

ICS 11.080

CCS C 59

WS

中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 10051—2026

## 消毒剂持续消毒效果实验室评价方法

Evaluation method for long-lasting disinfection effect of disinfectants in laboratory

2026-06-16 发布

2026-12-01 实施

国家疾病预防控制局 发布



## 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 试验方法 .....	2
5 评价规定 .....	4
6 注意事项 .....	4
附录 A（资料性） 试剂和培养基配方 .....	5



## 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。

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：中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所、四川省疾病预防控制中心、江苏省疾病预防控制中心、北京市疾病预防控制中心、空军特色医学中心、山东理工大学。

本文件主要起草人：段弘扬、张琪、马慧、徐燕、于礼、李涛、宋振耀、刘会、张流波。



# 消毒剂持续消毒效果实验室评价方法

## 1 范围

本文件描述了消毒剂持续消毒效果实验室评价的试验方法、评价规定和注意事项。

本文件适用于消毒剂对硬质无孔物体表面的持续消毒作用实验室效果评价。

## 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/T 38498-2020 消毒剂金属腐蚀性评价方法  
GB/T 38502-2020 消毒剂实验室杀菌效果检验方法  
WS/T 683-2020 消毒试验用微生物要求  
WS/T 10009-2023 消毒产品检测方法

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**初始接种 initial inoculation**

用于擦拭循环过程的载体，经压力蒸汽灭菌后滴染一定量菌悬液和有机干扰物的过程。

### 3.2

**再接种 re-inoculation**

在擦拭循环过程中对染菌载体重复添加一定量菌悬液和有机干扰物的过程。

### 3.3

**最终接种 final inoculation**

在一个完整擦拭循环结束后，向染菌载体添加一定量菌悬液和有机干扰物的过程。

### 3.4

**持续消毒作用 long-lasting disinfection effect**

**长效消毒作用**

消毒剂在较长时间（ $\geq 24$  h）对物体表面的微生物仍具有杀灭能力的现象。

### 3.5

**硬质无孔物体表面 non-porous hard surfaces**

物理结构坚硬、致密，表面和内部无空隙，液体、气体等难以渗透吸附，仅能附着于表面的物体接触面。

注：如金属、塑料、玻璃等表面。

## 4 试验方法

### 4.1 试验器材

#### 4.1.1 试验菌株

金黄色葡萄球菌（ATCC 6538）、大肠杆菌（8099）；根据消毒剂特定用途或试验特殊需要，可增选其他菌株。

#### 4.1.2 染菌载体

试验用染菌载体为直径 $24.0\text{ mm}\pm 0.1\text{ mm}$ ，厚度 $1.0\text{ mm}$ 的光滑不锈钢圆片。按照GB/T 38498-2020中5.2.1要求进行处理后，经压力蒸汽灭菌后备用。

#### 4.1.3 试剂

胰蛋白胨生理盐水溶液（TPS）、磷酸盐缓冲液（PBS）、0.6%牛血清白蛋白（0.6% BSA）、营养琼脂培养基、胰蛋白胨大豆琼脂培养基（TSA）、标准硬水、中和剂（经鉴定试验合格者）等。

#### 4.1.4 仪器耗材

离心管（盖子直径 $35\text{ mm}\pm 1\text{ mm}$ ，约 $13\text{ g}$ ）、砝码（总重 $210.0\text{ g}\pm 2.0\text{ g}$ ）、擦拭布（无纺布，100%聚丙烯， $50\text{ g/m}^2$ ， $60\text{ cm}\times 30\text{ cm}$ ）、镊子、恒温水浴箱、电动混匀器、浊度计、恒温培养箱、刻度吸管、移液器及配套枪头等。

### 4.2 试验步骤

#### 4.2.1 试验前准备和预处理

##### 4.2.1.1 菌悬液的制备

根据GB/T 38502-2020中5.1.2、WS/T 10009-2023中5.1.2.3、WS/T 683-2020中5.1和第6章要求完成试验菌株复苏、传代和培养。取第3代~第8代营养琼脂培养基培养 $18\text{ h}\sim 24\text{ h}$ 的金黄色葡萄球菌和大肠杆菌新鲜斜面培养物，稀释至适宜浓度制备初始接种和最终接种培养物（金黄色葡萄球菌和大肠杆菌菌量为 $1\times 10^8\text{ CFU/mL}\sim 5\times 10^8\text{ CFU/mL}$ ），以及再接种培养物（金黄色葡萄球菌和大肠杆菌为 $1\times 10^6\text{ CFU/mL}\sim 5\times 10^6\text{ CFU/mL}$ ）。将初始接种培养物、最终接种培养物和再接种培养物分别与0.6%牛血清白蛋白（0.6% BSA）按照1:1体积比进行混合，制成相应接种菌悬液。

##### 4.2.1.2 染菌载体的制备

试验组与阳性对照组所有试验均需设置平行样2个。取4片经压力蒸汽灭菌、干燥后的不锈钢片，分别吸取初始接种菌悬液 $10\text{ }\mu\text{L}$ 于不锈钢片中心，使用无菌接种环将其扩散至距钢片边缘 $0.5\text{ cm}$ 处， $36\text{ }^\circ\text{C}\pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ 干燥 $10\text{ min}$ 后备用。2片作为试验组，另外2片作为阳性对照组。

##### 4.2.1.3 试验组和对照组的预处理

将染菌载体放入一次性无菌平皿中，染菌面朝上。向试验组不锈钢片中心滴加 $0.1\text{ mL}$ 消毒剂（按照说明书使用浓度），向对照组不锈钢片中心滴加 $0.1\text{ mL}$ 标准硬水，室温静置 $24\text{ h}$ 使其自然晾干。

##### 4.2.1.4 擦拭准备

向离心管中装入 $210.0\text{ g}\pm 2.0\text{ g}$ 砝码，作为擦拭循环中摩擦压力来源。按照图1方式将擦拭布对折两次，使试验用擦拭布厚度为四层， $121\text{ }^\circ\text{C}$ 压力蒸汽灭菌后备用。按照图2示意图，将试验用擦拭布平

整固定包裹在装有砝码的离心管盖子上，并使用橡皮筋固定，制成擦拭装置，确保试验用擦拭布不出现移动。

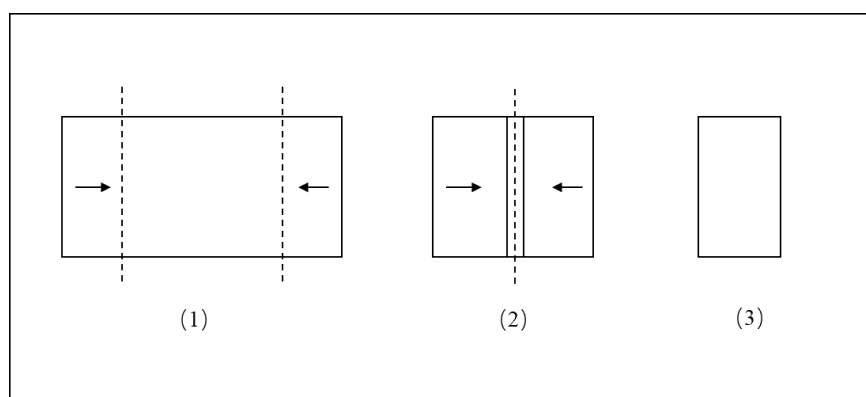


图1 擦拭布折叠方式示意图

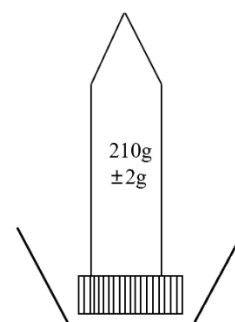


图2 擦拭装置示意图

#### 4.2.2 擦拭程序

##### 4.2.2.1 干擦拭

将不锈钢片使用镊子等固定在不皿中适当位置，染菌面朝上。随后，将擦拭装置离心管盖端垂直不锈钢片表面放置，仅施加水平方向作用力，使离心管向前移动一次，然后向后移动一次，划过不锈钢片表面，每次移动需确保与不锈钢片表面完全接触，完成一次干擦拭。

##### 4.2.2.2 干擦拭后再接种

吸取 10  $\mu$ L 再接种菌悬液于试验组和阳性对照组不锈钢片中心，用无菌接种环将其扩散至距钢片边缘 0.5 cm 处，随后放置于 36  $^{\circ}$ C  $\pm$  1  $^{\circ}$ C 培养箱至菌片干燥。

##### 4.2.2.3 湿擦拭

按照 4.2.2.1 中方法制作新的擦拭装置，使用标准硬水在距离擦拭布 75 cm 处使用简易喷壶对离心管盖一端喷水两次。将再接种后的不锈钢片固定在不皿中适当位置，染菌面朝上。随后，再次将擦拭装置离心管盖端垂直不锈钢片表面放置，仅施加水平方向作用力，使离心管向前移动一次，然后向后移动一次，划过不锈钢片表面，每次移动需确保与不锈钢片表面完全接触，完成一次湿擦拭。

##### 4.2.2.4 湿擦拭后再接种

室温放置约 1 min 至不锈钢片表面完全干燥。随后按照 4.2.2.2 中方法进行再接种，置于 36  $^{\circ}$ C  $\pm$  1  $^{\circ}$ C 培养箱至菌片干燥。

##### 4.2.2.5 擦拭循环

一个完整擦拭循环包括干擦拭、干擦拭后再接种、湿擦拭和湿擦拭后再接种。完成两次完整擦拭循环，在第三个擦拭循环进行湿擦拭后，室温干燥 1 min 至不锈钢片表面完全干燥，随后进入最终接种流程。

##### 4.2.2.6 最终接种

吸取 10  $\mu$ L 最终接种菌悬液滴加于不锈钢片中心，用无菌接种环将其扩散至距钢片边缘 0.5 cm 处。作用 10 min 后，将试验组不锈钢片放入 10 mL 含中和剂的离心管中，阳性对照组不锈钢片放入 10 mL 含 0.1% 吐温 PBS 的离心管中。充分振荡洗脱，取洗脱液稀释后接种于不皿，置于 36  $^{\circ}$ C  $\pm$  1  $^{\circ}$ C 培养箱中培养 48 h，计数菌落数。

##### 4.2.2.7 阴性对照

分别吸取试验用标准硬水、中和剂和稀释液各 1.0 mL 接种平皿，每份样本接种两个平皿，作为阴性对照组。

## 5 评价规定

5.1 试验重复三次，各次试验杀灭对数值均大于或等于 3.00，则可判定该消毒剂具有 24 h 持续消毒作用。阴性对照组应无菌生长，阳性对照组金黄色葡萄球菌和大肠杆菌回收菌落数为  $1 \times 10^6$  CFU/片 ~  $5 \times 10^6$  CFU/片。

5.2 计算各组的菌落总数 (CFU/片)，并换算为对数值，然后按照公式 (1) 计算杀灭对数值。

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

式中：

$KL$ ——杀灭对数值；

$N_0$ ——对照组平均活菌浓度的对数值；

$N_x$ ——试验组平均活菌浓度的对数值。

## 6 注意事项

6.1 在试验中每次均应设置阳性对照和阴性对照。阳性对照组回收菌量符合要求，阴性对照组无菌生长，试验方为有效。

6.2 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，则全部试验重做。

6.3 不锈钢片应确保表面光洁，不可使用任何可能影响试验结果的物品清洁钢片，不锈钢片每次试验后丢弃，不可重复使用。

6.4 擦拭过程中，应注意不锈钢片上垂直方向受力全部为离心管与砝码的重量，推拉作用力仅为水平方向，同时确保擦拭布与不锈钢片整个表面接触。擦拭布在每次干擦拭或湿擦拭后均需进行更换。

6.5 擦拭循环应在  $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ 、相对湿度为 40 %~70 % 的条件下进行。也可根据评价消毒剂说明书的使用要求选择其它条件。

**附录 A**  
(资料性)  
试剂和培养基配方

**A.1 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 ℃)，最终用纯化水加至1000 mL，分装后，经121 ℃压力蒸汽灭菌20 min后备用。

**A.2 磷酸盐缓冲液 (PBS, 0.03 mol/L, pH7.2)**

无水磷酸氢二钠	2.83 g
磷酸二氢钾	1.36 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，于121 ℃压力蒸气灭菌20 min备用。

**A.3 标准硬水 (硬度 342mg/L)**

氯化钙 (CaCl <sub>2</sub> )	0.304 g
氯化镁 (MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> 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.4 有机干扰物**

牛血清白蛋白	6 g
纯化水	1000 mL

溶解后用微孔滤膜 (孔径为0.45 μm) 滤过除菌，冰箱保存备用。

**A.5 营养琼脂培养基**

蛋白胨	10 g
牛肉膏	5 g
氯化钠	5 g

WS/T 10051—2026

琼脂	15 g
纯化水	1000 mL

用纯化水配制而成，调节pH至 7.2~7.4，加热溶解，分装，于121 °C压力蒸汽灭菌20 min备用。

#### A.6 胰蛋白胨大豆琼脂培养基（TSA）

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)
琼脂	1.6% (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。

