



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
国家标准化管理委员会

发布



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~ 5×10^5 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:

- 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。
- 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。
- 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。
- 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:

- 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℃ 冰箱存放不得超过 4 h。

附录 C

(规范性附录)

物体表面喷雾消毒效果现场试验方法

C.1 目的

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

C.2 试剂或材料

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

C.2.2 标准硬水(硬度 342 mg/L)。

C.2.3 中和剂溶液(经 A.5 中和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 胰蛋白胨生理盐水(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 移液器及配套的塑料吸头。

C.3.5 试管。

C.3.6 平皿。

C.3.7 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)。

C.3.8 无菌棉拭。

C.4 试验步骤

C.4.1 在使用现场,按说明书介绍的使用浓度、作用时间和消毒方法消毒物体表面,检测样本数应大于或等于 30 份。

C.4.2 在物体表面(桌面、台面、门等)用规格板标定两块相邻的面积各为 25 cm² 的区块,一块为阳性对照区,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 稀释液试管中浸湿,于管壁上挤干,对对照区块涂抹采样,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,作为阳性对照组样本。

C.4.4 按说明书中的方法和剂量对试验区物体表面进行消毒。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,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中和剂溶液试管内,电动混匀器混合 20 s 或者在手掌振敲 200 次,作为试验组样本。

C.4.5 将阳性对照组和试验组样本,分别取 1.0 mL,以琼脂倾注法接种平皿,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, 每日观察并记录最终结果。

C.4.6 将本次试验未用完的同批次中和剂溶液、稀释液、棉拭、培养基等分别设阴性对照。

C.4.7 按式(A.2)计算每次试验的杀灭对数值和平均杀灭对数值。

C.5 评价规定

阴性对照组应无菌生长, 阳性对照组应有较多细菌生长, 消毒样本的平均杀灭对数值大于或等于 1.00, 判定为消毒合格。

C.6 注意事项

C.6.1 在现场试验中, 自然菌的种类复杂, 平板上常出现大面积霉菌生长, 导致无法计数菌落。在两个平行的平板中如有一个平板可数清菌落数时, 即按该平板菌落数计算结果。如两平板均有大面积霉菌生长, 应重新进行试验。

C.6.2 阳性对照区和试验区应在相邻的区域, 但不得在同一区内进行试验。

C.6.3 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。

C.6.4 现场样本应及时检测。室温存放不得超过 2 h, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱存放不得超过 4 h。

C.6.5 若消毒对象为特定目标微生物, 则现场试验时应对该特定目标微生物进行检测, 检测方法参考相关标准规范; 结果评定时, 对自然菌的平均杀灭对数值大于或等于 1.00, 且该特定目标微生物不检出, 则判定为消毒合格。

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后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 采样液[非化学因子杀菌试验时,用含抗泡沫剂(辛醇或者橄榄油)的营养肉汤培养基;消毒剂杀菌试验时,用含相应中和剂的营养肉汤培养基]。

D.2.2.2 磷酸盐缓冲液(PBS, 0.03 mol/L, pH 7.2)(稀释液)。

D.2.2.3 中和剂溶液(经 D.4 中和剂鉴定试验鉴定合格)。

D.2.2.4 胰蛋白胨大豆琼脂培养基(TSA)(消毒剂杀菌试验时,应在其中加入相应的中和剂)。

D.2.2.5 血琼脂平板(含相应中和剂)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。一对空气舱所处环境(包括温度、湿度、光照、密闭性和通风条件等)应一致。舱宜以不锈钢或者铝合金和玻璃构建。应安装温度和湿度调节装置以及通风机过滤除菌或者其他消毒装置和相应管道,此外,还应开启喷雾染菌、给消毒剂、采样、袖套操作和样本传递等窗口。

D.3.2 喷雾染菌装置,包括:空气压缩机、压力表、气体流量计、气溶胶喷雾器等。喷出细菌气溶胶微粒的直径应 90% 以上在 $1.0\ \mu\text{m}$ ~ $10.0\ \mu\text{m}$ 之间。

D.3.3 空气微生物采样装置,包括:六级筛孔空气撞击式采样器、液体撞击式采样器、抽气设备、气体流量计等。

D.3.4 环境监测器材,如温度计、湿度计等。

D.3.5 电动混匀器、恒温培养箱、刻度吸管、浊度计、移液器及配套的塑料吸头。

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

取白色葡萄球菌的营养琼脂培养基斜面新鲜培养物(18 h~24 h),用 5.0 mL 吸管吸取 3.0 mL~5.0 mL 营养肉汤加入斜面试管内,反复吹吸,洗下菌苔,用无菌脱脂棉过滤后,用营养肉汤稀释成浓度

为 5×10^3 CFU/mL $\sim 3 \times 10^4$ 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 $\sim 3 \times 10^3$ 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 $\sim$ 第 3 组菌量在 50 CFU/平板 $\sim$ 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)：

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

- 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) 连续 3 次试验取得合格评价。

D.5 试验阶段

D.5.1 实验室试验

D.5.1.1 取试验菌悬液,用无菌脱脂棉过滤后,再用营养肉汤培养基稀释成所需浓度。

D.5.1.2 同时调节两个空气舱的温度、相对湿度至试验要求的温度(20℃~25℃)和相对湿度(50%~70%)。

D.5.1.3 将使用的器材一次放入空气舱内,将门关闭。此后,一切操作和仪器设备的操纵均在舱外通过带有密封袖套的窗口或者摇控器进行。直至试验结束,方可将门打开。

D.5.1.4 按预备试验确定的压力、气体流量及喷雾时间喷雾染菌。边喷雾染菌,边用风扇搅拌。喷雾染菌完毕,继续搅拌 5 min,而后静置 5 min,同时对对照组和试验组空气舱分别进行消毒前采样,作为对照组试验开始前和试验组消毒处理前的阳性对照(即污染菌量)。空气舱内空气细菌浓度应达 5×10^4 CFU/m³~ 5×10^6 CFU/m³(按消毒处理前阳性对照样本检测结果计)。

D.5.1.5 在 20 m³ 空气舱实验室试验时,用六级筛孔空气撞击式采样器采样,采样时,将六级筛孔空气撞击式采样器放在舱中央离地 1 m 高处(采样方法按采样器使用说明书进行)。在 1 m³ 空气舱实验室试验时,空气舱内用采样量较小的液体撞击式采样器采样,采样器置柜内中央处。

D.5.1.6 按产品说明书规定的用量,在试验空气舱内进行消毒。对照组空气舱同时作相应(不含消毒剂)处理。

D.5.1.7 作用至规定时间,对试验组和对照空气舱按前述要求同时采样。待作用至第二个预定消毒时间,再次采样。如此按作用时间继续分段采样,直至规定的最终作用时间为止。

D.5.1.8 用液体撞击式采样器采集的样本,进行活菌培养计数,在 36℃±1℃恒温培养箱内培养 48 h,观察最后结果。

D.5.1.9 用六级筛孔空气撞击式采样器采样时,采样平板直接放入 36℃±1℃恒温培养箱中培养 48 h,观察最后结果,计数生长菌落。

D.5.1.10 全程试验完毕,对表面和空气中残留的细菌做最终消毒后,打开通风机过滤除菌排风,排除舱内滞留的污染空气,为下一次试验作好准备。

D.5.1.11 在完成试验组与阳性对照组采样和样本接种后,应将未用的同批培养基、采样液和 PBS 等(各取 1 份~2 份),与上述两组样本同时进行培养或者接种后培养,作为阴性对照。若阴性对照组有菌生长,说明所用培养基或者试剂有污染,试验无效,更换无菌器材重新试验。

D.5.1.12 试验重复 3 次。

评价规定:分别计算每次试验的杀灭对数值,杀灭对数值均大于或等于 3.00 时判定为消毒合格。杀灭对数值为 $\lg(K_t)$,杀灭率的计算见式(D.2)、式(D.3):

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

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

式中:

N_t ——不同时间空气中细菌的自然消亡率;

V_0 ——对照组试验开始前的空气含菌量;

V_t ——试验过程中不同时间的空气含菌量;

K_t ——消毒处理对空气中细菌的杀灭率;

V_0' ——试验组消毒处理前的空气含菌量;

V_t' ——消毒过程中不同时间的空气含菌量。

消毒前后空气中的含菌量按式(D.4)、式(D.5)计算:

液体撞击式空气采样法空气含菌量 = $\frac{\text{平板上平均菌数} \times \text{稀释倍数} \times \text{采样液量}}{\text{采样流量} \times \text{采样时间}} \times 1\,000 \dots (\text{D.4})$

六级筛孔式空气撞击式采样法空气含菌量 = $\frac{\text{六级采样平板上总菌数}}{28.3 \times \text{采样时间}} \times 1\,000 \dots (\text{D.5})$

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间,在室内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,作为消毒前样本(阳性对照)。根据产品说明书进行消毒处理后,再做一次采样,作为消毒后的试验样本;同时将血琼脂平板放入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,采样器置室内中央离地 1.0 m 高处。房间大于 10 m²者,每增加 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(自然衰亡和消毒处理中杀菌的综合效果)做出验证结论。消亡率的对数值即为消亡对数值,按式(D.6)计算消亡率:

$$\text{消亡率} = \frac{\text{消毒前样本平均菌数} - \text{消毒后样本平均菌数}}{\text{消毒前样本平均菌数}} \times 100\% \dots (\text{D.6})$$

D.5.2.4 试验采样完成后,将未用的同批培养基,与上述试验样本同时进行培养或者接种后培养,作为阴性对照。阴性对照组若有菌生长,说明所用培养基有污染,试验无效,更换后重新试验。

D.5.2.5 试验重复 3 次。

D.5.2.6 β -溶血性链球菌的培养和结果观察:采样后的血琼脂平板在 35 ℃~37 ℃下培养 24 h~48 h;培养后,在血琼脂平板上形成呈灰白色、表面突起、直径 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,圆形或卵圆形,呈链状排列,长度在 4 个~8 个细胞至几十个细胞之间;菌落周围有明显的 2 mm~4 mm 界限分明、完全透明的无色溶血环;符合上述特征的菌落为 β -溶血性链球菌。

D.5.2.7 评价规定:除有特殊要求者外,对无人室内进行的空气消毒,每次的自然菌消亡对数值均大于或等于 1.00, β -溶血性链球菌为阴性,则判定为合格。

D.6 注意事项

D.6.1 每次实验室试验均应同时设置试验组与对照组。两组条件尽量保持一致。消毒前、后及不同次数间的环境条件应保持一致。

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,还需进一步验证,必要时可对中和剂的浓度进行适当的调整。

D.6.3 注意记录试验过程中的温度和相对湿度,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 每次试验完毕,空气舱应充分通风。必要时消毒冲洗间隔 4 h 后,方可做第二次试验。

D.6.6 试验时,空气舱应保持密闭,设有空气过滤装置,以防染菌空气外逸,污染环境。

D.6.7 试验时,空气舱或者现场房间应防止日光直射,以免造成杀菌作用不稳定。

D.6.8 雾柜排风过滤装置中的滤材应定期更换,换下的滤材应当经灭菌后再作其他处理。

D.6.9 在空气舱或者密闭房间内进行消毒剂喷雾消毒时,用悬挂染菌样片法观察的消毒效果,不能代表对空气的消毒效果。