

WS

中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 798—2022

消毒剂消毒效果定性试验标准 应用稀释法

Qualitative testing standard on disinfection effect of disinfectant—use dilution
method

2022 - 01 - 24 发布

2022 - 06 - 01 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会 发布

目 次

前言.....	II
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 试验材料.....	1
5 染菌载体的制备.....	2
6 中和剂鉴定试验.....	3
7 杀菌试验.....	5
8 结果判定.....	5
9 注意事项.....	6
附录 A（规范性附录） 培养基和试剂.....	7

前 言

本标准由国家卫生健康标准委员会消毒标准专业委员会负责技术审查和技术咨询,由中国疾病预防控制中心负责协调性和格式审查,由国家卫生健康委综合监督局负责业务管理、法规司负责统筹管理。

本标准起草单位:北京市疾病预防控制中心、中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所、中国人民解放军疾病预防控制中心。

本标准主要起草人:佟颖、于礼、沈瑾、魏秋华、王劲、韩杰、安伟、肖潇、高迪。

消毒剂消毒效果定性试验标准 应用稀释法

1 范围

本标准规定了消毒剂消毒效果定性试验应用稀释法的试验材料、染菌载体的制备、中和剂鉴定试验、杀菌试验、结果判定和注意事项。

本标准适用于消毒剂对光滑硬质物体表面的实验室定性消毒效果评价。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本标准必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本标准；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。

WS/T 683 消毒试验用微生物要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

应用稀释法 use dilution method

采用定性方法评价消毒剂对不锈钢圆筒载体上试验微生物杀灭效果的检测方法。

4 试验材料

4.1 试验微生物

4.1.1 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 作为细菌繁殖体中化脓性球菌的代表，试验菌种为 ATCC 6538。

4.1.2 铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 作为医院感染中常见分离的细菌繁殖体的代表，试验菌种为 ATCC 15442。

4.1.3 肠炎沙门菌 (*Salmonella enterica*)，试验菌种为 ATCC 10708。

4.2 培养基

4.2.1 传代培养基

营养肉汤或合成肉汤培养基，用于细菌传代培养，见附录A。

4.2.2 中和试验培养基

4.2.2.1 基础培养液：营养肉汤或液体硫乙醇培养基，作为中和试验的基础培养基，见附录A。

4.2.2.2 中和剂培养液：根据消毒剂有效成分选择相应中和剂加入基础培养基中制备成为中和剂培养液，中和剂培养液需经中和剂鉴定试验验证合格后方可使用。

4.2.3 其他培养基

胰蛋白胨大豆琼脂培养基（TSA），用于染菌载体的菌落计数，见附录A.5。

4.3 其他试剂和材料

4.3.1 磷酸盐缓冲液（见附录A.6）。

4.3.2 标准硬水（见附录A.7）。

4.3.3 有机干扰物：采用3%牛血清白蛋白；如为清洁物品采用0.3%牛血清白蛋白。

4.3.4 载体：304不锈钢圆筒，表面抛光，外径8 mm±1 mm，内径6 mm±1 mm，壁厚1 mm±0.5 mm，长度10 mm±1 mm。

4.3.5 吊钩：长度为50 mm~75 mm，直径为0.5 mm的镍铬合金丝，末端3 mm呈直角弯曲。

4.3.6 滤纸：直径为90 mm的定性滤纸。

4.3.7 器皿：25 mm×100 mm玻璃试管，直径为90 mm的平皿，10 mL吸管，移液器等。

4.4 仪器设备

II级及以上生物安全柜、恒温培养箱、振荡培养箱、恒温水浴箱、计时器等。

5 染菌载体的制备

5.1 载体准备

5.1.1 外观检查

载体经肉眼观察合格，方可使用。如有可见破损如钝化、缺口、凹陷或凿孔等应剔除。

5.1.2 清洗

将载体置于1 mol/L NaOH溶液中浸泡约12 h，用去离子水反复冲洗3次~4次，收集冲洗水加入2滴~3滴1%酚酞溶液，如酚酞变为粉红色，表明有NaOH残留，需要继续冲洗至酚酞不变色，将载体晾干后密闭保存。

5.1.3 筛选测试

5.1.3.1 测试要求

未使用过或使用过但试验中无菌生长的载体，不需进行筛选测试，经压力蒸汽灭菌后可使用。使用过的载体且在试验中有菌生长，应进行筛选测试，测试合格方可使用。

5.1.3.2 测试方法

按照7.1规定，在无有机干扰物条件下，选用500 mg/L苯扎氯铵消毒液对铜绿假单胞菌消毒作用10 min，以Letheen肉汤作为中和剂培养液，对每个载体进行杀菌试验。

5.1.3.3 测试结果判断

无菌生长为载体筛选测试合格，测试管中有菌生长，则该载体不合格。

5.1.4 灭菌

载体染菌前,将清洗后的载体放入试管中,加入去离子水至载体完全浸没,经压力蒸汽灭菌后,冷却至室温备用。

5.2 菌悬液的制备

5.2.1 参照 WS/T 683 的规定复苏菌种,接种于含 10 mL 营养肉汤或合成肉汤的试管中,经 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, $200\text{ r/min}\pm 20\text{ r/min}$ 振荡培养 $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$, 此为第 1 代培养物。

5.2.2 用移液器取第 1 代培养物 $10\text{ }\mu\text{L}$ 转种于含 10 mL 营养肉汤或合成肉汤的试管中,经 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, $200\text{ r/min}\pm 20\text{ r/min}$ 振荡培养 $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$, 此为第 2 代培养物,可继续传代培养至第 5 代。

5.2.3 用移液器取第 1~5 代的 24 h 新鲜培养物 $10\text{ }\mu\text{L}$ 转种于 10 个含 10 mL 营养肉汤或合成肉汤的试管中,经 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置培养 $48\text{ h}\sim 56\text{ h}$ 后备用。

5.2.4 铜绿假单胞菌培养物应去除培养菌液表面的菌膜,或使用 10 mL 吸管直接从溶液中部吸取菌液,放入另一个试管中。不可使用含菌膜的菌悬液进行试验。

5.2.5 将金黄色葡萄球菌、肠炎沙门菌和去除菌膜的铜绿假单胞菌培养菌液用电动混匀器振荡混合 20 s,室温静置 10 min 后,用 10 mL 吸管吸取上层四分之三的菌液转移至新的试管中混匀,以去除细菌碎片和团块,菌悬液于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷藏保存备用,于 30 min 内使用。

5.2.6 根据消毒剂的检测要求,按照 WS/T 683 的规定加入有机干扰物。

5.3 载体染菌

5.3.1 每次试验时取 80 个无菌载体染菌,首先向 4 个无菌试管 ($25\text{ mm}\times 100\text{ mm}$) 中分别加入 20 mL 制备好的菌悬液,依次向每管菌液中加入 20 个干燥无菌载体,确保载体完全浸没于菌液中,持续 $15\text{ min}\pm 2\text{ min}$ 。

5.3.2 用灭菌后的吊钩取出载体,轻触管壁去除多余菌液,垂直放置于无菌的双层滤纸上,置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱内干燥 $40\text{ min}\pm 2\text{ min}$ 后,于 2 h 内进行试验。

5.4 染菌载体菌落计数

5.4.1 随机挑选 2 个染菌载体,分别放入 2 个含 10 mL 营养肉汤的 50 mL 离心管中,用电动混匀器剧烈振荡混匀 20 s 进行洗脱,使用磷酸盐缓冲溶液进行 10 倍系列稀释。

5.4.2 选择适宜的稀释度,吸取 1 mL 加入无菌平皿中,将冷却至 $40\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的融化营养琼脂培养基,倾注于平皿中,平行接种于 2 个平皿,置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 $48\text{ h}\pm 2\text{ h}$ 后进行菌落计数。

5.4.3 每个染菌载体上金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的回收菌量为 $1.0\times 10^6\text{ CFU/载体}\sim 1.0\times 10^7\text{ CFU/载体}$,肠炎沙门菌的回收菌量为 $1.0\times 10^5\text{ CFU/载体}\sim 1.0\times 10^6\text{ CFU/载体}$ 。

6 中和剂鉴定试验

6.1 试验原则

通过中和剂鉴定试验结果,判断所选中和方法对消毒剂是否有效中和。若中和 I 组显示可有效中和,则仅使用中和剂培养液进行中和。若中和 I 组结果显示未完全中和,而中和 II 组为有效中和,则在选用中和剂培养液进行中和的基础上,再使用培养液进行二次中和。如仍显示未完全中和,则继续进行中和 II 组试验。试验重复三次。

6.2 菌悬液的稀释

6.2.1 取1 mL制备好的菌悬液加入9 mL磷酸盐缓冲溶液中进行10倍梯度稀释,取4个稀释梯度(举例: 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 和 10^{-7})进行中和试验。

6.2.2 同时取4个稀释梯度各1.0 mL采用倾注法接种于TSA平板中,置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 $48\text{ h}\pm 2\text{ h}$ 后,进行菌落计数。

6.3 中和I组

6.3.1 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。

6.3.2 选取4个无菌载体加入10 mL消毒剂溶液中,作用至规定时间后,用灭菌后的吊钩取出载体,轻触管壁去除多余消毒液,分别转移至4管含有10 mL中和剂培养液的试管中。

6.3.3 向上述4管中和剂培养液中分别接种0.1 mL 4个稀释梯度(10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 和 10^{-7})的菌液,置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 $48\text{ h}\pm 2\text{ h}$ 。

6.4 中和II组

6.4.1 重复6.3.1和6.3.2,载体在中和剂培养液中室温静置30 min后,用灭菌后的吊钩取出载体,轻触管壁去除多余液体,分别转移至4管含10 mL基础培养液的试管中。

6.4.2 向上述4管培养液中分别接种0.1 mL 4个稀释梯度(10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 和 10^{-7})的菌液,置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 $48\text{ h}\pm 2\text{ h}$ 。

6.5 阳性对照

未暴露于消毒剂的中和剂培养液和基础培养液各4管,分别接种0.1 mL 4个稀释梯度(10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 和 10^{-7})的菌液,置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 $48\text{ h}\pm 2\text{ h}$,作为阳性对照。

6.6 阴性对照

中和剂培养液和基础培养液各1管加入无菌载体,不接种菌液,置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 $48\text{ h}\pm 2\text{ h}$,作为阴性对照。

6.7 结果判定

6.7.1 菌悬液浓度

菌悬液计数最后两个稀释梯度(如 10^{-6} 和 10^{-7}),至少有一个稀释梯度的菌悬液的数量在5 CFU/mL~100 CFU/mL范围内。

6.7.2 阳性对照

基础培养液管有菌生长表明试验菌、培养液性能良好,中和剂培养液管有菌生长表明中和剂对试验菌生长无明显影响。

6.7.3 阴性对照

应无菌生长。

6.7.4 中和I组

接种菌量较低(5 CFU/mL~100 CFU/mL)的中和剂培养液管中有菌生长,认定为中和剂可有效中和消毒剂,且中和产物对试验菌生长无明显影响。若无菌生长或仅在接种高浓度菌液的试管中生长表明未完全中和,或中和产物有抑菌作用,需进行中和II组试验。

6.7.5 中和Ⅱ组

接种菌量较低（5 CFU/mL~100 CFU/mL）的培养液中有菌生长认为中和有效。

7 杀菌试验

7.1 试验步骤

7.1.1 用标准硬水配制消毒剂溶液至作用浓度，以每管 10 mL 分装至 60 个无菌试管（25 mm×100 mm）中，置于 20 °C±1 °C 水浴中平衡 10 min。

7.1.2 用灭菌后的吊钩以 20 s±5 s 间隔依次向每管消毒液中加入一个染菌载体，加入过程中勿触碰管壁，轻柔振荡 2~3 下后放入于 20 °C±1 °C 水浴中。

7.1.3 消毒作用至规定时间后，用灭菌后的吊钩依次钩取染菌载体，轻触管壁去除多余消毒液，转移至 10 mL 中和剂培养液管中，加入时勿触碰管壁。

7.1.4 振荡混匀，置 36 °C±1 °C 恒温培养箱中静置培养 48 h±2 h。

7.1.5 若中和剂鉴定试验结果显示中和 I 组未完全中和，在中和剂培养液中静置 30 min 后用灭菌后的吊钩将染菌载体取出后，转移至基础培养液管中，振荡混匀后进行培养。

7.2 阳性对照

将未经消毒处理的染菌载体 2 个，分别放入 10 mL 中和剂培养液和 10 mL 基础培养液管中振荡混匀，置 36 °C±1 °C 恒温培养箱中静置培养 48 h±2 h。

7.3 阴性对照

将无菌载体 2 个分别放入 10 mL 中和剂培养液和 10 mL 基础培养液中振荡混匀，置 36 °C±1 °C 恒温培养箱中静置培养 48 h±2 h。

7.4 试验次数

试验重复三次。

8 结果判定

阳性对照管应有菌生长，阴性对照管应无菌生长。消毒剂标注的消毒对象为光滑硬质物体表面时，对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的三次重复杀灭效果均应达到表 1 的要求，即金黄色葡萄球菌的杀灭试验，阳性管数为 0~3 个，且阳性对照菌量对数值为 6~7 时，判定为合格，铜绿假单胞菌的杀灭试验，阳性管数为 0~6 个，且阳性对照菌量对数值为 6~7 时，判定为合格。

表 1 消毒剂应用稀释法对微生物杀灭效果的判定

试验微生物	阳性管数（个）	试验管数（个）	阳性对照菌量对数值
金黄色葡萄球菌	0~3	60	6~7
铜绿假单胞菌	0~6	60	6~7

表 1（续）

试验微生物	阳性管数（个）	试验管数（个）	阳性对照菌量对数值
肠炎沙门菌	0~1	60	5~6
注：当消毒剂说明书标注对肠炎沙门菌有效时，增加肠炎沙门菌的杀灭效果试验，对肠炎沙门菌的三次重复杀灭试验，也应符合阳性管数为0~1个，且阳性对照菌量对数值为5~6的要求。			

9 注意事项

- 9.1 金黄色葡萄球菌在试验中可使用营养肉汤或液体硫乙醇培养基作为基础培养液，Letheen 肉汤对金黄色葡萄球菌有一定的抑制作用。
- 9.2 同一消毒剂拟对多种微生物进行杀灭试验时，应按微生物种类分别进行中和剂鉴定试验。
- 9.3 染菌载体转移至消毒剂管时应避免触碰管壁，严格无菌操作，操作中产生的微生物气溶胶可能导致测试管假阳性。
- 9.4 在结果判定时，如培养液未出现混浊，但发生颜色变化或出现膜状物，应与阳性对照对比来判定结果，并进行细菌的分离鉴定。
- 9.5 杀菌试验中试验组有菌生长时，可随机挑选阳性管进行鉴定，以排除污染。

附 录 A
(规范性附录)
培养基和试剂

A.1 营养肉汤培养基

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	5.0 g
氯化钠	5.0 g
蒸馏水加至	1000 mL

以上各成分蒸馏水溶解，调 pH 至 7.2~7.4，于 121 °C 压力蒸汽灭菌 20 min 备用。

A.2 合成肉汤培养基

L-胱氨酸	0.05g
DL-蛋氨酸	0.37g
L-精氨酸	0.40 g
DL-组氨酸	0.30 g
L-赖氨酸	0.85 g
L-酪氨酸	0.21 g
DL-苏氨酸	0.50 g
DL-缬氨酸	1.00 g
L-亮氨酸	0.80 g
DL-异亮氨酸	0.44 g
氨基乙酸	0.06 g
DL-丝氨酸	0.61 g
DL-丙氨酸	0.43 g
L-谷氨酸	1.30 g
L-天冬氨酸	0.45 g
DL-苯丙氨酸	0.26 g
DL-色氨酸	0.05 g

L-脯氨酸	0.05 g
氯化钠	3.00 g
氯化钾	0.20 g
硫酸镁	0.05 g
磷酸二氢钾	1.50 g
磷酸氢二钠	4.00 g
盐酸硫胺素	0.01 g
烟酰胺	0.01 g
蒸馏水加至	1000 mL

以上各成分蒸馏水溶解，调 pH 至 6.9~7.3，于 121 °C 压力蒸汽灭菌 20 min，冷却至室温后，加入 0.1 mL 无菌 10% 葡萄糖溶液备用。

A.3 液体硫乙醇培养基

酪蛋白胨	15.0g
酵母粉	5.0 g
葡萄糖	5.0 g
硫乙醇酸钠	0.5 g
L-胱氨酸	0.5 g
氯化钠	2.5 g
刃天青	0.001 g
蒸馏水加至	1000 mL

除葡萄糖和刃天青溶液外，取上述成分混合，微温溶解，调节 pH 为弱碱性，煮沸，滤清，加入葡萄糖和刃天青溶液，摇匀，调 pH 至 6.9~7.3，分装于 115 °C 压力蒸汽灭菌 20 min 备用。

A.4 Lethen 肉汤培养基

酪蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	5.0 g
吐温-80	5.0 g
卵磷脂	0.7 g
氯化钠	5.0 g

蒸馏水加至	1000mL
-------	--------

以上各成分蒸馏水溶解，调 pH 至 6.8~7.2，于 121 °C 压力蒸汽灭菌 20 min 备用。

A.5 胰蛋白胨大豆琼脂培养基 (TSA)

胰蛋白胨	15.0 g
大豆蛋白胨	5.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	16.0 g
蒸馏水加至	1000 mL

以上各成分蒸馏水溶解，调 pH 至 7.2~7.4，于 121 °C 压力蒸汽灭菌 20 min 备用。

A.6 磷酸盐缓冲液 (PBS, 0.03mol/L)

无水磷酸氢二钠	2.83 g
磷酸二氢钾	1.36 g
蒸馏水加至	1000 mL

以上各成分蒸馏水溶解，待完全溶解后，调 pH 至 7.2~7.4，于 121 °C 压力蒸汽灭菌 20 min 备用。

A.7 标准硬水 (硬度 342 mg/L)

氯化钙	0.034 g
六水氯化镁	0.139 g
蒸馏水加至	1000 mL

以上各成分蒸馏水溶解，待完全溶解后，于 121 °C 压力蒸汽灭菌 20 min 备用。