定试验(见附录 B)合格者。

4.3.2 稀释液 含 0.1%胰蛋白胨的生理盐水(见附录 A)。

4.3.3 标准硬水(见附录 A)。

4.3.4 有机干扰物(见附录 A)。

4.4 仪器设备

4.4.1 恒温培养箱。

4.4.2 恒温水浴箱。

4.4.3 计时器。

4.4.4 电动混和器。

4.4.5 刻度吸管(0.1 mL、1.0 mL、5.0 mL)或移液器。

4.4.6 生物安全Ⅱ级实验室(BSL-2)。

5 龟分枝杆菌脓肿亚种菌悬液和菌片的制备

5.1 菌悬液的制备

5.1.1 取冻干菌种管,以无菌操作打开,用毛细吸管吸加适量营养肉汤(应符合 GB/T 4789.28 要求,见附录 A)于管中,轻柔吹吸数次,使菌种融化分散。取含 5.0 mL~10.0 mL 营养肉汤或苏通综合液体培养基试管,滴入少许菌种悬液,置 37 °C 培养 18 h~24 h。用接种环取第 1 代培养的菌划线接种于商品化分枝杆菌专用复合琼脂培养基平皿上,于 37 °C 培养 72 h。挑取上述第 2 代培养物中典型菌落,接种商品化分枝杆菌专用复合琼脂培养基斜面,于 37 °C 培养 72 h,即为第 3 代培养物。密封后,在 4 °C 保存,时间不超过 6 周。

5.1.2 试验时取第 3 代斜面培养物,在商品化分枝杆菌专用复合琼脂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 72 h 新鲜培养物,用 5.0 mL 吸管吸取 3.0 mL~5.0 mL 稀释液加入斜面试管内,反复吹吸,洗下菌苔。随后,用 5.0 mL 吸管将洗液移至一含有 6 g~7 g 玻璃珠的无菌圆锥底试管中,用电动混合器混合至少 5 min。然后将菌液吸入到另一试管内制成菌悬液。菌悬液保存在 4 °C 冰箱内备用。当天使用不得过夜。

5.1.3 将制成的菌悬液,进行活菌培养计数,按其结果用稀释液稀释至所需浓度(悬液定量杀灭试验时回收菌数为 1×10^7 CFU/mL~ 5×10^7 CFU/mL)。

5.2 染菌载体(菌片)的制备

5.2.1 载体

5.2.1.1 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。根据消毒对象选择适宜材料载体作为代表。载体可以为方形,大小为 10 mm×10 mm。当以金属片为载体时,可用 12 mm 直径圆形金属片(厚 0.5 mm)。

5.2.1.2 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:

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

5.2.1.3 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。

5.2.1.4 载体经压力蒸汽灭菌后,使用滴染法染菌。

5.2.2 菌片的制备

取上述 5.1.2 所获得的龟分枝杆菌脓肿亚种菌悬液,用稀释液稀释至 2×10^8 CFU/mL~ 1×10^9 CFU/mL,然后取菌悬液 1 mL,加入有机干扰物 1 mL,混匀,取 10 μ L 滴染于灭菌载体上,于 37 °C 培养箱或室温自然干燥即可。活菌培养计数结果回收菌数应满足 1×10^6 CFU/片~ 5×10^6 CFU/片。

6 龟分枝杆菌脓肿亚种定量杀灭试验

6.1 试验分组

- 6.1.1 试验组,即预先设定的消毒剂量组,即选定消毒剂浓度与作用时间。
- 6.1.2 阳性对照组,以标准硬水代替消毒剂溶液,按照试验组相同的规定和程序进行试验。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。
- 6.1.3 阴性对照组,观察同次试验用相关试剂和培养基有无污染。

6.2 试验程序

6.2.1 悬液定量杀灭试验

适用于可稀释的化学消毒剂对分枝杆菌杀灭效果的评价或鉴定。

- 6.2.1.1 用标准硬水将消毒剂稀释成试验浓度的1.25倍,置20℃±1℃水浴待用。
- 6.2.1.2 试验组,于无菌大试管中加入0.5 mL试验用菌悬液,再加入0.5 mL有机干扰物质,混匀,20℃±1℃水浴5 min后,用无菌吸管吸取上述稀释的消毒剂溶液4.0 mL注入其中,迅速混匀并立即计时。待作用至各预定时间,分别吸取0.5 mL试验菌与消毒剂混合液加于4.5 mL经灭菌的中和剂中,混匀作用10 min,然后按照6.2.3进行活菌培养计数。
- 6.2.1.3 阳性对照,用标准硬水代替消毒剂按试验组方法试验,作为阳性对照。
- 6.2.1.4 根据活菌培养计数结果,按照6.3计算杀灭对数值。

6.2.2 载体定量杀菌试验

主要用于原液使用的液体化学消毒剂、黏稠的消毒剂和原液直接冲洗用的消毒剂对分枝杆菌消毒效果的评价。

- 6.2.2.1 将消毒剂置20℃±1℃水浴待用。
- 6.2.2.2 试验组,每个消毒剂量,取1片菌片,按每片染菌载体使用5.0 mL加入消毒剂溶液,在20℃±1℃条件下,待消毒作用至预定时间,立即用无菌镊子将染菌载体取出,移入含5.0 mL中和剂的试管中,电动混合器混合20 s,或将试管在手掌上振打80次。然后按照6.2.3的方法进行活菌培养计数。
- 6.2.2.3 阳性对照,用灭菌稀释液代替消毒剂按试验组方法试验,作为阳性对照。
- 6.2.2.4 根据活菌培养计数结果,按照6.3计算杀灭对数值。

6.2.3 龟分枝杆菌脓肿亚种的活菌培养计数

平皿倾注法:取1.0 mL分枝杆菌悬液(或菌片洗脱液)的适宜稀释倍数稀释液,加于灭菌平皿中,倾注经加热融化并冷却到45℃~50℃的商品化分枝杆菌专用复合琼脂培养基,每皿约25 mL~30 mL,旋转混匀。待冷却凝固后,放入干净的塑料袋内,37℃培养箱培养7 d,观察并计数菌落数。

6.3 杀灭对数值的计算

按式(1)计算杀灭对数值(KL)。

$$KL = \lg N_0 - \lg N_x \dots\dots\dots (1)$$

式中:
N₀——阳性对照的菌落数,CFU/mL或CFU/片;
N_x——相应试验剂量组的菌落数,CFU/mL或CFU/片。

7 评价规定

按产品使用说明书指定的使用浓度(强度)和作用时间,试验重复 3 次,应符合 GB 15981 要求。悬液定量杀灭试验中各次试验的杀灭对数值均 ≥ 4.00 ,载体定量杀灭试验中,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。

附录 A
(规范性附录)
培养基

A.1 改良罗氏培养基

A.1.1 成分

改良罗氏培养基成分见表 A.1。

表 A.1 改良罗氏培养基成分

成 分	用 量
味精(谷氨酸钠 95%以上)	7.2 g
磷酸二氢钾	2.4 g
硫酸镁	0.24 g
柠檬酸镁	0.6 g
甘油	12 mL
蒸馏水	600 mL
马铃薯淀粉	30.0 g
全卵液	1 000 mL
2%孔雀绿	20 mL

A.1.2 制法

各盐类成分溶解后,加马铃薯淀粉,混匀,沸水锅内煮沸 30 min~40 min(其间不时摇动,防凝块),呈糊状,待冷后,加入经消毒纱布过滤的新鲜全卵液 1 000 mL,混匀。加 2%孔雀绿 20 mL,混匀,分装试管(18 mm×180 mm),每一试管加培养基 7 mL,培养基斜面高度为培养基占试管底部的三分之二处为宜;若制作培养基平皿,则每皿($\Phi=9$ cm)加约 30 mL~35 mL,置血清凝固器内凝固。

凝固器内温度至 90℃后,放入分装好的培养基试管或平皿,以摆放两层为宜。待凝固器内温度达 85℃~90℃,计时,凝固 1 h~1.5 h 后取出,放冷,无菌试验后放 4℃冰箱备用,一个月内使用。

注:制备的培养基颜色鲜艳,表面光滑湿润,无气泡,有一定韧性和酸碱缓冲能力。

A.2 标准硬水(硬度 342 mg/L)

称取 0.304 g 氯化钙(CaCl_2)和 0.139 g 氯化镁($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$),用 1 000 mL 蒸馏水溶解后即成。

A.3 有机干扰物

a) 对未清洗物品的消毒效果评价时:称取 30 g 牛血清白蛋白,溶于 1 000 mL 蒸馏水中,待完全

溶解后用微孔滤膜(孔径为 0.45 μm)滤过除菌,4℃冰箱保存。

- b) 对清洗过物品的消毒效果评价时:称取 3 g 牛血清白蛋白,溶于 1 000 mL 蒸馏水中,待完全溶解后用微孔滤膜(孔径为 0.45 μm)滤过除菌,4℃冰箱保存。

A.4 磷酸盐缓冲液(PBS,0.03 mol/L,pH7.2)

称取 2.83 g 无水磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)和 1.36 g 磷酸二氢钾(KH_2PO_4),加入到 1 000 mL 蒸馏水中,待完全溶解后,调 pH 至 7.2~7.4,于 121℃压力蒸汽灭菌 20 min。

A.5 0.1%胰蛋白胨生理盐水溶液(TPS)

称取 1.0 g 胰蛋白胨、8.5 g 氯化钠,用 950 mL 以上蒸馏水溶解,并调节 pH 值在 7.0 ± 0.2 ,补加蒸馏水至 1 000 mL,分装后,经 121℃压力蒸汽灭菌。

A.6 苏通(Sauton)综合液体培养基

A.6.1 成分

苏通综合液体培养基成分见表 A.2。

表 A.2 苏通综合液体培养基成分

成 分	用 量
KH_2PO_4	0.5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 g
柠檬酸铁铵	0.05 g
柠檬酸	2.0 g
甘油	60 mL
天冬素	4.0 g
蒸馏水	940 mL

A.6.2 制法

上述成分加热溶解后,用氨水调节 pH 至 7.2,过滤、分装,121℃灭菌 20 min,冰箱保存备用。

A.7 营养肉汤培养基

A.7.1 成分

蛋白胨	10.0 g	牛肉膏	3.0 g
氯化钠	5.0 g	蒸馏水	1 000 mL

A.7.2 制法

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

附 录 B
(规范性附录)
中和剂鉴定试验方法

B.1 目的

确定所选中和剂是否适用于拟进行的分枝杆菌杀灭实验。

B.2 实验器材

- B.2.1 试验分枝杆菌悬液或分枝杆菌菌片。
- B.2.2 刻度吸管(0.1 mL、1.0 mL、5.0 mL)或移液器。
- B.2.3 平皿。
- B.2.4 恒温水浴箱。
- B.2.5 稀释液。
- B.2.6 分枝杆菌干燥培养基。
- B.2.7 电动混匀器。

B.3 试验设计原则

- B.3.1 试验中所用的消毒剂浓度应以杀菌试验中使用的最高浓度为准。
- B.3.2 所用实验方法应与杀菌试验方法一致,或用悬液或用载体定量试验。

B.4 实验分组

至少应平行进行以下各组试验:

- a) 中和剂+菌悬液(菌片)→培养
观察中和剂是否抑菌。
- b) (消毒剂+中和剂)+菌液或菌片→培养
观察中和产物和未被完全中和的残留消毒剂对试验分枝杆菌是否有抑菌作用。
- c) 稀释液+菌液或菌片→培养
作为菌悬液(菌片)阳性对照。
- d) 稀释液+中和剂→培养
作为试验材料阴性对照。

B.5 操作程序**B.5.1 中和剂悬液定量鉴定试验程序**

根据试验分组,准备足量的试管和平皿,并依次进行编号。将菌悬液用等量适用浓度的有机干扰物稀释成 2.5×10^3 CFU/mL~ 1.5×10^4 CFU/mL,作为试验菌悬液。

第一组 取 0.4 mL 标准硬水于试管中,加入 4.5 mL 中和剂,混匀,置 20 °C ±1 °C 的水浴中 5 min 后,加入 0.1 mL 菌悬液,混匀,作用 10 min 后,分别取 1.0 mL 接种两个平皿,做活菌培养计数。

第二组 取 0.4 mL 消毒剂于试管中,加入 4.5 mL 中和剂,混匀,置 20 °C ±1 °C 的水浴中 5 min 后,加入 0.1 mL 菌悬液,混匀,作用 10 min 后,分别取 1.0 mL 接种两个平皿,做活菌培养计数。

第三组 取 0.4 mL 标准硬水于试管,加入 4.5 mL 稀释液,混匀,置 20 °C ±1 °C 的水浴中 5 min 后,加入 0.1 mL 菌悬液,混匀,作用 10 min 后,分别取 1.0 mL 接种两个平皿,做活菌培养计数。

第四组 取标准硬水、稀释液、中和剂各 0.5 mL,接种于同一无菌平皿,倾倒入实验同批次的培养基 15 mL~20 mL,培养观察。

B.5.2 中和剂载体定量鉴定试验操作程序

根据试验分组,准备足量的试管和平皿,并依次进行编号。将菌悬液用等量适用浓度的有机干扰物稀释成 5×10^3 CFU/mL~ 1×10^4 CFU/mL,然后取 10 μL 滴染无菌载体,于 37 °C 培养箱或室温自然干燥。

第一组 取 5.0 mL 中和剂于试管中,置 20 °C ±1 °C 的水浴中 5 min 后,用无菌镊子取一片菌片放入试管中,作用 10 min。用电动混合器混合 10 s 或将试管振打 80 次,混匀,分别取 1.0 mL 接种两个平皿,做活菌培养计数。

第二组 取 5.0 mL 中和产物(以浸有消毒剂的载体置 5.0 mL 中和剂内,作用 10 min)于试管中,置 20 °C ±1 °C 的水浴中 5 min 后,用无菌镊子取一片菌片放入试管中,作用 10 min。用电动混合器混合 10 s 或将试管振打 80 次,混匀,分别取 1.0 mL 接种两个平皿,做活菌培养计数。

第三组 取 5.0 mL 稀释液于试管中,置 20 °C ±1 °C 的水浴中 5 min 后,用无菌镊子取一片菌片放入试管中,作用 10 min。用电动混合器混合 10 s 或将试管振打 80 次,混匀,分别取 1.0 mL 接种两个平皿,做活菌培养计数。

第四组 分别吸取稀释液和中和剂各 1.0 mL,接种于同一无菌平皿,倾倒入实验同批次的培养基 15 mL~20 mL,培养观察。

B.6 评价规定

B.6.1 第一、二、三组有相似菌量生长,悬液试验在 2.5×10^3 CFU/mL~ 1.5×10^4 CFU/mL,载体试验在 2.5×10^2 CFU/片~ 1.5×10^3 CFU/片,且组间菌落数误差率不应超过 15%。组间菌落数误差率(%)按式(B.1)计算:

$$\text{组间菌落数误差率} = \frac{(\text{3 组间平均菌落数} - \text{各组菌落平均数}) \text{绝对值之和}}{3 \times 3 \text{ 组间平均菌落数}} \times 100\% \dots (\text{B.1})$$

B.6.2 第四组无菌生长。

B.6.3 连续 3 次取得合格评价的中和剂方可用于正式杀灭试验。

