

WS

中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 10054—2026

代替 WS/T 327—2011

分枝杆菌消毒效果评价方法

Evaluation method of mycobactericidal effect

2026-06-16 发布

2026-12-01 实施

目 次

前 言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 基本要求	1
5 评价方法	1
6 评价规定	4
7 注意事项	5
附 录 A （规范性）培 养 基.....	6
附 录 B （规范性）中和剂鉴定试验方法.....	8
参 考 文 献	10

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件代替WS/T 327—2011《消毒剂杀灭分枝杆菌实验评价要求》。与WS/T 327—2011相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- 更改了术语和定义（见第3章，2011年版的第3章）；
- 增加了基本要求（见第4章）；
- 更改了试剂与仪器中的培养基、其他试剂、仪器设备等（见第5章，2011年版的第4章）；
- 增加了载体种类（见5.2.2.1）；
- 增加了物体表面模拟现场消毒试验（见5.3.2.3）；
- 更改了评价规定（见第6章，2011年版的第7章）；
- 更改了附录A中改良罗氏培养基的成分及制法、营养肉汤的成分（见A.1、A.7，2011年版的A.1、A.7）。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由国家疾病预防控制标准委员会消毒标准专业委员会提出，国家疾病预防控制局归口。

本文件起草单位：上海交通大学医学院附属仁济医院、上海市疾病预防控制中心、浙江省疾病预防控制中心、湖南省结核病防治所（湖南省胸科医院）、中国食品药品企业质量安全促进会、中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所。

本文件主要起草人：班海群、朱仁义、陆烨、谭云洪、苏裕心、李陆瑶、沈鑫、李涛、庄重、俞云表。

本标准于2011年首次发布，本次为第一次修订。

分枝杆菌消毒效果评价方法

1 范围

本文件规定了分枝杆菌消毒效果评价的基本要求、评价方法、评价规定和注意事项。
本文件适用于消毒剂及产生化学消毒因子的消毒器械对分枝杆菌的消毒效果评价。

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文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

GB/T 38497 内镜消毒效果评价方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

物体表面模拟现场消毒试验 *simulated on-site disinfection test of object surface*

在密闭空间内，用载体定量杀灭试验评价消毒剂或产生化学消毒因子的消毒器械对物体表面的消毒效果。

4 基本要求

4.1 实验室要求

分枝杆菌消毒试验应在独立实验室内进行，其要求应符合GB 19489中生物安全II级（BSL-2）规定。

4.2 试验要求

4.2.1 实验室试验

4.2.1.1 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的消毒效果评价，其操作程序应按5.3.2.1进行。

4.2.1.2 载体浸泡定量杀灭试验，适用于黏稠的消毒剂、冲洗用消毒剂和原液使用的消毒剂对分枝杆菌的消毒效果评价，其操作程序应按5.3.2.2进行。

4.2.1.3 产生化学消毒因子的消毒器械实验室试验要求同消毒剂，宜用载体浸泡定量杀灭试验。

4.2.2 模拟现场试验

4.2.2.1 物体表面模拟现场消毒试验，用于验证消毒剂、产生化学消毒因子的消毒器械对人工污染于载体表面分枝杆菌的消毒效果，其操作程序应按5.3.2.3进行。

4.2.2.2 内镜模拟现场消毒试验，用于验证内镜消毒剂和清洗消毒机对人工污染于模拟内镜分枝杆菌的消毒效果，应按GB/T 38497进行。

5 评价方法

5.1 试验器材

5.1.1 试验菌株

龟分枝杆菌脓肿亚种 CMCC (B) 93326或ATCC 19977。

5.1.2 培养基

- 5.1.2.1 营养肉汤培养基（见附录 A）。
- 5.1.2.2 苏通综合液体培养基（见附录 A）。
- 5.1.2.3 改良罗氏培养基（见附录 A）。
- 5.1.2.4 商品化分枝杆菌培养基，按产品说明书储存并在有效期内使用。

5.1.3 有机干扰物

- 5.1.3.1 有机干扰物包括牛血清白蛋白（BSA）或胰蛋白胨大豆肉汤培养基（TSB），见附录 A。
- 5.1.3.2 用于经过清洗或较清洁的消毒对象的消毒剂悬液定量杀菌试验使用 0.3% BSA；用于不经过清洗或较脏的消毒对象的消毒剂悬液定量杀菌试验使用 3.0% BSA。
- 5.1.3.3 载体浸泡定量杀菌试验使用 TSB。

5.1.4 其他试剂

- 5.1.4.1 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。
- 5.1.4.2 稀释液：胰蛋白胨生理盐水溶液（TPS）（见附录 A）。
- 5.1.4.3 标准硬水（见附录 A）。

5.1.5 仪器设备

- 5.1.5.1 恒温培养箱。
- 5.1.5.2 恒温水浴箱或恒温金属浴。
- 5.1.5.3 计时器。
- 5.1.5.4 电动混匀器。
- 5.1.5.5 刻度吸管（0.1 mL，1.0 mL，5.0 mL）或移液器及配套吸头。
- 5.1.5.6 II级生物安全柜。

5.2 菌悬液和染菌载体的制备

5.2.1 菌悬液的制备

- 5.2.1.1 以无菌操作方式开启冻干菌种管，用毛细吸管吸加适量培养液（营养肉汤或苏通综合液体培养基）于管中，吹吸数次，使菌种溶化分散。取含 5.0 mL~10.0 mL 培养液的试管，滴入少许菌种悬液，置 36 °C±1 °C 培养 18 h~24 h。用接种环取第 1 代培养的菌悬液，划线接种于分枝杆菌培养基（改良罗氏培养基或其他商品化分枝杆菌培养基）平板上，于 36 °C±1 °C 培养 72 h。挑取上述第 2 代培养物中典型菌落，接种于分枝杆菌培养基斜面，于 36 °C±1 °C 培养 72 h，即为第 3 代培养物。密封后，4 °C 保存，时间不超过 6 周。
- 5.2.1.2 试验时，取第 3 代斜面培养物在分枝杆菌培养基斜面上按上述方法连续传代，取第 5 代~第 6 代的分枝杆菌培养基斜面 72 h 培养物，用 5.0 mL 吸管吸取 3.0 mL~5.0 mL 稀释液加入斜面试管内，反复吹吸，洗下菌苔。用吸管将洗液移至另一含有适量玻璃珠（直径约 6 mm）的无菌圆锥底塑料试管中，用电动混匀器混合 5 min，将菌液吸入到另一试管内制成菌悬液。
- 5.2.1.3 菌悬液保存在 4 °C 冰箱内备用，当天使用，不应过夜。

5.2.2 染菌载体的制备

5.2.2.1 载体

5.2.2.1.1 应根据消毒对象选择相应的材料为载体。常用的材料有金属、玻璃、滤纸、棉布、聚四氟乙烯等，载体通常为方形，大小 10 mm×10 mm。金属载体一般用 12 mm 直径圆形金属片（厚 0.5 mm），特定用途的消毒产品可使用其他材质、形状的载体。

5.2.2.1.2 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、展平备用。

5.2.2.1.3 布片用 40 织纱的白平纹棉布制作。将脱脂后的布块按载体规定的大小抽去边缘一周的经纬纱各一根，按抽纱痕剪开。金属片以不锈钢制作，纸片以新华定性滤纸制作，用于内镜消毒的模拟内镜以聚四氟乙烯制作，按照 GB 38497 进行。

5.2.2.1.4 载体经压力蒸汽灭菌后，使用滴染法染菌。

5.2.2.2 染菌载体

取上述 5.2.1.2 所获得的菌悬液，用 TSB 将菌悬液稀释成浓度约为 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，用移液器逐片滴加菌液 10 μ L，必要时用接种环涂匀整个载体表面。如使用布片载体等渗透性材质载体，用镊子夹取载体一角滴染菌液，待菌液均匀扩散后，置于平皿内。置 $36 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温培养箱或室温干燥备用。每个染菌载体的活菌培养计数结果回收菌数应满足 1×10^6 CFU/片 $\sim 5 \times 10^6$ CFU/片。

5.3 试验方法

5.3.1 试验分组

5.3.1.1 试验组：实验室试验中，选定产品使用说明书指定的最低浓度及 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）进行试验。模拟现场试验中，根据使用说明书，选择最低浓度及最短作用时间或指定程序进行试验。

5.3.1.2 阳性对照组：以标准硬水代替消毒剂溶液，按照试验组相同步骤进行试验。所得结果代表试验体系中所含受试菌的初始浓度，以其作为对照组活菌浓度。

5.3.1.3 阴性对照组：观察同次试验用相关试剂和培养基有无污染。

5.3.2 试验操作程序

5.3.2.1 悬液定量杀灭试验

5.3.2.1.1 按产品说明书要求配制消毒液。无特殊说明者，使用标准硬水将消毒剂配制成试验浓度的 1.25 倍，置 $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴或金属浴 5 min 备用。

5.3.2.1.2 取上述 5.2.1.2 所获得的菌悬液，配制浓度为 1×10^7 CFU/mL $\sim 5 \times 10^7$ CFU/mL，试验前与牛血清白蛋白（BSA）等体积混合成试验用菌悬液（回收菌落数为 1×10^6 CFU/mL $\sim 5 \times 10^6$ CFU/mL）。

5.3.2.1.3 取消毒试验用无菌试管，加入 1.0 mL 含有 BSA 的菌悬液，置 $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴或金属浴中 5 min 后，用无菌吸管吸取上述浓度消毒液 4.0 mL 注入其中，迅速混匀并立即计时。待试验菌与消毒剂相互作用至各设定时间，分别吸取 0.5 mL 试验菌与消毒剂混合液加于 4.5 mL 中和剂中，混匀。各管试验菌与消毒剂混合液经加中和剂作用 10 min 后，分别吸取 1.0 mL 样液，按 5.3.2.5 进行活菌培养计数。

5.3.2.1.4 同时用标准硬水代替消毒液，进行平行试验，作为阳性对照。分别吸取稀释液与中和剂各 1.0 mL 于无菌平皿内，倾入上述试验同批次的培养基 15 mL ~ 20 mL，作为阴性对照样本。

5.3.2.1.5 根据活菌培养计数结果，按照 5.3.3 计算杀灭对数值。

5.3.2.1.6 试验重复 3 次。

5.3.2.2 载体浸泡定量杀灭试验

5.3.2.2.1 取无菌平皿，标明所注入消毒液的浓度。按每片染菌载体 5.0 mL 的量，吸取相应浓度的消毒剂溶液注入平皿中（吸管不易吸取的粘稠消毒剂可直接用无菌平皿按每片 5 g 的量称取样品）。置 $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴或金属浴 5 min 备用。

5.3.2.2.2 用无菌镊子取预先制备的染菌载体 3 片分别放入平皿中，并使之浸没于消毒液，待消毒作用至各预定时间，用无菌镊子将染菌载体取出分别移入含 5.0 mL 中和剂的试管中。用电动混匀器混合 20 s，或将试管在手掌上振打 80 次。中和作用 10 min。混匀后，吸取 1.0 mL 直接接种平皿，每管接种 2 个平皿，按 5.3.2.5 进行活菌培养计数。

5.3.2.2.3 同时用标准硬水代替消毒液，进行平行试验，作为阳性对照。分别吸取稀释液与中和剂各

1.0 mL 于无菌平皿内，倾入上述试验同批次的培养基 15 mL~20 mL，作为阴性对照样本。

5.3.2.2.4 根据活菌培养计数结果，按照 5.3.3 计算杀灭对数值。

5.3.2.2.5 试验重复 3 次。

5.3.2.3 物体表面模拟现场消毒试验

5.3.2.3.1 按产品使用说明书要求，选择合适的密闭空间进行模拟现场消毒试验。

5.3.2.3.2 试验组：在 BSL-2 实验室内的生物安全柜中，采用无菌操作方式，用无菌镊子取预先制备的染菌载体至少 10 片分别放入无菌平皿中，按 GB 19489 要求进行包装和运送，在现场选择相对分布均匀、包含最难消毒位置的至少 10 个点位放置平皿，采用无菌操作方式打开平皿盖，按产品使用说明书要求进行消毒。待消毒作用至预定时间，收集所有点位的无菌平皿，按 GB 19489 要求进行包装并运送回 BSL-2 实验室，在生物安全柜中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，电动混匀器混合 20 s，或将试管在手掌上振打 80 次。

5.3.2.3.3 阳性对照：取 2 片染菌载体，放置与试验组相同时间，作为阳性对照。

5.3.2.3.4 阴性对照：吸取稀释液 1.0 mL 于无菌平皿内，倾入上述试验同批次的培养基 15 mL~20 mL。

5.3.2.3.5 所有试验样本均按 5.3.2.5 进行活菌培养计数。

5.3.2.3.6 根据活菌培养计数结果，按照 5.3.3 计算杀灭对数值。

5.3.2.3.7 试验重复 3 次。

5.3.2.4 内镜模拟现场消毒试验

用于内镜消毒的消毒剂 and 清洗消毒机，分枝杆菌内镜模拟现场消毒试验操作流程和结果判定按照 GB/T 38497 进行。

5.3.2.5 活菌培养计数

平皿倾注法：取 1.0 mL 分枝杆菌悬液（或染菌载体洗脱液）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 °C~50 °C 的培养基，每皿约 15 mL~20 mL，旋转混匀。待冷却凝固后，放入干净的塑料袋内，36 °C±1 °C 培养箱培养 7 d，观察并计数菌落数。

5.3.3 杀灭对数值的计算

计算各组的活菌浓度（CFU/mL），并换算为对数值（N），然后按式（1）计算杀灭对数值（KL）。

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

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，可进行数字修约。如消毒试验组平均生长菌落数小于 1 时，规定此时的杀灭对数值，即为大于或等于对照组平均活菌浓度的对数值（ $KL \geq N_0$ ）。

6 评价规定

6.1 试验回收菌量要求

6.1.1 悬液定量杀灭试验，回收菌量为 1×10^6 CFU/mL~ 5×10^6 CFU/mL；

6.1.2 载体定量浸泡杀灭试验，回收菌量为 1×10^6 CFU/片~ 5×10^6 CFU/片。

6.2 试验结果判定

6.2.1 用悬液定量杀灭试验评价杀菌效果时，在产品规定使用最低浓度与最短作用时间，以及最短作用时间的 1.5 倍时，各次试验的杀灭对数值均应大于或等于 4.00，可判定该产品对分枝杆菌消毒合格。

6.2.2 用载体浸泡定量杀灭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应大于或等于 3.00，可判定该产品对分枝杆菌消毒合格。

6.2.3 用物体表面模拟现场消毒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时，各次试验的所有样本杀灭对数值应大于或等于 3.00，可判定该产品对分枝杆菌消毒合格。

7 注意事项

7.1 试验菌株的培养物和染菌载体的实验操作应在生物安全柜内进行，转运时应采用符合要求的包装材料密闭转运，并在灭菌后按医疗废物处理。

7.2 试验人员应佩戴个人防护装备，注意无菌操作。

7.3 实验室应有菌株意外泄漏时的应急预案和标准操作流程，发生意外泄露时应按 GB 19489 处理。

附录 A (规范性) 培养基

A.1 改良罗氏培养基

A.1.1 成分

L-天冬酰胺或谷氨酸钠	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
鸡蛋匀液	1000 mL
2%孔雀绿	20 mL

A.1.2 制法

各盐类成分加入600 mL蒸馏水溶解后，混匀，沸水浴或煮沸30 min，也可121 °C灭菌15 min，待冷后，加入经消毒纱布过滤的新鲜鸡蛋匀液1000 mL，混匀，加2%孔雀绿20 mL，混匀，分装试管（18 mm×180 mm），每一试管加培养基约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；若制作培养基平板，则每皿（ $\phi=9$ cm）加约30 mL~35 mL，置蒸汽凝固器内凝固。

凝固器预热后，放入分装好的培养基试管或平板，以摆放两层为宜。待凝固器内温度达85 °C~90 °C，计时，凝固1 h~1.5 h后取出，放冷，无菌试验后放4 °C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）

氯化钙（CaCl ₂ ）	0.304 g
氯化镁（MgCl ₂ ·6H ₂ O）	0.139 g
纯化水	1000 mL

将各成分加入到1000 mL纯化水中，待完全溶解后，用0.45 μm滤膜过滤除菌备用。

A.3 有机干扰物

A.3.1 牛血清白蛋白（BSA）

牛血清白蛋白	30 g或3 g
纯化水	1000 mL

将牛血清白蛋白加入到1000 mL纯化水中，待完全溶解后用微孔滤膜（孔径为0.45 μm）滤过除菌，4 °C冰箱保存备用。

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1000 mL纯化水中，待完全溶解后用微孔滤膜（孔径为0.45 μm）滤过除菌，4 °C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1000 mL纯化水中，待完全溶解后用微孔滤膜（孔径为0.45 μm）滤过除菌，4 °C冰箱保存。

A.3.2 胰蛋白胨大豆肉汤培养基（TSB）

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

用纯化水配制而成，调节pH为7.0~7.4，经121 °C压力蒸汽灭菌20 min备用。

A.4 磷酸盐缓冲液 (PBS, 0.03 mol/L, pH7.2)

无水磷酸氢二钠 (Na ₂ HPO ₄)	2.83 g
---	--------

磷酸二氢钾 (KH ₂ PO ₄)	1.36 g
--	--------

将各成分加入到1000 mL蒸馏水或纯化水中，待完全溶解后，于121 °C压力蒸汽灭菌20 min备用。

A.5 胰蛋白胨生理盐水溶液 (TPS)

胰蛋白胨	1.0 g
------	-------

氯化钠	8.5 g
-----	-------

纯化水	1000 mL
-----	---------

先用900 mL以上纯化水溶解，并调节pH值在7.0~7.2 (20 °C)，最终用纯化水加至1000 mL，分装后，经121 °C压力蒸汽灭菌20 min后备用。

A.6 苏通 (Sauton) 综合液体培养基

KH ₂ PO ₄	0.5 g
---------------------------------	-------

MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 g
---------------------------------------	-------

柠檬酸铁铵	0.05 g
-------	--------

柠檬酸	2.0 g
-----	-------

甘油	60 mL
----	-------

L-天冬酰胺	4.0 g
--------	-------

纯化水	1000 mL
-----	---------

将各成分加入到1000 mL纯化水中，加热溶解后，用氨水调节pH至7.2，过滤、分装，121 °C灭菌20 min，冰箱保存备用。

A.7 营养肉汤培养基

蛋白胨	10.0 g
-----	--------

氯化钠	5.0 g
-----	-------

牛肉膏	5.0 g
-----	-------

纯化水	1000 mL
-----	---------

将各成分溶解于1000 mL纯化水中，调节pH至7.2~7.4，分装，于121 °C压力蒸汽灭菌20 min备用。

附录 B
(规范性)
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试验。

B.2 试验设计原则

B.2.1 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.2.2 所用试验方法应与杀菌试验方法一致，相应使用悬液或载体定量试验。

B.3 试验分组

至少应平行进行以下各组试验。

- a) 中和剂+菌悬液或染菌载体→培养
观察中和剂是否抑菌。
- b) (消毒剂+中和剂)+菌悬液或染菌载体→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+菌悬液或染菌载体→培养
作为菌悬液或染菌载体阳性对照。
- d) 稀释液+中和剂→培养
作为试验材料阴性对照。

B.4 操作程序

B.4.1 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。鉴定试验包括四组：

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 $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 的水浴或金属浴中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（对于酸性氧化电位水检测时，取0.5 mL消毒剂于试管内，加入4.4 mL中和剂），混匀，置 $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 的水浴或金属浴中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 $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 的水浴或金属浴中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1.0 mL，接种于同一无菌平皿，倾入试验同批次的培养基15 mL~20 mL，培养观察。

B.4.2 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，然后取10 μ L滴染无菌载体，于 $36 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱或室温自然干燥。使载体试验回收菌量在 2.5×10^2 CFU/片~ 1.5×10^3 CFU/片之间。鉴定试验包括四组。

——第一组 取5.0 mL中和剂于试管中，置 $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 的水浴或金属浴中5 min后，用无菌镊子取1片染菌载体放入试管中，并使浸透于中和剂内，作用10 min。用电动混匀器混合20 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中和产物溶液（按每片浸有消毒剂的载体加入5.0 mL中和剂制备中和产物，作用10 min）于试管中，置 $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 的水浴或金属浴中5 min后，用无菌镊子取1片染菌载体放入试管中，并使浸透于中和产物溶液中，作用10 min。用电动混匀器混合20 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℃±1℃的水浴或金属浴中5 min后，用无菌镊子取1片染菌载体放入试管中，并使浸透于稀释液中，作用10 min。用电动混匀器混合20 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，倾入试验同批次的培养基15 mL~20 mL，培养观察。

B.5 评价规定

B.5.1 第一、二、三组有相似菌量生长，悬液试验作用体系中菌量在50 CFU/mL~300 CFU/mL之间，载体试验菌量在 2.5×10^2 CFU/片~ 1.5×10^3 CFU/片之间，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：

$$P_Z = \frac{\sum |x - \bar{x}_i|}{\sum \bar{x}_i} \times 100\% \dots\dots\dots (B.1)$$

式中：

P_Z ——组间菌落数误差率，%；

\bar{x} ——三组间菌落平均数；

\bar{x}_i ——各组菌落平均数，单位为菌落形成单位(CFU)。

B.5.2 第四组无菌生长。否则应更换试剂，重新试验。

B.5.3 试验重复3次，结果符合以上要求的，判定所选中和剂合格。

B.6 注意事项

B.6.1 试验所分各组均有其特定意义，不得任意删减。

B.6.2 无菌操作，保持试验用液和器材的无菌，注意更换吸管，保证试验的准确性。

B.6.3 试验组序应按本文件执行。

B.6.4 中和剂鉴定试验应根据正式杀灭试验进行选择(或设计)，悬液鉴定试验结果可用于载体试验，载体鉴定试验结果不可用于悬液试验。

参 考 文 献

- [1] GB/T 30690 小型压力蒸汽灭菌器灭菌效果监测方法和评价要求
 - [2] WS 233 病原微生物实验室生物安全通用准则
 - [3] WS 628 消毒产品卫生安全评价技术要求
 - [4] WS/T 10009 消毒产品检测方法
 - [5] YY 1277 压力蒸汽灭菌器 生物安全性能要求
-