

消毒技术规范

Technical standard for disinfection

(2008版)

中华人民共和国卫生部

二〇〇八年五月

1 总则

General Principle

1.1 引言

根据《中华人民共和国传染病防治法》和卫生部《消毒管理办法》制订本规范。

1.2 适用范围

本规范适用于消毒产品申报和监督时为评价其安全性、有效性和理化特性而开展的检测活动及与检测活动相关的实验条件的控制。

1.3 术语

1.3.1 消毒 disinfection

杀灭或清除传播媒介上病原微生物，使其达到无害化的处理。

1.3.2 灭菌 sterilization

杀灭或清除传播媒介上一切微生物的处理。

1.3.3 化学指示物 chemical indicator

利用某些化学物质对某一杀菌因子的敏感性，使其发生颜色或形态改变，以指示杀菌因子的强度（或浓度）和/或作用时间是否符合消毒或灭菌处理要求的制品。

1.3.4 生物指示物 biological indicator

染有一定量的特定微生物，用于指示消毒或灭菌效果的制品。

1.3.5 消毒剂 disinfectant

用于杀灭传播媒介上的微生物使其达消毒或灭菌要求的制剂。

1.3.6 有效氯 available chlorine

有效氯是衡量含氯消毒剂氧化能力的标志，是指与含氯消毒剂氧化能力相当的氯量（非指消毒剂所含氯量），其含量用 mg/L 或%浓度表示（有效碘及有效溴的定义和表示法与有效氯对应）。

1.3.7 中和剂 neutralizer

在微生物杀灭试验中，用以消除试验微生物与消毒剂的混悬液中和微生物表面上残留的消毒剂，使其失去对微生物抑制和杀灭作用的试剂。

1.3.8 中和产物 product of neutralization

中和剂与消毒剂作用后的产物。

1.3.9 菌落形成单位 colony forming unit, cfu

在活菌培养计数时，由单个菌体或聚集成团的多个菌体在固体培养基上生长繁殖所形成的集落，称为菌落形成单位，以其表达活菌的数量。

1.3.10 自然菌 natural bacteria

本规范指存在于某一试验对象上非人工污染的细菌。

1.3.11 存活时间 survival time, ST

用于生物指示物抗力鉴定时,指受试指示物样本,经杀菌因子作用后全部样本有菌生长的最长作用时间 (min)。

1.3.12 杀灭时间 killing time, KT

用于生物指示物抗力鉴定时,指受试指示物样本,经杀菌因子作用后全部样本无菌生长的最短作用时间 (min)。

1.3.13 D 值 D value

杀灭微生物数量达 90%所需的时间 (min)。

1.3.14 杀灭对数值 killing log value

当微生物数量以对数表示时,指消毒前后微生物减少的对数值。

1.3.15 杀灭率 killing rate, KR

在微生物杀灭试验中,用百分率表示微生物数量减少的值。

1.3.16 灭菌保证水平 sterility assurance level, SAL

灭菌处理后单位产品上存在活微生物的概率,通常表示为 10^{-n} ,本规范规定为 10^{-6} ,即经灭菌处理后,每件物品中有菌生长的概率是 $1/10^6$ 。

1.3.17 无菌检验 sterility testing

为明确灭菌后的物品中是否存在活微生物所进行的试验。

1.3.18 生物负载 bioburden

被测试的一个单位物品上承载活微生物的总数。

1.3.19 暴露时间 exposed time

消毒或灭菌物品受到消毒因子作用的时间,又称作用时间、处理时间。

1.3.20 载体 carrier

试验微生物的支持物。

1.3.21 满载 fully loaded

厂家说明书规定的最高装载量和摆放方式。

1.3.22 灭菌过程验证装置 process challenge device, PCD

对某一灭菌过程构成特定抗力的装置,用于评价该灭菌过程的有效性。

1.3.23 抗菌 antibacterial

采用化学或物理方法杀灭细菌或妨碍细菌生长繁殖及其活性的过程。

1.3.24 抑菌 bacteriostasis

采用化学或物理方法抑制或妨碍细菌生长繁殖及其活性的过程。

1.4 消毒产品检验的基本要求

1.4.1 实验室要求

开展消毒产品检测的检测机构应该通过实验室资格认定,其认定的检测项目应该涵盖消毒产

品检测项目。消毒产品申报卫生部卫生许可批件时，应该在卫生部授权的检测机构进行检测。

消毒实验室应按《微生物实验室生物安全管理条例》管理，符合 GB 19489《实验室生物安全通用要求》的条件，进行致病微生物包括分枝杆菌、黑曲霉菌、白色念珠菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和脊髓灰质炎病毒的消毒学试验时或检测现场标本时，应在生物安全 II 级以上的实验室内进行，并符合国家有关生物安全标准。实验室应采取封闭式布局，便于清洁、消毒。无菌检验必须在 100 级洁净度的实验室或 100 级层流操作柜中进行。

容量分析实验室工作温度应控制在 20℃~25℃。

毒理实验室应该为 ABSL-II 级或高于此要求。

1.4.2 人员要求

消毒产品检测的实验室人员应该是经过实验操作技术培训的专业人员。

实验审核人员应该具有中级职称、五年以上的消毒产品检测经历并经过专门培训。

实验室技术负责人和质量负责人应该具有高级职称，五年以上的消毒产品检测经历并经过专门培训。

1.4.3 受理要求

对申报卫生部卫生许可批件的国产消毒产品，检验机构应该只受理由生产企业所在地的卫生监督部门现场抽样并封样的样品，发现封签破损或其他异常情况导致封样无效时，应不予受理。

对申报卫生部卫生许可批件的进口消毒产品，检验机构受理时应该查验并留存消毒产品生产地所在国的销售证明和经我国海关验证的报关单底单。留存的销售证明和报关单可以为送检单位盖章认可的复印件。

检验项目由送检单位决定。受理样品数量应满足各项检测需要，发现数量不足时应该拒绝受理。因不可预知的原因，试验中确实需要补充样品数量时，送检单位应该按规定重新送样并在检验申请中说明理由，检验机构应重新受理，重新编排受理号。

受理时应同时要求送检单位提供盖章认可的产品说明书、配方、研制报告等材料。盖章认可的说明书应该与每件样品的说明书完全一致。受理后发现按说明书无法完成检验项目时应停止检测并向送检单位说明理由。

1.4.4 消毒效果检验要求

1.4.4.1 无菌操作要求

(1) 试验开始前，应以湿式方法清洁台面和打扫室内地面。

(2) 实验人员应穿戴工作服、防护鞋、口罩、帽子，进行无菌检验时，需经风淋后进入实验室，然后，正确穿戴好无菌隔离衣、鞋套、帽子和口罩。

(3) 每吸取一次不同样液应更换无菌吸管，接种环（针）需在火焰上烧灼灭菌后，才可再次使用，也可用一次性使用的无菌吸管和接种环（针）。

(4) 要求无菌的试剂，如蒸馏水、生理盐水、磷酸盐缓冲液、培养基、标准硬水、中和剂等，均需灭菌。

(5) 无菌器材和试剂，使用前须检查容器或包装是否完整，有破损者不得使用。

(6) 正在使用的无菌器材和试剂不得长时间暴露于空气中。

(7) 重复使用的器材，使用后应立即放入盛有消毒液的容器中，一次性使用的器材使用后应立即放入感染性废物收集袋中。

(8) 若不慎发生微生物培养物打碎或试验微生物其他泄漏事故时，不论是否具有致病性，均应立即停止手中工作，对污染及可能波及的区域进行消毒处理。

(9) 全部试验结束后，应对室内环境进行消毒处理。

1.4.4.2 检测要求

(1) 消毒学试验分为实验室试验、模拟试验和现场试验三个阶段。

(2) 实验室试验以悬液定量试验为主，试验应重复 3 次。对不适宜用悬液定量试验评价的消毒剂，如粘稠的消毒剂、冲洗用消毒剂和原液一次性使用的消毒剂等的实验室试验用载体定量试验，试验应重复 3 次。无特殊要求的情况下，载体定量试验以布片为载体，用途单一、明确的可以选用对应的玻璃片、不锈钢片、滤纸片等。评价消毒剂的实验室试验，消毒剂试验浓度需用产品说明书规定的该消毒剂对某一有代表性消毒对象的最低使用浓度。试验设 3 个不同作用时间，原则上第一时间为说明书规定的最短作用时间的 0.5 倍，第二时间为最短作用时间，第三时间为最短作用时间的 1.5 倍。对多用途的消毒剂，消毒对象所涉及的微生物相同时，若使用浓度相同，选择各种用途中最短的作用时间。若作用时间相同，选择各种用途中最低的使用浓度。使用浓度低、作用时间短者与使用浓度高、作用时间长者同时存在时，以前者为准。使用浓度高、作用时间短者与使用浓度低，作用时间长者同时存在时，每个剂量均须进行试验。

消毒器械产生的化学杀微生物因子的试验要求同消毒剂。对于冲洗用化学消毒因子可以用载体流动浸泡试验。如为物理杀微生物因子，试验一般用载体定量试验，在无特殊要求的情况下，以布片为载体。用途单一、明确的可以选用对应的玻璃片、不锈钢片、滤纸片等。试验重复 3 次。

灭菌试验应用载体定性试验，普通医疗器械的灭菌以不锈钢片为载体，特殊用途的可以选用玻璃片、聚四氟乙烯片等。灭菌试验按产品说明书规定的最低使用浓度（强度）和 0.5 倍的最短作用时间进行试验。载体定性试验应重复 5 次，载体数量应不小于 30 个，每次试验均应该设立规定数量的阴性对照和阳性对照。

(3) 消毒模拟现场或现场试验，以使用说明书的最低有效浓度（强度）和最短作用时间进行试验，试验应重复 3 次。每次试验均应该设立规定数量的阴性对照和阳性对照。

(4) 灭菌模拟现场或现场试验，以使用说明书的最低使用浓度（强度）和 0.5 倍的最短作用时间进行试验，消毒器械的灭菌试验应重复 5 次，消毒剂的灭菌试验应试验 60 个样本，至少重复 3 次。每次试验均应该设立规定数量的阴性对照和阳性对照。

(5) 在对消毒剂进行监督监测时，定量杀菌试验以说明书规定的最低浓度和最短时间验证其消毒效果。对用于灭菌的消毒剂则以说明书中规定的使用浓度和其 0.5 倍的作用时间验证其

灭菌效果。

(6) 鉴定和监测多用途消毒剂与消毒器械消毒效果时，现场或模拟现场试验的消毒对象原则上是在类似物品中最难达到消毒合格者，如医疗器械消毒或灭菌选用止血钳齿端；皮肤消毒选用人体前臂屈面皮肤；织物消毒选择棉布；一般物品表面（包括木质、塑料、橡胶、玻璃）消毒选用木质表面；餐具消毒选用竹（木）筷，不用于筷子消毒的可选用瓷质碗盘；瓜果蔬菜消毒选用黄瓜；地面消毒选择水泥地面；手消毒选择五指屈面；对于特指消毒对象而又在上述物品中不能选出有代表性物品时，则需用该特指对象进行试验。

(7) 进行实验室试验和模拟现场试验时，对用于经过清洗或较清洁的消毒对象的消毒剂，有机干扰物牛血清白蛋白的浓度为 0.3%，对用于不经过清洗或较脏的消毒对象的消毒剂，有机干扰物牛血清白蛋白的浓度为 3.0%。

1.4.4.3 对重复试验的要求

重复性试验不是只在同次试验中增加菌片数，或多作几份样本，而是应分期分批进行。必要的器材和试剂应重新制备或灭菌，以防产生系统性误差。

1.4.5 理化检验要求

1.4.5.1 标准品的纯度 $\geq 99.0\%$ ，对照品的纯度应采用最高纯度的试剂，也可使用标准品或对照品进行标定过的标准溶液作为含量测定的对照物。

1.4.5.2 以滴定法分析有效成分时，滴定液用量不得超过滴定管所标示的量。本规范规定滴定时所取样本的质量或容量（包括浓度），均根据此原则设定。若所测消毒剂浓度过高，可适当减少取样量或稀释后测定；若消毒剂浓度过低，可增加取样量或采用灵敏度更高的方法进行测定。

1.4.5.3 有效成分含量以法定计量单位表示。复方消毒剂以其杀菌主要有效成分含量表示；植物消毒剂以百分浓度表示，如 1 份原液加 4 份水即该消毒剂溶液的浓度为 20%。溶液或消毒剂的有效成分含量的表示，以 mg/L 或 mg/kg 为主。采用百分数表述含量时有下列 2 种含义：①液体和液体之间为体积百分数，用“%”表示，即 100mL 溶液中含溶质若干毫升，或 100mL 消毒剂中含有效成分若干毫升；②固体和固体之间为质量百分数，用“%”表示，即 100g 消毒剂中含有效成分若干克；对固体和液体之间采用质量浓度表示（mg/L、g/L 等），即 1L 溶液中含溶质若干毫克或克，或 1L 消毒剂中含有效成分若干毫克或克等。

1.4.5.4 本规范中所列试剂的纯度涉及基准、分析纯、化学纯及色谱纯等，未作专门说明者，一般采用分析纯。配制滴定液试剂（如硫代硫酸钠）因配制后尚需专门处理，亦可用化学纯。

1.4.5.5 本规范中，“滴定液”是指经过标定，浓度准确至 0.001mol/L~0.0001mol/L 的溶液。未经浓度标定者则称“溶液”，以示区别。摩尔（mole, mol）为物质的量的单位，当分子、原子或其它粒子等的个数约为 6.02×10^{23} 时即为 1mol。本规范中滴定液浓度的计算，除碘滴定液按原子量计算外，其它滴定液均按分子量计算。

1.4.5.6 滴定液的标定及所有样品测定均平行进行两次。将滴定管中滴定液补足至全量后滴定。所有试验结果（包括消毒剂有效成分测定及滴定液标定）应当以空白试验校正。所使用的滴定液

应按要求在有效使用期内使用。

1.4.5.7 粉剂和片剂的取样量为测定所需量的 10 倍以上,经研磨后精确称取适量样品进行测定。

1.4.5.8 如果选用色谱法或分光光度法,进行方法可靠性论证时应附空白样品(不含被测成分的其他成分所构成的样品)、模拟样品(空白样品加有效成分的标准品)以及待测样品的色谱图或光谱图。如果无法提供空白样品,可用加入标准量法进行方法可靠性的论证。

1.4.5.9 对理化检测方法检出限和定量下限的要求。检出限为被测物能被检出的最低量。定量下限为能够对被测物准确定量的最低浓度或质量,称为该方法的定量下限。检出浓度为按规范方法操作时,方法检出限对应的被测物浓度。最低定量浓度为按规范方法操作时,定量下限对应的被测物浓度。

常用检验方法的检出限和定量下限的计算可参考表 1-1。

表1-1 检出限及定量下限的定义

检验方法	检出限(对应的质量、浓度)	定量下限(对应的质量、浓度)
AAS/AFS	3 SD	10 SD
GC	3 倍空白噪音	10 倍空白噪音
HPLC	3 倍空白噪音	10 倍空白噪音
分光光度法	0.005 A	0.015 A
容量法	$X^*+3 SD$	$X+10 SD$

注: *X 为在终点附近出现可察觉变化的最小试剂体积的平均值。

1.4.5.10 对于本规范中测定方法不适用的产品,有效成分的测定,由厂家提供检测方法及方法可靠性的论证报告,经检验机构认可后方可采用。

1.4.5.11 样品的重量测定用称重法,天平的精度应为测定样品重量的 1% 以上。

1.4.5.12 对消毒剂测定一个批号,3 个样品,每个样品平行测定 2 次。对消毒器械的杀菌因子强度应该测定强度曲线,该曲线应能反映消毒器械消毒灭菌全过程杀菌因子强度的变化趋势。

1.4.5.13 玻璃仪器清洗干净,用蒸馏水冲洗 3 遍。所用容量瓶和量筒等不能加热,对仪器设备应进行计量检定。

1.4.6 毒理学实验要求

1.4.6.1 消毒产品毒理学实验评价程序

消毒剂安全性毒理学评价,可分为 4 个阶段。

第一阶段 包括急性经口毒性试验、急性吸入毒性试验、皮肤刺激试验、急性眼刺激试验、阴道黏膜刺激试验和皮肤变态反应试验等。

第二阶段 包括亚急性毒性试验和致突变试验。后者包括体外哺乳动物细胞基因突变试验(L5178Y 细胞基因突变试验,V79 细胞基因突变试验)、体外哺乳动物细胞染色体畸变试验(体细胞染色体水平,体外试验)、小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验(体细胞染色体水平,体内试验)、

哺乳动物骨髓细胞染色体畸变试验（体细胞染色体水平，体内试验）、程序外 DNA 修复合成试验（DNA 水平，体外试验）、小鼠精子畸形试验（性细胞基因和染色体水平，体内试验）、睾丸生殖细胞染色体畸变试验（性细胞染色体水平，体内试验）、小鼠精原细胞染色体畸变试验和小鼠精母细胞染色体畸变试验等。

第三阶段 包括亚慢性毒性试验和致畸胎试验等。

第四阶段 包括慢性毒性试验和致癌试验等。

1.4.6.2 毒理学试验受试物

（1）在急性经口毒性试验、急性吸入毒性试验、亚急性毒性试验、致突变试验、亚慢性毒性试验、致畸胎试验、慢性毒性试验和致癌试验时，一般采用消毒剂原形样品。消毒剂原形是指在销售过程中原包装的粉剂、片剂或原液。对于二元或多元包装的消毒剂，以按说明书规定的比例配制后作为消毒剂原形。

（2）在皮肤刺激试验、急性眼刺激试验和阴道黏膜刺激试验中所用受试物的浓度，通常是对皮肤、黏膜消毒时应用浓度的 5 倍。使用原形（原液）对皮肤、黏膜进行消毒的消毒剂，则采用消毒剂原形（原液）作为试验受试物，不需对消毒剂原形再进行浓缩。

（3）在皮肤变态反应试验时，采用的诱导浓度应为引起皮肤刺激反应的最低浓度或原液，激发浓度应为不引起皮肤刺激反应的最高浓度或原液。

1.4.7 检测记录要求

实验室对所进行的试验，应认真观察试验结果，按实验室资格认定和/或实验室认可的要求作好原始记录。为使记录规范化，一般用表格方式记录，表格中应包括样品名称与编号、检验日期、检测项目、检测依据、试验条件、使用仪器编号、观察结果、试验者和校核者签名等栏目。表格中每一栏目应用蓝黑或碳素墨水逐项填写。一次试验填写一份表格。原始记录数据和计算应及时校核，整理装订附于检验报告后，入档保存备查。

1.4.8 检测报告要求

检测报告必须逐项报告清楚，凡检验方法在本规范和有关标准中未列出者，必须详细描述。消毒灭菌效果的结果部分用表格将各试验组、阳性对照、阴性对照及其他对照组的数据列出，定性试验的对照可用文字加以说明。试验组应列出其杀灭对数值，杀灭效果合格时，杀灭对数值无须列出具体数值，用大于等于某一规定值表示；当杀灭对数值小于某一规定值时，则应列出具体杀灭对数值。并用文字简要叙述所得的结果。检验报告的结论部分，应根据试验结果得出明确的结论。此外，对试验中出现某些异常现象亦应加以说明。

1.4.9 检测结果评价

消毒效果试验、理化检验和毒理学实验均符合要求时可以认为该产品检测合格。

1.4.9.1 理化检验结果评价

符合下列条件的消毒产品认为理化检验合格：

(1) 消毒剂有效成分符合我国允许的消毒剂组分，不含有抗生素、激素等各种处方药成分和卫生部规定的禁用物质。

(2) 用于皮肤黏膜消毒的消毒剂限量成分符合要求；用于饮用水、食品和餐饮具消毒的消毒剂其有毒有害成分在使用浓度下符合有关标准的限量要求；消毒器械产生的有毒有害物质符合有关标准和规范的限量要求。

(3) 消毒剂的成分与申报的配方一致。在产品有效期内，有效成分含量及其变化应在规定的范围内。

(4) 最小样品单位间的重量误差小于 5%，主要有效成分含量误差小于 10%。

(5) 用于金属物品消毒的消毒剂对金属基本无腐蚀性，偶尔接触金属物品的消毒剂如果存在金属腐蚀性时在标识中应有警示。

(6) 消毒剂的 pH 值在合理的范围内，并与企业标准一致。

1.4.9.2 消毒效果试验结果评价

符合下列所有相应条件的消毒产品认为消毒效果试验结果合格：

(1) 去除残留消毒剂效果的鉴定试验合格。

(2) 消毒产品的实验室试验结果符合下列相应条件：

a. 悬液定量试验时，每次试验对细菌繁殖体和细菌芽孢如金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌、白色葡萄球菌、枯草杆菌黑色变种芽孢的杀灭对数值 ≥ 5.00 ，对龟分枝杆菌脓肿亚种、白色念珠菌和黑曲霉菌的杀灭对数值 ≥ 4.00 ，对病毒的灭活对数值 ≥ 4.00 。对照组微生物数在规定的范围内。

b. 载体定量试验和载体流动浸泡试验时，每次试验对各类微生物的杀灭对数值或灭活对数值 ≥ 3.00 ，对照组微生物数在规定的范围内。载体定性试验时，各次试验所有载体相应细菌芽孢均无生长，对照组微生物数在规定的范围内。

(3) 消毒模拟现场试验时，各次试验对试验微生物的杀灭对数值 ≥ 3.00 ，对照组微生物数在规定的范围内。灭菌模拟现场试验时，各次试验所有载体相应细菌芽孢均无生长，对照组微生物数在规定的范围内。

(4) 现场试验时，对消毒对象上自然菌的平均杀灭对数值 ≥ 1.0 。

(5) 消毒产品用于饮用水消毒时，消毒效果的评价按《生活饮用水卫生监督管理办法》进行。

2 消毒产品检验技术规范

Technical Standard for Testing Disinfection Products

2.1 消毒剂消毒与灭菌效果验证试验

2.1.1 适用范围

适用于消毒剂的消毒效果的许可检验和监督监测。

2.1.2 菌悬液与菌片的制备

2.1.2.1 适用范围

制备消毒剂杀菌试验用菌悬液与菌片，以供消毒剂杀菌试验时使用。也适用于本规范中其他消毒学试验所用菌悬液与菌片。

2.1.2.2 实验器材

(1) 实验菌种 金黄色葡萄球菌ATCC 6538、铜绿假单胞菌ATCC 15442、大肠杆菌 8099、枯草杆菌黑色变种ATCC 9372、白色葡萄球菌 8032。在上述规定的菌株基础上，根据消毒剂特定用途或试验特殊需要，还可增选其他菌株

(2) 有机干扰物 见附录A

(3) 磷酸盐缓冲液 见附录A

(4) 无菌蒸馏水或其他纯化水

(5) 稀释液 见附录 A

(6) 细菌培养基 营养琼脂培养基，营养肉汤培养基，见附录A

(7) 革兰染色液 见附录 A

(8) 芽孢染色液 见附录A

(9) 恒温水浴箱

(10) 玻璃漏斗

(11) 刻度吸管（1.0mL、5.0mL、10.0mL），毛细吸管

(12) 移液器（10 μ L、20 μ L、100 μ L、200 μ L、1000 μ L）及配套的塑料吸头

(13) 离心机

(14) 电动混匀器

(15) 浊度计

(16) 恒温培养箱

2.1.2.3 细菌悬液制备程序

(1) 细菌繁殖体悬液的制备

1) 以无菌操作方式开启菌种管，用毛细吸管加入适量营养肉汤培养基，轻柔吹吸数次，使菌种融化分散。取含 5.0mL~10.0mL 营养肉汤培养基试管，滴入少许菌种悬液，置 37℃ 培养 18h~24h。用接种环取第1代培养的菌悬液，划线接种于营养琼脂培养基平板上，置 37℃ 培养 18h~24h。或从microbank中取出一粒菌珠接种于平皿上，置 37℃ 培养 18h~24h，挑取上述第 2 代培养物中典型菌落，接种于营养琼脂斜面，置 37℃ 培养 18h~24h，即为第 3 代培养物。

2) 取第 3~6代的营养琼脂培养基培养 18h~24h 的新鲜斜面培养物，用 5.0mL 吸管吸取 3.0mL~5.0mL 稀释液（一般用TPS，酸化水用生理盐水）加入斜面试管内，反复吹吸，洗下菌苔。随后，用 5.0mL 吸管将洗液移至另一无菌试管中，用电动混匀器混合20s，或在手掌上振打80次，以使细菌悬浮均匀。

3) 初步制成的菌悬液，先用细菌浓度比浊测定法粗测其含菌浓度，然后以稀释液稀释至所需浓度。

4) 细菌繁殖体悬液应保存在4℃冰箱内备用。应当天使用不得过夜。

5) 怀疑有污染时，应以菌落形态、革兰染色与生化试验等法进行鉴定。

(2) 细菌芽孢悬液的制备

1) 以无菌操作方式开启菌种管，用毛细吸管加入适量营养肉汤培养基，轻柔吹吸数次，使菌种融化分散。取含 5.0mL~10.0mL 营养肉汤培养基试管，滴入少许菌种悬液，置 37℃ 培养 18h~24h。用接种环取第1代培养的菌悬液，划线接种于营养琼脂培养基平板上，置 37℃ 培养 18h~24h。挑取上述第 2 代培养物中典型菌落，接种于营养肉汤培养基，置 37℃ 培养 18h~24h，即为第 3 代培养物。

2) 用 10.0mL 吸管吸取 5.0mL~10.0mL 第 3~5代的 18h~24h 营养肉汤培养物，接种于罗氏瓶中营养琼脂培养基表面，将其摇动使菌液布满营养琼脂培养基的表面，再将多余肉汤培养物吸出，将罗氏瓶置 37℃ 恒温培养箱内培养 5d~7d。

3) 用接种环取菌苔少许涂于玻片上，固定后以改良芽孢染色法染色，并在显微镜（油镜）下进行镜检。当芽孢形成率达 95% 以上时，即可进行以下处理。否则，应继续在室温下放置一定时间，直至达到上述芽孢形成率后再进行以下处理。

改良芽孢染色法：①用接种环取菌苔涂布于玻片上，待自然干燥，而后通过火焰加热将菌固定于玻片上。②将涂片放入平皿内，片上放两层滤纸，滴加足量的 5.00% 孔雀绿水溶液。将平皿盖好，放54℃~56℃ 条件下，加热 30min。取出，去滤纸，用自来水冲去残留液。③加0.5% 沙黄水溶液，染1min。水洗，待干后镜检。芽孢呈绿色，菌体呈红色。

4) 加 10.0mL 无菌蒸馏水于罗氏瓶中，以L棒轻轻推刮下菌苔，吸出，再加入5.0mL 无菌蒸馏水冲洗培养基表面，吸出。将两次吸出的菌悬液集中于含玻璃珠的无菌三角烧瓶中，振摇5min。

5) 将三角烧瓶置 45℃ 水浴中 24h，使菌自溶断链，分散成单个芽孢。

6) 用无菌棉花或纱布过滤芽孢悬液，清除琼脂凝块。

7) 将芽孢悬液置无菌离心管内，以 3000r/min 速度离心 30min。弃上清液，加蒸馏水吹吸

使芽孢重新悬浮，本步骤重复3遍。

8) 将洗净的芽孢悬液放入含适量小玻璃珠的三角烧瓶内，80℃水浴10min(或60℃ 30min)，以杀灭残余的细菌繁殖体。待冷至室温后，摇匀分装保存于4℃冰箱中备用。有效使用期为半年。

9) 芽孢悬液在使用时，应先进行活菌培养计数。

10) 怀疑有杂菌污染时，应以菌落形态、革兰染色与生化试验等法进行鉴定。

2.1.2.4 菌片（染菌载体）的制备程序

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

(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：①将载体放在含洗涤剂的水中煮沸30 min；②以自来水洗净；③用蒸馏水煮沸 10min；④用蒸馏水漂洗至 pH 呈中性；⑤晾干、熨平备用。

(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，纸片以新华滤纸制作。

(4) 载体经压力蒸汽灭菌后，使用滴染法染菌。

染菌用菌悬液：菌悬液和芽孢悬液的制备按2.1.2.3 进行，试验用菌悬液的含菌量约为 2×10^8 cfu/mL ~ 1×10^9 cfu/mL，可使用浊度计调整菌液浓度。然后加入等量 3.0% 或 0.3% 的牛血清白蛋白，使菌液的浓度为 1×10^8 cfu/mL ~ 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10μ L，必要时用接种环涂匀整个载体表面。置37℃恒温培养箱或室温干燥备用。

(5) 每个菌片（载体）的回收菌数应为 1×10^6 cfu/片 ~ 5×10^6 cfu/片。

2.1.2.5 注意事项

(1) 用浊度计测定的菌悬液浓度，只用于在滴染菌片时对菌悬液稀释度的估计。作为菌悬液含菌浓度或菌片染菌量的正式报告（如杀菌试验中阳性对照组菌悬液或菌片所含菌量），必须以活菌培养计数的实测结果为准，不得使用根据比浊法判定的估计值。

(2) 菌液滴加不宜过快，避免流散影响染菌的准确性。

(3) 细菌繁殖体在载体上干燥的过程中，可引起部分死亡。因此应提高初始菌浓度，以便达到所需的回收菌量。

(4) 配制菌悬液和制备菌片时，应严格无菌操作，以防污染杂菌，影响杀菌试验的结果。

(5) 保存菌液的容器使用橡皮塞时，应将其预先煮沸 10min 进行脱硫处理。

(6) 菌悬液和菌片应随时放入冰箱内，尽量缩短室温放置时间，以减少细菌的自然死亡。

2.1.3 活菌培养计数技术

2.1.3.1 适用范围

测定消毒试验用细菌悬液、菌片（染菌载体）、采样液等样本含有活菌的数量。

2.1.3.2 实验器材

(1) 稀释液 见附录 A

(2) 细菌培养基 胰蛋白胨大豆琼脂培养基 (TSA), 胰蛋白胨大豆肉汤培养基 (TSB) 等, 见附录A

(3) 刻度吸管 (1.0mL、5.0mL、10.0mL)

(4) 移液器 (10 μ L、20 μ L、100 μ L、200 μ L、1mL、5mL) 及配套的塑料吸头

(5) 电动混匀器

(6) 浊度计

(7) 恒温培养箱

2.1.3.3 操作程序

活菌培养计数一般使用倾注法, 有特殊规定者, 可以使用其他方法。倾注法操作程序如下:

(1) 对菌悬液可直接进行培养计数。对菌片和小型固体样本, 将其直接投入含 5.0mL 稀释液的无菌试管中, 对棉拭则将其采样端剪入管内。用电动混匀器混合 20s, 或在手掌上用力振打 80次, 将菌洗下形成菌悬液。以上操作应严格按无菌要求进行。

(2) 将试管按需要数量分组排列于试管架上, 每管加入 4.5mL 稀释液。各组由左向右, 逐管标上 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 等。

(3) 将菌悬液样本用电动混匀器混合20s, 或在手掌上用力振打 80次, 随即吸取 0.5mL 加至 10^{-1} 管内。

(4) 将 10^{-1} 管依前法用电动混匀器混合20s, 或在手掌上用力振打 80次, 混匀, 再吸取出 0.5mL 加入 10^{-2} 管内。如此类推, 直至最后一管。必要时, 还可作某稀释度的 1:1或1:4 稀释。

(5) 选择适宜稀释度试管 (以预计生长菌落数每平板为 15cfu~300cfu 者为宜), 吸取其中混合均匀的悬液 1.0mL 加于无菌平皿内。每一稀释度接种 2个平皿。一般需接种 2个~3个不同稀释度。

(6) 将 40 $^{\circ}$ C~45 $^{\circ}$ C 熔化的培养基, 倾注于已加入样液的平皿中, 每平皿 15mL~20mL。

(7) 将平皿盖好, 即刻轻轻摇动混匀, 平放。待琼脂凝固后, 翻转平皿使底向上, 置 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱内培养。

(8) 培养至规定时间, 计数菌落数。对于现场试验样本, 应每日观察并记录菌落数。

(9) 计数菌落时, 一般以肉眼观察, 必要时用放大镜检查。以每平板菌落数在15cfu~300cfu 的稀释度为准记录结果。对黑曲霉菌活菌计数时, 以每平板菌落数在 15cfu~100cfu 的稀释度为准记录结果。对菌量极少的样本, 即使平板菌落数未达 15cfu 时, 亦可用其计算最终结果。

(10) 根据稀释倍数和接种量计算每毫升菌液或每一菌片 (染菌载体) 上的平均菌落数。

2.1.3.4 活菌计数中技术操作误差的测定

活菌计数因技术操作而引起的菌落数误差率 (平板间、稀释度间) 不宜超过 10%。误差率的计算可按下列公式进行。

$$\text{平板间误差率} = \frac{\text{平板间菌落数平均差}}{\text{平板间菌落平均数}} \times 100\%$$

$$\text{平板间菌落数平均差} = \frac{(\text{平板间菌落平均数} - \text{各平板菌落数})\text{的绝对值之和}}{\text{平板数}}$$

$$\text{平板间菌落平均数} = \frac{\text{各平板菌落数之和}}{\text{平板数}}$$

$$\text{稀释度间菌落数误差率} = \frac{\text{稀释度间菌落数平均差}}{\text{稀释度间菌落平均数}} \times 100\%$$

$$\text{稀释度间菌落平均差} = \frac{(\text{稀释度间菌落平均数} - \text{各稀释度菌落数})\text{的绝对值之和}}{\text{稀释度数}}$$

$$\text{稀释度间菌落平均数} = \frac{\text{各稀释度平均菌落数之和}}{\text{稀释度数}}$$

2.1.3.5 注意事项

- (1) 严格无菌操作，防止污染。
- (2) 认真检查实验器材有无破损（要特别注意试管底的裂痕和破洞），以防丢失样本和污染环境。
- (3) 注意菌液的均匀分散。
- (4) 取液要准确，尽量减少误差。
- (5) 每吸取一个稀释度样液，必须更换一支吸管或吸头。
- (6) 样液加入平皿后应尽快倾注培养基，避免样液干燥。
- (7) 倾注时培养基温度不得超过45℃，以防损伤细菌或真菌。
- (8) 倾注和摇动应尽量平稳，勿使培养基外溢，确保细菌分散均匀，便于计数菌落。

2.1.4 残留消毒剂（化学因子）的去除方法

2.1.4.1 目的

对于消毒剂的消毒效果试验，在达到规定的消毒时间时，要求立即终止其继续作用，以便准确检测出试验体系中仍然存活的微生物及其数量。本方法可去除残留消毒剂对微生物的杀灭和抑制作用。

2.1.4.2 去除残留消毒剂方法的原则要求

- (1) 应有效去除残留的消毒剂。

- (2) 对试验微生物无害，不减少其回收量。
- (3) 不破坏培养基的营养成份，不影响其透明度。

2.1.4.3 去除残留消毒剂的方法

(1) 稀释中和法（又称中和剂法）

指在消毒剂与微生物作用到达规定时间的终点时，取样加于适宜种类和浓度的中和剂中，将残留消毒剂迅速中和，使其不再持续杀灭和抑制微生物的方法。其操作要点如下：

- 1) 将经消毒剂作用过的微生物样本，在达到规定作用时间，即刻取样移入鉴定合格的中和剂溶液中。
- 2) 所用中和剂的浓度与容量应与鉴定试验结果规定的相同。
- 3) 即刻混匀，并按规定时间吸取样液进行随后的培养检测。
- 4) 在将样本接种培养基以前的操作，应按规定时间内进行，以免微生物与中和剂或中和产物接触过久。

(2) 过滤冲洗法

将经消毒剂作用过的微生物样本，立即加入适量稀释液中混匀（通过适量稀释，可减轻消毒剂的持续作用），并倾入装有微孔滤膜的滤器内，接真空泵抽吸过滤（或加压过滤）后，再加适量稀释液冲洗，同时过滤，可去除残留的消毒剂。多用于难以找到适宜中和剂的消毒效果试验。本方法应按拟进行试验具体情况，经鉴定合格后再使用。其操作要点如下：

- 1) 准备好微孔滤膜、滤器。滤膜及滤器需先经灭菌处理。
- 2) 初次过滤后，应使用一定量对微生物无害的稀释液进行冲洗，冲洗次数一般以洗净消毒剂为准。
- 3) 最后一次冲洗、滤净后，将微孔滤膜以无菌操作法取出，进行随后的培养检测。

2.1.4.4 注意事项

- (1) 处理时应严守无菌操作要求，所有试液须灭菌，接触样本和试液的器材均须无菌。
- (2) 每次吸液，均须更换一支无菌吸管，以防交叉污染。
- (3) 所用吸管的容量应尽量与拟吸取的液体量相近，不要用大吸管吸取少量液体。
- (4) 试验条件可影响残留消毒剂的去除效果，故每进行一种消毒效果试验，均需按规定对所选方法进行去除效果的鉴定试验。

2.1.5 中和剂鉴定试验

2.1.5.1 目的

确定所选中和剂是否适用于拟进行的消毒效果鉴定试验。

2.1.5.2 实验器材

- (1) 实验菌悬液和菌片（见 2.1.2）
- (2) 刻度吸管（1.0mL、5.0mL）
- (3) 平皿

- (4) 恒温水浴箱
- (5) 稀释液 见附录A
- (6) 培养基 见附录A
- (7) 电动混匀器

2.1.5.3 试验设计原则

(1) 通过所设各组试验结果综合分析, 应可确定所用中和剂是否对测试消毒剂有良好的中和作用, 对试验用微生物以及其恢复期培养是否有害或不良影响。

(2) 试验中所用消毒剂的浓度应为杀菌试验中使用的最高浓度。

(3) 同一消毒剂拟对多种微生物进行杀灭试验时, 所用中和剂应按微生物种类分别进行鉴定试验。对细菌繁殖体, 在大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌中任选其一进行试验; 对细菌芽孢、白色念珠菌、黑曲霉菌、分枝杆菌应分别进行鉴定试验。

当用其他特定微生物进行杀灭试验时, 均应以该特定微生物进行中和剂的鉴定试验。

(4) 鉴定时根据所用杀菌试验方法, 相应使用悬液或载体进行试验。

2.1.5.4 实验分组

在细菌与真菌杀灭试验中所用除药方法的鉴定, 至少应平行进行以下各组试验。

- 第 1 组 中和剂 + 菌悬液 → 培养
- 第 2 组 (消毒剂 + 中和剂) + 菌液 → 培养
- 第 3 组 稀释液 + 菌悬液 → 培养
- 第 4 组 稀释液 + 中和剂 + 培养基 → 培养

2.1.5.5 中和剂悬液定量鉴定试验操作程序

根据实验分组, 准备足量试管和平皿, 依次进行编号。将菌悬液用等量适合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4组:

第 1 组 取 0.4mL 标准硬水于试管内, 加入 4.5mL 中和剂, 混匀, 置 $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 水浴中 5min 后, 再加入 0.1mL 试验菌悬液, 混匀, 作用 10min, 分别吸取 1.0mL 接种于两个平皿中, 做活菌培养计数。

第 2 组 取 0.4mL 消毒剂于试管内, 加入 4.5mL 中和剂 (对于酸性氧化电位水检测时, 取 0.5mL 消毒剂于试管内, 加入 4.4mL 中和剂) 混匀, 置 $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 水浴中 5min 后, 再加入 0.1mL 试验菌悬液, 混匀, 作用 10min, 分别吸取 1.0mL 接种于两个平皿中, 做活菌培养计数。

第 3 组 取 0.4mL 标准硬水于试管内, 加入 4.5mL 稀释液, 混匀, 置 $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 水浴中 5min 后, 再加入 0.1mL 试验菌悬液, 混匀, 作用 10min, 分别吸取 1.0mL 接种于两个平皿中, 做活菌培养计数。

第 4 组 分别吸取稀释液、标准硬水与中和剂各 0.5mL 于同一无菌平皿内, 倒入上述试验同批次的培养基 15mL~20mL, 培养观察。

2.1.5.6 中和剂载体定量鉴定试验操作程序

根据实验分组,准备足量试管和平皿,依次进行编号。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 $\sim 1.5 \times 10^3$ cfu/片之间。鉴定试验包括4组:

第 1 组 吸取中和剂 5.0mL 于无菌平皿中,将其置 $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 水浴中 5min 后,用无菌镊子夹入 1 菌片,并使浸透于中和剂内,作用 10min。立即用无菌镊子取出菌片移入含 5.0mL 中和剂试管中,用电动混匀器混合20s,或将试管振打 80次,混匀,分别吸取 1.0mL 接种于两个平皿中,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 5.0mL 中和剂的量制备中和产物) 5.0mL 于无菌平皿内,将其置 $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 水浴中 5min 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 10min,用无菌镊子取出菌片,移入含 5.0mL 中和产物溶液的试管中,用电动混匀器混合20s,或将试管振打 80次,混匀。分别吸取 1.0mL 接种于两个平皿中,做活菌培养计数。

第 3 组 吸取稀释液 5.0mL 于无菌平皿内,将其置 $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 水浴中 5min 后,用无菌镊子夹入 1 菌片,并使浸透于稀释液中。作用 10min,立即用无菌镊子取出菌片移入含 5.0mL 稀释液的试管中,用电动混匀器混合20s,或将试管振打 80次,混匀,分别吸取 1.0mL 接种于两个平皿中,做活菌培养计数。

第 4 组 分别吸取稀释液与中和剂各 1.0mL 于同一无菌平皿内,倒入上述试验同批次的培养基 15mL ~ 20 mL,培养观察。

2.1.5.7 评价规定

实验结果符合以下全部条件,所测中和剂可判为合格:

(1)第 1、2和 3 组有相似量试验菌生长,悬液试验作用体系中菌量在50cfu/mL ~ 300 cfu/mL 之间,载体试验菌量在 2.5×10^2 cfu/片 $\sim 1.5 \times 10^3$ cfu/片 之间。其组间菌落数误差率应不超过 15%。第1、2和 3 组间菌落数误差率计算公式如下:

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

(2) 第4组无菌生长。否则,说明试剂有污染,应更换无污染试剂重新进行试验。

(3) 试验重复 3 次,每次试验均应符合以上要求。

2.1.5.8 注意事项

(1) 试验所分各组均有其特定意义,不得任意删减。

(2) 严守无菌操作,保持试验用液和器材的无菌,注意更换吸管,以防止污染影响试验的

准确性。

(3) 实验组序应按本规范所列排列。

2.1.6 过滤冲洗法去除残留消毒剂试验

2.1.6.1 目的

通过滤膜过滤和冲洗的方法，去除试验体系中的残留消毒剂，以便准确检测出试验体系中仍然存活的微生物及其数量。本方法可去除残留消毒剂对微生物的杀灭和抑制作用。

2.1.6.2 实验器材

- (1) 过滤设备 包括灭菌处理的滤器、微孔滤膜（孔径为 $0.45\mu\text{m}$ ），真空泵（或抽滤泵）
- (2) 稀释液和冲洗液 应不影响滤膜的性质，对微生物无伤害作用。可用生理盐水、PBS、稀释液（见附录A）、0.5%吐温80的PBS、可中和部分消毒成分的中和剂
- (3) 其他器材随试验微生物确定

2.1.6.3 试验设计原则

(1) 通过所设各组试验结果综合分析，应可确定所选方法是否对测试消毒剂有良好的去除作用，对试验微生物以及其恢复期培养是否有害或不良影响。

(2) 试验中所用消毒剂的浓度应为杀菌试验中使用的最高浓度。

(3) 同一消毒剂拟对多种微生物进行杀灭试验时，所用中和剂应按微生物种类分别进行鉴定试验。对细菌繁殖体，在大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌中任选其一进行试验；对细菌芽孢、白色念珠菌、黑曲霉菌、分枝杆菌应分别进行鉴定试验。

当用其他特定微生物进行杀灭试验时，均应以该特定微生物进行中和剂的鉴定试验。

(4) 鉴定中应根据正式杀灭试验的设计，选择使用悬液定量试验，还是载体定量试验。通常，悬液鉴定试验结果可用于载体试验。

2.1.6.4 过滤冲洗去除方法的鉴定

操作程序如下：

根据实验分组，准备足量试管和平皿，依次进行编号。将菌悬液用等量适合浓度的有机干扰物稀释成 $2.5 \times 10^2 \text{cfu/mL} \sim 1.0 \times 10^3 \text{cfu/mL}$ ，作为试验菌悬液。其试验分以下3组进行：

第1组 吸取 1.0mL 试验菌悬液于试管内，加入 4.0mL 标准硬水，混匀。取 1.0mL 加入到过滤器中，然后加入 50mL 蒸馏水作冲洗过滤处理，然后将滤膜有菌面朝上贴于平板表面，放置在 37°C 恒温培养箱中培养 48h（真菌和芽孢培养72h），计数菌落数。

第2组 吸取 0.2mL 试验菌悬液直接加入到过滤器中，然后加入 150mL 至 500mL 冲洗液于过滤器中，做第1次冲洗过滤处理，再加入 50mL 蒸馏水做第2次冲洗过滤处理，最后将滤膜有菌面朝上贴于平板表面，放置在 37°C 恒温培养箱中培养 48h（真菌和芽孢培养72h），计数菌落数。

第3组 吸取 4.0mL 消毒剂于试管中，加入 0.5mL 有机干扰物，再加入 0.5mL 稀释液，混匀，取 1.0mL 加入到过滤器中，加入 150mL 至 500mL 冲洗液做第1次冲洗过滤处理，再加入

50mL 冲洗液做第 2 次冲洗过滤处理，冲洗后吸取 0.2mL 试验菌悬液直接加入到过滤器中，再加入 50mL 蒸馏水做第 3 次冲洗过滤处理，然后将滤膜有菌面朝上贴于平板表面，置 37℃ 恒温培养箱中培养 48h（真菌和芽孢培养72h），计数菌落数。

2.1.6.5 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：

(1) 第 1、2 和3 组测定的结果，菌悬液菌数应在 50cfu/滤膜~200cfu/滤膜之间，其组间菌落数误差率不得超过 15%。组间菌落数误差率的计算见2.1.5.7中公式。

(2) 试验重复 3 次，每次试验均应符合以上要求。

2.1.7 细菌杀灭试验

2.1.7.1 目的

在实验室内验证消毒剂对悬液中或载体上细菌繁殖体和细菌芽孢的消毒效果。

2.1.7.2 实验器材

(1) 按 2.1.2 所示方法制备的金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌和枯草杆菌黑色变种芽孢悬液或菌片。对特定用途或试验特殊需要，可准备相应其他菌种的悬液或菌片

(2) 消毒剂溶液除有特殊规定者外，应使用无菌硬水配制。消毒剂溶液浓度应以所含有效成份为准。例如，含氯消毒剂以所含有效氯浓度为准，碘伏以所含有效碘为准，过氧乙酸以所含过氧乙酸量为准，复方消毒剂浓度以主要杀菌有效成分含量为准。各组消毒剂溶液有效成份浓度的计算，应以实验菌与消毒剂的混合液中有效成份的最终浓度（作用浓度）为准

(3) 去除残留消毒剂的中和剂或设备（经鉴定试验证实合格的中和剂或有关器材）

(4) 消毒剂稀释用标准硬水 见附录A

(5) 有机干扰物质 悬液试验和载体试验用牛血清白蛋白溶液，本规范中规定对用于经过清洗或较清洁的消毒对象的消毒剂，有机干扰物牛血清白蛋白的浓度为0.3%；对用于不经过清洗或较脏的消毒对象的消毒剂，有机干扰物牛血清白蛋白的浓度为3.0%。有机干扰物的配置方法见附录A

(6) TSA培养基 见附录A

(7) 含中和剂的胰蛋白胨大豆肉汤培养基（中和剂TSB），中和剂经鉴定合格

(8) 刻度吸管（1.0mL、5.0mL）

(9) 恒温水浴箱

(10) 恒温培养箱

(11) 电动混匀器

(12) 秒表

2.1.7.3 实验分组

试验中应分以下各组：

(1) 试验组 按测试目的有两种选择。

第一种适用于消毒产品鉴定。根据使用说明书，选定试验菌和一个消毒剂浓度（即产品使用说明书中指定的最低浓度）以及 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。如说明书指定最短作用时间为 20min，则 3 个作用时间应分别为 10min、20min 和 30min）进行试验。

第二种适用于消毒产品监督机构日常监测。根据所试菌种和消毒剂对该菌的杀灭能力，选定一株抗力较强的菌和一个消毒剂浓度（即产品使用说明书中指定的最低浓度）以及 1 个作用时间（说明书指定最短作用时间）进行试验。

(2) 阳性对照组 根据各种试验的规定，用标准硬水代替消毒剂溶液，按上述同样的步骤进行试验。所得结果代表试验体系中的菌液浓度，以其作为对照组活菌浓度。

2.1.7.4 悬液定量杀菌试验操作程序

(1) 按照 2.1.2 配制实验用菌悬液，使其浓度为 1×10^8 cfu/mL \sim 5×10^8 cfu/mL（回收菌落数为 1×10^7 cfu/mL \sim 5×10^7 cfu/mL）。

(2) 按照产品说明书要求配制消毒液。无特殊说明者，一律使用无菌硬水配制，配制的浓度为待测浓度的 1.25 倍（例如要评价的消毒液浓度为 200mg/L，则应配制的浓度为 250mg/L），置 $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 水浴备用。

(3) 取消毒试验用无菌试管，先加入 0.5mL 试验用菌悬液，再加入 0.5mL 有机干扰物质，混匀，置 $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 水浴中 5min 后，用无菌吸管吸取上述浓度消毒液 4.0mL 注入其中，迅速混匀并立即计时。

(4) 待试验菌与消毒剂相互作用至各预定时间，分别吸取 0.5mL 试验菌与消毒剂混合液加于 4.5mL 中和剂中，混匀。

(5) 各管试验菌与消毒剂混合液经加中和剂作用 10min 后，分别吸取 1.0mL 样液，按活菌培养计数方法测定存活菌数，每管样液接种 2 个平皿。如平板上生长的菌落数较多时，可进行系列 10 倍稀释后，再进行活菌培养计数。

(6) 同时用标准硬水代替消毒液，进行平行试验，作为阳性对照。

(7) 所有试验样本均在 37°C 恒温培养箱中培养，对细菌繁殖体培养 48h 观察最终结果；对细菌芽孢需培养 72h 观察最终结果。

(8) 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），然后按下式计算杀灭对数值：

杀灭对数值（KL）= 对照组平均活菌浓度的对数值（No）- 实验组活菌浓度对数值（Nx）

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，如果消毒实验组消毒处理后平均生长菌落数小于 1 时，本规范规定此时的杀灭对数值，即大于等于对照组平均活菌浓度的对数值（ $KL \geq No$ ）。

2.1.7.5 载体浸泡杀菌试验操作程序

(1) 载体浸泡定量杀菌试验操作程序

- 1) 按照2.1.2.4 制配实验用菌片,使每个菌片的回收菌数为 1×10^6 cfu/片 $\sim 5 \times 10^6$ cfu/片。
- 2) 取无菌平皿,标明所注入消毒液的浓度。按每片 5.0mL 的量,吸取相应浓度的消毒剂溶液注入平皿中。
- 3) 将盛有消毒剂平皿置 $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 水浴 5min,用无菌镊子取预先制备的菌片 3 片分别放入平皿中,并使之浸没于消毒液。
- 4) 待菌液与消毒剂相互作用至各预定时间,用无菌镊子将菌片取出分别移入一含 5.0mL 中和剂试管中。用电动混匀器混合20s,或将试管在手掌上振打 80次,中和作用 10min。混匀后,吸取 1.0mL 直接接种平皿,每管接种 2 个平皿,测定存活菌数。
- 5) 另取一平皿,注入 10.0mL 稀释液代替消毒液,放入 2 片菌片,作为阳性对照组。其随后的试验步骤和活菌培养计数与上述试验组相同。
- 6) 所有试验样本均在 37°C 恒温培养箱中培养,对细菌繁殖体培养 48h 观察最终结果;对细菌芽孢需培养 72h 观察最终结果。
- 7) 试验重复 3 次,计算各组的活菌量 (cfu/片),并换算为对数值 (N),然后按下式计算杀灭对数值:

$$\text{杀灭对数值 (KL)} = \text{对照组平均活菌量的对数值 (No)} - \text{实验组活菌量对数值 (Nx)}$$

(2) 载体浸泡定性灭菌试验操作程序

- 1) 按照2.1.2.4制配实验用菌片,使每个菌片的回收菌落数为 1×10^6 cfu/片 $\sim 5 \times 10^6$ cfu/片。
- 2) 取无菌平皿,标明所注入消毒液的浓度。按每片 5.0mL 的量,吸取相应浓度的消毒剂溶液注入平皿中。
- 3) 将盛有消毒剂平皿置 $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 水浴5min,用无菌镊子取预先制备的菌片 6 片分别放入平皿中,并使之浸没于消毒液。
- 4) 待试验菌与消毒液相互作用至预定时间,用无菌镊子将菌片取出分别移入一含 5.0mL 中和剂试管中。用电动混匀器混合20s,作为试验组样本。
- 5) 另取一平皿,注入 20.0mL 标准硬水代替消毒液,放入 4 片菌片,作用至设定时间,取出 2 片,分别移入含 5mL 中和剂试管中,其随后的试验步骤与上述试验组相同,作为阳性对照组样本。另取出 2 片,分别移入一含 5.0mL 中和剂试管中,用电动混匀器混合20s,或将试管在手掌上振打 80次,然后用稀释液做系列10倍稀释,选择适宜稀释度,吸取 1.0mL 接种平皿,每管接种 2 个平皿,做活菌培养计数,作为菌数对照组样本。
- 6) 所有试验样本均在 37°C 恒温培养箱中培养,对细菌繁殖体培养 48h,观察最终结果;对细菌芽孢需培养 7d,观察最终结果。
- 7) 试验重复5次,计算各组的活菌量 (cfu/片)。

2.1.7.6 流动浸泡载体定量杀灭试验操作程序

(1) 按照 2.1.2.4 制备实验用菌片，使每个菌片的回收菌落数为 1×10^6 cfu/片~ 5×10^6 cfu/片。

(2) 开启消毒设备，待产生的酸性氧化电位水或臭氧水中有效成分处于稳定状态时，进行杀灭试验。

(3) 取尼龙网片或不锈钢网片放 250mL 烧杯底部中央，将染菌载体放于尼龙网片或不锈钢网片表面，染菌载体上再盖一尼龙网片或不锈钢网片。将酸性氧化电位水或臭氧水通过管路沿烧杯壁流下，流动浸泡消毒至规定作用时间，用无菌镊子将染菌载体取出分别移入一含 5.0mL 中和剂试管中。用电动混匀器混合 20s，或将试管在手掌上振打 80 次，中和作用 10min。混匀，吸取 1.0mL 直接接种平皿，每管接种 2 个平皿，作为试验组样本。

(4) 另取两个染菌载体放入 250mL 烧杯中，放置方法与试验组相同。以自来水代替酸性氧化电位水或臭氧水，在相同流量下流动浸泡至最长作用时间，其余步骤与试验组相同，作为阳性对照组样本。

(5) 分别吸取稀释液与中和剂各 1.0mL 于同一无菌平皿内，倾入上述试验同批次的培养基 15mL~20mL，作为阴性对照样本。

(6) 所有试验样本均在 37℃ (黑曲霉菌在 30℃) 恒温培养箱中培养，对细菌繁殖体培养 48h 观察最终结果；对真菌和细菌芽孢需培养 72h 观察最终结果。

(7) 试验重复 3 次，计算各组的活菌量 (cfu/片)，并换算为对数值 (N)，然后按 2.1.7.5

(1) 7) 公式计算杀灭对数值。

2.1.7.7 滤膜过滤悬液定量杀灭试验

(1) 菌悬液的制备和定量杀灭试验同 2.1.7.4 (1)、(2) 和 (3)。

(2) 滤膜孔径 0.45 μ m

(3) 待试验菌与消毒剂相互作用至各预定时间，分别吸取 1.0mL 试验菌与消毒剂混合液加入到过滤器中过滤，然后加入 150mL 至 500mL 冲洗液 (预先置 20℃ \pm 1℃ 水浴中 5min) 做第 1 次冲洗过滤处理，再加入 50mL 蒸馏水做第 2 次冲洗过滤处理，最后将滤膜有菌面朝上贴于平板表面，置 37℃ 恒温培养箱中培养至规定时间。

(4) 吸取 0.5mL 试验菌悬液于试管内，加入 0.5mL 有机干扰物，再加入 4.0mL 标准硬水，混匀。做系列 10 倍稀释后取适当稀释度该混合液 1.0mL 加入到过滤器中，然后加入 50mL 蒸馏水 (预先置 20℃ \pm 1℃ 水浴中 5min) 作冲洗过滤处理，然后将滤膜有菌面朝上贴于平板表面，置 37℃ 恒温培养箱中培养至规定时间，计数菌落数，作为阳性对照。

(5) 分别吸取稀释液、蒸馏水和硬水各 1.0mL 于同一无菌平皿内，倒入上述试验同批次的培养基 15mL~20mL，置 37℃ 恒温培养箱中培养至规定时间，计数菌落数，作为阴性对照。

(6) 试验重复 3 次，计算各组的活菌量 (cfu/mL 或片)，并换算为对数值 (N)，然后按 2.1.7.5 (1) 7) 公式计算杀灭对数值。

2.1.7.8 评价规定

(1) 产品监督检验,在产品说明书指定的最低浓度与最短作用时间,重复试验3次。悬液定量杀灭试验中,各次的杀灭对数值均 ≥ 5.00 ,判定为消毒合格。载体定量杀灭试验,各次的杀灭对数值均 ≥ 3.00 ,判定为消毒合格。

(2) 产品申报卫生许可检验中,要求在产品说明书指定的浓度与3个作用时间,重复试验3次。在产品指定最低浓度与最短作用时间,以及最短作用时间的1.5倍时,要求悬液定量杀灭试验中各次的杀灭对数均 ≥ 5.00 。载体定量杀灭试验和流动浸泡载体定量杀灭试验中,各次的杀灭对数均 ≥ 3.00 ,判定为消毒合格。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。

在申报卫生许可检验中,检验机构如果发现产品说明书指定的浓度与作用时间,与常规消毒剂量差异较大,不能进行消毒试验评价时,可根据专业知识合理调整其浓度与时间,然后再进行测试。

(3) 对载体浸泡定性灭菌试验,阳性对照组有菌生长,菌数对照组符合要求,阴性对照组无菌生长,5次试验均无菌生长,判定为灭菌合格。

(4) 报告中应将各次试验的结果全部以表格的形式列出。阳性对照组应列出各次实验菌浓度,以及平均实验菌浓度。实验组应列出杀灭对数值,例如,杀灭对数值大于5.00时,应表示为 ≥ 5.00 ,而不必列出具体的数字;杀灭对数值小于5.00时,应列出具体的数字(例如2.58, 4.65)。

2.1.7.9 注意事项

(1) 在杀菌试验中,每次均应设置阳性对照。

(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,则全部试验需换用未污染试剂或培养基重做。

(3) 悬液定量杀菌试验时,有机干扰物质一般采用3.0% (W/V) 牛血清白蛋白贮存溶液,在消毒体系中稀释10倍(含量为0.3%),进行消毒试验。如果某消毒剂使用说明书中指定,其产品只用于清洁物品或器械的消毒或只用于冲洗浸泡消毒,可采用0.3% (W/V) 牛血清白蛋白贮存溶液,在消毒体系中稀释10倍(含量为0.03%),进行消毒试验。

2.1.8 分枝杆菌杀灭试验

2.1.8.1 目的

在实验室内验证消毒剂对悬液中或载体上分枝杆菌的消毒效果。

2.1.8.2 实验器材

(1) 实验菌株 龟分枝杆菌脓肿亚种 CA 93326 (ATCC 19977)

(2) 培养基 分枝杆菌干燥培养基

(3) 试验菌及其菌悬液或菌片的制备

(4) 中和剂 (根据 2.1.5 所示方法鉴定合格者)

(5) 稀释液 0.1% 胰蛋白胨的生理盐水溶液

- (6) 消毒剂稀释用硬水 见附录 A
- (7) 有机干扰物质 见附录 A
- (8) 刻度吸管 (0.1mL、1.0mL、5.0mL)
- (9) 恒温水浴箱
- (10) 电动混匀器
- (11) 计时装置
- (12) 恒温培养箱

2.1.8.3 龟分枝杆菌脓肿亚种菌悬液的制备

(1) 以无菌操作方式开启冻干菌种管,用毛细吸管吸加适量营养肉汤于管中,轻柔吹吸数次,使菌种融化分散。取含 5.0mL~10.0mL 营养肉汤试管,滴入少许菌种悬液,置 37℃ 培养 18h~24h。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平板上,置 37℃ 培养 72h。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,置 37℃ 培养 72h,即为第 3代培养物。密封后,4℃ 保存,时间不得超过6周。

(2) 试验时取第 3 代斜面培养物,在分枝杆菌干燥培养基斜面上连续传代,培养方法与第 3代相同。取第5~6代的分枝杆菌培养基斜面新鲜培养物(72h),用 5.0mL 吸管吸取 3.0mL~5.0mL 稀释液加入斜面试管内,反复吹吸,洗下菌苔。随后,用 5.0mL 吸管将洗液移至另一含有 6g~7g 玻璃珠的无菌圆锥底塑料试管中,在电动混匀器混合 5min 然后将菌液吸入到另一试管内制成菌悬液。

(3) 将制成的菌悬液,进行活菌培养计数(见 2.1.3),按其结果用稀释液稀释至所需浓度。

(4) 菌悬液保存在 4℃ 冰箱内备用,当天使用不得过夜。

2.1.8.4 实验分组

试验分为下列各组:

- (1) 试验组,按 2.1.7.3 规定,选定消毒剂浓度与作用时间。
- (2) 阳性对照组,以标准硬水代替消毒剂溶液,按 2.1.7.3 规定程序进行试验。所得结果代表试验体系中所含受试菌的活菌浓度,并以其计算消毒因子对受试菌的杀灭对数值。
- (3) 阴性对照组,观察同次试验用相关溶液和培养基有无污染。

2.1.8.5 试验程序

常用杀灭试验有:悬液定量杀灭试验、载体浸泡定量杀灭试验和流动浸泡载体定量杀菌试验等。其操作程序按 2.1.7.4、2.1.7.5 和2.1.7.6 进行,接种后的平皿应放入干净的塑料袋内,置 37℃ 恒温培养箱中培养 7d,观察最终结果。

2.1.8.6 评价规定

(1) 产品监督检验,按产品使用说明书指定的使用浓度和作用时间,重复试验 3 次,悬液定量杀灭试验各次试验的杀灭对数值均 ≥ 4.00 ,载体定量杀灭试验各次试验的杀灭对数值均

≥3.00, 判定为消毒合格。

(2) 产品申报卫生许可检验, 按产品使用说明书指定的使用浓度和 3 个作用时间, 重复试验 3 次。

用悬液定量杀菌试验评价杀菌效果时, 在产品规定使用浓度与最低作用时间, 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 ≥4.00, 在产品规定使用浓度与最短作用时间的 0.5 倍时, 允许杀灭对数值 <4.00, 判定为实验室试验该产品对分枝杆菌污染物消毒的有效剂量。

用载体浸泡定量杀菌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 ≥3.00, 在产品规定使用浓度与最短作用时间的 0.5 倍时, 允许杀灭对数值 <3.00, 判为实验室试验该产品对分枝杆菌污染物消毒的有效剂量。

2.1.8.7 注意事项

(1) 分枝杆菌试验操作应在生物安全 II 级实验室中进行, 避免造成实验人员实验室感染和对环境污染。

(2) 其它注意事项见 2.1.7.9。

2.1.9 真菌杀灭试验

2.1.9.1 目的

在实验室内验证消毒剂对悬液中或载体上真菌繁殖体或真菌孢子的消毒效果。

2.1.9.2 实验器材

(1) 麦芽浸膏琼脂 (MEA) 见附录 A

(2) 沙堡琼脂培养基 见附录 A

(3) 试验菌及其菌悬液或菌片 白色念珠菌 ATCC 10231 和黑曲霉菌 ATCC 16404 孢子悬液与菌片, 按 2.1.9.3 (1) 和 2.1.9.3 (2) 所示方法制备。根据消毒剂特定用途和特殊需要, 可选择相应的真菌或孢子悬液与菌片

(4) 中和剂 (根据 2.1.5 所示方法鉴定合格者)

(5) 磷酸盐缓冲液 (PBS, 0.03 mol/L, pH7.2)

(6) 消毒剂稀释用硬水 见附录 A

(7) 有机干扰物质 见附录 A

(8) 刻度吸管 (0.1mL、1.0mL、5.0mL)

(9) 恒温水浴箱

(10) 电动混匀器

(12) 计时装置

(13) 恒温培养箱

2.1.9.3 真菌悬液制备

(1) 白色念珠菌悬液的制备

1) 以无菌操作方式开启冻干菌种管, 用毛细吸管吸加适量沙堡液体培养基于菌种管中, 轻

柔吹吸数次,使菌种融化分散。取含 5.0mL~10.0mL 沙堡琼脂培养基试管,滴入少许菌种悬液,置 37℃ 培养 18h~24h。用接种环取第 1 代培养的菌悬液,划线接种于沙堡琼脂培养基平板上,置 37℃ 培养 18h~24h。挑取上述第 2 代培养物中典型菌落,接种于沙堡琼脂斜面,置 37℃ 培养 18h~24h,即为第 3 代培养物。

2)取第 3~6代的沙堡琼脂培养基斜面新鲜培养物(18h~24h),用 5.0mL 吸管吸取 3.0mL~5.0mL 稀释液加入斜面试管内,反复吹吸,洗下菌苔。随后,用 5.0mL 吸管将洗液移至另一无菌试管中,用电动混匀器混合20s,或在手掌上振打 80次,以使白色念珠菌悬浮均匀。

3) 悬液定量杀菌试验时,实验用菌悬液的含菌量为 1×10^7 cfu/mL~ 5×10^7 cfu/mL;载体定量杀菌试验时,菌片制备按 2.1.2.4 要求进行。

4) 菌悬液保存在 4℃ 冰箱内备用,当天使用不得过夜。

5) 怀疑有污染时,应以菌落形态、革兰染色与生化试验等法进行鉴定。菌落形态可直接用显微镜观察。菌体形态可在涂片后直接用高倍显微镜观察,也可用墨水阴地法染色(将菌与黑墨水在玻片上混匀,推成薄膜)后观察。

(2) 黑曲霉菌(ATCC 16404)孢子悬液或菌片的制备。

1) 以无菌操作方式开启冻干菌种管,用毛细管吸取少量麦芽浸膏营养肉汤培养基加到菌种管中,轻轻吹吸,使菌种沉淀物融化分散。取少许沉淀物悬液加到含 5.0mL 麦芽浸膏营养肉汤培养基试管中,置 $30^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中培养 42h~48h。用接种环划线接种第 1 代培养物于 MEA 培养基平板,置 $30^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中培养 42h~48h。取平板培养物中的典型菌落,接种于麦芽浸膏营养肉汤培养基,置 $30^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中培养 42h~48h,即为第 3 代培养物。

2) 用 10.0mL 吸管吸取 5.0mL~10.0mL 第 3 代培养物,接种罗氏瓶,并摇动使菌液布满 MEA 培养基表面,然后将多余肉汤培养物液体吸出,置 $30^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中培养 42h~48h。

3) 向罗氏瓶培养物中加入 5.0mL~10.0mL 0.05% (V/V) 吐温 80 生理盐水溶液,刮洗黑曲霉菌分生孢子于溶液中,将孢子悬液移入装有玻璃珠的三角瓶中,轻轻振摇 1min 后,滤过除去菌丝。滤过后,显微镜下(400 倍)观察是否存在菌丝,若悬液中有菌丝存在,可经 5000 r/min~6000 r/min,离心 20min。再次在显微镜下(400 倍)观察,若悬液中仍有菌丝存在,须再离心。

4) 黑曲霉菌分生孢子悬液在 $2^\circ\text{C} \sim 8^\circ\text{C}$ 储存不能超过 2d,使用前,混合均匀,在显微镜下(400 倍)观察是否有孢子出芽,若有孢子出芽,则不得使用。

5) 悬液试验时,可用稀释液适当稀释使实验用菌悬液的含菌量为 1×10^7 cfu/mL ~ 5×10^7 cfu/mL。

6) 制备染菌样片时染菌方法为滴染法,每片加菌悬液 $10\mu\text{l}$ 。染菌后,置二级生物安全柜内干燥备用。回收菌数应达 1×10^6 cfu/片~ 5×10^6 cfu/片。

2.1.9.4 实验分组

试验分为下列各组:

(1) 试验组,按 2.1.7.3 规定,选定消毒剂浓度与作用时间,对受试菌种的杀灭能力进行测定。

(2) 阳性对照组,以标准硬水代替消毒剂溶液,按 2.1.7.3 规定程序进行试验。所得结果代表试验体系中所含试验菌的活菌浓度,并以其计算消毒因子对试验菌的杀灭对数值。

(3) 阴性对照组,观察同次试验用相关溶液和培养基有无污染。

2.1.9.5 试验程序

常用杀灭试验有:悬液定量杀菌试验、载体浸泡定量杀菌试验等。对白色念珠菌使用沙堡琼脂培养基,对黑曲霉菌使用麦芽浸膏琼脂(MEA)。其操作程序详见 2.1.7。

活菌培养计数时,对白色念珠菌,在 37℃ 恒温培养箱中培养72h 观察最终结果。对黑曲霉菌,在30℃ 恒温培养箱中培养 72h 观察最终结果。

2.1.9.6 评价规定

(1) 产品监督检验,按产品使用说明书指定的使用浓度和作用时间,重复试验 3 次,对白色念珠菌和黑曲霉菌各次试验的杀灭对数值均 ≥ 4.00 ,判定为消毒合格。对所试特定真菌的杀灭对数值均 ≥ 4.00 ,判定为消毒合格。

(2) 产品申报卫生许可检验,按产品使用说明书指定的使用浓度和 3 个作用时间,重复试验 3 次,在产品规定使用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 ≥ 4.00 ,在产品规定使用浓度与最短作用时间的 0.5倍时,允许杀灭对数值 < 4.00 ,判定为消毒合格。

用载体浸泡定量杀菌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,以及最短作用时间的 1.5倍时,各次试验的杀灭对数值 ≥ 3.00 ,在产品规定使用浓度与最短作用时间的 0.5倍时,允许杀灭对数值 < 3.00 ,判定为消毒合格。

2.1.9.7 注意事项

(1) 黑曲霉菌试验操作应在专门的生物安全 II 级实验室内进行,避免造成环境污染和操作者受污染。

(2) 其它注意事项见 2.1.7.9。

2.1.10 病毒灭活试验

2.1.10.1 目的

评价各种用途的消毒因子对病毒的灭活效果。

2.1.10.2 实验器材

(1) 实验用病毒株 脊髓灰质炎病毒 I 型(poliovirus- I, PV- I)疫苗株;艾滋病病毒 1 型(human immunodeficiency virus, HIV-1)美国株

(2) 宿主细胞 可采用VERO细胞系、BGM细胞、HeLa细胞系或FL细胞系,作为PV- I 的测试细胞。用含有人T淋巴细胞白血病病毒 1 型(human T cell leukemia virus 1, HTLV-1)基因的人淋巴细胞(MT4 株)作为HIV-1的测试细胞。

- (3) 细胞培养瓶
- (4) 96 孔培养板
- (5) 恒温水浴箱
- (6) 二氧化碳培养箱
- (7) 二级生物安全柜
- (8) 低温冰箱 (-20℃, -80℃)
- (9) 液氮罐
- (10) 倒置显微镜
- (11) 低温高速离心机
- (12) 可调移液器及配套一次性塑料吸头
- (13) 细胞维持培养基 见附录A
- (14) 细胞完全培养基 见附录A
- (15) 去离子水、标准硬水 (硬度为324mg/L)
- (16) 有机干扰物 对未清洗较脏的物品用 3.0% 牛血清白蛋白。对已清洗较清洁的物品用 0.3% 牛血清白蛋白
- (17) 胎牛血清或新生牛血清

2.1.10.3 病毒悬液的制备

(1) 从液氮中取出冻存的试验用宿主细胞, 在 37℃ 温水中迅速融化, 用毛细吸管移置于含有细胞维持液的细胞管内, 吹吸数次, 混匀, 立即离心 (3000r/min, 3min), 去上清液。再加入适当的细胞维持液, 吹吸数次, 混匀, 同上离心后, 转种于加有 10mL 完全培养基的培养瓶中。逐日观察细胞生长情况, 在细胞长满单层时, 用于传代或消毒试验。

(2) 取出低温冻存的试验病毒毒种, 室温融化, 用不含胎牛血清的培养基作10倍稀释, 然后全部接种于已经长满单层细胞的细胞瓶内, 置37℃ CO₂培养箱中, 吸附 1~2h, 吸出病毒悬液, 加入细胞维持液, 至37℃ CO₂培养箱内培养。待3/4细胞出现病变时, 收获病毒。

(3) 将含有病毒及宿主细胞的培养液, 在冰浴条件下, 用超声波 (或室温与-20℃反复冻融3次) 破碎宿主细胞或用其他相应的方法破碎宿主细胞, 释放病毒。然后, 尽快离心 (6000r/min, 15min) 去除沉淀 (主要为细胞碎片), 上清液即为所需的病毒悬液。按每管 1.0mL 分装于无菌离心管 (1.5mL) 中。

(4) 取1支病毒悬液, 按病毒滴度测定法, 测定其病毒滴度。其余置 -80℃冷冻保存备用。

2.1.10.4 病毒载体的制备

(1) 按 2.1.2.4 制备载体。

(2) 取出低温冻存的病毒悬液, 室温融化, 与等量有机干扰物混合, 取 0.01mL 滴染于载体片上, 室温凉干后备用。

2.1.10.5 病毒滴度测定

(1) 操作步骤

用细胞维持液对样本做系列10倍稀释，每个稀释度滴加 4 孔（各孔中应该已经长满单层的宿主细胞）于培养板上，置37℃ CO₂培养箱 1h~2h，确保病毒吸附在细胞上。取出培养板，更换细胞维持液。放入CO₂培养箱中（37℃，5%CO₂）培养，每日在显微镜下观察细胞病变，连续观察3d~5d，逐孔记录细胞病变情况。

(2) 病毒滴度的计算

病毒滴度以半数细胞感染剂量（TCID₅₀）表示，TCID₅₀的对数值计算公式如下：

TCID₅₀ 对数值= 病变率高于50%组稀释度的对数值 + 距离比例

具体计算步骤如下：

1) 计算细胞病变率。先计数培养板上不同稀释度样本细胞病变发生与未发生的孔数，然后分别计算“细胞病变(-)”和“细胞病变(+)”的累积总计值。计算“细胞病变(-)”累积值时，由稀释度低样本组向稀释度高样本组累积；“细胞病变(+)”累积值则相反，由稀释度高样本组向稀释度低样本组累积（见表 2-2）。

各稀释度样本组“细胞病变(+)”累积总计值，除以该稀释度样本组“细胞病变(-)”与“细胞病变(+)”累积总计值之和即为其病变比，由之可得病变率(%)（见表 2-2）。

2) 计算距离比例。距离比例可按式计算：

$$\text{距离比例} = \frac{\text{高于50\%组的病变率} - 50}{\text{高于50\%组的病变率} - \text{低于50\%组的病变率}}$$

注：病变率高于 50% 组是指病变率超过50%的最低组，以下简称高于 50% 组；病变率低于 50% 组是指病变率低于 50% 的最高组，以下简称低于 50% 组。

计算举例：设试验数据如表 2-2。

表 2-2 某消毒剂对 HIV 灭活作用的测定结果

样本 稀释度	接种 孔数	细胞病变		累积值		病变比	病变率 (%)
		-	+	细胞病变 (-)	细胞病变 (+)		
10 ⁻⁴	4	0	4	0	12	12/12	100
10 ⁻⁵	4	0	4	0	8	8/8	100
10 ⁻⁶	4	1	3	1	4	4/5	80
10 ⁻⁷	4	3	1	4	1	1/5	20
10 ⁻⁸	4	4	0	8	0	0/8	0

本例，高于50%组病变率(%)为80；低于 50%病变率(%)为20；高于50%组稀释度对数值为6。

$$\text{距离比例} = \frac{80 - 50}{80 - 20} = 0.5$$

$$\text{TCID}_{50} \text{ 对数值} = 6 + 0.5 = 6.5$$

2.1.10.6 残留消毒剂中和稀释法的鉴定试验

(1) 目的

确定所选中和剂是否适用于拟进行的细胞感染法病毒灭活试验。

(2) 试验设计原则

1) 通过所设各组试验结果综合分析, 应可确定所用中和剂是否对测试消毒药物有良好的中和作用, 对试验用病毒和细胞株是否有害或不良影响。

2) 根据试验目的, 选择适宜的病毒株和细胞株。

3) 中和试验用消毒剂浓度应为最高使用浓度, 最短作用时间不得少于30s。

(3) 实验分组

1) 中和剂 + 病毒悬液 → 细胞维持培养基系列稀释, 接种细胞培养
观察中和剂对病毒有无抑制作用。

2) (消毒剂 + 中和剂) + 病毒悬液 → 细胞维持培养基系列稀释, 接种细胞培养
观察中和产物, 或未被完全中和的残留消毒剂对病毒有无抑制作用或对检测方法有无干扰。

3) 病毒悬液 → 细胞维持培养基系列稀释, 接种细胞培养
观察病毒是否可正常生长, 并将其结果作为阳性对照值。

4) 未接种病毒的细胞 → 培养
观察其生长是否正常。

(4) 病毒悬液定量法中和剂鉴定试验操作程序

1) 按 2.1.10.3 制备病毒悬液。消毒剂用标准硬水按规定浓度的 1.25倍配制, 备用。

2) 中和剂鉴定试验分以下4组:

第 1 组 吸取 0.98mL 中和剂溶液于试管内, 置 20℃ ± 1℃ 水浴 5min, 加入 0.02mL 病毒悬液, 混合均匀, 作用 10min, 以细胞维持培养基作系列稀释, 取样作为第 1 组样本。

第 2 组 吸取 0.98mL 中和产物 (0.9mL 中和剂 + 0.08mL 消毒剂溶液) 于试管内, 置 20℃ ± 1℃ 水浴 5min, 再吸加 0.02mL 病毒悬液, 混合均匀, 作用 10min, 以细胞维持培养基作系列稀释, 取样作为第 2 组样本。

第 3 组 吸取 0.98mL 细胞维持液于试管内, 置 20℃ ± 1℃ 水浴 5min, 再吸加 0.02mL 病毒悬液, 混合均匀, 作用 10min, 以细胞维持培养基作系列稀释, 取样作为第 3 组样本。

第 4 组 将试验用细胞, 加细胞维持液。

3) 将第 1~3 组样本进行病毒滴度测定, 观察第 4 组细胞生长情况。

(5) 病毒载体定量中和剂鉴定试验操作程序

1) 按 2.1.10.4 制备染毒载体。

2) 中和剂鉴定试验分以下 4 组：

第 1 组 吸取中和剂 1.0mL 于无菌试管中，将其置 $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 水浴 5min，用无菌镊子夹入 1 片病毒载体片，并使浸透于中和剂内，作用 10min，用细胞维持液做系列 10 倍稀释，取样作为第 1 组样本。

第 2 组 吸取中和产物溶液(以浸有消毒剂的载体置 1.0mL 中和剂内，作用 10min) 1.0mL 于无菌试管中，将其置 $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 水浴 5min，用无菌镊子夹入 1 片病毒载体片，并使浸透于中和产物溶液中。作用 10min，用细胞维持液做系列 10 倍稀释，取样作为第 2 组样本。

第 3 组 吸取细胞维持液 1.0mL 于无菌试管中，将其置 $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 水浴 5min，用无菌镊子夹入 1 片病毒载体片，并使浸透于细胞维持液中。作用 10min，用细胞维持液做系列 10 倍稀释，取样作为第 3 组样本。

第 4 组 将试验用细胞，加细胞维持液。

3) 将第 1~3 组样本进行病毒滴度测定，观察第 4 组细胞生长情况。

(6) 3d~5d 记录试验结果，试验重复 3 次。

(7) 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：

1) 第 1、2、3 组病毒滴度的误差率小于 50%，悬液定量法病毒滴度对数值为 5~7，载体法病毒滴度对数值为 4~6。

2) 第 4 组细胞生长正常。

3) 连续 3 次试验取得合格评价。

2.1.10.7 残留消毒剂物理去除方法的鉴定试验要点

病毒灭活试验中的物理去除法，首选稀释法，其次为吸附柱法、分子筛柱法、载体冲洗法。

(1) 分组

1) (病毒悬液 + 消毒剂) + 除药处理 → 细胞维持培养液系列稀释，接种培养观察去除残留药物后病毒可否恢复对细胞的感染作用。

2) 病毒悬液 + 除药处理 → 细胞维持培养液系列稀释，接种培养观察除药处理对病毒滴度有无影响。

3) 病毒悬液 → 细胞维持培养液系列稀释，接种培养观察病毒生长是否正常，并以该结果作为阳性对照值。

4) 未接种病毒的细胞 → 培养观察细胞生长是否正常。

(2) 悬液定量操作程序

1) 按 2.1.10.3 制备病毒悬液。消毒剂用标准硬水按规定浓度 1.25 倍配制备用。

2) 中和剂鉴定试验分以下 4 组:

第 1 组 吸消毒剂 0.8mL 于试管内, 置 $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 水浴中经 5min 后, 吸加 0.2mL 病毒悬液, 混匀。待作用至规定的时间, 对此液进行除药处理, 根据试验规定量, 吸取最终样本 (或用细胞维持培养液系列稀释的样液), 进行随后的病毒滴度测定。

第 2 组 吸取病毒悬液 0.2mL, 加 0.8mL 细胞维持培养液, 做除药处理。根据试验规定量, 吸取最终样本 (或用细胞维持培养液系列稀释的样液), 进行随后的病毒滴度测定。

第 3 组 吸取病毒悬液 0.2mL, 加细胞维持培养液 0.8mL, 不加消毒剂亦不做任何除药处理。直接进行病毒滴度测定。

第 4 组 向未接种病毒的细胞管内, 加入细胞维持培养液进行正常培养。

(3) 评价规定

试验结果符合以下全部条件, 所测物理除药法可判为合格:

- 1) 第 1 组无试验病毒或仅有少量病毒生长。且明显少于第 2 组、第 3 组的病毒生长。
- 2) 第 2、3 组病毒生长量相近, 二者差异不超过 1 个对数滴度。
- 3) 连续 3 次试验取得合格评价。
- 4) 可使用病毒载体, 按同样的原理与操作步骤进行试验, 判定合格标准相同。

2.1.10.8 脊髓灰质炎病毒灭活试验

(1) 目的

验证各种消毒因子对病毒的灭活效果。

(2) 悬液定量灭活试验操作程序

1) 按 2.1.10.3 制备病毒悬液, 低温保存备用。

2) 取待测消毒剂, 用灭菌硬水稀释至说明书设定的作用浓度的 1.25 倍, 置 $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 水浴中备用。

3) 取 0.1mL 有机干扰物与等量病毒悬液混合, 置 $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 水浴 5min, 加入 0.8mL 消毒剂样品混匀, 作用至设定时间, 取 0.1mL 加入到 0.9mL 的中和剂中混匀, 用细胞维持液做系列 10 倍稀释, 取样进行病毒滴度测定。

4) 阳性 (病毒) 对照组试验中, 用细胞维持液代替消毒剂, 其它同实验组。

5) 试验重复 3 次。

(5) 脊髓灰质炎载体定量灭活试验操作程序

1) 按 2.1.10.4 制备病毒载体。

2) 取待测消毒剂, 用灭菌硬水稀释至说明书设定的作用浓度, 于 $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 水浴中备用。

3) 取无菌平皿, 按每片 5.0mL 的量, 吸取消毒液注入平皿中。

4) 将平皿置 $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 水浴 5min 后, 用无菌镊子分别取病毒载体片浸没于消毒液中。

5) 作用至设定时间, 取出载体片分别移入含 1.0mL 的中和剂试管中。振打 80 次, 进行病毒滴度测定。

6) 直接将病毒载体片加到含 1.0mL 细胞维持液的试管中, 振打80次, 进行病毒滴度测定, 作为阳性对照组。

7) 试验重复3次。

(6) 平均灭活对数值的计算

平均灭活对数值按下式计算: 设阳性(病毒)对照组平均病毒感染滴度(TCID₅₀)的为N₀, 试验(消毒)组平均病毒感染滴度(TCID₅₀)为N_x。

$$\text{平均灭活对数值} = \lg N_0 - \lg N_x$$

(7) 评价规定

1) 悬液定量杀灭试验中, 杀灭对数值 ≥ 4.00 , 阳性对照组病毒滴度对数值在 5~7 之间为消毒合格。

2) 载体定量灭活试验中, 杀灭对数值 ≥ 3.00 , 阳性对照组病毒滴度对数值在 4~6 之间为消毒合格。

2.1.10.9 艾滋病病毒灭活试验

(1) 目的

测定消毒剂对艾滋病病毒灭活所需的剂量, 以验证对该病毒污染物消毒的实用剂量。

(2) 实验原理

用细胞感染法测定消毒剂作用前后(或试验组与对照组)样本中 HIV 的量。以细胞病变作为判断指标, 确定各组病毒的感染滴度, 计算消毒剂对 HIV 的灭活对数值。

(3) 安全防护

试验中要求采取严密防护措施。我国规定所有接触 HIV 的试验均需在生物安全三级(biological safety level 3, BSL 3)实验室内进行, 并制定有相应的安全防护措施。在 HIV 灭活试验时, 必须严格按照有关安全规定进行。

(4) 实验分组

1) 试验组 根据所测消毒剂对其他微生物的杀灭或灭活剂量估计, 设立适宜的浓度与作用时间组(不少于1个浓度, 3个作用时间), 对作用时间的设计应不短于 30s。所设组应能测出使 HIV 全部灭活所需的最低有效剂量(药物浓度与作用时间)。

2) 阳性对照组 用细胞维持液代替消毒剂, 按试验组规定步骤加入 HIV 悬液进行试验和培养, 观察 HIV 生长是否良好。

3) 阴性对照组 用不含 HIV 的完全培养基作为阴性对照, 观察所用培养基有无污染, 细胞是否生长良好。

4) 消毒剂对细胞毒性组 取系列稀释的不同浓度的待测消毒剂各100 μ L, 分别加入含有 100 μ L 用完全培养基制备的 MT4 细胞悬液(含细胞400 000 个/mL)的 96 孔培养板内。置二氧化碳恒温培养箱(37 $^{\circ}$ C)中培养 7d, 观察细胞生长情况, 确定对细胞无毒性的消毒剂最高稀

释度。

(5) HIV 悬液定量灭活试验操作程序

1) 从液氮中取出冻存的 MT4 细胞, 在 37℃ 温水中迅速融化, 并用细胞维持液洗涤两次后, 转种于加有 10mL 完全培养基培养瓶中。逐日观察细胞生长情况, 在细胞对数生长期时收获细胞用于消毒试验。

2) 从液氮中取出冻存 HIV-1 毒种, 接种于含 10mL 细胞悬液(含细胞700 000个/mL~800 000个/mL) 培养瓶中。逐日观察病变, 待3/4细胞出现病变时, 收获病毒。收获时, 将培养液取出, 尽快离心, 并将含病毒的上清液按每管 0.5mL 分装于无菌离心管(1.5mL) 中, 冷冻保存于-80℃ 备用。如不能立即离心, 可暂将培养瓶冷冻保存于-20℃, 并争取尽快离心分装。

3) 取待测消毒剂, 用无菌去离子水作 1:2、1:4、1:8 ... 系列稀释。视消毒剂的类型和实验目的, 确定最高稀释度。为防止污染培养液, 必要时在试验前需将消毒剂过滤除菌。

4) 取 100μL 有机干扰物, 与100μL 病毒原液混合。加入0.8mL待检消毒剂后计时。待作用至规定时间, 取出100μL, 加入0.9mL 用完全培养基制备的 MT4 细胞悬液(400 000 个/mL), 在 37℃, 放置 40min, 以确保残留病毒全部吸附在细胞上。阳性(病毒) 对照组试验中, 用无菌细胞维持液代替消毒剂; 消毒剂对细胞毒性组试验中, 用细胞维持液代替病毒。

5) 取出反应管, 立即采取去除残留消毒剂处理。处理可用物理去除法或中和稀释法(所用方法需先经试验证明, 既可有效去除残留消毒剂, 又对细胞和 HIV 无杀灭或抑制作用)。

6) 在 96 孔培养板上滴定样本中残留的病毒量。先在培养板(96孔) 的各孔中, 加入 100μL 用完全培养基制备的 MT4 细胞悬液(含细胞 400 000 个/mL)。同时, 用完全培养基对待滴定样本做 1:10 系列稀释, 然后取 100μL 稀释好的样本加入已含 MT4 细胞悬液的96孔培养板内。每个稀释度做 4 孔。

7) 将按上述程序加液的 96 孔培养板, 放入二氧化碳培养箱中(37℃, 5%CO₂), 逐日在显微镜下观察细胞病变。被感染细胞融合肿胀, 出现多核巨细胞。第 4 天, 在各反应孔内补加 50μL 新鲜完全培养基。第 7 天, 逐孔观察并记录细胞病变情况。

8) 试验重复 3 次。

(6) 评价规定

1) 对测试滴度的HIV, 3次灭活试验后均应不再检出, 此时的灭活对数值应 ≥ 4.00 , 可判为该消毒剂浓度与作用时间, 对HIV污染物消毒的实验室试验合格。

2) 在正常情况下, HIV 阳性对照组病毒感染滴度(TCID₅₀) 对数值应在 5~7 之间。阴性对照组宿主细胞生长良好, 并且无 HIV 检出。所用浓度的消毒液对宿主细胞生长无不良影响。否则, 根据发现的问题, 或调整 HIV 悬液浓度, 或选择适宜消毒液浓度, 或更换污染试剂和培养基, 或改进其他有关条件后, 重做试验。

(7) 注意事项

1) 操作人员应具有较丰富的病毒学实验工作经验, 必须绝对遵守BSL3实验室的安全制度。

身体状况欠佳，或有伤口时，应暂时停止工作。

2) 有感染可能性的操作，均应在BSL3实验室的层流负压超净工作台中进行。

3) 一旦发生事故，有病毒感染或污染环境的可能时，切莫惊慌，除立即进行妥善消毒处理外，并应尽快报告实验室和单位领导。

4) 本试验周期较长，在全部过程中应注意防止样本污染。

2.1.11 消毒剂杀菌作用影响因素试验

2.1.11.1 目的

对新消毒产品进行评价时，了解有机物、温度和pH对消毒剂杀菌作用的影响规律。

2.1.11.2 实验器材

(1) 菌片与菌悬液（按 2.1.2 要求和方法制备）

(2) 恒温水浴箱

(3) 冷水浴装置（可放入试管架的容器，以冰水调节水温）

(4) 温度计

(5) pH 计

(6) 有机物，根据消毒剂的使用对象选择，如酵母粉、血清、蛋白胨、牛血清白蛋白

(7) 中和剂（经中和剂试验鉴定合格）

(8) 盐酸（用无菌纯化水配制）

(9) 氢氧化钠（用无菌纯化水配制）

2.1.11.3 实验微生物的选择

根据所测消毒剂鉴定需要决定。一般情况下，对细菌繁殖体应选择大肠杆菌和金黄色葡萄球菌，作为革兰阳性与阴性细菌的代表；对细菌芽孢应选择枯草杆菌黑色变种芽孢。也可直接选择特定的微生物进行试验。

2.1.11.4 消毒剂浓度和作用时间的设定

试验中应分以下各组：

(1) 试验组 各种因素影响的测定，均用杀灭相应微生物试验所得最低有效浓度和 3 个作用时间进行杀灭试验。以该最低有效浓度所需的最短有效时间和最短有效时间的2倍、3倍为3个作用时间。试验结果应测出合格杀灭对数值的最低有效剂量。必要时，可根据需要调整消毒剂浓度或作用时间，若最短有效时间较长（>30min），可根据情况适当缩短作用时间的组距。对最短有效时间较短者（<5min），可根据情况适当延长作用时间的组距。

(2) 阳性对照组 用标准硬水代替消毒剂溶液，按上述同样的步骤进行试验。所得结果代表活菌浓度。

2.1.11.5 有机物对杀灭微生物效果影响的测定

(1) 以小牛血清为有机物代表，应设置无小牛血清对照组；含 25% 小牛血清组；含 50% 小牛血清组等 3 组。各组所用消毒剂浓度和作用时间，见 2.1.11.4。

(2) 菌悬液与无菌小牛血清按 1:1 与 3:1 比例混合, 分别配成含 50% 与 25% 小牛血清的菌悬液。此含小牛血清的菌悬液, 可用于悬液定量杀菌试验, 亦可滴染菌片进行载体定量试验。

(3) 以悬液定量杀灭试验或载体浸泡定量杀灭试验进行测定, 试验程序见 2.1.7。

(4) 试验应重复 3 次。

(5) 计算每次试验的杀灭对数值和平均杀灭对数值。

2.1.11.6 温度对杀灭微生物效果影响的测定

(1) 设置 $10^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 $20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 $30^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 等, 以 10°C 为间隔。各组消毒剂浓度和作用时间的设置见 2.1.11.4。

(2) 以悬液定量杀灭试验或载体浸泡定量杀灭试验进行测定, 试验程序见 2.1.7。

(3) 试验应重复 3 次。

(4) 计算每次试验的杀灭对数值和平均杀灭对数值。

2.1.11.7 pH 对杀灭微生物效果影响的测定

(1) 以该消毒剂的使用浓度 pH 值和使用浓度的 pH 值加 2、pH 值减 2, 设 3 组进行试验。对消毒液 pH 值的调节, 先用 pH 计测定原消毒剂的 pH 值, 在偏酸时慢慢滴加氢氧化钠溶液, 偏碱时慢慢滴加盐酸溶液以调整。随时用 pH 计测定消毒剂的 pH 值。当达到所要求的 pH 值后, 停止调整, 进行随后的试验。必要时, 在 pH 值调整后可测定有效成分含量以观察是否受到 pH 值变化的影响。

(2) 各 pH 组所用消毒液浓度和作用时间, 见 2.1.11.4。

(3) 以悬液定量杀灭试验或载体浸泡定量杀灭试验进行测定, 试验程序见 2.1.7。

(4) 试验应重复 3 次。

(5) 计算每次试验的杀灭对数值和平均杀灭对数值。

2.1.11.8 评价规定

有机物影响试验以不含小牛血清组为对照, 温度影响试验以 $20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 组为对照, pH 影响试验以消毒剂使用溶液 pH 值组为对照。

(1) 该组第 1 个~3 个作用时间杀灭效果均合格, 判为该组所试因素无影响。

(2) 该组第 1 个作用时间杀灭效果不合格, 第 2 个、第 3 个作用时间杀灭效果合格, 判为该组所试因素有轻度影响。

(3) 该组第 1 个、第 2 个作用时间杀灭效果不合格, 第 3 个作用时间杀灭效果合格, 判为该组所试因素有中度影响。

(4) 该组第 1 个~3 个作用时间杀灭效果均不合格, 判为该组所试因素有重度影响。

2.2 消毒剂模拟现场和现场消毒效果鉴定试验

2.2.1 消毒剂对食(饮)具的模拟现场消毒效果鉴定试验

2.2.1.1 目的

用于验证消毒剂对食(饮)具上细菌和病毒的消毒效果。

2.2.1.2 实验器材

(1) 实验菌株 大肠杆菌(8099), 对尚需用于杀灭其他特定微生物者, 可用该微生物进行试验。菌悬液制备按 2.1.2 规定的方法和要求进行。

(2) 中和剂溶液 经中和剂鉴定试验合格

(3) 稀释液 见附录 A

(4) 培养基 胰蛋白胨大豆琼脂培养基

(5) 有机干扰物 对用于清洗后食(饮)具消毒的消毒剂使用 0.3% 牛血清白蛋白, 对用于未清洗的食(饮)具直接消毒的消毒剂使用 3.0% 牛血清白蛋白。

(6) 无菌棉拭

(7) 规格板(用可弯曲的软性材料制备, 中央留一大小为 5.00cm×5.00cm 空格作为采样部位)

(8) 试验用食(饮)具样本 瓷碗(盘)或竹(木)筷前端(周长 2.0cm, 长度 12.5cm, 总面积为 25cm²)

(9) 标准硬水 见附录 A

2.2.1.3 操作程序

(1) 按产品使用说明书的浓度和作用时间进行大肠杆菌杀灭试验。

(2) 用无菌规格板在试验用碗(盘)内表面标出染菌区。无菌操作吸取菌悬液, 分别滴加于染菌区, 每区 0.1mL, 涂匀, 置 37℃ 恒温培养箱至干燥。对筷子取前端 12.5cm 长度, 蘸染预定量菌液后, 置 37℃ 或室温干燥。

(3) 试验组 将 10 个染菌碗(盘)或 10 个筷子样本, 依次定时放入含消毒剂溶液的容器中, 使其完全浸没。作用至规定时间, 轻轻取出碗(盘), 弃掉消毒剂, 分别向碗(盘)内的染菌区加入 5mL 中和剂溶液, 用 L 棒刮洗染菌区, 作用 10min, 分别取 1.0mL 样液, 以倾注法接种 2 块平皿。轻轻取出筷子样本, 放入含 20mL~25mL 中和剂溶液的试管中, 电动混匀器振荡 20s 或振打 200 次, 作用 10min, 分别取 1.0mL 样液, 以倾注法接种 2 块平皿。将接种好的平板放 37℃ 恒温培养箱培养 48h, 计数菌落数, 作为试验组。

(4) 阳性对照组 直接向 2 个染菌碗(盘)的染菌区加入 5mL 中和剂, 或直接将 2 支染菌筷子样本浸没于含 20mL 中和剂溶液的试管中。随试验组采样、检测, 检测结果作为消毒前菌量, 菌量应在 1×10^6 cfu/样本~ 5×10^6 cfu/样本。

(5) 阴性对照组 将本次试验未用完的中和剂、稀释液、培养基等分别设阴性对照。

(6) 以上试验重复 3 次。

(7) 按下式计算每件食(饮)具上的生长菌落数。

每件食(饮)具样本生长菌落数(cfu/样本)=平板上平均菌落数×检测时样本稀释倍数

(8) 按 2.1.7.4 (8) 计算每次试验的杀灭对数值和平均杀灭对数值。

2.2.1.4 评价规定

阴性对照组均无菌生长，阳性对照组菌量为 1×10^6 cfu/样本 $\sim 5 \times 10^6$ cfu/样本，以每种食（饮）具 30 个样本中大肠杆菌杀灭对数值均 ≥ 3.00 ，所用消毒剂的浓度和作用时间为消毒合格剂量。

2.2.2 消毒剂对医疗器械模拟现场消毒效果鉴定试验

2.2.2.1 目的

用于验证消毒剂对人工污染芽孢、分枝杆菌和白色念珠菌的医疗器械的消毒效果。

2.2.2.2 实验器材

(1) 实验菌株 枯草杆菌黑色变种(ATCC 9372)芽孢(下简称芽孢,其悬液的制备按 2.1.2.3

(2) 规定进行); 龟分枝杆菌脓肿亚种(ATCC 19977); 白色念珠菌(ATCC 10231)

(2) 中和剂溶液 经中和剂鉴定试验合格

(3) 培养基 胰蛋白胨大豆琼脂培养基,分枝杆菌干燥培养基,沙堡琼脂培养基 见附录 A

(4) 有机干扰物 0.3%牛血清白蛋白

(5) 载体 医用止血钳齿端部分,按 2.1.2.4(2)进行脱脂处理,灭菌后备用。

(7) 塑料试管(1.8cm \times 18cm)

(8) 标准硬水 见附录 A

2.2.2.3 操作程序

(1) 以载体浸泡定量杀菌试验进行消毒效果的测定。按产品使用说明书中的消毒剂作用浓度和作用时间进行试验。

(2) 染菌时,将止血钳样本齿面朝上,用 0.1mL 无菌吸管或移液器将 0.02mL 菌悬液滴染齿部,涂匀,置 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱内至干燥。

(3) 取无菌平皿,按每个载体 10mL 用量加入消毒剂,置 20 $^{\circ}$ C \pm 1 $^{\circ}$ C 水浴中保温 5min。

(4) 将 10 个染菌样本浸没于消毒液中进行消毒处理。

(5) 作用至规定时间,取出样本,分别移入含 10mL 中和剂溶液的塑料试管内。在手掌上振打 200 次,分别取样液 1.0mL,以倾注法接种 2 个无菌平皿,放 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱培养至规定时间,计数菌落数,作为试验组。

(6) 每次试验,以标准硬水代替消毒液,将 2 个染菌样本以同样条件处理,然后与试验组样本同法进行活菌培养计数,作为阳性对照组,其菌量应在 1×10^6 cfu/样本 $\sim 5 \times 10^6$ cfu/样本。

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

(8) 以上试验重复 3 次。

2.2.2.4 评价规定

阴性对照组均无菌生长,阳性对照组菌量达到规定要求,30 个试验组样本的微生物杀灭对数值均 ≥ 3.00 ,判定为消毒合格。

2.2.3 消毒剂对医疗器械模拟现场灭菌效果鉴定试验

2.2.3.1 目的

用于验证消毒剂对人工污染芽孢的医疗器械的灭菌效果。

2.2.3.2 实验器材

(1) 实验菌株 枯草杆菌黑色变种 (ATCC 9372) 芽孢 (其悬液的制备按 2.1.2.3 (2) 规定进行)

(2) 稀释液 见附录 A

(3) 中和剂溶液 经中和剂鉴定试验合格

(4) 培养基 胰蛋白胨大豆琼脂培养基, 见附录 A

(5) 含中和剂的胰蛋白胨大豆肉汤培养基

(6) 标准硬水 见附录 A

(7) 载体 医用止血钳齿端部分, 按 2.1.2.4 (2) 规定方法进行脱脂处理。灭菌后备用

(8) 塑料试管 (1.8cm×18cm)

2.2.3.3 操作程序

(1) 按产品使用说明书中的最低使用浓度与 0.5 倍最短作用时间。

(2) 染菌样本按 2.2.2.3 (2) 进行制备。

(3) 取无菌平皿, 按每个载体 10mL 用量加入消毒剂, 置 20℃±1℃ 水浴中保温 5min。

(4) 将 20 个染菌样本浸没于消毒剂中作用至规定时间后取出, 分别放于含 10mL 中和剂肉汤的试管内, 置 37℃ 恒温培养箱中培养 7d, 观察最终结果, 作为试验组。

(5) 以标准硬水代替消毒剂, 将 2 个染菌载体依上同样条件处理, 与实验组样本同法接种、培养、观察结果, 作为阳性对照组。

(6) 另取 2 个染菌样本, 分别放入含 10mL 中和剂溶液塑料试管内。在手掌上振打 200 次, 取样液置 37℃ 恒温培养箱中培养 72h, 计数菌落数, 作为菌数对照组。其菌量应为 1×10^6 cfu/样本~ 5×10^6 cfu/样本。

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

(8) 试验重复 3 次。

2.2.3.4 评价规定

阳性对照组菌量达到规定要求, 阴性对照组均无菌生长, 试验组 60 个样本均无菌生长, 判定为灭菌合格。有菌生长者, 肉汤培养基呈轻度浑浊, 有皱褶状菌膜, 轻轻振摇可见絮状沉淀, 无菌生长者肉汤清澈透明。

2.2.3.5 注意事项

本试验应严格无菌操作, 否则灭菌试验可能失败。

2.2.4 医疗器械消毒剂连续使用稳定性鉴定试验

2.2.4.1 目的

用于验证消毒剂在连续使用有效期内对医疗器械的消毒、灭菌效果。

2.2.4.2 实验器材

- (1) 枯草杆菌黑色变种 (ATCC 9372) 芽孢 (悬液按 2.1.2.3 (2) 进行制备)
- (2) 中和剂溶液 经中和剂鉴定合格者
- (3) 含中和剂的胰蛋白胍大豆肉汤培养基 见附录 A
- (4) 胰蛋白胍大豆肉汤培养基 见附录 A
- (5) 载体 医用止血钳齿端部分, 按 2.1.2.4 (2) 方法进行脱脂处理, 灭菌后备用
- (6) 医疗器械 医用剪刀、止血钳、镊子等小型器械。
- (7) 无菌带盖搪瓷盘
- (8) 标准硬水 见附录 A

2.2.4.3 操作程序

- (1) 按 2.2.2.3 (2) 制备染菌样本。
- (2) 试验时, 配制双份 2000mL 消毒液, 分别盛装于 2 个无菌带盖搪瓷盘中。各放入清洁的试验用医疗器械, 使达满载要求。每次试验同时对 2 个搪瓷盘中的消毒液进行检测。
- (3) 搪瓷盘内放入器械后, 每日将器械取出, 用清水洗涤, 沥干, 再回放入消毒液中。连续每日将器械取出、洗涤、沥干、再放入, 直至试验结束。
- (4) 放入器械至使用说明书上连续使用的最长时间, 吸取消毒液样本。对于医疗器械消毒的消毒剂按消毒剂对医疗器械的消毒模拟现场试验 (2.2.2) 的方法, 每盘用 5 个染菌样本进行试验; 对于医疗器械灭菌的消毒剂按消毒剂对医疗器械的模拟现场灭菌试验 (2.2.3) 的方法, 每盘用 10 个染菌样本进行试验。测定该消毒液对芽孢的杀灭效果。
- (5) 试验重复 3 次。

2.2.4.4 评价规定

对于医疗器械消毒的消毒剂按消毒剂对医疗器械的消毒模拟现场试验 (2.2.2) 的评价规定进行; 对于医疗器械灭菌的消毒剂按消毒剂对医疗器械的模拟现场灭菌试验 (2.2.3) 的评价规定进行。试验均达到合格要求时判定为连续使用稳定性试验合格。

2.2.4.5 注意事项

- (1) 盛装消毒液的搪瓷盘, 在操作完毕后应加盖, 以免有杂菌污染。
- (2) 本试验应严格无菌操作, 否则灭菌试验可能失败。

2.2.5 消毒剂对手模拟现场消毒效果鉴定试验

2.2.5.1 目的

用于验证消毒剂对人工污染于手表面细菌的消毒效果。

2.2.5.2 实验器材

- (1) 实验菌株 大肠杆菌 8099 或 NCTC 10538, 可增加特定细菌进行试验。菌悬液按 2.1.2.3 制备

- (2) 培养基 胰蛋白胨大豆琼脂培养基 (TSA) 见附录 A
胰蛋白胨大豆肉汤培养基 (TSB) 见附录 A
- (3) 中和剂溶液 经中和剂鉴定合格者
- (4) 普通洗手液
- (5) 参考样品 正丙醇 60% (V/V) 与异丙醇 60% (V/V)
- (6) 标准硬水 见附录 A
- (7) 稀释液 见附录 A
- (8) 吸管、试管、平皿
- (9) 电动混匀器

2.2.5.3 试验步骤

(1) 菌悬液的制备 取 2 支在 TSB 中培养 18h~24h 的大肠杆菌培养物分别接种于 1L TSB 大三角烧瓶中, 在 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 18h~24h, 用 TSB 将其稀释为 $2 \times 10^8 \text{cfu/mL} \sim 2 \times 10^9 \text{cfu/mL}$ 菌悬液。

(2) 将 12 名~15 名志愿者随机分为两组, 第一组使用参考样品, 第二组使用试验样品。

(3) 使用普通洗手液洗手 1min 去除手表面的自然菌, 用无菌纸、巾将手擦干。

(4) 将 $2 \times 10^8 \text{cfu/mL} \sim 2 \times 10^9 \text{cfu/mL}$ 大肠杆菌的菌悬液放入无菌容器中。

(5) 将手掌中间到指尖部位浸入菌悬液中, 手指分开, 停留 5s 后在空气中干燥 3min。

(6) 干燥后立即将拇指与其它手指尖在含 10mL TSB 的平皿中搓洗 1min, 做适当稀释后, 分别取样液 1.0mL 以倾注法接种 2 个无菌平皿, 置 37°C 恒温培养箱培养 48h, 计数菌落数, 作为试验前菌数。

(7) 不再重复污染手, 并作为试验样品组, 立即进行消毒处理。

(8) 对试验样品组, 按说明书规定的用量、作用时间和使用频率以标准的洗手方法 (如图 2-1) 搓擦 30s~60s (卫生手消毒) 或最长 5min (外科手消毒)。

(9) 参考样品组, 对于卫生手消毒, 取 60%异丙醇 3mL 于手心中, 按标准的洗手方法用力搓擦 30s, 以确保手的所有部位均匀接触异丙醇。重复使用异丙醇按上述方法搓擦使总的搓擦时间为 60s。对于外科手消毒, 使用 60%正丙醇 3mL, 按标准的洗手方法用力搓擦, 当接近干燥时, 再加 3mL 正丙醇搓擦。以保持作用 5min。

(10) 以自来水冲洗 5s, 抖掉手上残留的水。

(11) 立刻将拇指与其它手指尖在盛有 10mL 含中和剂的 TSB 的平皿中搓洗 1min, 做适当稀释后, 分别取样液 1.0mL 以倾注法接种 2 个无菌平皿, 置 37°C 恒温培养箱培养 48h, 计数菌落数, 作为试验后菌数。



图 2-1 标准的洗手方法

(12) 在试验当日，第一组与第二组样品对换，重复上述试验。

(13) 分别计算参考样品组和试验样品组菌数减少的对数值。

2.2.5.4 评价规定

(1) 试验样品组减少的对数值大于或等于参考样品组减少的对数值，判定为消毒合格。

(2) 试验样品组减少的对数值小于参考样品组减少的对数值，但无统计学意义，判定为消毒合格。

(3) 试验样品组减少的对数值小于参考样品组减少的对数值，且有统计学意义，判定为消毒不合格。

2.2.5.5 注意事项

(1) 试验样品和参考样品必须在同一志愿者配对进行试验，并在同一天、相同环境和同样试验条件下进行。

(2) 志愿者应年满 18 岁，身体健康，手部皮肤应无破损、无皮肤病，手指甲短而干净。

(3) 所有志愿者都应使用同一批菌悬液染菌，菌悬液最多可使用 3 小时。

(4) 对于免洗手类消毒液，试验组应根据说明书介绍的方法涂擦，作用时间一般到消毒液干燥后停止。

2.2.6 消毒剂对手现场消毒效果鉴定试验

2.2.6.1 目的

用于验证消毒剂对手表面细菌的消毒效果。

2.2.6.2 实验器材

- (1) 中和剂溶液 经中和剂鉴定合格
- (2) 培养基 胰蛋白胨大豆琼脂培养基, 见附录 A
- (3) 稀释液 见附录 A
- (4) 标准硬水 见附录 A
- (5) 无菌棉拭
- (6) 电动混匀器
- (7) 吸管、试管、平皿

2.2.6.3 试验步骤

- (1) 随机选定志愿者, 试验不少于 30 人次。
- (2) 消毒前, 在志愿者双手相互充分搓擦后, 让志愿者左手指并拢, 用无菌棉拭在含 10mL 稀释液试管中浸湿, 于管壁上挤干后, 在五指屈面指尖至指根, 往返涂擦 2 遍, 每涂擦一遍, 将棉拭转动一次。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, 作为阳性对照组样本。
- (3) 按消毒剂使用说明书的方法和使用浓度对右手进行消毒, 对卫生手的消毒一般设定作用时间为最长 1min, 最短 30s; 对外科洗手后的泡手一般设定作用时间为 3min, 最长 5min。消毒后用中和剂溶液代替稀释液, 用与阳性对照组同样的方法对志愿者右手上残留的自然菌采样一次, 作为试验组样本。
- (4) 将阳性对照组和试验组样本, 分别取 1.0mL, 以倾注法接种平皿, 每个样本接种 2 个平皿, 置 37℃ 恒温培养箱中培养 48h, 每日观察并记录最终结果。
- (5) 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。
- (6) 计算杀灭对数值

2.2.6.4 评价规定

阴性对照组应无菌生长, 30 人次手上自然菌的平均杀灭对数值 ≥ 1.00 , 判定为消毒合格。

2.2.6.5 注意事项

- (1) 本试验需有志愿者参与, 重复人次较多, 一人可多次受试, 但不得在一批试验或同日反复参与, 否则可影响结果的准确性。
- (2) 志愿者接受试验时, 不得触摸任何表面, 以免使手的试验部位沾染杂菌。
- (3) 棉拭涂抹采样, 较难标准化, 为此应尽量使棉拭的大小, 用力的均匀, 吸取采样液的数量, 以及洗菌时敲打的轻重等先后保持一致。
- (4) 擦拭消毒时, 要依据说明书适量均匀涂抹。
- (5) 现场样本须及时检测, 常温运送、存放不得超过 2h, 4℃ 冰箱存放不得超过 4h。
- (6) 对于免洗手类消毒液, 试验组应根据说明书介绍的方法涂擦, 作用时间一般到消毒液

干燥后停止。

2.2.7 消毒剂对皮肤模拟现场消毒效果鉴定试验

2.2.7.1 目的

用于验证消毒剂对人工污染于皮肤表面细菌的消毒效果。

2.2.7.2 实验器材

- (1) 实验菌株 金黄色葡萄球菌 ATCC 27217, 可增加特定细菌进行试验。
- (2) 培养基 胰蛋白胨大豆琼脂培养基 (TSA), 见附录 A
- (3) 稀释液 见附录 A
- (4) 中和剂溶液 经中和剂经鉴定合格
- (5) 普通洗手液
- (6) 金属筒 (直径 2.2cm、高度 3cm)
- (7) 尼龙刮菌棒
- (8) 吸管、试管、平皿
- (9) 电动混匀器
- (10) 一次性接种环
- (11) 外用皮肤消炎药膏
- (12) 皮肤消毒剂
- (13) 75% 酒精
- (14) 标准硬水 见附录 A
- (15) 恒温培养箱

2.2.7.3 试验步骤

- (1) 菌悬液的制备按 2.1.2.3 进行。
- (2) 用普通洗手液清洗志愿者前臂内侧 1min, 用自来水冲净残留洗手液, 用无菌纸、巾擦干, 以去除前臂内侧表面自然菌。
- (3) 在志愿者的双前臂内侧中段, 用带有印墨直径为 3.00cm 的玻璃筒扣在皮肤上, 划分出试验区。
- (4) 使用加样器取 10 μ L 菌悬液, 滴加于前臂试验区 (使回收菌落数为 2×10^6 cfu/试验区 $\sim 1 \times 10^7$ cfu/试验区), 用一次性接种环把菌悬液涂成圆形, 其边缘应与印墨有 4mm \sim 5mm 的距离, 使其在空气中自然干燥。
- (5) 根据消毒剂使用说明书规定的方法对右前臂内侧进行消毒, 一般设定作用时间为 1min \sim 3min, 最长 5min。
- (6) 作用至规定时间, 用中和剂溶液对前臂上涂菌的区域进行取样。采样时, 将金属筒放置于试验区中间部位, 罩住染菌区, 不要接触到盖有印墨的边缘。将 1.0mL 中和剂溶液吸移至金属筒内, 用尼龙刮菌棒刮洗金属筒罩住区域内的皮肤 60s, 将筒内液体吸移至试管内, 再加

1.0mL 中和剂溶液对该区域内的皮肤进行第二次刮洗 30s, 将第二次擦洗的液体, 注入含第一次刮洗液体的试管中, 作为试验组样本。

(7) 以标准硬水代替消毒剂对左前臂做同样处理, 用稀释液做适当稀释, 取适宜稀释度作为对照组样本。

(8) 将阳性对照组和实验组样本, 分别取 1.0mL, 以倾注法接种平皿, 每个样本接种 2 个平皿, 置 37℃ 恒温培养箱中培养 48h, 观察最终结果。

(9) 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。

(10) 计算杀灭对数值。

(11) 试验不得少于 15 人次。

2.2.7.4 评价规定

阴性对照组无菌生长, 阳性对照组回收菌落数为 2×10^6 cfu/试验区 $\sim 1 \times 10^7$ cfu/试验区, 且对每一人次皮肤表面人工污染的金黄色葡萄球菌的杀灭对数值均 ≥ 3.00 , 判定为消毒合格。

2.2.7.5 注意事项

(1) 志愿者录用标准

- 1) 年龄介于 18 岁至 65 岁;
- 2) 志愿者身体健康;
- 3) 前臂皮肤完好无损且没有皮肤病及其它皮肤问题。

(2) 排除志愿者的标准, 如果志愿者有下列情况之一, 不能被录用参加试验

- 1) 孕妇;
- 2) 诊断患有糖尿病、各种传染病、器官移植者。

(3) 试验采样结束后, 先用 75% 的酒精对志愿者前臂进行消毒, 然后用皮肤消毒剂对双前臂进行消毒处理, 处理后清水冲洗, 擦干, 再涂少量的抗生素软膏于试验区, 以防皮肤感染。

(4) 在试验完成后的 48h~72h 内, 志愿者如发现前臂上有小脓疱、水疱, 隆起的红色痒疱, 应及时通知检验单位。

2.2.8 消毒剂对皮肤现场消毒效果鉴定试验

2.2.8.1 目的

用于验证消毒剂对皮肤表面细菌的消毒效果。

2.2.8.2 实验器材

(1) 中和剂溶液 经中和剂经鉴定合格

(2) 培养基 胰蛋白胨大豆琼脂培养基 (TSA)

(3) 稀释液 见附录 A

(4) 标准硬水 见附录 A

(5) 规格板 (用牛皮纸制备, 中央留一 $3.00\text{cm} \times 10.0\text{cm}$ 的空格作为采样部位) 121°C 15min 灭菌备用

- (6) 无菌棉拭
- (7) 电动混匀器
- (8) 吸管、试管、平皿

2.2.8.3 试验步骤

(1) 随机选定志愿者，试验不少于 30 人次。

(2) 让志愿者将左右前臂内侧中段相互充分对搓，将规格板放于志愿者左前臂内侧中段表面，用无菌棉拭在含 10mL 稀释液试管中浸湿，于管壁上挤干后，在规格板框定的区域内，横向往返涂擦 3 遍，纵向往返涂擦 10 遍，每涂擦一遍，将棉拭转动一次。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，电动混匀器振荡混匀 20s，或在手掌振打 200 次，用稀释液作适当稀释，取适宜稀释度作为阳性对照组样本。

(3) 按消毒剂使用说明书的方法对右前臂内侧进行消毒，一般设定作用时间为 1min~3min，最长不超过 5min。作用至设定时间用中和剂溶液代替稀释液，与阳性对照组同样的方法对志愿者右前臂内侧表面残留的自然菌采样一次，作为试验组样本。

(4) 将阳性对照组和试验组样本，分别取 1.0mL，以倾注法接种平皿，每个样本接种 2 个平皿，置 37℃ 恒温培养箱中培养 48h，观察最终结果。

(5) 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。

(6) 以手为单位计算杀灭对数值。

2.2.8.4 评价规定

阴性对照组无菌生长，阳性对照组有较多细菌生长，30 人次皮肤表面自然菌的平均杀灭对数值 ≥ 1.00 ，判定为消毒合格。

2.2.8.5 注意事项

(1) 本试验需有志愿者参与，重复人次较多，一人可多次受试，但不得在一批试验或同日反复参与，否则可影响结果的准确性。

(2) 志愿者试验时，不得触摸任何表面，以免使试验部位沾染杂菌。

(3) 棉拭涂抹采样，较难标准化，为此应尽量使棉拭的大小，用力的均匀，吸取采样液的数量，以及洗菌时敲打的轻重等先后保持一致。

(4) 擦拭消毒时，要依据说明书适量均匀涂抹。

(5) 现场样本须及时检测，常温运送、存放不得超过 2h，4℃ 冰箱存放不得超过 4h。

2.2.9 消毒剂对其他物体表面模拟现场消毒效果鉴定试验

2.2.9.1 目的

用于验证消毒剂对人工污染于一般物体（指除本规范已有专门规定如食（饮）具、医疗器械等以外的物体）表面细菌的消毒效果。

2.2.9.2 实验器材

(1) 实验菌株 大肠杆菌（8099）可增加特定细菌进行试验。菌悬液按 2.1.2 制备

- (2) 中和剂溶液 经中和剂鉴定试验合格
- (3) 稀释液 见附录 A
- (4) 培养基 胰蛋白胨大豆琼脂培养基, 见附录 A
- (5) 标准硬水 见附录 A
- (6) 规格板 (用不锈钢材料制备, 中央留一 $5.00\text{cm} \times 5.00\text{cm}$ 的空格作为采样部位)
- (7) 无菌棉拭
- (8) 电动混匀器

2.2.9.3 试验步骤

(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。每次试验, 各类物品表面测试 30 个样本。

(2) 染菌时, 选物品较平的部位, 于规格板中央空格, 用无菌棉拭沾以菌悬液均匀涂抹。待自然干燥后进行试验。每次试验设 2 个区块作为阳性对照区, 10 个区块为试验区。

(3) 将无菌棉拭在含 10mL 稀释液试管中浸湿, 于管壁上挤干, 对对照组区块涂抹采样, 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, 电动混匀器振荡 20s, 或在手掌上振打 200 次, 用稀释液做适当稀释后, 作为阳性对照组样本。

(4) 按说明书中的方法和使用剂量对物体表面进行消毒。将无菌棉拭在含 10mL 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, 分别对消毒区块进行涂抹采样, 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, 电动混匀器振荡 20s, 或在手掌上振打 200 次, 作为试验组样本。

(5) 将阳性对照组和试验组样本, 分别取 1.0mL, 以倾注法接种平皿, 每个样本接种 2 个平皿, 放 37°C 恒温培养箱中培养 48h, 观察最终结果。

(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。

(7) 试验重复 3 次。

(8) 计算平均杀灭对数值。

2.2.9.4 评价规定

阴性对照组无菌生长, 阳性对照组检测菌量为 $2.5 \times 10^7 \text{cfu}/\text{样本} \sim 1.25 \times 10^8 \text{cfu}/\text{样本}$, 30 个样本的平均杀灭对数值 ≥ 3.00 , 判定为消毒合格。

2.2.9.5 注意事项

(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。

(2) 棉拭涂抹采样较难标准化, 为此应尽量使棉拭的大小, 用力的均匀, 吸取采样液的量, 洗菌时敲打的轻重等等先后一致。

(3) 现场样本须及时检测。室温存放不得超过 2h, 4°C 冰箱存放不得超过 4h。

2.2.10 消毒剂对其他物体表面现场消毒效果鉴定试验

2.2.10.1 目的

用于验证消毒剂对一般物体（指除本规范已有专门规定如食（饮）具、医疗器械等以外的物体）表面自然菌的消毒效果。

2.2.10.2 实验器材

- (1) 中和剂溶液 经中和剂鉴定试验合格
- (2) 稀释液 见附录 A
- (3) 培养基 胰蛋白胨大豆琼脂培养基 见附录 A
- (4) 规格板（用不锈钢材料制备，中央留一 5.00cm×5.00cm 的空格作为采样部位）
- (5) 无菌棉拭
- (6) 电动混匀器

2.2.10.3 操作程序

在使用现场，按说明书介绍的用量、作用时间、使用频率和消毒方法消毒物体表面，检测样本数应 ≥ 30 份。

(1) 在物体表面（桌面、台面、门等）用规格板标定 2 块相邻的面积各为 25cm² 的区块，一供消毒前采样，一供消毒后采样。

(2) 将无菌棉拭在含 10mL 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，电动混匀器振荡 20s 或在手掌振打 200 次，做适当稀释后，作为阳性对照组样本。

(3) 按说明书中的方法和剂量对物体表面进行试验。将无菌棉拭在含 10mL 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，电动混匀器振荡 20s 或在手掌振打 200 次，作为试验组样本。

(4) 将阳性对照组和试验组样本，分别取 1.0mL，以琼脂倾注法接种平皿，每个样本接种 2 个平皿，置 37℃ 恒温培养箱中培养 48h，每日观察并记录最终结果。

(5) 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。

(6) 计算杀灭对数值。

2.2.10.4 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 ≥ 1.00 ，判定为消毒合格。

2.2.10.5 注意事项

(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。

(2) 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。

(3) 棉拭涂抹采样较难标准化，为此应尽量使棉拭的大小，用力的均匀，吸取采样液的量，

洗菌时敲打的轻重等等先后一致。

(4) 现场样本须及时检测。室温存放不得超过 2h，4℃冰箱存放不得超过 4h。

2.2.11 消毒剂对织物表面模拟现场消毒效果鉴定试验

2.2.11.1 目的

用于验证消毒剂对人工污染于织物上细菌的消毒效果。

2.2.11.2 实验器材

(1) 实验菌株 金黄色葡萄球菌 ATCC 6538。可增加特定细菌进行试验，菌悬液按 2.1.2 制备

(2) 中和剂溶液 经中和剂鉴定试验合格

(3) 稀释液 见附录 A

(4) 培养基 胰蛋白胨大豆琼脂培养基

(5) 载体 布片，规格 10mm×10mm

(6) 标准硬水 见附录 A

(7) 小布袋 规格 50mm×50mm

(8) 白大衣

(9) 电动混匀器

2.2.11.3 试验步骤

(1) 菌片的制备见 2.1.2.4。

(2) 将菌片放入小布袋中，每袋放入 1 个菌片，分别将 10 个小布袋放入 5 件白大衣的左右口袋内。

(3) 按说明书中的使用浓度将白大衣浸没于消毒剂溶液中，浸泡至设定的消毒作用时间，以无菌操作方式用镊子将菌片放入含 5mL 中和剂溶液的试管内，电动混匀器振荡 20s 或在手掌振打 80 次，作为试验组样本。

(4) 将 2 个菌片放入一小布袋中，浸没于标准硬水至与试验组同样的时间，以无菌操作方式用镊子将染菌布片放入含 5mL 中和剂溶液的试管内，在电动混匀器上振荡 20s 或在手掌振上打 80 次，作为阳性对照组样本。

(5) 将阳性对照组和试验组样本分别取 1.0mL，以倾注法接种平皿，每个样本接种 2 个平皿，置 37℃恒温培养箱中培养 48h，观察最终结果。

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

(7) 试验重复 3 次。

(8) 计算杀灭对数值。

2.2.11.4 评价规定

阴性对照组无菌生长，阳性对照组回收菌落数为 1×10^6 cfu/片~ 5×10^6 cfu/片，30 个样本的杀灭对数值均 ≥ 3.00 ，判定为消毒合格。

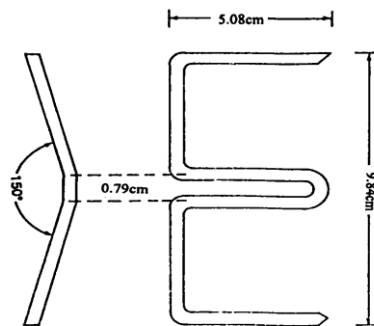
2.2.12 消毒洗衣粉（剂）对织物表面模拟现场消毒效果鉴定试验

2.2.12.1 目的

用于鉴定消毒洗衣粉（剂）对人工污染于织物上细菌的消毒效果。

2.2.12.2 试验器材

- (1) 实验菌株 金黄色葡萄球菌 ATCC 6538, 铜绿假单胞菌ATCC 15442
- (2) 培养基 营养琼脂A（琼脂含量为1.5%）
营养琼脂B 在营养琼脂A中另加入1.5% 的琼脂
胰蛋白胨大豆肉汤培养基（TSB）
胰蛋白胨大豆琼脂培养基（TSA）
- (3) 牛血清白蛋白（过滤除菌）
- (4) 烷基酚聚氧乙烯醚（Tergitol）
- (5) 碳酸钠
- (6) 标准硬水 见附录A
- (7) 非离子浸湿剂 见测试棉布制备部分
- (8) 冲洗溶液
- (9) 中和剂 经中和剂鉴定合格
- (10) 吐温80（过滤除菌）
- (11) 灭菌去离子水或蒸馏水
- (12) 不锈钢转轴（由一条直径0.16cm 不锈钢丝制成，如图2-2）



俯视图

侧面图

图 2-2 缠绕测试布条的不锈钢转轴

(13) 有金属螺盖的玻璃罐（容积为470 mL，可高压灭菌，并可放入转轴的广口罐），将罐口覆盖牛皮纸，加盖，于121℃灭菌25min 备用。

(14) 转动速度为45r/min~60r/min的滚动摇床

(15) 可调恒温水浴箱

(16) 吸管 (1mL, 5mL, 和10mL)

(17) 培养皿

(18) 铺有滤纸的玻璃培养皿。

(19) 菌种保存管

(20) 细菌培养箱

(21) 涡流振荡器

(22) 细菌比浊仪

(23) 棉布 32织纱/cm×32织纱/cm平织棉布

(24) 别针、镊子、无菌手套、3mm~5mm玻璃珠、秒表、载体布片 2.5cm×3.75cm, 见测试棉布准备

(25) 磷酸盐缓冲液 (PBS 0.03mol/L pH7.2)

2.2.12.3 实验准备

(1) 测试棉布的制备

1) 非离子浸润剂的制备: 取 5g 烷基酚聚氧乙烯醚, 5g 碳酸钠加入到 1L 去离子水中。

2) 洗涤液的制备: 1.5g 非离子浸润剂, 1.5g 碳酸钠, 加入到 3L 去离子水中。

将大约 300g 测试棉布加入 3L 洗涤溶液。加热煮沸 1h。取出棉布在煮沸的去离子水中清洗 5min 后放入凉去离子水中 5min, 以去除残留的浸润剂。然后将棉布晾干。

(2) 测试棉布和转动支架的准备: 取处理过的棉布, 剪成 5cm 宽, 重量为 15g ±1g 的布条, 将其一端插入固定在测试转动支架的水平方向的外边, 然后在三条水平支架间以足够的张力缠绕 12 个整圈, 将布条的另一端用不锈钢别针固定在前一圈布条上。最后以 121℃ 压力蒸汽灭菌 15min, 备用。

(3) 细菌悬液的制备: 取 0.5mL 营养肉汤溶解的冻干的菌种, 然后吸取 0.1mL 接种于含 10mL 的营养肉汤的试管, 置 35℃±2℃ 培养 24h。然后, 振荡混合均匀。用 10μL 接种环在营养琼脂平板上划线, 置 35℃±2℃ 培养 24h。然后, 从平板上挑取单个菌落种入菌种保藏管中, 上下摇动 10 次, 吸弃多余液体, 置 -85℃ 冰箱保存。试验前, 从菌种保藏管中取出一粒带菌小粒珠, 放入营养琼脂斜面, 晃动斜面。将斜面至 35℃ 培养 24 h。每天转种 1 次, 连续传三代。第四天, 用 5mL PBS 洗脱斜面上的菌苔, 取 0.5mL 加入到含 9.5mL PBS 的试管中, 混匀, 取 1mL~2mL 加入含有 20mL 营养琼脂 B 的细胞培养瓶中, 晃动培养瓶使菌液覆盖整个琼脂表面。吸

弃多余菌液，然后将培养瓶倒置平放在 35℃ 培养箱中，培养 24h。用 5mL PBS 和 3g 灭菌玻璃珠洗脱细胞瓶中的菌体，用 PBS 调整浓度至 1×10^8 cfu /mL ~ 5×10^8 cfu /mL，然后加入等量的 3.0% 牛血清白蛋白。

(4) 染菌载体的制备：每片载体接种 20 μ L 菌悬液，放回培养皿中，加盖，置 35℃ \pm 2℃ 培养箱中干燥 20min。

(5) 测试样品的制备：至少在实验开始前 20min，将盛有 265mL 硬水的玻璃罐在水浴箱中恒温至测试温度 (25℃ \pm 1℃)，加入被测试样品混合溶解。

2.2.12.4 试验步骤

(1) 将两片染菌载体放入转动支架的第 6 和 7 层布条之间，将第 3 片放入第 7 和 8 层布条之间。

(2) 以无菌操作方式将转动单元 (支架、布条和染菌载体) 放入含有测试产品的玻璃罐中，加盖。

(3) 玻璃罐固定在摇床上，滚动旋转洗涤 20min，取下玻璃罐。

(4) 以无菌操作方式，取出转动单元，取出 3 片染菌载体，放入到含有 30mL 中和剂的试管中，在振荡器中混合 10s，然后振打 80 次，用 PBS 做 10 倍系列稀释，并选择适宜稀释度样液接种 TSA 平板。每个稀释度接种 2 个平板。

(5) 对照组除用 0.5% (V/V) 的吐温 80 替代测试产品外，其它实验条件和步骤均与试验组相同。

(6) 将试验组、对照组和菌数对照组平板倒置于 35℃ \pm 2℃ 培养箱中培养 48h \pm 4h，计数菌落数。

(7) 结果计算

试验重复 3 次。记录并计算测试样品的细菌总数，求其平均值。

2.2.12.5 评价规定

按 2.1.7.4 (8) 方法计算杀灭对数值，杀灭对数值 ≥ 3.00 ，判定为消毒合格。

2.2.12.6 注意事项

(1) 将旋转单元放入玻璃罐后应将盖子盖紧，以防转动时漏水。

(2) 试验时应严格无菌操作，以防止杂菌污染。

2.2.13 消毒剂对瓜果蔬菜模拟现场消毒效果鉴定试验

2.2.13.1 目的

用于验证消毒剂对瓜果蔬菜上细菌的消毒效果。

2.2.13.2 实验器材

- (1) 实验菌株 大肠杆菌 (8099), 菌悬液按 2.1.2 制备
- (2) 标准硬水 见附录 A
- (3) 中和剂溶液 经中和剂鉴定合格
- (4) 稀释液 见附录 A
- (5) 培养基 胰蛋白胨大豆琼脂培养基
- (6) 无菌棉拭
- (7) 灭菌剪刀
- (8) 试验用果蔬 首选粗细均匀、新鲜、普通品种黄瓜 (黄瓜周长约 10.0cm), 试验前标出染菌区, 即取中间段, 每段长度约 2.5cm, 使染菌区表面积为 25.0cm^2
- (9) 电动混匀器

2.2.13.3 操作程序

- (1) 按产品使用说明书的消毒方法、作用浓度和作用时间, 进行杀灭试验。
- (2) 用流动水充分清洗样品, 去除黄瓜表面污渍, 然后用无菌纱布擦干。
- (3) 用棉签蘸取菌悬液均匀涂布在标出的染菌区, 置 37°C 恒温培养箱或室温至干燥。样本的回收菌量为 $1\times 10^6\text{cfu}/\text{样本}\sim 5\times 10^6\text{cfu}/\text{样本}$ 。
- (4) 按照每件试验样本 400mL 配制试验浓度消毒液。将 10 件试验样本依次定时浸没于消毒液中, 浸泡至设定时间取出样本, 将无菌棉拭于含 10mL 中和剂溶液试管中沾湿分别在试验样本染菌区涂抹采样。将棉拭棉花端剪入原中和剂溶液试管内, 电动混匀器振荡 20s 或在手掌振打 200 次, 作用 10min, 作为试验组样本。
- (5) 按照每件试验样本 400mL 配制标准硬水。将 2 件试验样本依次浸没于标准硬水中, 浸泡时间和其余步骤与试验组相同, 作为阳性对照组样本。
- (6) 将阳性对照组和试验组样本分别取 1.0mL, 以倾注法接种平皿, 每个样本接种 2 个平皿, 置 37°C 恒温培养箱中培养 48h, 观察最终结果。
- (7) 将本次试验未用完的同批次中和剂溶液、稀释液、培养基等分别设阴性对照。
- (8) 试验重复 3 次。
- (9) 按 2.1.7.4 (8) 计算杀灭对数值。

2.2.13.4 评价规定

3 次试验阴性对照均无菌生长, 阳性对照组回收菌量均为 $1\times 10^6\text{cfu}/\text{样本}\sim 5\times 10^6\text{cfu}/\text{样本}$, 30 个样本的杀灭对数值均 ≥ 3.00 , 所用消毒剂的浓度和作用时间为消毒合格剂量。

2.3 空气消毒效果鉴定试验

2.3.1 目的

用于验证消毒器械或消毒剂对空气中细菌的消毒效果。

2.3.2 试验设备和器材

(1) 实验菌株 白色葡萄球菌 8032, 菌悬液的制备方法见 2.1.2

(2) 采样液 非化学因子杀菌试验时, 用含抗泡沫剂(辛醇或橄榄油)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。

(3) 中和剂 经中和剂鉴定合格

(4) 磷酸盐缓冲液(PBS 0.03 mol/L, pH 7.2)

(5) 普通营养肉汤培养基

(6) 普通营养琼脂培养基, 消毒剂杀菌试验时, 尚需在其中加入相应的中和剂

(7) 相邻的一对气雾柜或气雾室, 一个用于消毒试验, 一个用于试验对照。一对气雾柜或气雾室所处环境(包括温度、湿度、光照、密闭性、和通风条件等)应一致。柜(或室)宜以不锈钢或铝合金和玻璃构建。应安装温度和湿度调节装置以及通风机过滤除菌或其它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。

(8) 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 90% 以上应在 $1\mu\text{m}\sim 10\mu\text{m}$ 之间

(9) 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

(10) 环境监测器材, 如温度计、湿度计等

2.3.3 中和剂鉴定试验

(1) 用稀释液将制备好的菌悬液稀释至约 $2.5\times 10^2\text{cfu/mL}\sim 1\times 10^3\text{cfu/mL}$ 备用。

(2) 中和剂鉴定试验操作步骤:

第 1 组 分别吸取上述稀释的菌悬液 0.2mL, 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。观察中和剂对试验菌生长有无抑制作用。

第 2 组 按产品使用说明书的要求, 在 1m^3 的气雾柜中喷雾消毒剂, 喷雾结束后, 用含中和剂的营养琼脂平板于空气中采样 10min, 分别吸取上述稀释的菌悬液 0.2mL, 均匀涂抹于两块采了消毒剂的平皿, 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。

第 3 组 分别吸取上述稀释的菌悬液 0.2mL, 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。

第 4 组 分别吸取稀释液 0.2mL, 均匀涂抹于两块含中和剂的营养琼脂平板上, 37°C 恒温培养箱中培养 48h, 作为阴性对照组。

(3) 实验结果符合以下全部条件, 所测中和剂可判为合格:

第 1、2 和 3 组有相似量实验菌生长, 菌量在 $50\text{cfu/平板}\sim 200\text{cfu/平板}$ 之间, 三组间菌落数误差率应不超过 15%。三组间菌落数误差率计算公式见 2.1.5.7。

第 4 组无菌生长。否则, 说明试剂有污染, 应更换无污染试剂重新进行试验。

连续 3 次试验取得合格评价。

2.3.4 实验阶段

在进行正式空气消毒前，应先进行预备试验，了解所测消毒剂或消毒器械是否对试验菌具有杀灭作用（悬液定量杀菌试验法，见 2.1.7.4），以便设定正式试验的剂量分组。

当预备试验证明拟测试的消毒剂或消毒器械有可能用于空气消毒时，即可依次进行随后的正式试验。由于空气消毒试验操作难度大，且其消毒空间愈大，难度愈大，故最好由小到大逐步进行，以免造成试验的反复，耗费人力、物力和时间。空气消毒试验分为实验室试验、模拟现场试验与现场试验。三个阶段试验的特点见表 2-3。

表 2-3 各阶段空气消毒试验的特点

项 目	实验室试验	模拟现场试验	现场试验
目 的	测定最低有效剂量	测定最低有效剂量	验证实用消毒效果
试验柜（室）	≥1m ³ 柜	10m ³ ~20m ³ 柜	≥20m ³ 房间
采样器	液体撞击式	六级筛孔空气撞击式	六级筛孔空气撞击式
菌 株	白色葡萄球菌	白色葡萄球菌	空气中自然菌
试验菌雾粒	<10μm	<10μm	不 定
温 度	20℃~25℃	20℃~25℃	自然条件
相对湿度	50%~70%	50%~70%	自然条件
中和剂	加于采样液中	加于采样培养基中	加于采样培养基中
对 照	需有自然消亡对照 (衰亡率<50%)	需有自然消亡对照 (衰亡率<50%)	不需自然消亡对照
结果计算	杀灭率	杀灭率	消亡率

2.3.5 实验室试验与模拟现场消毒效果鉴定试验

- (1) 取试验菌菌悬液，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。
- (2) 同时调节两个气雾柜（或室）的温度、相对湿度至试验要求的温度和相对湿度。
- (3) 将使用的器材一次放入气雾柜（或室）内，将门关闭。此后，一切操作和仪器设备的操纵均在柜（或室）外通过带有密封袖套的窗口或摇控器进行。直至试验结束，方可将门打开。
- (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 5min，而后静置 5min，同时对对照组和试验组气雾柜（或室）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）。气雾柜（或室）内空气细菌浓度应达 $5 \times 10^4 \text{cfu/m}^3 \sim 5 \times 10^6 \text{cfu/m}^3$ （按消毒处理前阳性对照样本检测结果计）。
- (5) 在模拟现场鉴定试验时，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柜室中央 1m 高处（采样方法按采样器使用说明书进行）。在实验室试验时，

气雾柜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。

(6) 按产品说明书规定方法和根据预备试验结果所设计的用量，在试验气雾柜（或室）内进行消毒。对照组气雾柜室同时作相应（不含消毒剂）处理。

(7) 作用至规定时间，对试验组和对照气雾柜（或室）按前述要求同时进行采样。待作用至第二个预定消毒时间，再次进行采样。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。

(8) 在实验室试验阶段，用液体撞击式采样器采集的样本，按 2.1.3 所示方法进行活菌培养计数，在 37℃ 恒温培养箱内培养 48h，观察最后结果。

(9) 在模拟现场试验阶段，用六级筛孔空气撞击式采样器采样时，采样平板直接放入 37℃ 恒温培养箱中培养 48h，观察最后结果，计数生长菌落。

(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，排除柜（或室）内滞留的污染空气，为下一次试验作做好准备。

(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，说明所用培养基或试剂有污染，试验无效，更换无菌器材重新进行。

(12) 试验重复 3 次，分别计算每次试验的杀灭率，杀灭率均 $\geq 99.90\%$ 时判定为消毒合格。杀灭率的计算方法如下：

$$N_t = \frac{V_0 - V_t}{V_0} \times 100\%$$

$$K_t = \frac{V_0'(1 - N_t) - V_t'}{V_0'(1 - N_t)} \times 100\%$$

[N_t : 不同时间空气中细菌的自然消亡率；

V_0 与 V_t : 分别为对照组试验开始前和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' 与 V_t' : 分别为试验组消毒处理前、和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下列公式计算：

1) 液体撞击式空气采样法空气含菌量

$$\text{空气含菌量 (cfu/m}^3\text{)} = \frac{\text{平板上平均菌数 (cfu/mL)} \times \text{稀释倍数} \times \text{采样液量 (mL)}}{\text{采样流量 (L/min)} \times \text{采样时间(min)}} \times 1000$$

2) 六级筛孔式空气撞击式采样法空气含菌量

$$\text{空气含菌量 (cfu/m}^3\text{)} = \frac{\text{六级采样平板上总菌数 (cfu)}}{28.3\text{L/min} \times \text{采样时间 (min)}} \times 1000$$

[举例：用某消毒剂对气雾柜内空气消毒 10min，实验组消毒前空气含菌量为 100 000 cfu/m³，消毒后为 100cfu/m³；对照组处理前空气含菌量为 90 000cfu/m³，处理后为 50 000 cfu/m³。该消毒剂作用 10min 对空气中微生物的杀灭率按下法计算：

① 细菌在空气中 10min 的自然消亡率为：

$$N_t = \frac{90000 - 50000}{90000} \times 100\% = 44.44\%$$

② 对空气中微生物的杀灭率为：

$$K_t = \frac{100000(1 - 44.44\%) - 100}{100000(1 - 44.44\%)} \times 100\%$$

$$= \frac{55560 - 100}{55560} \times 100\% = 99.82\%$$

该次试验，消毒剂作用 10min，可将空气中细菌杀灭 99.82%。]

2.3.6 现场消毒效果鉴定试验

(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进行空气中自然菌采样，作为消毒前样本（阳性对照）。消毒处理后，再作一次采样，作为消毒后的试验样本。

(2) 采样时，采样器置室内中央1.0m 高处。房间大 10m² 者，每增加 10m² 增设一点，最多设 5 点。

(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。消亡率的计算按下式进行：

$$\text{消亡率} = \frac{\text{消毒前样本平均菌数} - \text{消毒后样本平均菌数}}{\text{消毒前样本平均菌数}} \times 100\%$$

[举例：一无人手术室，消毒前采样，空气中的平均含菌量为 5000cfu/m³。用某消毒剂喷雾对室内空气消毒 30min 后采样，含菌量减至 50cfu/m³。该消毒剂处理 30min 后，室内空气中自然菌的消亡率可按下法计算：

$$\text{消亡率} = \frac{5000 - 50}{5000} \times 100\% = 99.00\%$$

该消毒剂作用 30 min, 可使房间内空气中自然菌的消亡率达 99.00%。]

(4) 试验采样完成后, 应将未用的同批培养基, 与上述试验样本同时进行培养或接种后培养, 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, 更换后重新进行。

(5) 试验重复 3 次或以上。计算出每次的消亡率。除有特殊要求者外, 对无人室内进行的空气消毒, 每次的自然菌消亡率均 $\geq 90\%$ 者为合格。

2.3.7 注意事项

(1) 实验室试验和模拟试验中, 因控制统一的条件较难, 故每次均需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亦应尽量保持一致。

(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。

(3) 注意记录试验过程中的温度和相对湿度, 以便分析对比。

(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。

(5) 每次试验完毕, 气雾柜、气雾室应充分通风。必要时消毒冲洗间隔 4h 后始可做第二次试验。

(6) 试验时, 气雾柜(室)必须保持密闭, 设有空气过滤装置, 以防染菌空气外逸, 污染环境。

(7) 试验时, 气雾柜、气雾室或现场房间应防止日光直射, 以免造成杀菌作用不稳定。

(8) 雾柜排风过滤装置中的滤材应定期更换, 换下的滤材应经灭菌后再作其他处理。

(9) 在气雾柜或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。

2.4 水消毒效果鉴定试验

2.4.1 目的

用于验证疫区生活饮用水消毒剂与消毒器械的消毒效果。

2.4.2 实验器材

- (1) 实验菌株 大肠杆菌 (8099) 悬液
- (2) 微孔滤膜滤器和滤膜 (滤膜孔径为 $0.45\mu\text{m}$, 滤膜大小视滤器型号确定)
- (3) 抽滤水泵或气泵
- (4) 恒温水浴箱
- (5) 三角烧瓶、广口瓶

- (6) 品红亚硫酸钠培养基 见附录 A
- (7) 中和剂 经中和剂鉴定合格
- (8) 模拟现场消毒装置 (见 2.4.8)
- (9) 磁力搅拌器

2.4.3 试验阶段

疫区饮用水消毒效果的鉴定应经过实验室杀菌试验,天然水样消毒试验两个阶段的检测。实验室试验的目的是以大肠杆菌为试验菌,用悬液定量杀菌试验法测出在试管中消毒所需的剂量。天然水样消毒试验是由自然水体取样,进一步验证受试消毒剂或方法对成分较复杂的天然水的消毒效果。对用于较大水体(如人工游泳池水、高层建筑二次供水)消毒的设备和方法,必要时尚需进行模拟现场或现场试验,以进一步验证其消毒效果。

由于生活饮用水卫生标准,除微生物外还需考虑化学污染等方面,因此对其安全评价尚需由有关专业单位对其他条件,例如化学物质含量和 pH 值等,进行检测和判定,以对所鉴定的消毒剂或器械做出合格与否的综合评价。

2.4.4 试验菌污染水样的配制

取 37℃ 培养 18h~24h 的新鲜大肠杆菌斜面,用生理盐水洗下菌苔,混匀后再用生理盐水适当稀释,配制成试验用大肠杆菌悬液。将用生理盐水配制的大肠杆菌悬液加入脱氯的自来水或蒸馏水中,使其含菌量达到 5×10^4 cfu/100mL~ 5×10^5 cfu/100mL。

2.4.5 试验菌污染水样中活菌的培养计数

(1)将纤维滤膜在蒸馏水中煮沸消毒 3 次,每次 15min。每次煮沸后需更换蒸馏水洗涤 2~3 次,以除去残留溶剂。

(2)滤器用压力蒸汽灭菌(121℃, 20min),也可用酒精火焰灭菌。

(3)用无菌镊子夹取无菌的滤膜边缘,将粗糙面向上,贴放在已灭菌滤器的滤床上,稳妥地固定好滤器。取一定量待检水样(稀释或不稀释)注入滤器中,加盖,打开抽气阀门,在负压 0.05 Mpa 下抽滤。

(4)水样滤完后,再抽气约 5s,关上滤器阀门,取下滤器。用无菌镊子夹取滤膜边缘,移放在品红亚硫酸钠琼脂培养基平板上,滤膜截留细菌面向上。滤膜应与琼脂培养基完全紧贴,当中不得留有气泡,然后将平板倒置,放入 37℃ 恒温培养箱内培养 22h~24h。

(5)观察结果和计数:计数滤膜上生长带有金属光泽的黑紫色大肠杆菌菌落,并计算出染菌水样中含有的大肠杆菌数(cfu/100mL)。

$$\text{大肠杆菌数 (cfu/100mL)} = \frac{\text{滤膜上菌落数} \times \text{稀释倍数}}{\text{被检水样体积 (mL)}} \times 100$$

2.4.6 实验室杀菌试验操作程序

2.4.6.1 饮水消毒剂消毒鉴定试验

(1) 实验分组

1) 试验组 申请消毒产品卫生许可证时,按使用说明书规定的最低剂量,设定 1 个浓度,3 个作用时间(使用说明书规定的最低作用时间,规定最短作用时间的1.5倍和规定最短作用时间的0.5倍),测定其对大肠杆菌的杀菌效果。进行消毒产品监督检查时,按使用说明书规定的最低剂量,设定 1 个浓度,1 个作用时间(使用说明书规定的最短作用时间),测定其对大肠杆菌的杀菌效果。

2) 阳性对照组 以未经消毒的实验菌污染水样进行活菌培养计数。

3) 阴性对照组 以试验所用同批次未经使用的培养基进行培养,观察有无细菌生长。

(2) 操作程序

1) 按 2.4.4所示方法配制试验菌污染水样。

2) 将装有试验菌污染水样的三角烧瓶放入恒温水浴箱(20℃±2℃)中,开动磁力搅拌器,使细菌在水中分布均匀。先取 2 份试验菌污染水样,按 2.4.5 所示方法进行大肠杆菌活菌计数,作为阳性对照组。

3) 待水样的温度恒定后加入消毒剂,迅速搅拌均匀。从开始加消毒剂起计时,按规定时间吸取水样,注入装有中和剂的无菌三角烧瓶中,以终止消毒作用。

4) 将中和后水样,分别取 100mL、10mL、1mL 各 2 份,按 2.4.5 所示方法进行大肠杆菌的活菌培养计数。

5) 将未接种大肠杆菌的试验用同批培养基平板 2 个,置恒温培养箱中培养,作为阴性对照组。

6) 试验重复 3 次。

(3) 评价规定

当阳性对照组平均菌量在 5×10^4 cfu/100mL~ 5×10^5 cfu/100mL,阴性对照组均无菌生长时。在 3 次试验中均使大肠杆菌下降至 0cfu/100mL 的最低剂量,判定为实验室试验中饮水消毒最低有效剂量。若阳性对照和阴性对照未达上述要求,应寻找原因,纠正后重做试验。

2.4.6.2 饮水消毒器消毒鉴定试验

本节饮水消毒器械指能产生消毒液并用于饮水消毒的饮水消毒装置。

(1) 实验分组

1) 试验组 申请消毒产品卫生许可证时,按使用说明书规定的最低剂量,设定 1 个作用浓度(使用说明书规定的最低作用浓度)和3 个作用时间(使用说明书规定的最短作用时间,最短作用时间的1.5倍和最短作用时间的0.5倍),测定其对大肠杆菌的杀菌效果。进行消毒产品监督检查时,按使用说明书规定的最低剂量,设定 1 个浓度(使用说明书规定的最低作用浓度)和1 个作用时间(使用说明书规定的最短作用时间),测定其对大肠杆菌的杀菌效果。

- 2) 阳性对照组 以未经消毒的试验菌污染水样进行活菌培养计数。
- 3) 阴性对照组 以试验所用同批次未经使用的培养基进行培养, 观察有无细菌生长。

(2) 操作程序

- 1) 按 2.4.4 所示方法配制试验菌污染水样。
- 2) 取 2 份试验菌污染水样, 按 2.4.5 所示方法进行大肠杆菌活菌计数, 作为阳性对照组。
- 3) 应用气压法或水泵法进行消毒处理。应用气压法时, 按要求联接高压 ($2\text{kg}/\text{cm}^2 \sim 3\text{kg}/\text{cm}^2$) 气源、耐压水样贮水器 ($3\text{kg}/\text{cm}^2 \sim 5\text{kg}/\text{cm}^2$)、流量计和饮水消毒器。应用水泵法时, 则按要求联接耐压水样贮水器 ($3\text{kg}/\text{cm}^2 \sim 5\text{kg}/\text{cm}^2$)、水泵、流量计和饮水消毒器。然后将加有试验菌的水样通过消毒器, 取消毒过的水样置含中和剂的灭菌三角瓶中, 混匀。分别吸取中和后水样 100mL、10mL、1mL 各 2 份, 按 2.4.5 所示方法进行大肠杆菌的活菌计数。
- 4) 将未接种大肠杆菌的试验用同批培养基平板 2 个, 置培养箱中培养, 作为阴性对照组。
- 5) 试验重复 3 次。

(3) 评价规定

当阳性对照组平均含菌量在 $5 \times 10^4 \text{cfu}/100\text{mL} \sim 5 \times 10^5 \text{cfu}/100\text{mL}$, 阴性对照组均无菌生长时, 在 3 次试验中使大肠杆菌均下降至 $0 \text{cfu}/100\text{mL}$ 的最低剂量, 可判定为实验室试验中饮水消毒最低有效剂量。若阳性对照组和阴性对照组含菌量未达上述要求, 应寻找原因, 纠正后重做试验。

2.4.6.3 饮水过滤器除菌鉴定试验

(1) 实验分组

1) 试验组 申请消毒产品卫生许可证时, 按使用说明书规定的最大流量, 测定其对大肠杆菌的除菌效果。

- 2) 阳性对照组 以未经消毒的实验菌污染水样进行活菌培养计数。
- 3) 阴性对照组 以试验所用同批次未经使用的培养基进行培养, 观察有无细菌生长。

(2) 操作程序

- 1) 按 2.4.4 所示方法配制试验菌污染水样。
- 2) 取 2 份试验菌污染水样, 按 2.4.5 所示方法进行大肠杆菌活菌计数, 作为阳性对照组。
- 3) 按过滤器产品规定的最大流量, 将试验菌污染水样分段通过饮水过滤除菌装置。按规定过滤的水量, 用无菌三角瓶分段采集: 初始、1/4、2/4、3/4、4/4 等各段流出的水样 (不需加中和剂)。
- 4) 对过滤后各段水样, 分别取 100mL、10mL、1mL 各 2 份, 进行大肠杆菌活菌培养计数 (见 2.4.5)。
- 5) 将未接种大肠杆菌的试验用同批培养基平板 2 个, 置培养箱中培养, 作为阴性对照组。
- 6) 试验重复 3 次。

(3) 评价规定

当阳性对照组平均含菌量在 $5 \times 10^4 \text{cfu}/100\text{mL} \sim 5 \times 10^5 \text{cfu}/100\text{mL}$, 阴性对照组均无菌生长时,

在 3 次试验所有流量段水样中大肠杆菌下降至 0cfu/100mL 时, 判为实验室试验中饮水消毒效果合格。若阳性对照组和阴性对照组含菌量未达上述要求, 应寻找原因, 纠正后重做试验。

2.4.7 杀菌效果影响因素测定试验操作程序 (用于饮用水化学消毒试验)

2.4.7.1 水温影响试验

将人工染有大肠杆菌的水样, 温度分别调控在 $5^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、 $20^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、 $30^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 条件下, 对不同温度的水样, 按说明书上规定的最低使用剂量 (1 个浓度, 1 个作用时间) 进行杀菌试验, 观察水温的影响。试验程序同 2.4.5 或 2.4.6。试验重复 3 次。3 次试验中, 3 个温度组杀菌效果均达合格标准, 判为温度对该消毒剂杀菌效果影响不明显, 所试剂量可在 $5^{\circ}\text{C}\sim 30^{\circ}\text{C}$ 条件下使用。否则应依据杀菌效果确定仅可在杀菌效果均达合格标准的温度区间内使用。试验中应设阳性对照和阴性对照组。两对照组结果未达 2.4.6.1(3) 要求, 应寻找原因, 纠正后重做试验。

2.4.7.2 有机物影响试验

(1) 腐殖酸配制: 取 0.1g 腐殖酸 (分析纯) 用少许 2.0mol/L 氢氧化钠溶液溶解, 加蒸馏水 50mL, 用滤纸过滤至 100mL 容量瓶中, 用 2.0mol/L 盐酸溶液调节 pH 值至中性, 并定容至 100mL, 比色测定实际色度。

(2) 水样制备: 在水样中加入腐殖酸, 比照标准色度管, 使色度各为 0 度、10 度、15 度, 然后分别加入大肠杆菌悬液, 配成不同色度的人工染有大肠杆菌水样。

(3) 消毒处理: 按说明书上推荐的最低使用剂量 (1 个浓度, 1 个作用时间) 进行杀菌试验, 观察有机物的影响。试验程序同 2.4.6.1 或 2.4.6.2。试验重复 3 次。

(4) 3 次试验中, 3 个浓度的有机物组杀菌效果均达合格标准, 判为有机物对该消毒剂杀菌效果影响不明显, 所试剂量可用于色度低于 15 度水的处理。否则应依据杀菌效果确定仅可用于低于杀菌效果均达合格标准色度水的处理。试验中应设阳性对照和阴性对照组。两对照组结果未达 2.4.6.1(3) 要求, 应寻找原因, 纠正后重做试验。

2.4.7.3 水中 pH 值的影响试验

(1) 水样制备: 用氢氧化钠 (分析纯) 或盐酸 (分析纯) 调水样 pH 值分别调为 6.5, 7.0 和 8.5, 然后加入大肠杆菌悬液, 配成不同 pH 值的试验菌污染水样。

(2) 消毒处理: 按说明书上推荐的最低使用剂量 (1 个浓度, 1 个作用时间) 进行杀菌试验, 观察 pH 值的影响。试验程序同 2.4.6.1 或 2.4.6.2。试验重复 3 次。

(3) 3 次试验中, 3 种 pH 值的消毒剂浓度杀菌效果均达合格标准, 判定为 pH 值对该消毒剂杀菌效果影响不明显, 所试剂量可用于 pH 值 6.5~8.5 水的处理。否则应依据杀菌效果确定仅可在杀菌效果均达合格标准的 pH 值区间内使用。试验中应设阳性对照和阴性对照组。两对照组结果未达要求见 2.4.6.1(3), 应寻找原因, 纠正后重做试验。

2.4.8 模拟现场和现场消毒与灭菌效果鉴定试验

考虑到实用情况下各种水质对消毒效果的影响, 根据产品申报的使用范围, 选用某些未做试验菌污染水样的天然水样, 如井水、河水、湖水或高层建筑贮水箱的水等进行消毒试验。

2.4.8.1 饮水消毒剂对天然水样消毒效果鉴定试验

(1) 根据说明书的最低使用剂量选择 1 个浓度, 1 个作用时间, 对天然水样进行杀菌试验。

(2) 同时设置阳性对照组与阴性对照组。

(3) 将装有天然水样的三角烧瓶放入恒温水浴箱 ($20^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$) 中, 开动磁力搅拌器, 使细菌在水中分布均匀。取 2 份同批同类天然水样, 每份 100mL, 按 2.4.5 所示方法计数大肠菌群数, 作为阳性对照组。

(4) 待水样的温度恒定后, 加入消毒剂, 迅速搅拌均匀。从开始加消毒剂起计时, 按规定时间吸取水样, 注入装有中和剂的无菌三角烧瓶中, 以终止消毒作用。

(5) 将中和后水样, 分别取 100mL 2 份, 按 2.4.5 所示方法进行大肠菌群的活菌培养计数。

(6) 将未接种水样的试验用同批培养基平板 2 个, 置培养箱中培养, 作为阴性对照组。

(7) 试验重复 3 次。当阳性对照组均有菌生长。阴性对照组均无菌生长时, 可判定在 3 次试验中均使大肠菌群下降至 0cfu/100mL, 判定为对天然水样消毒合格。

(8) 如阳性对照组和阴性对照组含菌量未达上述要求, 应寻找原因, 纠正后重做试验。

2.4.8.2 饮水消毒器对天然水样消毒效果鉴定试验

(1) 根据使用说明书的最低使用剂量选择 1 个浓度, 1 个作用时间, 对天然水样进行杀菌试验。

(2) 试验前, 先取 2 份试验用天然水样, 每份 100mL, 按 2.4.5 所示方法进行大肠菌群的活菌培养计数, 作为阳性对照组。在消毒前, 应用无菌水冲洗和通过 5min~10min, 以消除内表面污垢并证明管路通畅。然后, 将天然水样本按 2.4.6.2(2) 要求通过消毒器进行消毒处理, 将处理后水样移到含中和剂的三角烧瓶中, 混匀。

(3) 将中和的水样 2 份, 每份 100mL, 按 2.4.5 所示方法进行大肠菌群的活菌培养计数。

(4) 大肠菌群的活菌培养计数量, 按 2.4.5 所示方法检测。用滤膜过滤法检测时, 所用水量应一致, 约数毫升。污染严重的天然水, 检测时可适当稀释。

(5) 将未接种水样的试验用同批培养基平板 2 个, 置培养箱中培养, 作为阴性对照组。

(6) 试验重复 3 次。当阳性对照组均有大肠菌群生长, 阴性对照组均无菌生长时, 在 3 次试验中均使大肠菌群下降至 0cfu/100mL, 判定为对天然水样消毒合格。

(7) 如阳性对照组和阴性对照组含菌量未达上述要求, 应寻找原因, 纠正后重做试验。

2.4.8.3 饮水过滤器对天然水样除菌效果鉴定试验

(1) 取 2 份试验用天然水样, 每份 100mL, 按 2.4.5 所示方法进行大肠菌群的活菌培养计数。所得结果作为过滤前含菌量, 作为阳性对照组。

(2) 在消毒前, 应用无菌水冲洗和通过 5min~10min, 以消除内表面污垢并证明管路通畅。再按过滤器产品规定流量, 将天然水样分段通过过滤器。按规定过滤的水量, 用无菌三角瓶分段采集: 初始、1/4、2/4、3/4、4/4 等各段流出的水 (不需加中和剂)。

(3)对过滤后各段水样,分别取 100mL、10mL、1mL 各 2 份,按 2.4.5 所示方法进行大肠菌群的活菌培养计数。

(4)将未接种水样的试验用同批培养基平板 2 个,置培养箱中培养,作为阴性对照组。

(5)试验重复 3 次。当阳性对照组均有菌生长,阴性对照组均无菌生长,3 次试验中所有流量段水样大肠菌群均降至 0cfu/100mL,判定为对天然水样的消毒效果合格。

(6)如阳性对照组和阴性对照组含菌量未达上述要求,应寻找原因,纠正后重做试验。

2.4.8.4 高层建筑二次供水消毒设备消毒效果鉴定试验

对较大水体消毒设备和方法的鉴定,在模拟现场和现场试验中选做其一即可,但首先应考虑后者,只有在无法进行现场试验时,才做模拟现场试验。大水体现场消毒试验的操作程序,随当时当地情况,设备大小和所采取的消毒方法而定。

(1)高层建筑二次供水消毒有两种主要方式,一是直接对贮水池中的水用物理或化学法消毒,一是将贮水池水引出通过消毒装置(如紫外线照射装置、过滤装置或消毒剂添加和搅拌装置等)进行消毒,遂后再输送到用户。

(2)直接对水池中水进行消毒的设备和方法的鉴定,可参照游泳池水消毒设备和方法鉴定的有关要求,进行消毒和采样检测(见 2.4.8.5)。试验剂量选用使用说明书中规定的剂量。样本按 2.4.5 所示方法进行活菌培养计数。检测中阴性对照组的设置和结果的评价,与天然水样杀菌试验相同(见 2.4.8.1; 2.4.8.2; 2.4.8.3)。但检测需重复 5 次,结果均符合要求者(使用含氯消毒剂消毒的水样,剩余氯量为 0.3mg/L~0.5mg/L)判定为合格。

(3)将水引出后消毒的设备和方法的鉴定,可在进入消毒器和消毒后出水口管道上各加一个三通阀门,分别采集消毒前和消毒后水样。将样本按 2.4.5 所示方法进行活菌培养计数。试验剂量选用使用说明书规定者。检测中阴性对照组的设置和结果的评价,与天然水样杀菌试验相同(见 2.4.8.1; 2.4.8.2; 2.4.8.3)。但检测需重复 5 次,结果均符合要求者(使用含氯消毒剂消毒的水样,剩余氯量为 0.3mg/L~0.5mg/L)判定为合格。

(4)对条件不容许加装三通阀门时,可进行模拟现场试验。先设一大型水箱(大小根据鉴定的消毒设备流量和试验时间计算),在其出水口下游用管道依次连接水箱出口阀门、排水泵、三通阀门(一端接下面的流量计,另一端接一回流管,必备需要时可将菌悬液送回水箱)、流量计和所鉴定的消毒装置。消毒装置的进水口前装一三通阀门,以备采集阳性对照水样。

试验时,水箱内盛装含大肠杆菌悬液(浓度为 5×10^4 cfu/100mL~ 5×10^5 cfu/100mL,见 2.4.4)的水样。打开水箱出口阀门,根据流量计所示,用阀门和水泵控制流出水样的量和压力,并使按规定流量进入消毒装置。当水流按规定流量稳定地由消毒装置出水口流出后,先采阳性对照水样,而后由消毒装置出水口采集消毒后水样。将水样按 2.4.5 所示方法进行活菌培养计数。试验剂量选用使用说明书规定者,检测中,阴性对照组的设置和结果的评价,与天然水样杀菌试验相同(见 2.4.8.1; 2.4.8.2; 2.4.8.3)。但检测需重复 5 次,结果均符合要求者(使用含氯消毒剂消毒的水样,剩余氯量为 0.3mg/L~0.5mg/L)判定为合格。

其他类似设备和方法亦可参照有关原则进行。

2.4.8.5 人工游泳池水消毒效果现场鉴定试验

(1) 试验方法

- 1) 水样在现场采集。一般设 2 个采样点, 超过 1000m² 设 3 个采样点。
- 2) 采样时, 使用无菌玻璃瓶在水面下 30cm 深处采集。瓶内加有适量鉴定合格的中和剂溶液 (见 2.1.5)。每点采 1 个样本。
- 3) 以高峰期闭馆后消毒前的样本作为阳性对照样本, 消毒至设定时间后的样本作为试验样本。
- 4) 按说明书的消毒剂量进行试验, 检测细菌总数和大肠菌群数。
- 5) 试验重复 5 次。

(2) 评价规定

每次试验对水中细菌总数的杀灭率 $\geq 90\%$, 对大肠菌群的杀灭率 $\geq 99.9\%$; 消毒后样本细菌总数还应 $\leq 1000\text{cfu/mL}$, 大肠菌群 $\leq 18\text{cfu/L}$ 。全部符合上述要求者判定为合格。

2.4.8.6 医疗机构污水(污泥)现场消毒试验

(1) 目的

通过现场试验确认消毒剂(器械)对医疗机构污水(污泥)消毒的效果。

(2) 实验器材

- 1) 培养基 乳糖胆盐培养基、伊红亚甲基蓝培养基、乳糖蛋白胨培养基、亚硒酸盐增菌液、SS培养基、革兰阴性增菌液、改良罗氏培养基等
- 2) 革兰染色液
- 3) 比色管
- 4) 过滤器
- 5) 离心机
- 6) 恒温培养箱
- 7) 吸管、试管、平皿、量筒

(3) 试验步骤

1) 按产品说明书使用的浓度和作用时间进行污水处理。以未进行消毒的污水做阳性对照, 对照组只做粪大肠菌群试验, MPN/L值 ≥ 5000 。

2) 进行下列检测:

- ①总余氯按 GB 11898 方法进行。
- ②粪大肠菌群按 GB 18466-2005 附录A方法进行。
- ③致病菌(沙门氏菌、志贺氏菌、结核杆菌)按 GB 18466-2005 附录B、C、E方法进行。
- ④污泥的消毒效果按 GB 18466-2005 附录A、B、C、E方法进行。

3) 试验次数应连续三次

(4) 评价规定

按表2-4评价医疗机构污水消毒效果。按表2-5评价污泥现场消毒效果。

表2-4 医疗机构污水排放标准值

医疗机构类别	粪大肠菌群 MPN/L	肠道致病菌	结核杆菌	总余氯 mg/L	
				≥ 1.0	2~10
综合性医疗机构	≤ 500 预处理 ≤ 5000	不得检出	-	≥ 1.0	2~10
传染病、结核病医疗机构	≤ 100	不得检出	不得检出	≥ 1.5	6.5~10

表 2-5 医疗机构污泥排放标准值

医疗机构类别	粪大肠菌群	肠道致病菌	结核杆菌	蛔虫卵死亡率 %
综合医疗机构和其它医疗机构	≤ 100	不得检出	-	> 95
传染病医疗机构	≤ 100	不得检出	-	> 95
结核病医疗机构	≤ 100	-	不得检出	> 95

2.4.8.7 注意事项

- (1) 粪大肠菌群 (MPN/L值) 必须按 GB 18466-2005 附录A.1中检索表检索。
- (2) 结核医院污水必须做结核杆菌检测试验, 其它医疗机构污水不做结核杆菌。
- (3) 采样器材需先灭菌。

2.5 消毒器械消毒与灭菌效果鉴定试验

2.5.1 压力蒸汽灭菌器灭菌效果鉴定试验

2.5.1.1 目的

用于验证压力蒸汽灭菌器(下简称灭菌器)对细菌芽孢的灭菌效果。

2.5.1.2 实验器材

(1) 指示菌株 嗜热脂肪杆菌芽孢(ATCC 7953 或 SSIK 31株)菌片, 含菌量为 1.0×10^6 cfu/片 $\sim 5.0 \times 10^6$ cfu/片, 或嗜热脂肪杆菌ATCC 7953芽孢灭菌指示物, $121^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ 条件下, 存活时间 ≥ 3.9 min, 杀灭时间 ≤ 19 min, D值为1.3min ~ 1.9 min

(2) 标准测试包 由 3 件平纹长袖手术衣, 4 块小手术巾, 2 块中手术巾, 1 块大毛巾, 30 块 $10\text{cm} \times 10\text{cm}$ 8 层纱布敷料包裹而成, 体积为 $25\text{cm} \times 30\text{cm} \times 30\text{cm}$

(3) 通气储物盒 体积为 $22\text{cm} \times 13\text{cm} \times 6\text{cm}$

(4) 满载物品 使用说明书中规定灭菌器可以处理的物品

(5) 培养基 溴甲酚紫蛋白胨培养液

(6) 恒温培养箱

2.5.1.3 实验步骤

(1) 将两个菌片装入灭菌小纸袋内。

(2) 将该纸袋或两个嗜热脂肪杆菌ATCC 7953 芽孢灭菌指示物置于标准测试包中心部位。

(3) 对下排气式压力蒸汽灭菌器，在灭菌器室内排气口上方放置标准测试包；对预真空式压力蒸汽灭菌器，在灭菌器内每层各放置一个标准测试包；对小型压力蒸汽灭菌器用通气贮物盒代替标准测试包，盒内盛满中试管，指示菌片或灭菌指示物放于中心部位的两只灭菌试管内（试管口用灭菌牛皮纸包封），将贮物盒平放于小型压力蒸汽灭菌器底部。

(4) 按灭菌器设定 0.5 倍的灭菌时间（不包括穿透时间）进行灭菌后，取出指示菌片，投入溴甲酚紫蛋白胨培养液中，或取出灭菌指示物，经 $56^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 7d（灭菌指示物的培养方法按说明书执行），观察培养基颜色变化。检测时以培养基作为阴性对照，以加入指标微生物菌片的培养基作为阳性对照。灭菌指示物的阴性对照和阳性对照的设置方法按说明书操作。

(5) 试验重复 5 次。

2.5.1.4 评价规定

每次试验阳性对照变黄，阴性对照颜色不变，对照菌片的回收菌量均为 $1 \times 10^6 \text{cfu/片} \sim 5 \times 10^6 \text{cfu/片}$ ；试验组颜色不变，判定为灭菌器灭菌效果合格。

用灭菌指示物进行评价时，结果判定按说明书进行。

2.5.1.5 注意事项

(1) 所用菌片和灭菌指示物须取得卫生部许可批件，并在有效期内使用。

(2) 样本检测稍有污染即可将灭菌成功的结果全部否定，故试验时必须注意防止环境的污染和严格遵守无菌操作技术规定。

(3) 试验必须在满载条件下进行。

2.5.2 干热灭菌柜灭菌效果鉴定试验

2.5.2.1 目的

验证干热灭菌柜对细菌芽孢的灭菌效果。

2.5.2.2 实验器材

(1) 枯草杆菌黑色变种（ATCC 9372）芽孢 在 $160^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 条件下，存活时间 $\geq 3.9 \text{ min}$ ，杀灭时间 $\leq 19 \text{ min}$ ，D 值为 $1.3 \text{ min} \sim 1.9 \text{ min}$ 。查资料实验室自用的枯草杆菌黑色变种芽孢悬液和芽孢菌片按 2.1.2.3 和 2.1.2.4 制备

(2) 染菌载体 玻片，面积为 $10 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$ ，必要时增用或改用其他载体

(3) TSB 见附录 A

(4) 满载物品 使用说明书中规定灭菌器可以处理的物品

(5) 多点温度测定仪

2.5.2.3 柜内温度测定

将多点温度测定仪的各个探头，分别放于灭菌柜内各层对角线的内、中、外 3 点，相邻层对角线交叉。在柜内摆放满载物品至满载。关闭柜门，开启电源，按灭菌柜设计程序进行灭菌。每 3min 记录各点的温度至灭菌程序结束。试验重复 3 次，计算各点不同时间的平均温度，列出图表。

2.5.2.4 灭菌试验步骤

(1) 每次试验取 2 个菌片为一组，平放于无菌平皿内，勿重叠。加盖，分别放于灭菌柜内各层对角线的内、中、外 3 点，相邻层对角线交叉。在柜内摆放满载物品至满载。

(2) 关闭柜门，开启电源，按灭菌柜设计程序时间的 0.5 倍时间进行灭菌。灭菌完毕，取出平皿，将菌片取出接种于含 5.0mL TSB 试管中，置 37℃ 恒温培养箱内培养 7d，自第 3 日起每日观察结果，混浊表面有皱褶状菌膜者表示有菌生长，判定为阳性；澄清者表示无菌生长，判定为阴性。对难以判定的肉汤管，取其中 0.2mL 悬液接种 TSA 平板，用灭菌 L 棒涂布均匀，置 37℃ 恒温培养箱中培养。48h 后涂片染色，在显微镜下观察菌落形态，或进一步做其他试验，以判断生长者是否为试验菌。若有非试验菌污染，应查找原因重新进行试验。

(3) 试验设菌数对照组，以同批试验用菌片 2 片放在室温下，待试验组灭菌接种后，立即分别移入含 5.0mL PBS 试管中，振打 80 次，按 2.1.3 所示方法进行活菌培养计数。

(4) 试验设阳性对照组，以同批试验用菌片 2 片放在室温下，待试验组灭菌接种后，立即分别接种于 5.0mL TSB，放入培养箱中培养 7d，自第 3 日起每日与试验组同时观察结果。

(5) 阴性对照组，以未染菌载体 2 片分别接种于 5.0mL TSB 放入培养箱中作定性培养，观察有无细菌生长。

(6) 试验重复 5 次。

2.5.2.5 评价规定

(1) 在 3 次测定温度的试验中，各点平均温度均达设计要求。

(2) 在 5 次灭菌试验中，各次试验菌数对照组的回收菌量为 1×10^6 cfu/片 $\sim 5 \times 10^6$ cfu/片；阳性对照组有菌生长；阴性对照组无菌生长；所有试验菌片均无菌生长判定为灭菌合格。

2.5.2.6 注意事项

(1) 样本检测稍有污染即可将灭菌成功的结果全部否定，故试验时必须注意防止环境的污染和严格遵守无菌操作技术规定。

(2) 试验必须在满载条件下进行。

2.5.3 红外线食具消毒柜消毒效果鉴定试验

2.5.3.1 目的

用于验证红外线消毒碗柜（下简称消毒碗柜）对食（饮）具的消毒效果。

2.5.3.2 实验器材

- (1) 大肠杆菌（8099）悬液
- (2) 脊髓灰质炎病毒悬液
- (3) 载体 玻片，面积为10mm x 10mm，必要时增用或改用其他载体
- (4) 食（饮）具
- (5) 多点温度测定仪

2.5.3.3 柜内温度测定

将多点温度测定仪的探头分别于消毒碗柜每层的内、外两点（大型碗柜在内、中、外 3 点）放置，在柜内摆放食（饮）具至满载。关闭柜门，开启电源，按消毒碗柜设定程序进行消毒。每 3min 记录各点的温度至消毒程序结束。试验重复 3 次，计算各点不同时间的平均温度，列出图表。

2.5.3.4 大肠杆菌杀灭试验

- (1) 按 2.1.2 制备大肠杆菌菌片。
- (2) 在消毒碗柜满载的情况下，将干燥大肠杆菌菌片置无菌平皿内，每平皿放 2 片，勿重叠。在消毒碗柜每层的内、外两个点各放一含菌片的平皿（大型碗柜在内、中、外各放一平皿），打开平皿盖。
- (3) 关闭柜门，开启电源，按消毒碗柜原设计程序进行消毒。消毒完毕，按说明书规定的时间打开柜门，盖上平皿盖，取出平皿。将菌片移入含 5mL PBS 试管内，按 2.1.3 所示方法进行活菌培养计数。
- (4) 在上述消毒试验时，将未消毒菌片，放置室温下，当消毒组试验完毕后，取该菌片进行活菌培养计数，作为阳性对照。另将同批培养基与 PBS 等培养，作为阴性对照。
- (5) 试验重复 3 次。
- (6) 按 2.1.7 计算平均杀灭对数值。

2.5.3.5 脊髓灰质炎病毒灭活试验

- (1) 按 2.1.10 所示方法制备脊髓灰质炎病毒悬液和载体。
- (2) 在消毒碗柜满载的情况下，将染毒载体置无菌平皿内，每平皿放 2 片，勿重叠。在消

毒碗柜每层的内、外两个点各放一平皿（大型碗柜在内、中、外各放一平皿），打开平皿盖。

（3）关闭柜门，开启电源，按说明书设定程序进行消毒。消毒完毕，按说明书规定的时间，打开柜门，盖上平皿盖，取出平皿。将载体移入含 1mL 细胞维持液的试管中。振打80次，取样按 2.1.10 所示方法检测残留脊髓灰质炎病毒滴度。

（4）阳性对照，将染毒载体 2 片，分别移入含 1mL 细胞维持液的试管中。振打80次，取样，按 2.1.10 所示方法检测残留脊髓灰质炎病毒滴度。脊髓灰质炎病毒滴度对数值为 4~6。

（5）阴性对照，用不含脊髓灰质炎病毒的完全培养基作为阴性对照，以观察培养基无污染，细胞是否生长良好。

（6）试验重复 3 次。

（7）计算病毒的灭活对数值。

2.5.3.6 评价规定

符合以下全部要求者判定为消毒合格。

（1）柜内最低温度点达到 120℃，并持续 15min 以上。

（2）每次试验对大肠杆菌杀灭对数值各点均 ≥ 3.00 ，阳性对照组回收菌数为 1×10^6 cfu/片~ 5×10^6 cfu/片，阴性对照无菌生长。

（3）每次试验对脊髓灰质炎病毒灭活对数值 ≥ 3.00 ，阴性对照细胞生长良好，阳性对照组病毒对数值应为 4~6。

2.5.4 微波灭菌柜消毒与灭菌效果鉴定试验

2.5.4.1 目的

验证微波灭菌柜对微生物的消毒与灭菌效果。

2.5.4.2 实验器材

（1）实验菌株 金黄色葡萄球菌(ATCC 6538)、大肠杆菌(8099)、铜绿假单胞菌(ATCC 15442)、龟分枝杆菌(ATCC 19977)、枯草杆菌黑色变种(ATCC 9372)芽孢

（2）载体 布片或玻片，面积为10mm×10mm，必要时增用或改用其他载体

（3）微波漏能测试仪

（4）TSB 见附录A

（5）满载用物品 使用说明书中规定处理的物品

2.5.4.3 细菌及其芽孢和真菌杀灭试验操作程序

（1）按 2.1.2.4 所示相关方法制备试验用细菌及其芽孢和真菌菌片。每一牛皮纸小袋装 2 个菌片。

(2) 按说明书在灭菌柜内摆放满载用物品至满载, 并做预处理。将试验菌片放于柜室各层中央和四角的物品中间, 每层共放置 5 袋。柜室容量小者可适当减少放置菌片数量。

(3) 关闭柜门, 按说明书的消毒程序进行消毒处理, 按说明书的灭菌程序的半周期进行灭菌处理。完毕后, 打开柜门, 取出菌片。

(4) 消毒试验按 2.1.7 做定量杀菌效果的检测。灭菌试验时, 将取出的试验菌片移种于 TSB 中, 置 37℃ 恒温培养箱培养, 作为试验组。

(5) 将同批试验用的菌片放在室温下, 待消毒或灭菌试验组达规定作用时间后, 立即将该菌片 2 片分别移入含 5.0mL PBS 试管中, 各振荡 80 下。按 2.1.3 所示方法进行活菌培养计数, 作为菌数对照组。

(6) 将同批试验用的菌片放在室温下, 待灭菌实验组达规定作用时间后, 立即将该批试验用的菌片 2 片, 分别接种于 5.0mL TSB, 置 37℃ 恒温培养箱中培养, 作为阳性对照组。

(7) 在灭菌试验中, 将同批试验用的载体 2 片, 分别接种于 5.0mL TSB, 置 37℃ 恒温培养箱培养, 作为阴性对照。在消毒试验中, 将同批次中和剂溶液、稀释液、培养基等分别设阴性对照。

(8) 消毒试验重复3次, 灭菌试验重复 5 次。

2.5.4.4 评价规定

(1) 每次消毒试验中的菌数对照组回收菌量为 1×10^6 cfu/片~ 5×10^6 cfu/片; 阴性对照组应无菌生长, 试验组的杀灭对数值均 ≥ 3.00 , 判定为消毒合格。

(2) 每次灭菌试验中的菌数对照组回收菌量为 1×10^6 cfu/片~ 5×10^6 cfu/片; 阳性对照组有菌生长; 阴性对照组无菌生长; 试验组无细菌生长判定为灭菌合格。

2.5.4.5 注意事项

(1) 微波强弱受电压影响很大。试验时, 应注意电压是否符合说明书规定值。

(2) 测试人员长时间受微波照射, 对人体有害, 试验时应做好防护。

(3) 测试的灭菌柜应先用微波漏能测试仪检测有无微波泄漏。

2.5.5 紫外线灯辐射照度的测定和消毒试验

2.5.5.1 目的

测定紫外线灯(包括双灯管组合灯具)辐射照度及对微生物的杀灭作用, 以验证其杀菌性能是否达到合格标准。

2.5.5.2 实验器材

(1) 实验菌株 金黄色葡萄球菌(ATCC 6538)、大肠杆菌(8099)、铜绿假单胞菌(ATCC 15442)、

枯草杆菌黑色变种 (ATCC 9372) 芽孢、白色葡萄球菌 (8032)

- (2) 载体 玻片, 面积为 $10\text{mm}\times 10\text{mm}$
- (3) 紫外线照度计
- (4) 紫外线灯测定架
- (5) 稳压器 (220V)

2.5.5.3 辐射照度测定

- (1) 将待测紫外线灯管固定于测定架, 调节距离使灯管距其下方垂直中心放置照度计处 1m。
- (2) 开启紫外线灯稳定5min 后, 用照度计在灯管下方垂直距离 1m 的中心处测量其辐射照度值 ($\mu\text{W}/\text{cm}^2$)。
- (3) 测量时, 电压应稳定在 220V。
- (4) 普通型或低臭氧型直管紫外线灯, 在灯管下方垂直 1m 的中心处, 新灯管的辐射照度值应符合表2-6和表2-7的要求。
- (5) 使用中的灯管, 可在原装置处进行测定。测定位置仍在灯管下方垂直距离 1m 的中心处。使用中灯管的辐射照度值应不低于表2-6和表2-7的要求, 低于此值者应予更换。
- (6) 多灯管组合灯具的测定方法和合格标准, 同单支灯管。
- (7) 对异型 (非直管型)、高照度型等灯管的检测距离和辐射照度值合格标准, 随产品用途和使用方法而定。原则上, 应不低于产品使用说明书注明的辐照度值, 并按其推荐剂量 [即辐射照度值乘以照射时间 (s)] 进行杀菌试验, 证明能满足应用所需效果者判定为实验室测试合格。
- (8) 辐射照度检测, 每次鉴定抽查 10 支灯管, 每支灯管重复测定 3 次。各次数据均达标准, 辐射照度判定为合格。

2.5.5.4 细菌及其芽孢和真菌杀灭效果的测定

- (1) 按 2.1.2 所示方法制备细菌及其芽孢和真菌菌片。菌片以玻片为载体。
- (2) 试验时, 确定菌片照射位置。若无特殊要求, 应在灯管下方垂直距离 1m的中心处。
- (3) 将菌片平置于无菌平皿中, 勿重叠。平皿放于测定架预先确定的照射位置上进行照射。
- (4) 按产品使用说明书规定的作用时间的 0.5倍、1.0倍和1.5倍设置3个作用时间进行试验。
- (5) 将照射后样本送实验室进行活菌培养计数 (见 2.1.3) 的测定。
- (6) 以试验用的同批菌片置室温下, 待试验组消毒完毕后, 立即将该批菌片 2 片分别放入含 5.0mL PBS 试管中, 电动混匀器振荡20s或各振打 80次。取洗液按 2.1.3 所示方法进行活菌培养计数, 作为阳性对照组。
- (7) 以同次实验用培养基或 PBS 接种培养基培养, 作为阴性对照组。

(8) 试验重复3次。

(9) 对异型（非直管型）、高照度型，或非 30W 功率等灯管的照射距离，随产品用途和使用方法而定。

2.5.5.5 评价规定

每次试验阳性对照组回收菌量为 1×10^6 cfu/片 $\sim 5 \times 10^6$ cfu/片，阴性对照组无菌生长，各次试验的杀灭对数值均 ≥ 3.00 ，判定为消毒合格。

2.5.5.6 臭氧产生量的测定

紫外线灯产生的臭氧量不同可影响杀菌效果和使用的安全，故应测定臭氧浓度以便进行综合考虑。臭氧浓度测定方法见本规范理化鉴定技术。检测条件应以产品使用说明中规定的使用方法、面积（或容积）和时间为准，进行现场（或模拟现场）测定。臭氧浓度应写明于使用说明书中，低臭氧紫外线灯产生的臭氧浓度，应不超过国家规定的工作场所安全浓度（ $0.16\text{mg}/\text{m}^3$ ）。

2.5.5.7 有效使用期的测定

将灯管装设于测试架上，通电 2h 45min 后，关闭 15min 再启动。每周测试一次辐射照度值，直至低于下限值（见表2-6、表2-7）为止。该样本连续照射的时间（不包括关闭时间），即为其有效使用时间（h）。随机抽样，重复测试 3~5 支灯管，取其最低值为有效使用时间。

表 2-6 双端紫外线杀菌灯辐射照度标准

标准功率（W）	4	6	8	13	15	18	20	30	36	40
额定值（ $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ）	12	18	28	41	44	66	75	107	110	117
禁用下限值（ $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ）	8	12	18	27	29	43	49	70	72	76

表 2-7 单端紫外线杀菌灯辐射照度标准

标准功率（W）	7	9	11	18	24	36	55(T5)
额定值（ $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ）	16	23	8	57	94	147	170
禁用下限值（ $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ）	10	15	25	37	61	96	111

2.5.5.8 注意事项

- (1) 测试前应先用酒精棉球擦除灯管上的灰尘和油垢，以免影响紫外线的照射强度。
- (2) 杀菌试验时，应使紫外线直接照射拟消毒表面，否则不能反映该剂量真实的杀菌效果。
- (3) 在紫外线灯下工作时，勿直视灯管，并穿戴防护眼镜、防护服、手套等，以减少对测试人员的伤害。在有人工作环境中，空气中臭氧浓度不得超过 $0.16\text{mg}/\text{m}^3$ 。

(4) 测定辐照度值或进行杀菌试验时, 应保持室内洁净。

2.5.6 紫外线消毒箱消毒效果鉴定试验

2.5.6.1 目的

用于验证紫外线消毒箱对物体表面微生物的消毒效果。

2.5.6.2 实验器材

(1) 实验菌株 金黄色葡萄球菌(ATCC 6538)、大肠杆菌(8099)、铜绿假单胞菌(ATCC 15442)、枯草杆菌黑色变种(ATCC 9372)芽孢、白色念珠菌(ATCC 10231)、龟分枝杆菌脓肿亚种(ATCC19977)

(2) 载体 玻片, 面积为10mm×10mm, 必要时可增用或改用其他载体

(3) 紫外线照度计

(4) 紫外线灯测定架

(5) 满载用物品 使用说明书中规定消毒的物品

2.5.6.3 紫外线辐射照度测定

打开消毒箱的盖或门, 将内装紫外线灯管取下, 在紫外线灯测定架上按 2.5.5.3 测定其照射强度的辐照度值, 以确定是否与产品质量标准或企业标准中规定的相同。必要时, 以与箱门(或盖)一样大小的铝板, 用胶带固定于消毒箱的门框(或消毒箱盖)上。铝板中央处钻一直径为 15mm 小圆孔, 开启箱内紫外线灯, 照射 5min, 待稳定后, 通过铝板上小圆孔用照度计测定射出紫外线的辐照度值 ($\mu\text{W}/\text{cm}^2$)。

2.5.6.4 对微生物杀灭效果的测定

(1) 细菌及其芽孢、龟分枝杆菌和真菌杀灭效果的测定

1) 按 2.1.2 所示相关方法制备细菌及其芽孢和真菌菌片。

2) 每次试验只测试一种微生物, 以防交叉污染。试验用样片每 2 片为一组, 平放于无菌平皿中, 勿重叠。箱内容积过小时, 可将试验细菌及其芽孢和真菌直接涂染于所设计消毒的物品表面进行试验, 每 2 件为一组。

3) 根据消毒箱容积的大小, 放入一定数量装有样片的平皿, 或直接涂染的样本, 但消毒箱内应同时将所设计消毒的物品摆放至使用说明书中规定的最高装载量(满载)。

4) 关闭消毒箱门(或盖), 打开紫外线灯, 照射至规定时间。

5) 取出样本, 按 2.1.3 所示方法进行活菌计数。

6) 以试验用的同批菌片置室温下, 待实验组菌片消毒达规定作用时间后, 立即将该批菌片 2 片分别放入含 5.0mL PBS 试管中, 各振打 80 下。取样液按 2.1.3 所示方法进行活菌培养计数, 作为阳性对照组。

7) 用同批次试验用培养基或 PBS 接种培养基培养, 作为阴性对照组。

8) 试验重复3次。

(2) 评价规定

每次试验阳性对照组回收菌量为 1×10^6 cfu/片 $\sim 5 \times 10^6$ cfu/片, 阴性对照组无菌生长, 各次试验的杀灭对数值均 ≥ 3.00 , 判定为消毒合格。

2.5.6.5 注意事项

试验时, 应注意箱内物品有无未被紫外线直接照到处(如被箱内支架遮挡)。如实用中拟消毒物品有可能处于该位置, 在染菌样片布点时应考虑观察该部位的消毒效果。

2.5.7 环氧乙烷灭菌器灭菌效果鉴定试验

2.5.7.1 目的

用于验证环氧乙烷灭菌器对细菌芽孢的灭菌效果。

2.5.7.2 实验器材

(1) 试验菌株 枯草杆菌黑色变种(ATCC 9372)芽孢或枯草杆菌黑色变种(ATCC 9372)芽孢灭菌指示物, 在柜内环氧乙烷浓度为 $600\text{mg/L} \pm 30\text{mg/L}$, 温度为 $54^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, 相对湿度为 $60\% \pm 10\%$ 条件下, 芽孢的ST值 $\geq 7.8\text{min}$, KT值 $\leq 58\text{min}$, D值为 $2.6\text{min} \sim 5.8\text{min}$

(2) 染菌载体 布片, 面积为 $10\text{mm} \times 10\text{mm}$, 必要时增用或改用其他载体。菌片回收菌量为 1×10^6 cfu/片 $\sim 5 \times 10^6$ cfu/片

(3) 聚乙烯塑料袋 大小为 $60\text{mm} \times 40\text{mm}$, 材料厚度为 $0.15\text{mm} \sim 0.25\text{mm}$

(4) 满载用物品 使用说明书中规定的灭菌物品

2.5.7.3 环氧乙烷灭菌器灭菌确认试验操作程序(半周期法)

(1)按 2.1.2 制备枯草杆菌黑色变种芽孢悬液和菌片。菌片放入聚乙烯塑料袋内密封包装, 每袋 2 片。每次试验需用多少袋菌片应依据灭菌柜室可用体积大小确定: a) 体积 $\leq 5\text{m}^3$ 时, 用 10 袋(20个菌片); b) $5\text{m}^3 < \text{体积} \leq 10\text{m}^3$ 时, 每增加 1m^3 , 应增加1袋(10袋 ~ 15 袋); c) 体积 $> 10\text{m}^3$ 时, 每增加 2m^3 , 应增加1袋(≥ 16 袋)。

(2) 将装有菌片的聚乙烯塑料袋或灭菌指示物先放置被灭菌物品中, 然后再放入灭菌柜。放置点的选择首先应考虑最难灭菌位置(可根据产品设计参数或温湿度监测数据, 如靠近柜室不受热的位置或柜门处等), 其余再均匀分布于灭菌柜室中。

(3) 按使用说明书所规定的环氧乙烷浓度、0.5倍作用时间(灭菌周期中灭菌处理时间的一半)、柜内的温度和相对湿度, 在满载条件下进行环氧乙烷灭菌处理。灭菌周期一般包括a) 排除空气; b) 预处理; c) 加入灭菌剂; d) 灭菌处理; e) 去除灭菌剂; f) 换气; g) 加入空气至大

气压。

(4) 灭菌完毕，取出菌片，分别移种于 5mL TSB中，置 37℃ 恒温培养箱内培养 7d，自第 3 日起每日观察结果，混浊表面有皱褶状菌膜者表示有菌生长，判定为阳性；澄清者表示无菌生长，判定为阴性。对难以判定的肉汤管，取其中 0.2mL 悬液接种TSA平板，用灭菌 L 棒涂布均匀，置 37℃ 恒温培养箱中培养，48h 后涂片染色，在显微镜下观察菌落形态，或进一步做其他试验，以判断生长者是否为试验菌。若有非试验菌污染，应查找原因重新进行试验。或取出灭菌指示物，经 37℃±1℃ 培养 7d（灭菌指示物的培养方法按说明书执行），作为试验组。

(5) 以同批试验用菌片 2 片放在室温下，待试验组灭菌接种后，立即分别移入含 5.0mLPBS 试管中，振打 80次，按 2.1.3 所示方法进行活菌培养计数，作为菌数对照组。

(6) 以同批试验用菌片 2片放在室温下，待试验组灭菌接种后，立即分别接种于 5.0mL TSB，放入培养箱中培养 7d，自第 3 日起每日与试验组同时观察结果，作为阳性对照组。

(7) 以未染菌载体 2 片分别接种于 5.0mL TSB放入培养箱中作定性培养，观察有无细菌生长，作为阴性对照组。

(8) 试验重复 5 次。

2.5.7.4 评价规定

每次试验菌数对照组的回收菌量为 1×10^6 cfu/片~ 5×10^6 cfu/片；阳性对照组有菌生长；阴性对照组无菌生长；所有试验菌片均无菌生长判定为灭菌合格。对难以判断结果的TSB，取其中 0.2mL 悬液接种营养琼脂平板，用无菌L 棒涂抹均匀，置 37℃ 恒温培养箱内培养。48h 后涂片染色，显微镜下观察菌落形态，或进一步做其他试验，判断有无生长或生长的是否为试验菌。若为非试验菌，则应重新进行试验。

用灭菌指示物进行评价时，结果判定按说明书进行。

2.5.7.5 注意事项

(1) 温度和相对湿度对环氧乙烷气体杀菌效果影响较大，故应严格控制试验中的有关条件。

(2) 环氧乙烷液体可溶解聚乙烯、聚氯乙烯等，不可将其液体滴落于此类物品上。环氧乙烷不论液体或气体，均可损坏赛璐璐制品，试验时应予注意。

(3) 环氧乙烷是一种易燃易爆并具有中等毒性的药品为保证试验安全进行，操作及试验人员应事先熟悉环氧乙烷性能和设备操作规程，并严格遵守安全守则。投药时，应缓慢打开钢瓶阀门，勿使药液突然喷出。操作现场应采取防火防爆措施，不得有明火作业及电火花发生，严禁穿着有钉的鞋进入现场，以防摩擦产生火花而引发安全事故。

(4) 工作环境中应通风良好。灭菌结束，打开容器，在排放环氧乙烷气体时，必须开窗。

工作现场空气中环氧乙烷最高容许浓度为 $2\text{mg}/\text{m}^3$ 。如人员吸入过多环氧乙烷气体，可引起头痛，呕吐等中毒症状，严重者可致肺水肿等。如出现中毒症状，需迅速离开现场至通风良好处休息。轻者呼吸新鲜空气，直到症状消除；重者应及时送医院治疗。

(5) 现场监测灭菌效果时，灭菌作用时间按说明书执行，不必使用 0.5 倍作用时间。

2.5.8 臭氧消毒柜消毒效果鉴定试验

2.5.8.1 目的

用于验证臭氧消毒柜（下简称消毒柜）对物体表面上微生物的消毒效果。

2.5.8.2 实验器材

(1) 实验微生物 金黄色葡萄球菌 (ATCC 6538)、大肠杆菌 (8099)、铜绿假单胞菌 (ATCC 15442)、白色念珠菌 (ATCC 10231) 和脊髓灰质炎病毒 I 型疫苗株

(2) 载体 布片或玻片，面积为 $10\text{mm} \times 10\text{mm}$ ，必要时可增用或改用其他载体

(3) 臭氧浓度测定仪

(4) 温度与湿度计

(5) 满载用物品 使用说明书中规定的消毒物品

2.5.8.3 臭氧浓度测定

(1) 仪器测定 臭氧浓度可用臭氧测定仪测定。操作按仪器使用说明书规定进行。

(2) 化学滴定法测定 参考本规范理化鉴定实验技术。

2.5.8.4 杀菌试验操作程序

(1) 按使用说明书中的额定参数设定进行消毒试验。

(2) 按 2.1.2 所示相关方法制备菌片。

(3) 按说明书中规定的最高装载量装载满载用物品。

(4) 以 2 片菌片一组，置一无菌平皿中，勿重叠。试验时，将放有菌片的平皿盖打开，分层布放，每层内、中、外各点分别放一组样本。

(5) 按照使用说明书要求，调节柜内温度与相对湿度，开启臭氧消毒柜进行消毒。

(6) 消毒至规定时间，取出菌片，按 2.1.3 所示方法进行活菌培养计数。因载体对臭氧气体的吸收量少，臭氧分解快，不必进行去除残留臭氧的处理。

(7) 将未消毒的菌片 2 片，放置于柜外室温下。待试验组消毒完毕后，取阳性对照菌片 2 片，同时进行活菌培养计数检测，作为阳性对照组。

(8) 取本次试验同批的 PBS 和培养基接种培养基培养，作为阴性对照组。

(9) 试验重复 3 次。

2.5.8.5 脊髓灰质炎病毒灭活试验操作程序

(1) 按 2.1.10 所示方法制备脊髓灰质炎病毒载体。

(2) 在消毒柜满载的情况下，将干燥的染有脊髓灰质炎病毒的载体置灭菌平皿内，每平皿放 2 片，勿重叠。在消毒柜每层的内、外两个点各放一含染有脊髓灰质炎病毒载体的平皿（大型碗柜可在内、中、外各放一平皿），平皿盖打开。

(3) 关闭柜门，开启电源，按原规定程序进行消毒。消毒完毕，按说明书规定的时间，打开柜门，盖上平皿取出。将载体移入含 1mL 细胞维持液的试管中。振打80次，取样按 2.1.10 测定病毒滴度，作为试验组。

(4) 将染有脊髓灰质炎病毒的载体 2 片柜外室温放置，与试验组同时分别移入含 1mL 细胞维持液的试管中。振打80次，取样按 2.1.10测定病毒滴度，作为阳性对照组。

(5) 用不含脊髓灰质炎病毒的完全培养基作为阴性对照组，观察细胞是否生长良好。

(6) 试验重复 3 次。

(7) 计算病毒的灭活对数值。

2.5.8.6 评价规定

每次细菌杀灭试验，阳性对照组回收菌量在 1×10^6 cfu/片 $\sim 5 \times 10^6$ cfu/片，阴性对照无菌生长，试验组杀灭对数值均 ≥ 3.00 ，判定为消毒合格。

每次脊髓灰质炎病毒灭活试验，阳性对照组病毒对数值为 4~6，阴性对照组细胞生长良好，试验组灭活对数值 ≥ 3.00 ，判定为消毒合格。

2.5.8.7 注意事项

(1) 空气中臭氧浓度不得超过 $0.16\text{mg}/\text{m}^3$ ，试验场所应保持通风良好。

(2) 湿度影响臭氧气体对细菌的杀灭效果，试验时必须保持一致。

2.5.9 臭氧水消毒器对物品表面消毒效果鉴定试验

2.5.9.1 目的

用于验证臭氧水消毒器产生的臭氧水的消毒效果。

2.5.9.2 实验器材

(1) 实验微生物 金黄色葡萄球菌 (ATCC 6538)、大肠杆菌 (8099)、铜绿假单胞菌 (ATCC 15442)、白色念珠菌 (ATCC 10231) 和脊髓灰质炎病毒 I 型疫苗株

(2) 载体 布片，面积为 $10\text{mm} \times 10\text{mm}$ ，必要时可增用或改用其他载体

(3) 中和剂 采用 0.1% 硫代硫酸钠、0.1% 吐温80的PBS

(4) 臭氧浓度测定仪

- (5) 温度与湿度计
- (6) 500mL 塑料杯
- (7) 水流量计 (1L/min~10L/min)
- (8) 不锈钢网

2.5.9.3 臭氧浓度测定

仪器测定法按仪器使用说明书要求进行。

化学滴定法测定参考本规范理化鉴定实验技术。针对不同原理的设备还需分别按下列要求测定。

(1) 通过式臭氧消毒设备

测定水样流出消毒设备后臭氧浓度由高到低的衰变曲线。测定时,若出水流量可调,设 3 个流量(流量大小不同臭氧含量不同),若出水流量不可调,则按说明书要求设 1 个流量,各流量水样流出消毒设备后,即刻测定水样中臭氧含量,然后再将水样放 20℃ 水浴中,设 5个~6个时间段,分别测定水样中臭氧含量,并绘制臭氧浓度衰变曲线。

(2) 暴气式臭氧消毒设备

测定一定容量的水体中臭氧浓度由低到高,直到臭氧浓度达饱和时的浓度变化曲线。测定时,无专用容器者,设 3L 和 6L 两个容量的水样,若无专用容器但需在更大容量的水样中进行试验者,视消毒设备状况,按使用说明书要求调整水样用量。有专用容器者,按说明书要求,加入规定容量的水样,通入臭氧气体,设 5个~6个时间段(应测出臭氧浓度达饱和时的最短时间),分别测定水样中臭氧含量,并绘制臭氧浓度变化曲线。

2.5.9.4 杀灭微生物试验操作程序

按臭氧设备制备臭氧水消毒剂的方式分为暴气式与通过式两类。

(1) 暴气方式臭氧设备制备臭氧水的杀灭微生物试验

- 1) 按 2.1.2 所示相关方法制备菌片。
- 2) 有专用容器者,按说明书要求向专用容器内加入规定容量的无菌蒸馏水;无专用容器者,用容量 $\geq 3000\text{mL}$ 的烧杯,盛装 3000mL 无菌蒸馏水样。

若无专用容器但需在更大容量的水样中进行试验者,视消毒设备状况,按使用说明书要求调整水样用量。

3) 将不锈钢网放盛水容器底部中央,染菌布片放不锈钢网表面,染菌布片上再盖一不锈钢网片。

4) 连接微孔扩散装置与臭氧气源出口,开启臭氧消毒设备,开始消毒处理。

5) 待臭氧暴气浸泡消毒至说明书中规定作用时间,0.5倍和 1.5倍的作用时间,分别以无菌操作方法取出样片,移入含 5mL 中和剂溶液的试管中,中和 10min,进行活菌计菌。

6) 试验同时设阳性对照和阴性对照组, 阳性对照用无臭氧气体代替臭氧气体, 在水样体积和暴气量等相同条件下, 将染菌样片暴气浸泡至最长作用时间, 取出样片, 进行活菌计数。

7) 试验重复3次。

(2) 通过式臭氧水杀灭微生物试验按流动载体浸泡试验

1) 按 2.1.2 所示相关方法制备菌片。

2) 将臭氧水消毒设备开机 5min, 使臭氧水中臭氧含量稳定。

3) 微生物试验按流动载体浸泡试验 (见 2.1.7.6)。

4) 试验重复3次。

2.5.9.5 评价规定

每次试验阳性对照组的回收菌量在 1×10^6 cfu/片 $\sim 5 \times 10^6$ cfu/片, 阴性对照组无菌生长, 试验组杀灭对数值 ≥ 3.00 , 判定为消毒合格。

2.5.10 酸性氧化电位水生成器消毒效果鉴定试验

2.5.10.1 目的

用于验证酸性氧化电位水生成器产生的酸性氧化电位水的消毒效果。

2.5.10.2 实验器材

(1) 实验微生物 金黄色葡萄球菌 (ATCC 6538)、大肠杆菌 (8099)、铜绿假单胞菌 (ATCC 15442)、白色念珠菌 (ATCC 10231)、黑曲霉菌 (ATCC 16404) 孢子、枯草杆菌黑色变种 (ATCC9372) 芽孢和脊髓灰质炎病毒 I 型疫苗株

(2) 中和剂 杀菌试验采用 0.05% 硫代硫酸钠、0.1% 吐温80的生理盐水

病毒灭活试验采用 0.05% 硫代硫酸钠的PBS

(3) pH 测定仪和ORP 测定仪

2.5.10.3 杀灭微生物试验操作程序

(1) 菌悬液的制备

按 2.1.2 所示相关方法制备菌悬液。必要时, 可增设其他试验微生物。用 5.0mL 吸管吸取 3.0mL ~ 5.0 mL 稀释液加入斜面试管内, 反复吹吸, 洗下菌苔。随后, 用 5.0mL 吸管将洗液移至另一无菌试管中, 用电动混匀器混合 (振荡) 20s, 或在手掌上振打80次, 以使细菌悬浮均匀, 然后用稀释液将其制成细菌浓度为 2×10^9 cfu/mL $\sim 1 \times 10^{10}$ cfu/mL 的试验用菌悬液 (对白色念珠菌、黑曲霉菌孢子菌悬液浓度为 2×10^8 cfu/mL $\sim 1 \times 10^9$ cfu/mL)。

(2) 悬液定量杀菌试验操作程序

1) 开启生成器, 待产生的酸性氧化电位水中有效成分处于稳定状态时, 用 250mL 磨口三角瓶接取满瓶后, 盖好瓶盖, 置 $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 水浴备用。

2) 取消毒试验用无菌大试管, 先加入 0.05mL 试验用菌悬液, 再加入 0.05mL 有机干扰物质, 混匀, 用无菌吸管加入酸性氧化电位水 9.9mL, 混匀。

3) 作用至规定时间, 分别吸取 0.5mL 试验菌与酸性氧化电位水混合液加于含 4.5mL 中和

剂试管中，混匀，作用 10min，作为试验组。

4) 同时用标准硬水代替酸性氧化电位水，进行平行试验，作为阳性对照组。

5) 用同批次的中和剂、培养基作为阴性对照组。

6) 按2.1.3将各组样本进行活菌培养计数。

7) 试验重复3次。

8) 计算杀灭对数值。

(3) 评价规定

每次杀菌试验阳性对照组的回收菌量为 1×10^7 cfu/mL \sim 5×10^7 cfu/mL，阴性对照组无菌生长，试验组杀灭对数值 ≥ 5.00 ，判定为消毒合格。对白色念珠菌和黑曲霉菌孢子，阳性对照组的回收菌量为 1×10^6 cfu/mL \sim 5×10^6 cfu/mL，阴性对照组无菌生长，试验组的杀灭对数值 ≥ 4.00 ，判定为消毒合格。

2.5.10.4 脊髓灰质炎病毒灭活试验

(1) 按 2.1.10 所示方法制备脊髓灰质炎病毒悬液。

(2) 取脊髓灰质炎病毒悬液 0.05mL 加入到无菌试管中，再加入 0.05mL 有机干扰物，然后加入 4.9mL 酸性氧化电位水，混匀，至 20℃ 水浴中作用至规定时间。

(3) 取 0.1mL 病毒与酸性氧化电位水混合液，加入到含 0.9mL 中和剂的试管中。振打混合后，取样按 2.1.10 所示方法测定病毒滴度。

(4) 用细胞维持液代替酸性氧化电位水，其余步骤与试验组相同，作为阳性对照组。

(5) 用不含脊髓灰质炎病毒的完全培养基作为阴性对照组。

(6) 试验重复 3 次。

(7) 计算病毒的灭活对数值。

(8) 评价规定

每次试验阳性对照组病毒滴度对数值为5~7，阴性对照组细胞生长良好，灭活对数值 ≥ 4.00 ，判定为消毒合格。

2.5.10.5 现场和模拟现场试验

酸性氧化电位水现场和模拟现场试验所用实验器材，染菌方法，采样方法，培养方法和评价方法与（2.2消毒剂模拟现场和现场消毒鉴定试验）相同。消毒方法视消毒对象而定，对瓜果蔬菜、餐饮具、医疗器械、较小的物体表面（如塑料玩具），采用流动冲洗浸泡的方法，即将被消毒物品放入容器内，将酸性氧化电位水连续不断地加入到容器中，使被消毒物品完全浸泡于酸性氧化电位水中；卫生手、皮肤粘膜的消毒时采用流动冲洗的消毒方法；对环境地面和物体表面（如桌、台面）可采用无纺布等在酸性氧化电位水中浸湿后擦洗消毒的方法。消毒时间按厂家使用说明书规定的消毒作用时间。

2.5.11 甲醛低温蒸汽灭菌柜灭菌效果鉴定试验

2.5.11.1 目的

用于验证甲醛低温蒸汽灭菌柜对物体表面污染细菌芽孢的灭菌效果。

2.5.11.2 实验器材

- (1) 实验菌株 嗜热脂肪杆菌 (ATCC 7953) 芽孢菌片, 含菌量要求为 1×10^6 cfu/片 ~ 5×10^6 cfu/片
- (2) 载体 滤纸片, 面积为 $16\text{mm} \times 6.2\text{mm}$
- (3) 灭菌过程验证装置 (PCD) 管材为聚四氟乙烯
- (4) 嗜热脂肪杆菌恢复培养基
- (5) 溴甲酚紫蛋白胨培养液
- (6) 满载用物品 使用说明书中规定的物品
- (7) 甲醛气体浓度测定仪
- (8) 气相色谱仪

2.5.11.3 工作环境中甲醛浓度测定

- (1) 测定灭菌前、灭菌过程中、灭菌结束开启灭菌柜门时, 距灭菌柜 1m 内甲醛浓度及排气时排水口的甲醛浓度。
- (2) 测定方法按甲醛浓度测定仪使用说明书进行。

2.5.11.4 灭菌鉴定试验步骤

- (1) 按 2.1.2 制备嗜热脂肪杆菌芽孢悬液和菌片。菌片放入PCD中设定的位置, 将PCD放入聚乙烯塑料袋内密封。每层四角和中央各放置一个PCD。
- (2) 按使用说明书所规定的甲醛浓度、0.5倍有效作用时间(灭菌周期中灭菌处理时间的一半)、柜内温度, 在满载条件下进行灭菌处理。
- (3) 灭菌完毕, 取出菌片, 分别移种于 5mL 溴甲酚紫蛋白胨培养液中, 置 56°C 恒温培养箱内培养 7d, 作为试验组。
- (4) 以同批试验用菌片 2 片放在室温下, 待试验组灭菌接种后, 立即分别移入含 5.0mL PBS 试管中, 振打 80次, 按 2.1.3 所示方法进行活菌培养计数, 作为菌数对照组。
- (5) 以同批试验用菌片 2 片放在室温下, 待试验组灭菌接种后, 立即分别接种于 5.0mL 溴甲酚紫蛋白胨培养液, 放入培养箱中培养 7d, 作为阳性对照组。
- (6) 以未染菌载体 2 片分别接种于 5.0mL 溴甲酚紫蛋白胨培养液, 放入培养箱培养 7d, 作为阴性对照组。
- (7) 试验重复 5 次。

2.5.11.5 评价规定

每次试验中的菌数对照组检测回收菌量均达 1×10^6 cfu/片 ~ 5×10^6 cfu/片, 阳性对照组有菌生长, 阴性对照组无菌生长, 试验组无菌生长判定为灭菌合格。

2.5.12 过氧化氢气体等离子体灭菌效果鉴定试验

2.5.12.1 目的

验证过氧化氢气体等离子灭菌柜对细菌芽孢的灭菌效果。

2.5.12.2 实验器材

- (1) 实验菌株 枯草杆菌黑色变种 (ATCC9372) 芽孢, 抗力鉴定合格
嗜热脂肪杆菌 (ATCC 7953) 芽孢, 抗力鉴定合格
- (2) 染菌载体 不锈钢片、钢针、聚四氟乙烯片等, 必要时可增用或改用其他载体, 载体回收菌量为 1×10^6 cfu/载体 $\sim 5 \times 10^6$ cfu/载体
- (3) 培养基 TSA 见附录 A
TSB 见附录 A
溴甲酚紫蛋白胨培养液 见附录 A
- (4) 中和剂 0.1% 的硫代硫酸钠
- (5) 含中和剂的 TSB
- (6) 磷酸盐缓冲液 (0.03mol/L, pH 7.2)
- (7) 模拟医疗器械管腔 材质、内径和长短应与厂家提供的说明书中最难灭菌的消毒对象相一致
- (8) 不锈钢管腔 内径约为 1.2cm \sim 1.5cm, 长度为 3.0cm \sim 5.0cm, 两端有接口, 可与模拟医疗器械管腔连接, 不锈钢管腔内体积应小于或等于模拟医疗器械管腔内体积, 管腔一端应有可密封的接口, 便于放置染菌载体
- (9) 满载用物品 使用说明书中规定的物品

2.5.12.3 过氧化氢气体等离子体强度的测定按有关规定进行。

2.5.12.4 灭菌效果测定操作程序

- (1) 将染菌载体放入模拟医疗器械管腔中间位置, 或不锈钢管腔内, 两端分别连接模拟医疗器械管腔, 置专用等离子体灭菌包装袋内。
- (2) 灭菌于满载条件下进行。
- (3) 将放有染菌载体的专用包装袋分别置于灭菌柜各层最难灭菌的位置, 关闭柜门。
- (4) 按说明书的要求加入规定量及规格的过氧化氢。
- (5) 设定半周期灭菌程序, 并启动该灭菌程序, 进行灭菌处理试验。
- (6) 灭菌程序结束后, 在无菌条件下取出染菌载体, 将枯草杆菌黑色变种芽孢载体放入含中和剂的 TSB 培养液, 37℃ 培养, 将嗜热脂肪杆菌芽孢载体放入溴甲酚紫蛋白胨培养液, 56℃ 培养, 作为试验组。
- (7) 将同批试验用 2 个枯草杆菌黑色变种芽孢载体分别放入含 5.0mL 稀释液试管中, 各

振打 200 次；将同批试验用 2 个嗜热脂肪杆菌芽孢载体分别放入含 5.0mL 稀释液试管中，各振打 200 次。按 2.1.3 进行活菌培养计数，作为菌数对照组。

(8) 将同批试验用 2 个枯草杆菌黑色变种芽孢载体放入含中和剂的 TSB 培养液，37℃培养；将同批试验用 2 个嗜热脂肪杆菌芽孢载体放入溴甲酚紫蛋白胨培养液，56℃培养，作为阳性对照组。

(9) 将同批试验用未染菌载体 2 个放入含中和剂的 TSB 培养液，37℃培养，2 个放入溴甲酚紫蛋白胨培养液，56℃培养，作为阴性对照组。

(10) 试验重复 5 次。

2.5.12.5 评价规定

每次试验的菌数对照组回收菌量均为 1×10^6 cfu/载体 $\sim 5 \times 10^6$ cfu/载体；阳性对照组有菌生长；阴性对照组无菌生长；试验组无菌生长时判定为灭菌合格。

2.5.13 内镜清洗消毒机消毒效果鉴定试验

2.5.13.1 目的

用于验证内镜消毒机对模拟内镜内表面污染细菌芽孢的消毒效果。

2.5.13.2 实验器材

(1) 实验菌株 枯草杆菌黑色变种 (ATCC 9372) 芽孢

(2) 培养基 胰蛋白胨大豆琼脂培养基 (TSA)

(3) 中和剂 经中和剂鉴定试验合格

(4) 磷酸盐缓冲液 (0.03mol/L, pH 7.2)

(5) 模拟内镜 聚四氟乙烯管，外径 10mm \sim 12mm，内径 6mm，总长度 1000mm，分别在 50mm、500mm、950mm 处剪断，共分为 4 截。其内壁能与载体外壁紧密相套连接。

(6) 染菌载体 聚四氟乙烯管 (外径 6mm，内径 4mm，长度 30mm)，回收菌量为 1×10^6 cfu/载体 $\sim 5 \times 10^6$ cfu/载体

2.5.13.3 试验方法

(1) 将 3 个染菌载体两端依次与各截模拟内镜紧密相套连接，使其完全套入到模拟内镜管内。按说明书将模拟内镜装放于消毒机内设定的位置，开启内镜清洗消毒机按设定的消毒程序进行处理。

(2) 消毒程序结束后，以无菌操作方式取出各载体，分别加入到含有 10mL 中和剂溶液的试管内，振打 200 次，做系列 10 倍稀释后选适宜稀释度按 2.1.3 进行活菌培养计数，作为试验组。

(3) 取 2 个染菌载体，不做消毒处理，分别加入到含有 10mL 中和剂溶液的试管内，振打 200 次，做系列 10 倍稀释后选适宜稀释度按 2.1.3 进行活菌培养计数，作为阳性对照组。

(4) 分别取中和剂和稀释液接种两个平皿，每平皿 1.0mL，作为阴性对照组。

(5) 试验重复 3 次。计算各次试验各载体的芽孢减少对数值。

2.5.13.4 评价规定

每次试验阳性对照组回收菌数为 1×10^6 cfu/载体 $\sim 5 \times 10^6$ cfu/载体；阴性对照组无菌生长；试验组各载体芽孢减少对数值 ≥ 4.00 ，判定为消毒合格。

2.6 灭菌与消毒指示物鉴定试验

2.6.1 压力蒸汽灭菌生物指示物鉴定试验

2.6.1.1 目的

测定压力蒸汽灭菌生物指示物所含菌量，以及在 $121^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ 饱和蒸汽作用下的存活时间、杀灭时间与 D 值是否达到要求指标。

2.6.1.2 实验器材

(1) 压力蒸汽灭菌生物指示器材抗力检测器 (biological indicator evaluator resistometer, pressured steam sterilization, BIER) 技术指标：时间控制以秒为单位；温度控制以 0.1°C 为单位；加热至预定温度时间应 ≤ 10 s；排气时间 ≤ 5 s；试验期间柜室内温度误差 $\leq \pm 0.5^\circ\text{C}$ 。

(2) 56°C 恒温培养箱

(3) 溴甲酚紫蛋白胨培养液 见附录A

(4) 嗜热脂肪杆菌恢复琼脂培养基 见附录A

(5) 磷酸盐缓冲液 (PBS, 0.03mol/L , pH7.2)

(6) 回收液 (含 0.1% 吐温80的PBS液)

2.6.1.3 含菌量的测定

抽取 3 个生物指示物样本。样本如为菌悬液式指示，直接用 PBS 作适当稀释后，按 2.1.3 规定进行活菌培养计数即可；样本如为载体式指示物，应先置回收液中洗下芽孢，并以 PBS 稀释至适当浓度，接种于TSA (或恢复培养基)， $56^\circ\text{C} \sim 60^\circ\text{C}$ 培养 72h，计数菌落数。

2.6.1.4 存活时间和杀灭时间的测定

(1) 试验按作用时间分为 3.9min 和 19.0min 两组，各组测定20个样本。

(2) 先将抗力检测器的电热蒸汽发生器加满蒸馏水，以不超过最高水位为度。

(3) 接通检测器电源，预热，使达到预定蒸汽压。

(4) 设定灭菌温度 ($121^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$) 和作用时间。

(5) 启动抗力检测器工作程序，使自动运行两个循环，以保证柜室等得到充分的预热。

(6) 将20个样本置专用载物架后放入抗力检测器柜室中，保证每个样本都可充分暴露于蒸汽中。

(7) 关闭柜门，先设定一组所规定的灭菌时间。

(8) 启动抗力检测器工作程序，使自动进行抽真空 \rightarrow 柜室加热 \rightarrow 灭菌处理 \rightarrow 排气。

(9) 打开柜门，取出样本。

(10) 紧接着重复(6)～(9)的程序进行另一组的测定。

(11) 取出的样本应尽快(勿超过2h)接种于溴甲酚紫蛋白胨培养液，放入56℃～60℃恒温培养箱，培养7d或按产品使用说明书规定的时间培养，观察最终结果。

2.6.1.5 D值的测定

(1) 抽取50个样本，在0min～20min范围内分成10个作用时间组进行试验。每组5个样本。作用时间递增幅度，可根据预备试验结果适当变动(最长时间必须达到使菌全部死亡的作用时间)。

(2) 将各组样本按2.6.1.4(2)～(9)所示程序，分次进行灭菌处理。

(3) 灭菌完毕，按2.6.1.3所示对各组样本分别进行含菌量的测定，培养基应选用恢复培养基。

(4) 计算每个作用时间样本上平均存活芽孢数的对数值。以作用时间为横坐标(X)，存活芽孢数的对数值为纵坐标(Y)，算出芽孢存活对数值与作用时间的回归方程($Y=a+bX$)。

(5) 计算各实际测定值与直线回归方程的相关程度(相关系数)。

(6) 根据所得直线回归方程式，计算D值。

2.6.1.6 稳定性试验

(1) 取包装完好并在产品使用说明书规定的储存条件下，存放足量产品。

(2) 达到说明书规定的储存期限(至少一年)时进行检测。检测时，先观察外观，特别注意指示剂中的培养液颜色有无变化。

(3) 在外观正常情况下，进一步按2.6.1.3、2.6.1.4所示方法测定活菌数量、存活时间、杀灭时间。

2.6.1.7 评价规定

(1) 含菌量 载体的含菌量为 1×10^6 cfu/载体～ 5×10^6 cfu/载体，菌悬液的含菌量为 1×10^6 cfu/ml～ 5×10^6 cfu/ml，判定为含菌量合格。

(2) 存活时间和杀灭时间 在 $121^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ 饱和蒸汽条件下，存活时间 ≥ 3.9 min，杀灭时间 ≤ 19.0 min。测定结果，3.9min组(存活时间组)20个生物指示管均有菌生长；19.0min组(杀灭时间组)20个生物指示管均无菌生长时，判定为合格。其中各组有一个以下样本未达规定要求，可重复试验2遍，如各样本均达规定要求，仍判定为合格。

(3) D值 在 $121^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ 饱和蒸汽条件下，为1.3min～1.9min。

(4) 稳定性试验 菌量数下降 $< 50\%$ ，存活时间和杀灭时间又在规定合格范围内者，判定为合格。

2.6.1.8 注意事项

(1) 进行生物指示剂鉴定时，必须用压力蒸汽灭菌生物指示器材抗力检测器进行，不能用普通压力蒸汽灭菌器代替。

(2) 每次测定, 间隔时间不宜超过100s。如间隔过长, 检测器必须重新预热。

(3) 抗力测定时不能用普通培养基代替恢复培养基。

(4) 严格无菌操作, 尤其是对生物指示菌片进行存活和杀灭时间测定时。

(5) 对生物指示菌片测定时, 操作程序与判断标准与上述生物指示管基本相同, 只是将单片菌片装于牛皮纸袋中, 以防灭菌时被冷凝水浸湿。此外灭菌完毕, 需将样本分别接种于溴甲酚紫蛋白胨培养液中培养, 7d或按产品使用说明书规定的时间观察最终结果。

2.6.2 压力蒸汽灭菌化学指示卡鉴定试验

2.6.2.1 目的

测定压力蒸汽灭菌化学指示卡产品在饱和蒸汽作用下所产生的颜色变化, 与拟代表的温度、杀菌作用时间的吻合情况, 判断该指示卡是否合格。

2.6.2.2 实验器材

(1) 压力蒸汽灭菌生物指示物抗力检测器

(2) 温度测定仪(温度计) 精确度0.1℃, 准确度0.5℃

2.6.2.3 实验分组

试验根据作用温度和时间分组, 一般情况下, 以使用说明书标明的变色温度和作用时间为第1组, 而后温度不变, 作用时间缩短5min为第2组, 再缩短5min为第3组; 另外, 作用时间不变, 温度下降2℃为第4组, 再下降2℃为第5组。预真空式压力蒸汽灭菌第2组和第3组, 每组只间隔1min即可。

例如, 某一下排气式压力蒸汽灭菌化学指示卡使用说明书写明, 在温度为121℃, 作用20min可全部达到变色完全(与标准合格色块相同)。对该指示卡鉴定试验时, 可分组如下:

第1组 121℃, 20min;

第2组 121℃, 15min;

第3组 121℃, 10min;

第4组 119℃, 20min;

第5组 117℃, 20min。

又如, 某一预真空式压力蒸汽灭菌化学指示卡使用说明书写明, 在温度为132℃, 作用3min可全部达到变色完全。对该指示卡鉴定试验时, 可分组如下:

第1组 132℃, 3min;

第2组 132℃, 2min;

第3组 132℃, 1min;

第4组 130℃, 3min;

第5组 128℃, 3min。

根据需要进行稳定性试验时, 取包装完好并在产品使用说明书规定的储存条件下, 保存至一定时间(至少一年)的化学指示卡, 同样按上述方法分组进行检测。

2.6.2.4 实验室试验操作程序

- (1) 每组试验, 取 10 片化学指示卡和 1 个温度测定仪(温度计), 同时放入检测器中。
- (2) 操作抗力检测器, 将各组样本按 2.6.1.4 (2) ~ (9) 所示程序分次进行处理 (各组要求的温度和作用时间, 见 2.6.2.3)。
- (3) 立即打开柜门, 取出上述物品, 进行观察。
- (4) 检测时, 对比化学指示卡上变色色块与标准色块的颜色, 确认是否达到标准色块的合格要求; 观察温度测定仪(温度计) 所示温度。
- (5) 各组试验均重复 3 次。

2.6.2.5 评价规定

- (1) 每次试验均符合下列情况者判定为合格:
 - 1) 第 1 组指示卡 100% 变色完全, 第 2 与第 4 组指示卡 $\geq 50\%$ 变色完全, 第 3 与第 5 组指示卡 $\leq 20\%$ 变色完全;
 - 2) 每次测定温度与设定温度相差 $\leq 0.5^{\circ}\text{C}$ 。
 - 3) 使用温度测定仪时, 设定温度的维持时间与设定时间相差 $\leq 10\text{s}$ 。
- (2) 稳定性试验符合上述情况者, 判定为在保存期内稳定性试验合格。

2.6.2.6 注意事项

- (1) 测定时应使用饱和蒸汽, 否则可影响结果的准确性。
- (2) 温度测定仪(温度计) 检定时所发现的误差, 在记录试验温度时, 应将读数校正。
- (3) 重复试验要求不是只在同次试验中增加一些化学指示卡, 而是每重复一次试验即应进行一次压力蒸汽灭菌处理。

2.6.3 压力蒸汽灭菌化学指示胶带与化学指示标签的鉴定试验

2.6.3.1 目的

测定压力蒸汽灭菌用化学指示胶带与化学指示标签在设定温度的饱和蒸汽和作用时间下的变色情况, 判断该指示胶带和标签是否合格。

2.6.3.2 实验器材

- (1) 压力蒸汽灭菌生物指示物抗力检测器
- (2) 温度测定仪(温度计) 精确度 0.1°C , 准确度 0.5°C

2.6.3.3 实验分组

以使用说明书表明的变色温度和作用时间为第 1 组; 而后, 温度不变, 作用时间缩短 10min 为第 2 组; 另外, 时间不变, 温度下降 10°C 为第 3 组。预真空式压力蒸汽灭菌第 2 组可缩短至 1min。

例如, 使用说明书表明, 某种用于下排气式压力蒸汽灭菌的化学指示胶带, 在温度为 121°C , 作用 20min 可全部达到变色完全(与标准合格色块相同)。试验时, 可分组如下:

- 第 1 组 121°C , 20min;

第 2 组 121℃, 10min;

第 3 组 111℃, 20min。

又如,某一用于预真空与脉动真空式压力蒸汽灭菌的的化学指示胶带,说明书写明,在温度为 132℃,作用 3min 可全部达到变色完全。试验时,可分组如下:

第 1 组 132℃, 3min;

第 2 组 132℃, 1min;

第 3 组 122℃, 3min。

根据需要进行稳定性试验时,取包装完好并在产品使用说明规定的储存条件下,保存至一定时间(至少一年)的化学指示标签或胶带,同样按上述方法分组进行检测。

2.6.3.4 试验操作程序

(1) 每组试验取 5 个标签或来自不同卷的 5 段胶带,粘贴于厚纸片上,随同温度测定仪(温度计)放入检测器中。

(2) 操作抗力检测器,待达到要求的温度及其相应的压力,持续至设定的时间,排空柜室内蒸汽使成常压。

(3) 打开柜门,取出样本。

(4) 观察、记录化学指示胶带、标签,是否变色和温度测定仪(温度计)显示的温度。

(5) 各组试验重复 3 次。

2.6.3.5 评价规定

(1) 每次试验符合以下条件者判定为合格:

1) 第 1 组全部样本变色完全;

2) 第 2 和第 3 组变色完全的样本比例不超过 20%;

3) 每次测定温度与设定温度相差 $\leq 0.5^{\circ}\text{C}$ 。

(2) 稳定性试验符合上述情况者,判定为在保存期内稳定性试验合格。

2.6.3.6 注意事项

(1) 对既用于 121℃ 条件,又用于 132℃ 条件下监测的化学指示标签或胶带需同时进行两种温度条件下的检测。

(2) 对未印有变色完全的标准色块的指示胶带和标签,可依据生产者另外提供的完全变色样本,对变色完全与否进行判断。

2.6.4 B-D测试纸和一次性B-D测试包的鉴定试验

2.6.4.1 目的

测定B-D测试纸产品在饱和蒸汽作用下所产生的颜色变化,与代表的温度和时间以及是否有不可冷凝气体存在的情况吻合,判定B-D测试纸和一次性B-D测试包是否合格。

2.6.4.2 实验器材

(1) B-D测定仪 技术指标:时间控制以秒为单位;温度控制以 0.1°C 为单位;暴露期柜室

内温度误差 $\leq 0.5^{\circ}\text{C}$ ；加热到预定温度的时间 $\leq 10\text{s}$ ，排气时间 $\leq 5\text{s}$ ，包含3种循环方式：低大气压循环、跨大气压循环、高大气压循环；可以定量注入和泄露冷空气

(2) 标准布包 用棉布包，棉布的经、纬数范围分别为24~36、22~33，棉布包规格为 $(250\pm 20)\text{mm}\times(300\pm 20)\text{mm}\times(265\pm 15)\text{mm}$ ，重量为 $4.0\text{Kg}\pm 5\%$

(3) 温度测定仪（温度计） 精确度 0.1°C ，准确度 0.5°C

(4) 干热烤箱

2.6.4.3 实验分组

试验分为成功通过组、失败组和干热试验组，一般情况下，成功通过组在使用说明书标明的变色温度和作用时间下分别运行低大气压循环、跨大气压循环、高大气压循环（低大气压循环步骤：①压力下降到 5.0KPa ，②输入蒸汽使压力达到 97.0KPa ，③重复步骤①、②三次，④蒸汽输入达到设置运行压力，⑤在标明的变色温度和时间下暴露，⑥降压达到 5.0KPa ，⑦输入空气。跨大气压循环步骤：①降压至 5.0KPa ，②蒸汽输入达到 150.0KPa ，③排气降压到 50.0KPa ，④重复步骤②、③三次，⑤蒸汽输入达到设置压力数值减去 10.0KPa ，⑥降压到 $110.0\text{KPa}\sim 120.0\text{KPa}$ ，⑦重复步骤⑤、⑥一次，⑧蒸汽输入达到设置的压力数值，⑨在标明的变色温度和时间下暴露，⑩降压到 5.0KPa ，⑪输入空气。高大气压循环步骤：①压力降到 5.0KPa ，②蒸汽输入达到 95.0KPa ，③压力下降到 5.0KPa ，④重复步骤②、③一次，⑤蒸汽输入使压力达到设置压力数值减去 20.0KPa ，⑥降压至 $105.0\text{KPa}\sim 120.0\text{KPa}$ ，⑦重复步骤⑤、⑥两次，⑧输入蒸汽达到设置运行压力，⑨在标明的变色温度和时间下暴露，⑩降压至 5.0KPa ，⑪输入空气）。失败组按照4种不同的失败的方式分组，第1组：温度降低 2°C ，作用时间不变，在上述条件下分别运行低大气压循环、跨大气压循环、高大气压循环。第2组：修改脉动深度，暴露温度和时间不变，在上述条件下分别运行低大气压循环和跨大气压循环。第3组：诱导漏气，暴露温度和时间不变，在上述条件下运行低大气压循环。第4组：冷空气注入，暴露温度和时间不变，在上述条件下分别运行低大气压循环和高大气压循环。干热试验组在干热 $(140^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C})$ 条件下暴露 30min 。

例如，某一B-D测试纸使用说明书写明，在温度为 134°C ，作用 3.5min 。对该B-D测试纸鉴定试验时，可分组如下：

成功通过组 134°C ， 3.5min （运行低大气压循环、跨大气压循环、高大气压循环）

失败组

第1组 132°C ， 3.5min （运行低大气压循环、跨大气压循环、高大气压循环）

第2组 134°C ， 3.5min （降低脉动深度，运行低大气压循环和跨大气压循环）

第3组 134°C ， 3.5min （诱导漏气，运行低大气压循环）

第4组 134°C ， 3.5min （空气注入，运行低大气压循环和高大气压循环）

干热试验组 140°C ， 30min

2.6.4.4 操作程序

(1) 标准包的准备 试验前，将布包在温度为 $20^{\circ}\text{C}\sim 30^{\circ}\text{C}$ ，相对湿度为 $40\%\sim 60\%$ 的条件

下放置 4h。

(2) 对成功通过试验和失败试验, 操作B-D测定仪, 在第一次测试前需运行一个空循环, 预热暴露舱。将B-D测试纸放置在标准布包的中心, 将温度测定仪和标准布包同时放入B-D测定仪。分组按不同的参数和循环模式进行检测。检测结束后, 读取温度测定仪的参数, 同B-D测定仪的参数进行比较。

(3) 对干热试验, 将B-D测试纸直接放置在 140℃干热烤箱中 30min, 对于不耐受 140℃的B-D测试纸, 干热试验可以暴露在 130℃±2℃, 45min, 观察颜色变化。

(4) 对一次性B-D测试包的验证试验, 用一次性B-D测试包代替标准布包进行试验。

(5) 成功通过试验和失败试验重复 3 次, 干热试验重复5次。

2.6.4.5 评价规定

测定结果符合以下全部情况者判定为合格:①成功通过组 100% 完全均匀变色, 失败组 100% 变色不完全, 干热试验组无明显颜色变化。②温度测定仪记录的参数与设定的温度相差≤0.5℃; 设定温度的维持时间与设定时间相差≤10s。

2.6.4.6 稳定性试验

取包装完好并在产品使用说明书规定的储存条件下, 保存至一定时间(至少一年)的B-D测试纸, 用实验室试验(2.6.2.4)方法进行检测。若结果符合上述要求, 可视为指示卡在该保存期内性能稳定。

2.6.4.7 注意事项

(1) 测定时应使用饱和蒸汽, 否则可影响结果的准确性。

(2) 温度测定仪应同时记录暴露舱和标准布包中心点的温度。

(3) B-D测定仪为专用设备, 不得用一般压力蒸汽灭菌器代替。

(4) 对所要求的重复性试验, 不可只在同次试验中增加一些B-D测试纸, 而应每重复一次试验即应进行一次压力蒸汽灭菌处理。

2.6.5 紫外线灯管照射强度化学指示卡鉴定试验

2.6.5.1 目的

测定紫外线灯管照射强度化学指示卡在照射后颜色的变化与所受照射剂量的相关情况, 判定其是否合格。

2.6.5.2 实验器材

(1) 紫外线照度计

(2) 30W 低臭氧直管紫外线灯

(3) 紫外线灯测定架(测定时, 紫外线灯固定于测定架顶端。顶端高 2m, 可上下移动)

2.6.5.3 试验操作程序

(1) 将紫外线灯装于测定架上, 指示卡置灯管下方垂直中心位置的照射台上(灯管与照射台距离可上下调整, 以使达检测时规定的照射强度)。

(2) 开启紫外线灯, 待 5min 后灯管工作稳定, 按指示卡上各标准色块注明的强度, 分别调整好灯管下照射台中心测试点处的紫外线照射强度(用照度计测定), 以进行随后的照射试验。

(3) 照射试验时, 在测定架上对指示卡变色区进行照射。每 10 张指示卡为一组, 每组照射 1min, 每个强度照射 3 组(共 30 张指示卡)。

(4) 照射后, 即刻用肉眼观察照射过的指示卡, 比较其变色区色块与相应标准色块的颜色。

(5) 同时用照度计测定紫外线照射强度, 以便与指示卡结果核对。

(6) 变色区色块与标准色块, 以及指示卡检测结果与照度计测定结果的符合率均 $\geq 90\%$ 者, 判定为合格。

2.6.5.4 稳定性试验

(1) 在产品使用说明书规定的条件下, 存放足量指示卡。

(2) 达到规定的储存期限(至少一年)后, 按 2.6.5.3 方法进行检测和判定。

2.6.5.5 注意事项

(1) 为防失准, 所用照度计必须定期检测校正, 并在计量标定有效期内者。

(2) 试验中所用指示卡必须为同一批产品。

(3) 测试时, 对指示卡照射 1min, 时间应准确, 过长或过短均可影响结果。

(4) 光敏指示卡反应变色后, 久存可能颜色有所改变, 为此检测结果应即时观察并用文字记录。

(5) 大量样本的测试, 应分多次进行, 否则易发生系统误差。

(6) 电压波动可影响灯管放射的紫外线强度, 试验时应予注意。

2.6.6 消毒剂浓度试纸鉴定试验

2.6.6.1 目的

通过检测消毒剂浓度试纸(下简称试纸)颜色反应情况与溶液中消毒剂浓度相关程度, 判定其是否合格。

2.6.6.2 实验器材

消毒剂有效成分化学分析器材

2.6.6.3 测定分组

鉴定时, 应根据试纸使用说明书所列可测试消毒剂种类分别进行测试。测试中, 取比色卡上所示标准色块中的高、中、低 3 个浓度作为 3 个组。对每种消毒剂, 每组浓度测试 30 个样本(取自 3 个以上最小包装)。3 组的主要有效成分浓度, 均应分别用化学滴定法测定。

2.6.6.4 试验操作程序

(1) 配制各种消毒剂的高、中、低 3 组浓度溶液, 并按本规范中有关方法测定其主要有效成分浓度。

(2) 对各消毒剂浓度组, 分别用试纸浸于溶液中, 润湿即取出。达到使用说明书规定的作用时间后与标准色块比较, 确定所测浓度。每条试纸作为一个样本, 逐个样本分别进行测定。

(3) 将试纸测得的浓度与化学滴定法测得的浓度比较, 该组样本总符合率 $\geq 90\%$ 者为合格。

2.6.6.5 稳定性试验

(1) 取包装完好并在产品使用说明书规定的储存条件下, 存放足量产品。

(2) 达到规定的储存期限(至少一年)后进行检测。检测时, 先观察外观, 然后按 2.6.6.4 所示方法进行检测和判定。

2.6.6.6 注意事项

(1) 有效成分不稳定的消毒剂, 应在试纸检测后尽快以化学法滴定其浓度。

(2) 对于反应后颜色可消退的产品, 应及时观察结果, 并用文字记录。

2.7 抗(抑)菌效果鉴定试验

2.7.1 目的

测定抗(抑)菌产品对细菌和真菌的抗(抑)菌作用。

常使用的方法有抑菌环试验、最小抑制浓度测定试验、滞留抑菌效果测定试验、洗衣粉抗菌效果测定试验、振荡烧瓶试验、浸渍试验与贴膜试验, 可视情况选用。

2.7.2 抑菌环试验

2.7.2.1 原理

利用抑菌剂不断溶解经琼脂扩散形成不同浓度梯度, 以显示其抑菌作用。试验通过抑菌环大小以判断其是否具有抑菌能力。本试验适用于抑菌剂与溶出性抗(抑)菌产品的抗(抑)菌效果鉴定。

2.7.2.2 实验器材

(1) 实验菌株 金黄色葡萄球菌(ATCC 6538)、大肠杆菌(8099 或 ATCC 11229)、白色念珠菌(ATCC 10231)菌悬液(见 2.1.2)及根据抑菌剂特定用途所用的其他菌悬液

(2) 抑菌剂载体 5mm 直径圆形新华一号定性滤纸片, 经压力蒸汽灭菌处理后, 置 120℃ 烘干 2h, 保存备用

(3) 活菌培养计数所需器材 见 2.1.3

(4) 微量移液器 5 μ L~50 μ L, 可调式

(5) 游标卡尺

(6) 营养琼脂培养基、胰蛋白胨大豆琼脂培养基与沙堡琼脂培养基

2.7.2.3 操作程序

(1) 抑菌片的制备: 对液体抑菌剂, 取无菌并干燥的滤纸片。每片滴加实际使用浓度抑菌剂溶液 5 μ L, 然后将滤纸片平放于清洁的无菌平皿内, 开盖置恒温培养箱(37℃)中烘干, 或置室温下自然干燥后备用。

溶出性抗(抑)菌产品, 可直接制成直径为 5mm, 厚不超过 4mm 圆片(块), 每 4 片(块)一组。

(2) 阴性对照样片的制备: 取无菌干燥滤纸片, 每片滴加无菌蒸馏水 5 μ L, 干燥后备用。

溶出性抗（抑）菌产品的阴性对照样本，应取同种材质不含抑菌成份的样品，制成与试验组大小相同的样片（块）。

（3）试验菌的接种：用无菌棉拭子蘸取浓度为 5×10^5 cfu/mL ~ 5×10^6 cfu/mL 试验菌悬液，在适宜的培养基平板表面均匀涂抹 3 次。每涂抹 1 次，平板应转动 60° ，最后将棉拭子绕平板边缘涂抹一周。盖好平皿，置室温干燥 5min。

（4）抑菌剂样片贴放：每次试验贴放 1 个染菌平板，每个平板贴放 4 片试验样片，1 片阴性对照样片，共 5 片。用无菌镊子取样片贴放于平板表面。各样片中心之间相距 25mm 以上，与平板的周缘相距 15mm 以上。贴放好后，用无菌镊子轻压样片，使其紧贴于平板表面。盖好平皿，置 37°C 恒温培养箱，培养 16h ~ 18h 观察结果。用游标卡尺测量抑菌环的直径（包括贴片）并记录。

（5）试验重复 3 次。

（6）测量抑菌环时，应选均匀而完全无菌生长的抑菌环进行。测量其直径应以抑菌环外沿为界。

2.7.2.4 评价规定

（1）抑菌作用的判断：

抑菌环直径大于 7mm 者，判为有抑菌作用。

抑菌环直径小于或等于 7mm 者，判为无抑菌作用。

（2）3 次重复试验（共 12 个样片）均有抑菌作用结果者，判为合格。

（3）阴性对照组应无抑菌环产生。否则试验无效。

2.7.2.5 注意事项

（1）每次试验均应设置阴性对照。在报告中亦必须将对照组的结果列出。

（2）接种用细菌悬液的浓度应符合要求。浓度过低，接种菌量少，抑菌环常因之增大；浓度过高，接种量过多，抑菌环则可减小。

（3）应保持琼脂浓度的准确性，否则可影响抑菌环的大小。

（4）培养时间不得超过 18h。培养过久，部分细菌可恢复生长，抑菌环变小。

（5）抑菌环直径可受抑菌剂的量、抑菌性能和干湿度影响。故抑菌剂滤纸片应在试验当天制备。

2.7.3 最小抑菌浓度测定试验（琼脂稀释法）

2.7.3.1 原理

本试验采用琼脂稀释法将不同浓度的抑菌剂混合溶解在琼脂培养基中，然后点种细菌，通过细菌的生长与否，确定抗（抑）菌物质抑制受试菌生长的最低浓度，即最小抑菌浓度（Minimal Inhibitory Concentration, MIC）。本方法适用于非溶出性抗（抑）菌产品抗（抑）菌效果的鉴定。

2.7.3.2 实验器材

(1) 实验菌株 金黄色葡萄球菌 ATCC 6538 , 大肠杆菌 8099或ATCC 11229, 可根据抑菌剂的用途, 选择特定的菌株

(2) 营养琼脂培养基, 制备后经高压灭菌后, 置 45℃~50℃水浴备用, 此培养基将用于对照试验

(3) 磷酸盐缓冲液 0.03mol/L, pH7.2

(4) 灭菌蒸馏水

(5) 加样器 (1μL~10μL)

(6) 45℃~50℃水浴恒温培养箱

(7) 吸管、试管、平皿

(8) 37℃恒温培养箱

2.7.3.3 操作步骤

(1) 抗(抑)菌溶液的配制: 以无菌操作取 5mL或 5g(固体研磨后)样品, 放入 45mL 灭菌蒸馏水中, 充分振荡溶解, 配成 10% 的均匀分散的溶液或悬液。

(2) 抗菌剂稀释液配制: 将已配成 10% 的抗(抑)菌溶液或悬液用蒸馏水做对倍系列稀释成不同浓度的受试液, 置 45℃~50℃ 水浴恒温备用。

(3) 双倍浓度营养琼脂培养基: 制备后经高压灭菌后, 置 45℃~50℃ 水浴备用, 此培养基将用于稀释抗(抑)菌溶液或悬液。

(4) 含抗(抑)菌液培养基的配制: 分别取 10mL 系列稀释的抗菌液加入平皿内。将在 45℃~50℃ 水浴中的双倍浓度营养琼脂培养基 10mL, 加进平皿内, 边加边摇晃平板, 使抗(抑)菌液和培养基充分混匀。

(5) 用加样器取1μL~2μL(含菌量约为 10^7 cfu/mL 的PBS溶液)菌悬液点种于含抗(抑)菌液培养基的平皿, 接种后所形成的菌液圈直径约 5mm~8mm(每个点菌量约为 10^4 cfu)。

(6) 以同样方法接种不含抗(抑)菌成分的营养琼脂平板, 作为阳性对照。

(7) 将接种后的平板放置 35℃ 恒温培养箱中, 倒置培养 18h~24h, 观察结果。

2.7.3.4 评价规定

菌落生长被完全抑制的最低抗(抑)菌液浓度为该样品对受试菌的MIC。单一菌落生长可忽略不计。

2.7.3.5 注意事项

(1) 接种时, 应由低抗(抑)菌剂浓度向高浓度平板依次接种, 最后接种对照平板。

(2) 为了保证平板受热均匀, 培养时平板堆放不得超过4个。

2.7.4 最小抑菌浓度测定试验(营养肉汤稀释法)

2.7.4.1 原理

本试验将不同浓度的抑菌剂混合溶解于营养肉汤培养基中, 然后接种细菌, 通过细菌的生长与否, 确定抑菌剂抑制受试菌生长的最低浓度, 即最小抑菌浓度(MIC)。本方法适用于溶出性抑

菌产品最低抑菌浓度的测定。

2.7.4.2 实验器材

(1) 实验菌株 金黄色葡萄球菌 (ATCC 6538), 大肠杆菌 (8099或ATCC 11229), 可根据抑菌剂的用途, 选择特定的菌株

(2) 营养肉汤培养基 见附录 A

(3) 稀释液 见附录A

(4) 吸管、试管

(5) 37℃恒温培养箱。

2.7.4.3 操作步骤

(1) 按 2.1.2 所示方法制备金黄色葡萄球菌、大肠杆菌悬液

(2) 含抗菌剂培养基配制: 将抗(抑)菌溶液用蒸馏水做对倍系列稀释成不同浓度的受试液, 取各稀释度受试液 2.5mL 加入到含 2.5mL 双倍浓度营养肉汤的试管中。

(3) 取 0.1mL 含菌量约为 10^8 cfu/mL 菌悬液接种于含抗(抑)菌剂的营养肉汤的试管中, 作为试验组样本。

(4) 以同样方法接种不含抗(抑)菌剂的营养肉汤的试管中, 作为阳性对照组样本。

(5) 取2支含营养肉汤的试管, 作为阴性对照组样本。

(6) 将试验组样本、阳性对照组样本及阴性对照组样本放置 37℃恒温培养箱中, 培养 48h, 观察结果。

(7) 试验中应将试验用菌悬液进行活菌培养计数, 其作用浓度应为 5×10^5 cfu/mL~ 5×10^6 cfu/mL。

2.7.4.4 评价规定

当阳性对照管有细菌生长(混浊), 阴性对照管无菌生长(透明), 试验用菌悬液的作用浓度为 5×10^5 cfu/mL~ 5×10^6 cfu/mL 时, 试验组无菌生长的最高稀释度所对应的抗(抑)菌剂浓度, 为该样品对受试菌的MIC。

2.7.4.5 注意事项

接种时, 应由低抗(抑)菌剂浓度向高浓度依次接种。

2.7.5 滞留抑菌效果鉴定试验

2.7.5.1 原理

本试验通过模拟适合细菌生长、繁殖和可能产生感染的皮肤条件下, 使用随机性、双盲的、配对比较的方法, 检测抗(抑)菌样品 12h 或 24h 的滞留抑菌效果。

2.7.5.2 实验器材

(1) 试验产品 试验品为 25 套按顺序编号的样品。每套 2 块, 一块为测试样品皂, 另一块为不含抗(抑)菌剂的对照样品

(2) 不含抑菌剂的洗发液和沐浴液各 25 瓶 (200mL/瓶, 试验调整阶段用)

- (3) 不含抑菌剂的香皂 25 块 (试验调整阶段用)
- (4) 胰蛋白酶大豆肉汤培养基 (TSB)
- (5) 胰蛋白酶大豆琼脂培养基 (TSA)
- (6) 0.075mol/L 的磷酸盐缓冲液
- (7) 70%酒精
- (8) 恒温培养箱
- (9) 金属筒 (直径 2.2cm、高度 3cm)
- (10) 一次性接种环 (直径 4mm)
- (11) 小塑料碗 (直径 2.2cm、高 2.5mm)
- (12) 胶带 (Darapore, 3M 公司生产)
- (13) 尼龙刮菌棒
- (14) Triton-X 100 500ml
- (15) 外用抗生素软膏 (例如: 百多邦莫匹罗星软膏)
- (16) 玻璃弯棒
- (17) 羊血 经脱纤维处理
- (18) 金黄色葡萄球菌 ATCC 27217 (此株金黄色葡萄球菌是一种低毒性、对青霉素敏感、对四环素有抗药性的色素株, 曾用于许多试验研究, 没有任何严重副作用)。
- (19) 皮肤消毒剂

2.7.5.3 试验步骤

(1) 调整阶段

试验开始前 7d 至 14d, 志愿者使用不含抗(抑)菌成分的香皂、洗发水和沐浴液进行日常的洗手、洗澡。此阶段持续至少 7d, 但不超过 14d。

(2) 清洗阶段

清洗阶段共 3d, 志愿者每天用抗(抑)菌样品清洗一侧前臂, 用对照样品清洗另一侧前臂, 清洗过程如下:

- 1) 先清洗左臂, 用流动水 (水温应保持在 35℃~37℃) 打湿前臂内侧;
- 2) 用香皂从手腕至臂肘上下摩擦 15s;
- 3) 用手在涂有香皂的手臂上上下下摩擦泡沫 45s;
- 4) 用流动的清水冲洗前臂 15s, 不要搓擦;
- 5) 用纸巾沾干前臂. 不要搓擦;
- 6) 重复以上步骤清洗右臂;

7) 按上面所描述的试验步骤每日清洗前臂 3 次, 每次间隔至少一个小时, 在最后一次清洗之后, 需记录好时间, 在 12h 之后, 进行滞留效果检测。在第 9 次清洗前臂以后, 志愿者不能洗澡、淋浴或洗净前臂, 直到试验结束。清洗前后的两块香皂的重量及志愿者完成清洗的情况,

须记录下来。

(3) 试验阶段

清洗阶段的第四天（最后一次清洗后 12h 或 24h），将在志愿者每只前臂上划出一个试验区，对试验区进行接种、封包和回收存活细菌，具体步骤如下：

1) 将金黄色葡萄球菌（ATCC 27217）连续转种 3 代，取第 3 代培养物接种于胰蛋白大豆肉汤培养基（TSB）中，在 $35^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的条件下培养 $20\text{h}\pm 2\text{h}$ 。然后用胰蛋白酶大豆肉汤适当稀释菌悬液，使菌悬液浓度约为 $10^8\text{cfu/mL}\sim 10^9\text{cfu/mL}$ 。

2) 细菌接种：在志愿者的每只前臂中间部位（不要在手腕和肘褶皱处），用带有印墨直径为 3.00cm 的玻璃量筒扣在皮肤上，划分出一个试验区。使用加样器取 $10\mu\text{L}$ 上述菌悬液，接种于前臂试验区（菌落数为 $10^6\text{cfu/试验区}\sim 10^7\text{cfu/试验区}$ ），用一次性接种环，把接种物涂成一圆形，使其与试验区边缘应有 4mm~5mm 的距离。

3) 封包：细菌接种后立即用小塑料碗扣于染菌区上面，再用胶带将小塑料碗固定在皮肤上，记录封包的时间。

4) 回收存活细菌：接种后 $2\text{h}\pm 5\text{min}$ 对前臂上接种的区域进行取样。将金属筒放置于试验区中间部位，不要接触到盖有印墨的边缘。将 1mL 含 0.1% triton-X100 的 0.075mol/L 磷酸盐缓冲液吸移至金属筒内，用尼龙刮菌棒刮洗金属筒罩住区域内的皮肤 60s，将筒内液体吸移至试管内，再加 1mL 含 0.1% triton X-100 的 0.075mol/L 磷酸盐缓冲液，对该区域内的皮肤进行第二次刮洗 30s，将第二次擦洗的液体，注入含第一次刮洗液体的试管中。

5) 实验区试验后的消毒处理：一个实验区采样之后，需用 70% 的酒精对实验区进行消毒。然后对另一个实验区以同样方法进行采样，采样结束后，先用 70% 的酒精对实验区进行消毒，然后用皮肤消毒剂对两只前臂进行消毒处理，处理后清水冲洗，擦干，再涂少量的抗生素软膏。

6) 平皿接种与培养：对每一个取样进行平皿接种，以 0.0375mol/L 磷酸盐缓冲液对样品进行 10 倍系列稀释，选适当稀释度取 0.1mL 接种于 2 个含 5% 羊血的 TSA 平板表面，用玻璃弯棒涂匀，在 $35^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中培养 $48\text{h}\pm 4\text{h}$ ，计数菌落数。

7) 以试验同批次的稀释液、培养基等分别设阴性对照。

8) 抑菌率的计算

抑菌率 = $[(\text{对照平均菌落数} - \text{试验平均菌落数}) / \text{对照平均菌落数}] \times 100\%$

2.7.5.4 评价规定

(1) 各次试验阴性对照菌无菌生长。

(2) 实验不得少于 16 人次，抑菌率均 $\geq 50\%$ ，判定该产品在规定的时间内有滞留抑菌作用。

2.7.5.5 注意事项

(1) 志愿者录用标准

1) 年龄介于 18 岁至 65 岁的男性或女性；

2) 志愿者应身体健康；

3) 前臂应完好无损且没有皮肤病及其它皮肤问题;

4) 同意在整个试验期间, 避免使用抗(抑)菌洗液和乳膏、局部类固醇类药和全身或局部使用抗生素, 除非因为并发病症医生要求使用;

5) 同意在清洗阶段使用非药物香皂或洗液洗澡和淋浴, 但志愿者不能清洗前臂。在第 9 次洗完前臂以后, 不洗澡, 淋浴或洗净前臂, 直到试验结束。

(2) 排除志愿者的标准 如果志愿者有下列情况之一, 不能被录用参加试验

1) 同时参加另外一个临床试验

2) 在过去的 14d 中, 参加过任何一种形式的关于清洁手或手臂的试验

3) 对香皂、去污剂、香水或青霉素过敏

4) 怀孕妇女

5) 诊断患有糖尿病、肝炎、艾滋病 (HIV 阳性)、器官移植者,

(3) 其它试验限制

1) 志愿者不得使用其它清洁用品;

2) 志愿者应避免洗热水盆浴和游泳;

3) 志愿者应避免接触未干的油漆、涂料或者其它溶剂;

4) 志愿者应避免在手腕处和前臂上喷洒香水。

(4) 在试验完成后的 48h~72h 内, 需检查前臂上有没有小脓疱、水疱, 隆起的红色痒疱。出现这些情况的志愿者应尽快通知检验单位。

2.7.6 洗衣粉抗(抑)菌效果鉴定试验

2.7.6.1 原理

本方法通过模拟洗衣机的洗衣过程, 检测除(杀)菌洗衣粉(剂)的抗菌作用。

2.7.6.2 实验器材

(1) 实验菌株 大肠杆菌 (8099 或 ATCC11229), 金黄色葡萄球菌 (ATCC 6538)

(2) 培养基 营养琼脂 A 琼脂含量为 1.5%

营养琼脂 B 在营养琼脂 A 中另加入 1.5 % 的琼脂

营养肉汤

胰蛋白胨大豆琼脂培养基 (TSA)

(3) 牛血清白蛋白 (过滤除菌)

(4) 烷基酚聚氧乙烯醚 (Tergitol)

(5) 碳酸钠

(6) 标准硬水

(7) 非离子浸湿剂

- (8) 冲洗溶液
- (9) 含 0.5% 吐温的磷酸盐缓冲液
- (10) 吐温 80 (过滤除菌)
- (11) 无菌去离子水或蒸馏水
- (12) 不锈钢转轴 由一条直径 0.16cm 不锈钢丝制成 如图 2-2
- (13) 有金属螺盖的玻璃罐 容积为 470mL, 可高压灭菌, 并可放入转轴的广口罐, 将罐口覆盖牛皮纸, 加盖, 于 121℃ 灭菌 25min 备用
- (14) 转动速度为 45r/min~60r/min 的滚动摇床
- (15) 可调恒温水浴箱
- (16) 吸管 (1mL、5mL、10mL)
- (17) 培养皿
- (18) 铺有滤纸的玻璃培养皿
- (19) 菌种保存管
- (20) 细菌培养箱
- (21) 涡流振荡器
- (22) 细菌比浊仪
- (23) 棉布 32 织纱/cm × 32 织纱/cm 平织棉布
- (24) 别针、镊子、无菌手套、3mm~5mm 玻璃珠、秒表、载体布片 2.5cm×3.75cm

2.7.6.3 实验准备

(1) 测试棉布的制备

1) 非离子浸润剂的制备: 取 5g 烷基酚聚氧乙烯醚, 5g 碳酸钠加入到 1L 去离子水中。

2) 洗涤液的制备: 1.5g 非离子浸润剂, 1.5g 碳酸钠, 加入到 3L 去离子水中。

将大约 300g 测试棉布加入 3L 洗涤溶液, 加热煮沸 1h, 取出棉布在煮沸的去离子水中清洗 5min, 然后放入凉去离子水中 5min, 以去除残留的浸润剂, 然后将棉布晾干。

(2) 测试棉布和转动支架的准备: 取处理过的棉布, 剪成 5cm 宽, 重量为 15g ±1g 的布条, 将其一端插入固定在测试转动支架的水平方向的外边, 然后在三条水平支架间以足够的张力缠绕 12 个整圈, 将布条的另一端用不锈钢别针固定在前一圈布条上。最后以 121℃ 压力蒸汽灭菌 15min, 备用。

(3) 细菌悬液的制备: 取 0.5mL 营养肉汤冻干的菌种溶解, 接种于含 10mL 的营养肉汤的试管, 于 35℃±2℃ 培养 24h。然后振荡混合均匀。用 10μL 接种环在营养琼脂平板上划线, 置

于 $35^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 培养 24h。然后从平板上挑取单个菌落种入菌种保藏管中，上下摇动 10 次，吸弃多余液体，置 -85°C 冰箱保存。试验前，从菌种保藏管中取出一粒带菌小颗粒放入营养琼脂斜面，晃动斜面。将斜面至 35°C 培养 24h。每天转种 1 次，连续传三代。

第四天，用 5mL PBS 洗脱斜面上的菌苔，取 0.5mL 加入到含 9.5mL PBS 的试管中，混匀，取 1mL~2mL 加入含有 20mL 营养琼脂 B 的细胞培养瓶中，晃动培养瓶使菌液覆盖整个琼脂表面。吸弃多余菌液，然后将培养瓶倒置平放在 35°C 培养箱中培养 24h。

用 5mL PBS 和 3g 灭菌玻璃珠洗脱细胞瓶中的菌体，用 PBS 调整浓度至 $1\times 10^8\text{cfu/mL}\sim 5\times 10^8\text{cfu/ml}$ ，然后加入等量 3.0% 的牛血清白蛋白。

(4) 染菌载体的制备：每片载体接种 20 μL 菌悬液，放回培养皿中，加盖，于 $35^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 在培养箱中干燥 20min。

(5) 测试样品的制备：至少在实验开始前 20min，将盛有 265mL 硬水的玻璃罐在水浴箱中恒温至测试温度 ($25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$)。加入被测试样品混合溶解。

2.7.6.4 实验步骤

(1) 将 2 片染菌载体放入转动支架的第 6 和 7 层布条之间，将第 3 片放入第 7 和 8 层布条之间。

(2) 以无菌操作方式将转动单元（支架、布条和染菌载体）放入含有测试产品的玻璃罐中，加盖。

(3) 玻璃罐固定在摇床上，滚动旋转洗涤 20min，取下玻璃罐。

(4) 以无菌操作方式，取出转动单元，取出 3 片染菌载体，放入到含有 30mL 含 0.5% 吐温 80 的 PBS 的试管中，在振荡器中混合 10s。然后振打 200 次，用 PBS 做 10 倍系列稀释，并选择适宜稀释度样液接种 TSA 平板。每个稀释度接种 2 个平板。

(5) 对照组除用 0.5% 吐温 80 替代测试产品外，其它实验条件和步骤均与试验组相同。

(6) 菌数对照：将 3 片染菌载体加入含有 30mL 0.5% 吐温 80 的 PBS 试管中，在振荡器振荡 10s，然后振打 80 次，用 PBS 做系列 10 倍稀释，并取适宜稀释度样液 1.0mL，以倾注法接种 TSA 平板，每个稀释度接种 2 两个平板。

(7) 将试验组、对照组和菌数对照组平板倒置于 $35^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 $48\text{h}\pm 4\text{h}$ ，计数菌落数。

(8) 以试验同批次的稀释液、培养基等分别设阴性对照。

(9) 结果计算

试验重复 3 次。记录并计算测试样品的细菌总数，求其平均值。

用下列公式计算除菌率：

$$\text{抑菌率 (\%)} = (A-B) / A \times 100\%$$

其中 A 为实验前对照样品的菌落数；B 为试验后实验样品的菌落数。

2.7.6.5 评价规定

各次阴性对照均无菌生长，对照组回收菌数应为 1×10^6 cfu/片 $\sim 5 \times 10^6$ cfu/片，抑菌率达到 50% 者，判定为有抗菌作用。

2.7.6.6 注意事项

- (1) 将旋转单元放入玻璃罐后应将盖子盖紧，以防转动时漏水。
- (2) 试验时应严格无菌操作，以防止杂菌污染。

2.7.7 振荡烧瓶试验

2.7.7.1 原理

在液体中通过快速长时间振荡，增加微生物与抗（抑）菌产品内抑菌剂的接触以显示其抑菌作用。试验根据抑菌率大小判断其是否具有抑菌能力。本试验适用于对非溶出性抗（抑）菌织物的抗（抑）菌效果鉴定。

2.7.7.2 实验器材

- (1) 实验菌株 金黄色葡萄球菌 (ATCC 6538)、大肠杆菌 (8099)、白色念珠菌 (ATCC 10231) 菌悬液的制备方法见 2.1.2。根据抑菌剂特定用途也可用其他菌悬液
- (2) 磷酸盐缓冲液 (PBS, 0.03mol/L, pH 值 7.2)
- (3) 振荡摇床 (300r/min)
- (4) 三角烧瓶
- (5) 营养琼脂培养基、胰蛋白胨大豆琼脂培养基 (TSA) 与沙堡琼脂培养基

2.7.7.3 操作程序

- (1) 将抗菌物品剪切成 10mm×10mm 样片，称取 0.75g 2份分别置入 250mL 的三角烧瓶中。
- (2) 在上述三角烧瓶中加入 70mL PBS 和 5mL 菌悬液，使菌悬液在 PBS 中的浓度为 1×10^4 cfu/mL $\sim 5 \times 10^4$ cfu/mL。
- (3) 将三角烧瓶固定于振荡摇床上，在作用温度为 20℃ ~ 25 ℃ 的条件下，以 300r/min 分别振摇 2min、1h。吸取 1.0mL 用 PBS 作适当稀释至 10^{-2} ，作为试验组振荡前样液。
- (4) 分别吸取振荡前和振荡后样液及适当稀释度的稀释液各 1.0mL，以琼脂倾注法接种平皿，每个样液接种 2 个平皿，按照 2.1.3 规定的方法进行活菌培养计数。
- (5) 试验同时设阴性对照样片和不加样片组。对照样片组以不含抗菌剂的材质、大小相同的样片代替抗菌样片外，其它操作程序均与实验组相同。不加样片组分别取 5mL 菌悬液和 70mL PBS 加入 250mL 三角烧瓶中，混匀，分别于振荡前和振荡后 1h，各取 1.0mL 菌悬液与 PBS 的混合液做适当稀释。同上，按 2.1.3 法进行活菌培养计数。

(6) 以试验同批次的稀释液、培养基分别设阴性对照。

(7) 试验重复3次，按下式计算抑菌率

抑菌率= (样品振荡前平均菌落数-样品振荡后平均菌落数) /样品振荡前平均菌落数×100%

2.7.7.4 评价规定

(1) 各次试验阴性对照均应无菌生长。

(2) 不加样片组活菌计数在 1×10^4 cfu/mL~ 5×10^4 cfu/mL 之间，且样本振荡前后平均菌落数差值在 10% 以内，试验有效。

(3) 各次试验中，试验样片抑菌率与对照样片抑菌率的差值菌>26%，即判定该产品具有抗菌作用。

2.7.7.5 注意事项

(1) 振荡前须将振荡摇床上的三角烧瓶固定牢，以免碰破。

(2) 试验中，在实验误差允许的范围内，如果试验组和对照组出现振荡后菌落数高于振荡前菌落数的情况，其抑菌率可按“0”计算。

2.7.8 浸渍试验

2.7.8.1 原理

将试样和对照织物分别放于三角瓶中，用含有肉汤培养基的试验菌悬液接种于试样和对照织物上，经培养后，分别将培养前后试样上的细菌洗下，测定细菌的数量，可计算出试样上细菌减少的百分率。该方法适用于溶出性抗菌织物抗（抑）效果的检测。

2.7.8.2 实验器材

(1) 实验菌株 金黄色葡萄球菌 (ATCC 6538)

(2) 试样 在距试样布边 10cm 以上、离布端 1m 以上部位，剪取直径为 5cm 的圆形试样若干（需用试样数量要根据纤维类别及织物织法而定，以能吸收 1ml 菌液且三角瓶中不留残液为度）。另同法剪取对照织物若干，取 3 份试样和 2 份对照织物分别装于三角瓶中，盖好瓶口，121℃ 15min 灭菌备用

(3) 肉汤培养基

(4) 胰蛋白胨大豆琼脂培养基

(5) 磷酸盐缓冲液 (PBS, 0.03mol/L, pH为7.2~7.4)

(6) 恒温水浴箱

(7) 37℃培养箱

2.7.8.3 菌悬液的制备

用接种环将保存的菌种以划线法接种到营养琼脂平皿上，在 37℃恒温培养箱中培养 24h，取平皿上典型的菌落移种到含肉汤培养基的三角瓶中，在 37℃条件下培养 24h，用肉汤对培养液进行系列稀释，使菌悬液的含菌量为 1×10^5 cfu/mL~ 5×10^5 cfu/mL。

2.7.8.4 试验步骤

(1) 分别取 1mL 菌悬液加在 3 份准备好的三角瓶内的织物上, 确保其均匀分布, 且三角瓶中不留多余液, 封好瓶口, 以防蒸发。

(2) 分别在一个盛有试样和对照织物的三角瓶中加入 100mL 缓冲液, 剧烈摇晃 1min 洗涤细菌, 取 1mL 做系列 10 倍稀释, 选适当稀释度以倾注法接种平皿, 作为“0”接触时间样品和对照织物上的细菌数。

(3) 将另一个装有接种试样的三角瓶在 37℃恒温培养箱中培养 20h±2h, 然后加入 100mL 缓冲液, 剧烈摇晃 1min 洗涤细菌, 取 1mL 做系列 10 倍稀释, 选适当稀释度以倾注法接种平皿, 作为试验组。

(4) 试样不接种菌悬液, 在“0”接触时间加入 100mL 缓冲液, 剧烈摇晃 1min 取样, 接种平皿, 作为阴性对照组。

(5) 另取 1 个装有对照织物的三角烧瓶, 接种 1mL 菌悬液后, 在 37℃ 恒温培养箱中培养 20h±2h, 然后加入 100mL 缓冲液, 剧烈摇晃 1min 洗涤细菌, 取 1mL 做系列 10 倍稀释, 选适当稀释度以倾注法接种平皿, 作为阳性对照组。

(6) 将阴性和阳性对照样本与试验组样本一并放入 37℃恒温培养箱中培养 48h, 计数菌落数。

(7) 试验重复 3 次。

(8) 结果计算

$$\text{抑菌率 (\%)} = \frac{\text{B 或 C 或 (B+C)} / 2 - \text{A}}{\text{B 或 C 或 (B+C)} / 2} \times 100$$

A- 试验组试样上的细菌数;

B- “0”接触时间试样上的细菌数;

C- “0”接触时间对照织物上的细菌数;

如果“B”和“C”差别较大时, 取较大值; 如果“B”和“C”差别不大时, 取平均值。

2.7.8.5 评价规定

- (1) “0”接触时间对照织物的平均菌落数应在 $1 \times 10^3 \text{cfu/mL} \sim 5 \times 10^3 \text{cfu/mL}$ 。
- (2) 阴性对照应无菌生长, 阳性对照菌数比“0”接触时间的菌数明显增加。
- (3) 各次试验的抑菌率均 $\geq 50\%$, 即判定该样片具有抗菌作用。

2.7.8.6 注意事项

- (1) 对织物进行染菌操作时, 应确保其均匀分布, 且三角瓶中不沾染或存留多余菌液。
- (2) 三角瓶内的织物染菌后, 应将瓶口封好, 以防液体蒸发, 造成细菌死亡。

2.7.9 贴膜试验

2.7.9.1 原理

本方法是通过将细菌污染于抗菌制品表面，然后用塑料薄膜覆盖，使细菌与抗菌制品表面充分接触，以测定其抗菌效果。适用于抗菌塑料、抗菌地板、抗菌瓷砖等产品的抗（抑）菌效果测定。

2.7.9.2 实验器材

(1) 实验菌株 金黄色葡萄球菌(ATCC 6538)、大肠杆菌(8099)、白色念珠菌(ATCC 10231)，也可根据抑菌剂特定用途选用其他菌株

(2) 磷酸盐缓冲液

(3) 培养基 胰蛋白胨大豆琼脂培养基(TSA)胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB)与沙堡琼脂培养基

(4) 薄膜 不影响细菌生长和不吸水的材料，厚度不规定，使用一面应有较好的粘性，面积为 $40\text{mm} \pm 2\text{mm}$ 的正方形

(5) 无菌塑料袋

(6) 恒温水浴箱

(7) 37°C 恒温培养箱

(8) 样片 将试样及对照试样（与试样同质不含抗菌组分）分别制成边长为 $50\text{mm} \pm 2\text{mm}$ 的正方形，其中抗菌样片 3 个，对照样片 6 个。试验前，以脱脂棉蘸取酒精轻轻擦拭样片 2~3 次，充分干燥

2.7.9.3 操作程序

(1) 倾注琼脂培养基平板。

(2) 将菌悬液用 1/500 的营养肉汤稀释成 $2.5 \times 10^5 \text{cfu/mL} \sim 1.0 \times 10^6 \text{cfu/mL}$ 实验用菌悬液。

(3) 将样片试验面朝上放于无菌平皿中，取 0.4mL 菌悬液滴染于样片中央，涂匀。按图表示的方法用薄膜覆盖，小心触压薄膜，使菌液均匀散开，盖上平皿盖。如图 2-3

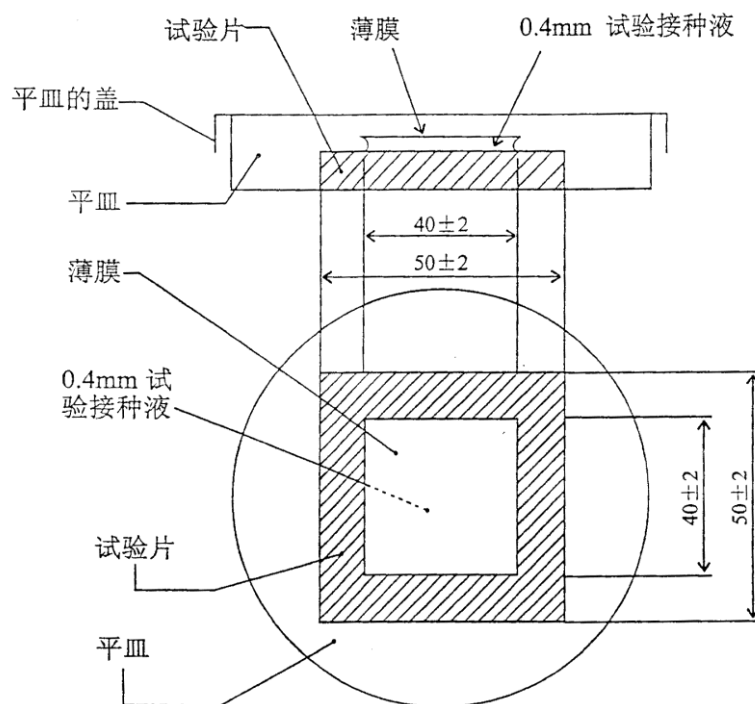


图 2-3 菌液接种到试验片和用薄膜覆盖示意图

(4) 将装有接种过菌液的试验样片的平皿(3个抗菌样片和3个对照样片),置 $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$,相对湿度不低于90%的条件下,培养箱内培养 $24\text{h} \pm 1\text{h}$ 。

(5) 洗脱 以无菌操作方式用镊子将覆盖膜和试验样片放入塑料袋中,然后加入10mL肉汤培养液,用手充分揉搓袋中的试验样片和覆盖薄膜,将细菌洗下。

(6) 吸取1mL洗下的菌液,至含9mL PBS的试管中,做系列10倍稀释,取适当稀释度接种2个平皿,以倾注法加入15mL~20mL TSA,置 $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱内培养40h~48h。

(7) 将另3个对照样片接种后立即用镊子将覆盖膜和试验样片放入塑料袋中,洗脱和接种方法与试验样片相同。

(8) 以试验用同批次稀释液、培养基等分别设阴性对照。

(9) 试验重复3次。

2.7.9.4 活菌数的计算

$$N = C \times D \times V$$

N: 为活菌数

C: 为2个平板的平均菌落数

D: 为稀释倍数

V: 为洗脱用肉汤培养基的液体的毫升数

2.7.9.5 结果的计算与判定

(1) 试验成立应符合的条件

1) 各次试验阴性对照均无菌生长

2) 对照样片接种后直接求出活菌数的对数值符合下列公式

$$(L_{\text{最大值}} - L_{\text{最小值}}) / L_{\text{平均值}} \leq 0.2$$

公式中, $L_{\text{最大值}}$ 最大活菌数的对数值

$L_{\text{最小值}}$ 最小活菌数的对数值

$L_{\text{平均值}}$ 平均活菌数的对数值

3) 对照样片接种后的活菌数平均值应为 1.0×10^5 cfu/样片 $\sim 4.00 \times 10^5$ cfu/样片

4) 覆盖了薄膜的对照样片培养 24h 后的活菌数, 每样片均不少于 1.0×10^4 cfu。

(2) 抗菌活性值的计算:

$$R = \log(B/A) - \log(C/A) = \log(B/C)$$

R: 抗菌活性值

A: 对照样片在接种后的活菌数的平均值

B: 对照样片在接种后培养 24h 的活菌数的平均值

C: 抗菌样片在接种后培养 24h 的活菌数的平均值

(3) 评价规定

各次试验抗菌活性值均 ≥ 2.0 , 判定该试样具有抗菌作用。

2.7.9.6 注意事项

(1) 用薄膜覆盖, 小心触压薄膜, 以免菌液溢出薄膜外。

(2) 试验时应严格无菌操作, 以防杂菌污染。

3 理化检验技术

Technical specifications for physical and chemical tests

3.1 消毒产品原料或单方制剂的测定方法

3.1.1 常用器材

- (1) 移液管 (1mL、5mL、10mL、25mL); 移液器 (200 μ L、1000 μ L)
- (2) 滴定管 (5mL、10mL、25mL、50mL, 酸式与碱式)
- (3) 毛细滴管
- (4) 碘量瓶 (100mL、250mL)
- (5) 容量瓶 (50mL、100mL、250mL、1000mL)
- (6) 锥形瓶 (100mL、250mL、500mL)
- (7) 称量杯 (瓶)
- (8) 吸球
- (9) 分液漏斗 (250mL)
- (10) 研钵
- (11) 量筒
- (12) 烧杯
- (13) 注射器 (1mL、5mL、100mL); 微量注射器 (10 μ L、25 μ L、100 μ L)
- (14) 垂熔玻璃滤器
- (15) 比色皿
- (16) 酒精比重计
- (17) 大气采样器
- (18) 天平 (感量 0.1mg)
- (19) 分光光度计
- (20) 酸度计
- (21) 臭氧分析仪
- (22) 气相色谱仪
- (23) 高效液相色谱仪
- (24) 原子荧光分光光度计

(25) 原子吸收分光光度计

3.1.2 含量测定方法

3.1.2.1 有效氯含量的测定

(1) 原理 在酸性溶液中，含氯消毒剂中的有效氯氧化溶液中的碘化钾产生等摩尔的碘，用硫代硫酸钠标准溶液滴定释放出的碘，根据硫代硫酸钠标准溶液的用量，计算有效氯的含量。

(2) 试剂配制 2mol/L 硫酸、100g/L 碘化钾与 5g/L 淀粉等溶液。配制并标定 0.1mol/L 硫代硫酸钠滴定液（见 3.1.3.1）。

(3) 样品测定 精密吸取液体含氯消毒剂适量，使其相当于有效氯约 0.6g，置 100mL 容量瓶中，加蒸馏水至刻度，混匀。对固体含氯消毒剂，精密称取适量使其相当于有效氯约 0.6g，置烧杯中以蒸馏水溶解，转入 100mL 容量瓶中。称量杯及烧杯需用蒸馏水洗 3 次，洗液全部转入容量瓶。

向 100mL 碘量瓶中加入 2mol/L 硫酸 10mL，100g/L 碘化钾溶液 10mL 和混匀的消毒剂稀释液 10.0mL。此时，溶液出现棕色。盖上盖并振摇混匀后加蒸馏水数滴于碘量瓶盖缘，置暗处 5 min。打开盖，让盖缘蒸馏水流入瓶内。用硫代硫酸钠滴定液（装于 25mL 滴定管中）滴定游离碘，边滴边摇匀。待溶液呈淡黄色时加入 5g/L 淀粉溶液 10 滴，溶液立即变蓝色。继续滴定至蓝色消失，记录用去的硫代硫酸钠滴定液总量，必要时将滴定结果用空白试验校正。重复测 2 次，取 2 次平均值进行以下计算。

(4) 计算公式 因 1mol/L 硫代硫酸钠滴定液 1mL 相当于 0.03545g 有效氯，按下式计算有效氯含量：

$$\text{固体样品} \quad \omega (\%) = \frac{c \times V_{st} \times 0.03545}{m} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{液体样品} \quad \rho (g/L) = \frac{c \times V_{st} \times 0.03545}{V} \times 1000 \quad (2)$$

式中： ω 、 ρ 为有效氯含量，% 或 g/L； c 为硫代硫酸钠滴定液浓度，mol/L； V_{st} 为滴定用去硫代硫酸钠滴定液体积（减空白），mL； m 为碘量瓶中所含消毒剂原药质量，g； V 为碘量瓶中含液体消毒剂原液体积，mL。

(5) 注意事项 本方法适合测定各种含氯消毒剂中的有效氯。液体样品及可溶性样品可按产品标示的有效氯含量，吸取或称取适量于 100mL 容量瓶中用水稀释至刻度，混匀。对于固体样品，将具有代表性的固体样品于研钵中研匀，用减量法称取 1~2g，置于 100mL 烧杯中，加

少量水，将样品调成糊状。将样品全部转移至 100mL 容量瓶中，稀释到刻度，混匀。固体样品的取样量一般指常用的漂粉精（有效氯含量 60%~70%）和漂白粉（有效氯含量 25%~30%）的取样量，其它含氯消毒剂的取样量可据此计算。

3.1.2.2 有效碘含量的测定

(1) 原理 在弱酸性溶液中，含碘消毒剂中的游离碘定量的与硫代硫酸钠发生反应，根据硫代硫酸钠标准溶液的用量，计算有效碘的含量。

(2) 试剂配制 5g/L 淀粉溶液。冰醋酸（36%）。配制并标定 0.1 mol/L 硫代硫酸钠滴定液（见 3.1.3.1）。

(3) 样品测定 精密取含碘消毒剂适量，使其相当于有效碘约 0.25g，置 100mL 容量瓶中并加入醋酸 5 滴。用 0.1 mol/L 硫代硫酸钠滴定液滴定，边滴边摇匀。待溶液呈淡黄色时加入 5g/L 淀粉溶液 10 滴（溶液立即变蓝色），继续滴定至蓝色消失，记录用去的硫代硫酸钠滴定液总量，必要时将滴定结果用空白试验校正。重复测 2 次，取 2 次平均值进行以下计算。

(4) 计算公式 因 1mol/L 硫代硫酸钠滴定液 1mL 相当于 0.1269g 有效碘，按下式计算有效碘含量：

$$\text{固体样品} \quad \omega (\%) = \frac{c \times V_{st} \times 0.1269}{m} \times 100\% \quad (1)$$

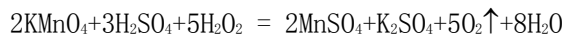
$$\text{液体样品} \quad \rho (g/L) = \frac{c \times V_{st} \times 0.1269}{V} \times 1000 \quad (2)$$

式中： ω 、 ρ 为有效碘含量，% 或 g/L； c 为硫代硫酸钠滴定液浓度，mol/L； V_{st} 为滴定用去硫代硫酸钠滴定液体积（减空白），mL； m 为碘量瓶中所含消毒剂原药的质量，g； V 为碘量瓶中含液体消毒剂原液体积，mL。

(5) 注意事项 本方法适用于测定含碘消毒剂中的有效碘。当消毒剂的酸性很强或含醇量较高时，不宜使用淀粉指示剂。此时，可直接观察碘的黄色消失以判断终点（如测定碘酊、碘甘油等碘制剂时，直接用硫代硫酸钠滴定至溶液无色即可认为到达终点）。

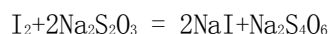
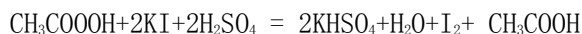
3.1.2.3 过氧乙酸（C₂H₄O₃）含量的测定

(1) 原理 由于反应不完全或放置期间的分解，过氧乙酸溶液中含有部分过氧化氢。在酸性条件下，高锰酸钾不与过氧乙酸作用，仅与过氧化氢起氧化还原反应，使其分解掉，反应式为：



故在加入碘化钾前，先滴加高锰酸钾溶液至微粉色，以消除过氧化氢的干扰。上述氧化还原反应进行较慢，可用硫酸锰为催化剂，以加速反应的进行。碘化钾与过氧乙酸反应产生

等摩尔碘，用硫代硫酸钠标准溶液滴定释放出的碘，根据硫代硫酸钠的用量，计算过氧化物的含量。反应式为：



(2) 试剂配制 2mol/L 硫酸、100g/L 碘化钾、0.01mol/L 高锰酸钾、100g/L 硫酸锰、30g/L 钼酸铵与 5g/L 淀粉。配制并标定 0.05mol/L 硫代硫酸钠滴定液（见 3.1.3.1）。

(3) 样品测定 精密吸取样品适量，使其相当于过氧乙酸约 0.7g，于 100mL 容量瓶中用蒸馏水稀释至刻度，混匀。向 100mL 碘量瓶中加 2mol/L 硫酸 5mL，100g/L 硫酸锰 3 滴，精密加入混匀的过氧乙酸稀释液 5.0mL，摇匀并用 0.01mol/L 高锰酸钾溶液滴定至溶液呈粉红色。随即加 100g/L 碘化钾溶液 10mL 与 30g/L 钼酸铵 3 滴，摇匀并用 0.05mol/L 硫代硫酸钠滴定液（装于 25mL 滴定管中）滴定至淡黄色。加入 5g/L 淀粉溶液 3 滴（溶液立即变蓝色），继续用硫代硫酸钠滴定至蓝色消失，记录硫代硫酸钠滴定液的总用量。重复测 2 次，取 2 次平均值进行以下计算。

(4) 计算公式 因 1mol/L 硫代硫酸钠 1mL 相当于 0.03803g 过氧乙酸，按下式计算过氧乙酸含量：

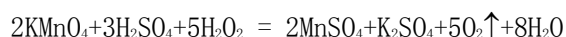
$$\rho (\text{g/L}) = \frac{c \times V_{st} \times 0.03803}{V} \times 1000$$

式中： ρ 为过氧乙酸含量，g/L； c 为硫代硫酸钠滴定液的浓度，mol/L； V_{st} 为滴定中用去的硫代硫酸钠滴定液的体积，mL； V 为碘量瓶中所含过氧乙酸样液体积，mL。

(5) 注意事项 本方法适用于测定过氧化物类消毒剂中的过氧乙酸有效成分。方法表明需滴加高锰酸钾溶液至微粉色，以消除过氧化氢的干扰。实验时可根据实际浓度，先用高浓度的高锰酸钾溶液滴定，再用低浓度高锰酸钾滴定，否则消耗高锰酸钾溶液的量过多。实验中，加碘化钾和钼酸铵后放置 8 分钟后，实验平行结果较好。过氧乙酸性质不稳定，易分解，高温保存时间短，应贮存在阴凉通风处。贮存容器应以聚乙烯桶或瓶为宜。过氧乙酸切勿与其他药品、有机物质随意混合，以免剧烈分解甚至爆炸。

3.1.2.4 过氧化氢（H₂O₂）含量的测定

(1) 原理 在酸性溶液中，高锰酸钾可氧化消毒剂中的过氧化氢，根据高锰酸钾标准溶液的用量，计算过氧化氢的含量。其反应式为：



(2) 试剂配制 2mol/L 硫酸与 100g/L 硫酸锰等溶液。另外配制并标定 0.02mol/L 高锰

酸钾滴定液（见 3.1.3.3）。

(3) 样品测定 精密吸取样品适量，使其相当于过氧化氢约 0.3g，于 100mL 容量瓶中用蒸馏水稀释至刻度，混匀。取过氧化氢稀释液 10.0mL，置 100mL 碘量瓶中，加入 2mol/L 硫酸 20mL 与 100g/L 硫酸锰 3 滴，摇匀。用 0.02mol/L 高锰酸钾滴定液（装于 25mL 滴定管中）滴定至溶液呈粉红色，记录高锰酸钾滴定液用量。重复测 2 次，取 2 次平均值进行以下计算。

(4) 计算公式 因 1mol/L 高锰酸钾滴定液 1mL 相当于 0.08505g 过氧化氢，故可按下式计算过氧化氢含量：

$$\rho(\text{g/L}) = \frac{c \times V_{st} \times 0.08505}{V} \times 1000$$

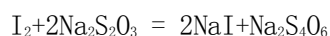
式中： ρ 为过氧化氢含量，g/L； c 为高锰酸钾滴定液的浓度，mol/L； V_{st} 为高锰酸钾滴定液体积，mL； V 为碘量瓶中所含过氧化氢样液体积，mL。

(5) 注意事项 本方法适用于测定过氧化物类消毒剂中的过氧化氢有效成分。

3.1.2.5 臭氧 (O₃) 含量的测定

第一法 碘量法

(1) 原理 在酸性溶液中，臭氧与碘化钾反应，产生等摩尔的碘，用硫代硫酸钠标准溶液滴定释放出的碘，根据硫代硫酸钠标准溶液的用量，计算样品中臭氧的含量。反应式为：



(2) 试剂配制 3mol/L 硫酸、200g/L 碘化钾与 5g/L 淀粉等溶液。配制并标定 0.05mol/L 硫代硫酸钠滴定液（见 3.2.1.3.1）。

(3) 采样 检测臭氧水（臭氧水溶液）浓度时，精密吸取样本 100.0mL~300.0mL（浓度较低，但不低于 10mg/L 时，取 400.0mL）置于 500mL 带塞锥形瓶中，加 200g/L 碘化钾溶液 20mL，混匀。再加 3mol/L 硫酸 5mL，瓶口加塞，静置 5min。取样涉及到水流量时，水流量应按企业使用说明书设定。

检测臭氧气体浓度时，将采集的样品吸收液（蒸馏水 350mL 与 200g/L 碘化钾溶液 20mL）装于 500mL 带塞锥形瓶中，从臭氧发生器排气管处采臭氧气体 5L 以上，加 3mol/L 硫酸 5mL，瓶口加塞，静置 5min。

(4) 样品测定 上述两种样品均用 0.05mol/L 硫代硫酸钠滴定液滴定至溶液呈淡黄色时加 5g/L 淀粉溶液数滴，继续滴定至无色。记录用去硫代硫酸钠滴定液总量，并将滴定结果用空白

试验校正。重复测定 2 次。

(5) 计算公式 取 2 次测试平均值计算臭氧浓度。因 1mol/L 硫代硫酸钠滴定液 1mL 相当于 24.00mg 臭氧，故臭氧含量可按下式计算

$$\rho \text{ (mg/L)} = \frac{c \times V_{st} \times 24.00}{V}$$

式中： ρ 为臭氧含量，mg/L； c 为硫代硫酸钠滴定液的浓度，mol/L； V_{st} 为硫代硫酸钠滴定液消耗体积（减空白），mL； V 为臭氧水升数或其气体采样体积，L。

(6) 注意事项 本方法适用于测定过氧化物类消毒剂中的臭氧有效成分或臭氧发生器产生的臭氧气体的含量。

第二法 紫外光度法

(1) 原理 当空气样品以恒定的流速进入仪器的气路系统，样品空气交替地或直接进入吸收池或经过臭氧涤去器再进入吸收池，臭氧对 254nm 波长的紫外光有特征吸收。零空气样品，通过吸收池时被光检测器检测的光强度为 I_0 ；臭氧样品通过吸收池时被光检测器检测的光强度为 I ， I/I_0 为透光率。每经过一个循环周期，仪器的微处理系统根据郎伯一比耳定律求出臭氧的浓度。关系式如下：

$$I/I_0 = e^{-ac1}$$

式中： a 为吸光系数； c 为臭氧浓度； l 为吸收池厚度。

(2) 仪器设备与实验材料 紫外臭氧分析仪；采样管线（采用玻璃、聚四氟乙烯等不与臭氧起化学反应的惰性材料）；颗粒物滤膜（孔径为 5 μ m 滤膜及其支撑物应由聚四氟乙烯等不与臭氧起化学反应的惰性材料制成。新滤膜需要在工作环境中适应 5min~15min 后再使用。应能去除可改变分析器性能、影响臭氧测定的所有颗粒物）；零空气（来源不同的零空气可能含有不同的残余物质。因此，在测定 I_0 时，向光度计提供零气的气源与发生臭氧所用的气源相同）。

(3) 样品测定

按臭氧分析仪使用说明校准仪器。接通电源，打开仪器电源开关，仪器至少预热一小时。待仪器稳定后，连接气体采样管线进行现场测定。

(4) 计算公式 按以下公式计算臭氧浓度

$$C = 2.141 \times A$$

式中： C —— 样品气体中臭氧浓度，mg/m³；

A —— 仪器显示的臭氧读数，ppm；

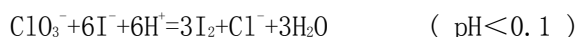
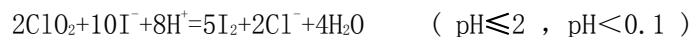
2.141—— 臭氧换算成标准状态下（20℃，101.3 kPa）的 mg/m³ 换算系数。

(5) 注意事项 本方法适用于臭氧及臭氧残留量的测定。根据比尔吸收定律原理早期紫外光度法只适用于 O₃ 低浓度测定，但随着仪器技术的进步，适用范围增大。本方法不受常见气体的干扰，但少数有机物如苯及苯胺等，在 254nm 处吸收紫外光，对测定产生正干扰。紫外臭氧测定方法干扰物质（1ppm 计）的响应（以%浓度计）分别为：苯乙烯=20；反式-甲基苯=乙烯>100；苯甲醛 =5；0-甲氧甲酚=12；硝基甲酚=100。下列物质在浓度低于 1ppm 时不产生反应：甲苯、过氧硝酸乙酰酯、丁二酮一（2，3）、过氧硝酸苯酰酯、硝酸钾酯、硝酸正丙酯、硝酸正丁酯。当被测空气中颗粒物浓度超过 100μg/m³ 时也对臭氧的测定产生影响。为此，当空气中存在有机物和颗粒物浓度较大时，应去除后再进行测定。

3.1.2.6 二氧化氯（ClO₂）含量的测定

第一法 五步碘量法

(1) 原理 该法是利用不同 pH 值条件下 ClO₂、Cl₂、ClO₂⁻、ClO₃⁻ 分别与 I⁻ 反应来测定各响应物质的含量。反应方程式如下：



然后用硫代硫酸钠作滴定剂，分步滴定反应产生的 I₂。

(2) 试剂配制 无氧化性氯二次蒸馏水（蒸馏水中加入亚硫酸钠，将氧化性氯还原为氯离子（以 DPD 检查不显色），再进行蒸馏，所得水为无氧化性氯二次蒸馏水）、2.5mol/L 盐酸溶液、100g/L 碘化钾溶液（称取 10g 碘化钾溶于 100mL 蒸馏水中，储于棕色瓶中，避光保存于冰箱中，若溶液变黄需重新配制）、饱和磷酸氢二钠溶液（用十二水合磷酸氢二钠与蒸馏水配成饱和溶液）、pH=7 磷酸盐缓冲溶液（溶解 25.4g 无水 KH₂PO₄ 和 216.7g Na₂HPO₄·12H₂O 于 800mL 蒸馏水中，用水稀释成 1000mL）、50g/L 溴化钾溶液（溶解 5g 溴化钾于 100mL 水中，储于棕色瓶中，每周重配一次）。配制并标定 0.1mol/L 硫代硫酸钠滴定液（见 3.1.3.1）。硫代硫酸钠标准溶液（0.01mol/L）临用时现配。

分析中所用试剂均为分析纯，用水为无氧化性氯二次蒸馏水。

(3) 样品测定 滴定过程中氧化性物质的质量不得大于 15mg，可根据需要将样品适当稀释；以下所有试验操作应在室温 20℃~25℃ 条件下进行。

①按照样品说明书将样品活化后,吸取适量样品溶液用蒸馏水稀释,使其氧化性物质浓度在 2000mg/L~3000mg/L (活化后氧化性物质浓度在此浓度范围内的样品溶液可直接取样测定)。

②在 500mL 的碘量瓶中加 200mL 蒸馏水,吸取 2.0mL~5.0mL 样品溶液或稀释液于碘量瓶中,加入适量磷酸盐缓冲液,用 pH 计校核溶液 pH 值至 7.0 (对于 pH<3 溶液应先用 1mol/L 或 0.1mol/L 氢氧化钠溶液调至 pH>3 后,再用缓冲液调节)。加入 10mL 碘化钾溶液,用硫代硫酸钠标准溶液滴至淡黄色时,加 1mL 淀粉溶液,继续滴至蓝色刚好消失为止,记录读数为 A。

③在上述②滴定后的溶液中加入 3.0mL 2.5mol/L 盐酸溶液,调节 pH≤2,并放置暗处 5min,用硫代硫酸钠标准溶液滴定至蓝色消失,记录读数为 B。

④在 500mL 碘量瓶中加 200mL 蒸馏水,吸取 2.0mL~5.0mL 样品溶液或稀释液于碘量瓶中,加入与②同量的磷酸盐缓冲液,然后通入高纯氮气吹(约 10min)至溶液无色后,再继续吹 30min,加入 10mL 碘化钾溶液,用硫代硫酸钠标准溶液滴定至淡黄色时,加 1mL 淀粉溶液,继续滴至蓝色刚好消失为止,记录读数为 C。

⑤在上述④滴定后的溶液中加入 3.0mL 2.5mol/L 盐酸溶液,调节 pH≤2,并放置暗处 5min,用硫代硫酸钠标准溶液滴定至蓝色刚好消失为止,记录读数为 D。

⑥在 50mL 碘量瓶中加入 1mL 溴化钾溶液和 10mL 浓盐酸,混匀,吸取 2.0mL~5.0mL 样品溶液于碘量瓶中,立即塞住瓶塞并混匀,置于暗处反应 20min,然后加入 10mL 碘化钾溶液,剧烈振荡 5s,立即转移至有 25mL 饱和磷酸氢二钠溶液的 500mL 碘量瓶中,清洗 50mL 碘量瓶并将洗液转移至 500mL 碘量瓶中,使溶液最后体积在 200mL~300mL,再用硫代硫酸钠标准溶液滴定至淡黄色时,加 1mL 淀粉溶液,继续滴至蓝色刚好消失为止,同时用蒸馏水作空白对照,得读数为 E = 样品读数 - 空白读数。

(4) 计算公式

F、G、H、I 分别按式 (1) ~ (4) 计算:

$$F = \frac{(B - D) \times C \times 16863}{V} \dots\dots\dots (1)$$

$$G = \frac{D \times C \times 16863}{V} \dots\dots\dots (2)$$

$$H = \frac{[E - (A + B)] \times C \times 13908}{V} \dots\dots\dots (3)$$

$$I = \frac{[A - (B - D) \div 4] \times C \times 35450}{V} \dots\dots\dots (4)$$

式 (1) ~ (4) 中:

F — ClO₂ 的浓度, mg/L;

G — ClO_2^- 的浓度, mg/L;

H — ClO_3^- 的浓度, mg/L;

I — Cl_2 的浓度, mg/L;

A. B. D. E — 上述各步中硫代硫酸钠标准溶液用量, mL;

C — 硫代硫酸钠标准溶液的浓度, mol/L;

V — 二氧化氯溶液的样品体积, mL。

(5) 方法检出限 0.1mg/L, 平均回收率 98.0%, 相对标准偏差 <10%。

(6) 注意事项: 本方法规定了用五步碘量法测定消毒剂中二氧化氯。同时还可以测定消毒剂中的氯气、亚氯酸根离子、氯酸根离子的含量。本方法适用于由亚氯酸盐、氯酸盐为原料制成的二氧化氯消毒剂。

在实验操作时要防止阳光直射, 准备工作要充分到位, 尽可能缩短操作时间, 以防止二氧化氯因挥发、分解而影响测定的准确性。

第二法 分光光度法

(1) 二氧化氯标准贮备溶液制备:

在 A 瓶中放入 300mL 水, 将 A 瓶一端玻璃管与空气压缩机相接, 另一玻璃管与 B 瓶相连。B 瓶为高强度硼硅玻璃瓶, 瓶口有三根玻璃管; 第一根插至离玻璃瓶底 5mm 处, 用以引进空气; 第二根上接滴液漏斗, 漏斗下端伸至液面下; 第三根下端离开液面, 上端与 C 瓶相接。溶解 10g 亚氯酸钠于 750mL 水中并倒入 B 瓶中; 在分液漏斗中装有 10% 硫酸溶液 20mL。C 瓶装亚氯酸钠饱和溶液。D 瓶为 2L 硼硅玻璃收集瓶, 瓶中装有 1500mL 水, 用以吸收所发生的二氧化氯, 余气由排气管排出。整套装置应放在通风橱内 (见图 3-4)。

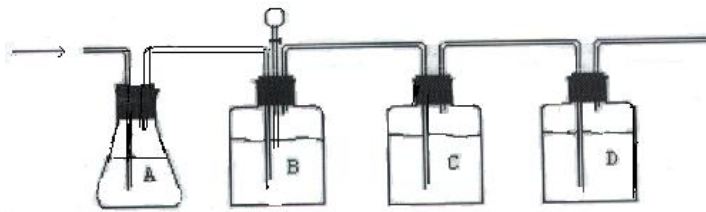


图 3-4 ClO_2 发生吸收装置图

启动空气压缩机, 使空气均恒通过整个装置。每隔 5min 由分液漏斗加入 5mL 硫酸溶液, 加完最后一次硫酸溶液后, 空气流量持续 30min。所获得的黄色二氧化氯标准溶液放于棕色瓶中, 4°C 保存, 其浓度应为 250mg/L~600mg/L。

(2) 二氧化氯标准溶液的制备:

临用前吸取一定量二氧化氯标准贮备液(按第一法准确标定),用二次蒸馏水稀释至浓度为250mg/L。

(3) 标准曲线的绘制

分别取0.0、4.00、10.0、20.0、40.0、60.0、80.0、100.0mL 二氧化氯标准溶液于100mL容量瓶中,加二次蒸馏水至刻度,配成浓度为0、10、25、50、100、150、200、250mg/L的二氧化氯溶液,以蒸馏水为空白于360nm~430nm处测定吸光度值,以二氧化氯的质量(mg)对吸光度值进行线性回归,并绘制标准曲线。

(4) 样品测定

直接取消毒剂溶液或其稀释液以蒸馏水为空白于360nm~430nm测定其吸光度值,根据标准曲线方程计算其中所含二氧化氯的浓度(mg/L)。

(5) 计算:

$$X(\text{mg/L}) = \frac{\rho \times V_1}{V_2}$$

式中: X 为二氧化氯含量, mg/L; ρ 为标准曲线方程计算二氧化氯的浓度, mg/L; V_1 为消毒剂稀释后体积, mL; V_2 为消毒剂稀释前体积, mL。

方法检出限10mg/L,标准曲线线性范围10mg/L~250mg/L,方法平均回收率103.3%,相对标准偏差<10%。

3.1.2.7 有效溴含量的测定

(1) 原理 在酸性溶液中,含溴消毒剂中的有效溴氧化溶液中的碘化钾产生等摩尔的碘,用硫代硫酸钠标准溶液滴定释放出的碘,根据硫代硫酸钠标准溶液的用量,计算有效溴的含量。

(2) 试剂配制 碘化钾,硫酸溶液(1+8),5g/L淀粉指示剂。配制并标定0.1mol/L硫代硫酸钠滴定液(见3.1.3.1)。

(3) 样品测定 称取样品0.15g(精确至0.0002g),置于先加有125mL水、2g碘化钾的250mL碘量瓶中,在电磁搅拌器上充分搅拌,使样品完全溶解,加硫酸溶液(1+8)20mL。盖上盖并振摇混匀后加蒸馏水数滴于碘量瓶盖缘,置暗处5min。打开盖,让盖缘蒸馏水流入瓶内。用硫代硫酸钠标准液滴定游离碘,边滴边摇匀。待溶液呈淡黄色时加入5g/L淀粉溶液10滴,溶液立即变蓝色。继续滴定至蓝色消失,记录用去的硫代硫酸钠滴定液总量,必要时将滴定结果用空白试验校正。重复测2次,取2次平均值进行以下计算。

(4) 计算公式 因 1mol/L 硫代硫酸钠滴定液 1mL 相当于 0.07991g 有效溴,按下式计算有效溴含量:

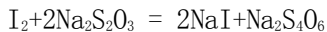
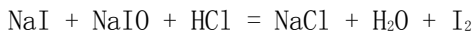
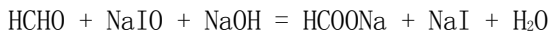
$$\omega (\%) = \frac{c \times V_{st} \times 0.07991}{m} \times 100\%$$

式中: ω 为有效溴含量, %; c 为硫代硫酸钠标准溶液浓度, mol/L; V_{st} 为滴定用去硫代硫酸钠滴定液体积(减空白), mL; m 为称取样品的质量, g;。

(5) 注意事项 本方法适用于测定单一含溴消毒剂中的有效溴。

3.1.2.8 甲醛(CH₂O)含量的测定

(1) 原理 在碱性溶液中, 甲醛被碘氧化为相应的酸, 而后调节溶液的酸碱度至弱酸性, 用硫代硫酸钠标准溶液滴定剩余碘, 根据加入的碘和消耗的硫代硫酸钠的量, 计算甲醛含量。有关反应式为:



(2) 试剂配制 50g/L 氢氧化钠溶液、稀盐酸溶液(1+2)与 5g/L 淀粉溶液。配制并标定 0.05mol/L 硫代硫酸钠滴定液(见 3.1.3.1)与 0.05mol/L 碘滴定液(见 3.1.3.2)。

(3) 样品测定 精密吸取样品适量, 使其相当于甲醛约 0.30g, 置于 100mL 容量瓶中, 用蒸馏水稀释至刻度, 混匀。向碘量瓶中加 50g/L 氢氧化钠溶液 10mL 和混匀的甲醛稀释液 5.0mL, 再自 50mL 滴定管缓慢加入 0.05mol/L 碘滴定液约 40mL, 边加边摇匀, 至溶液呈鲜黄色, 精确记下用去的碘滴定液毫升数。将碘量瓶盖上盖子并加蒸馏水于盖缘。放置 20min 后再加入 25mL 稀盐酸, 并用 0.05mol/L 硫代硫酸钠滴定液(装入 25mL 滴定管中)滴定至溶液呈淡黄色。加入 5g/L 淀粉溶液 10 滴(溶液立即变蓝色), 继续用硫代硫酸钠滴定液滴定至蓝色消失。记录硫代硫酸钠滴定液总用量。重复测 2 次, 取 2 次的平均值进行以下计算。

(4) 计算公式 因 1mol/L 碘滴定液 1mL 相当于 0.01501g 甲醛, 故可按下式计算甲醛含量:

$$V_{IS} = \frac{c_{st} \times V_{st}}{c_I} \quad V_{IF} = V_I - V_{IS}$$

$$\rho (g/L) = \frac{c_I \times V_{IF} \times 0.01501}{V} \times 1000$$

式中: ρ 为甲醛含量, g/L; V_{IS} 为与硫代硫酸钠反应的碘滴定液体积, mL; c_{st} 为硫代硫酸

钠滴定液的浓度, mol/L; V_{st} 为硫代硫酸钠滴定液的体积, mL; c_I 为碘滴定液浓度, mol/L; V_I 为碘滴定液滴定中用去的体积, mL; V_{IF} 为与甲醛反应消耗的碘滴定液, mL; V 为碘量瓶中所含甲醛样液体积, mL。

(5) 注意事项 本方法适用于测定单一甲醛消毒剂中的甲醛含量。

3.1.2.9 戊二醛 (C₅H₈O₂) 含量的测定

(1) 原理 戊二醛与三乙醇胺溶液反应, 以盐酸羟胺中性溶液作指示剂, 用硫酸标准溶液滴定剩余三乙醇胺溶液, 根据硫酸标准溶液的用量计算戊二醛的含量。

(2) 试剂配制 65g/L 三乙醇胺溶液、0.4g/L 溴酚蓝乙醇溶液与盐酸羟胺中性溶液(17.5g 盐酸羟胺加蒸馏水 75mL 溶解, 并加异丙醇稀释至 500mL, 摇匀。加 0.4g/L 溴酚蓝乙醇溶液 15mL, 用 65g/L 三乙醇胺溶液滴定至溶液显蓝绿色)。配制并标定 0.25 mol/L 硫酸滴定液(见 3.1.3.4)。

(3) 样品测定 精密吸取样品适量, 使其相当于戊二醛约 0.2g, 置 250mL 碘量瓶中, 精确加 65g/L 三乙醇胺溶液 20.0mL 与盐酸羟胺中性溶液 25mL, 摇匀。静置反应 1h 后, 用 0.25mol/L 硫酸滴定液(装于 25mL 滴定管中)滴定。待溶液显蓝绿色, 记录硫酸滴定液用量。同时, 以不含戊二醛的三乙醇胺、盐酸羟胺中性溶液重复上述操作(空白对照)。重复测 2 次, 取 2 次的平均值进行以下计算。

(4) 计算公式 因 1mol/L 硫酸滴定液 1mL 相当于 0.1001g 戊二醛, 按下式计算戊二醛含量:

$$\rho \text{ (g/L)} = \frac{c \times (V_2 - V_1) \times 0.1001}{V} \times 1000$$

式中: ρ 为戊二醛含量, g/L; c 为硫酸滴定液浓度, mol/L; V_1 与 V_2 分别为样品与空白对照滴定中用去的硫酸滴定液体积, mL; V 为戊二醛样品体积, mL。

(5) 注意事项 本方法适用于测定醛类消毒剂中戊二醛有效成分的含量。方法的关键是配制盐酸羟胺中性溶液时, 应看准蓝绿色。对于高浓度的戊二醛, 应预先稀释至质量浓度为 2% 左右稀溶液后再进行测定。

3.1.2.10 环氧乙烷 (C₂H₄O) 含量的测定

第一法 容量分析法

(1) 原理 环氧乙烷用盐酸处理时, 导致环的破裂, 同时消耗等摩尔的盐酸。先用一定量

的盐酸和环氧乙烷作用, 然后再用氢氧化钠标准溶液滴定过量的盐酸。根据盐酸和氢氧化钠标准溶液的用量, 计算环氧乙烷的含量。

(2) 试剂配制 5 g/L 甲基橙溶液及盐酸-氯化镁溶液(在 0.2mol/L 盐酸中加入 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 120g, 溶解并稀释至 100mL)。配制并标定 0.1mol/L 氢氧化钠滴定液(见 3.1.3.5)。

(3) 样品测定 取 20mL 盐酸-氯化镁溶液放入 40mL 容量瓶中, 盖上瓶盖, 称重。于冰瓶中取出装有环氧乙烷样品的容器, 取样品适量, 使其相当于环氧乙烷约 40mg~50mg, 尽快置于称量瓶中, 重新盖上瓶盖, 混匀, 称重。两次重量差即为环氧乙烷样品重量。然后, 加 5g/L 甲基橙溶液 1 滴作为指示剂, 用 0.1mol/L 氢氧化钠滴定液(装入 25mL 滴定管中) 滴定。当红色溶液变成黄色时, 记录氢氧化钠滴定液用量。同时以蒸馏水代替环氧乙烷重复上述操作(空白对照)。重复测 2 次, 取 2 次的平均值进行以下计算。

(4) 计算公式 因 1mol/L 氢氧化钠滴定液 1mL 相当于 0.04405g 环氧乙烷, 故可用下式计算其含量:

$$\omega (\%) = \frac{c \times (V_2 - V_1) \times 0.04405}{m} \times 100\%$$

式中: ω 为环氧乙烷含量, %; c 为氢氧化钠滴定液浓度, mol/L; V_1 与 V_2 分别为样品与空白对照滴定中用去的氢氧化钠滴定液体积, mL; m 为环氧乙烷样品的质量, g。

第二法 气相色谱法

(1) 原理 采用色谱柱分离, 氢火焰离子化检测器检测, 根据保留时间定性, 峰高或峰面积定量。

(2) 色谱参考条件与系统适用性试验 色谱柱: 2m×4mm 不锈钢柱; 固定相: 角鲨烷-吐温 80-101 白色硅烷化担体 (10:0.5:100); 柱温 60℃; 气化室温度 150℃; 检测室温度 150℃; 载气 (N_2) 流速 50mL/min。理论塔板数按环氧乙烷峰计算, 应不低于 500, 环氧乙烷峰与其他杂质峰的分离度应大于 1.5。

(3) 标准曲线的绘制 用 5mL 注射器取一定量的环氧乙烷纯气(在标准状况下 1mL 环氧乙烷气体重 1.965mg), 注入 100mL 注射器中, 用清洁空气稀释至 100mL, 计算环氧乙烷浓度, 然后再用 100mL 注射器适当稀释配成环氧乙烷浓度为 0.0025、0.005、0.01、0.05mg/L 及 0.1 mg/L 的标准气体。分别进样 0.1mL, 测量其峰高, 以环氧乙烷峰高对其质量 (μg) 进行线性回归, 计算线性回归方程。

(4) 样品测定 用大气采样器在现场采集一定量的空气，取 0.1mL 空气样品（记录温度及气压）直接进样，测其峰高，根据线性回归方程计算样品中环氧乙烷含量。

(5) 计算公式 按下式将换算成体积，并计算环氧乙烷的含量。

$$V_0 = V \times \frac{273}{273+t} \times \frac{p}{101.3}$$

$$X (\text{mg} / \text{m}^3) = \frac{m \times 1000}{V_0}$$

式中： X 为样品中环氧乙烷的含量， mg/m^3 ； V 为进样体积， mL ； p 为测定样品时的气压， KPa ； t 为测定样品时的温度， $^{\circ}\text{C}$ ； m 为样品中环氧乙烷的质量， μg ； V_0 为换算为标准状况下的样品体积， mL 。

3.1.2.11 乙醇 ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$) 含量的测定

第一法 气相色谱法（同样适用于异丙醇含量的测定）：

(1) 原理 以聚乙二醇类色谱柱分离，氢火焰离子化检测器检测，根据保留时间定性，峰高或峰面积定量。

(2) 色谱参考条件 色谱柱：2.0m×4mm 玻璃柱；固定相：GDX—102（60—80目）；柱温 180 $^{\circ}\text{C}$ ；进样口温度和检测器温度 230 $^{\circ}\text{C}$ ；载气（ N_2 ）流速 45 mL/min ；氢气流速 45 mL/min ；空气流速 450 mL/min 。

(3) 标准曲线的绘制 配制乙醇质量浓度分别为 0、100、300、500、1000 及 2000 mg/L 的乙醇标准系列，取 1 μL 标液进入气相色谱仪测其峰高，以乙醇峰高对其含量绘制标准曲线。

(4) 样品测定 直接取 1 μL 样品溶液或稀释液进入气相色谱仪测其峰高，与标准系列比较而定量。

(5) 计算公式

$$X = A \times \frac{V_1}{V_2}$$

式中： X 为样品中乙醇质量浓度， mg/L ； A 为样品测定溶液中乙醇质量浓度， mg/L ； V_1 为样品稀释后定容的体积， mL ； V_2 为取样品原液的体积， mL 。

本方法检出限 0.1%，方法线性范围 0.0%~2.0%，加标回收率 99.5%，相对标准偏差 <10%。

(6) 注意事项 用气相色谱法能完全分离甲醇、乙醇、异丙醇、正丁醇和异戊醇，因此这类脂肪醇不干扰测定。本方法适合测定基体较复杂时，消毒剂样品中的乙醇有效成分。本法也能用于其他醇类消毒剂，根据有效成分的不同，可适当调节色谱条件尤其是温度。

第二法 比重法:

(1) 原理 根据阿基米德定理,当酒精计在酒精溶液中平衡时,它所排开酒精溶液质量等于酒精计本身质量,根据酒精计的质量和排开酒精溶液的体积,可得出溶液的相对密度,再换算成体积分数。

(2) 样品测定 于约 20℃ 在量筒中加入适量乙醇样品溶液,其量以使酒精比重计放入后能充分浮起为准。将比重计下按后,缓慢松手,当其上浮静止且溶液无气泡时,读取液面处比重计刻度即为其百分含量。

(3) 注意事项 本方法操作简单,无需特殊仪器,适用于仅含乙醇和水的溶液。由于不能排除其他醇类的干扰,当存在甲醇、异丙醇、正丁醇、异戊醇等的干扰时,应以气相色谱法为准。

3.1.2.12 醋酸氯己定(醋酸洗必泰, $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10} \cdot 2C_2H_4O_2$)含量的测定

第一法 高效液相色谱法

(1) 原理 醋酸氯己定在 254nm 处有紫外吸收,可用反相高效液相色谱(HPLC)分离,并根据保留时间定性,峰面积定量。

(2) 试剂配制 乙腈(色谱纯); 0.02mol/L 磷酸二氢钾溶液:称取磷酸二氢钾 2.7g 加蒸馏水溶解并定容至 1000mL,用磷酸调节 pH 值至 2.5; 醋酸氯己定标准溶液:称取醋酸氯己定标准品 0.1g,用少量蒸馏水溶解后并定容至 100mL,此溶液每 1L 含醋酸氯己定 1g。

(3) 色谱参考条件 色谱柱: C_{18} 柱(150mm×4.6mm I.D., 5 μ m); 流动相: 0.02mol/L 磷酸二氢钾溶液和乙腈以 65:35 的体积比相混合,分析前,经 0.45 μ m 滤膜过滤及真空脱气; 流量: 1.0mL/min; 紫外检测波长: 254nm; 柱温: 25℃。在该色谱条件下,醋酸氯己定的 t_R 约 3.1min。

(4) 标准曲线的绘制 用醋酸氯己定标准溶液配制质量浓度分别为 0、0.05、0.2、0.4 和 0.5g/L 的标准系列。在设定色谱条件下,分别取 5 μ L 进行分析。以标准系列质量浓度为横坐标 C,峰面积为纵坐标 Y,进行线性回归处理,得到线性方程。

(5) 样品测定 若消毒剂中醋酸氯己定的标示浓度过高,需适当稀释,使其稀释后浓度在标准曲线线性范围内。对于固体或膏体样品应先用蒸馏水配制成水溶液。经 0.45 μ m 滤膜过滤备用。在设定的色谱条件下,进 5 μ L 样品溶液进行分析。根据峰面积,从线性方程计算出相应的醋酸氯己定浓度。根据取样量和稀释倍数,换算出样品中醋酸氯己定的最终浓度。

(6) 注意事项 本方法适用于测定各种类型的双胍化合物中醋酸氯己定有效成分,同样适用于测定葡萄糖酸氯己定,但需要校正系数或采用同类标准溶液。如果遇到某些有干扰的复方消毒剂,可适当调整流动相或在流动相中加入适量甲醇以达到最佳分离效果。

第二法 容量分析法

(1) 原理 在酸性溶液中，醋酸氯己定与高氯酸标准溶液发生反应，根据反应中所消耗的高氯酸量，可计算醋酸氯己定的含量。

(2) 试剂配制 甲基橙的饱和丙酮溶液（0.1g 甲基橙加约 50mL 丙酮，振摇使其溶解为饱和溶液）。备丙酮和冰醋酸。配制并标定 0.1mol/L 高氯酸滴定液（见 3.1.3.6）。

(3) 样品测定 精密称取样品适量，使其相当于醋酸氯己定约 0.15g，置于 100mL 锥形瓶中，加丙酮 30mL 与冰醋酸 2mL，振摇使溶解后，加甲基橙的饱和丙酮溶液 1.0mL，用高氯酸滴定液（装入 25mL 滴定管中）滴定。待溶液显橙色，记录高氯酸滴定液用量。同时以不含醋酸氯己定的丙酮与冰醋酸溶液重复上述操作（空白对照）。重复测 2 次，取其平均值进行以下计算。

(4) 计算公式 因 1mL 的 1mol/L 高氯酸滴定液相当于 0.3128g 醋酸氯己定，故可按下列式计算醋酸氯己定含量：

$$\omega (\%) = \frac{c \times (V_1 - V_2) \times 0.3128}{m} \times 100\%$$

式中： ω 为醋酸氯己定含量，%； c 为高氯酸滴定液浓度，mol/L； V_1 与 V_2 分别为样品与空白对照滴定中所用高氯酸滴定液体积，mL； m 为醋酸氯己定样品质量，g。

(5) 注意事项 本法仅适用于非水溶液的样品。若为醋酸氯己定水溶液样品，则量取约含醋酸氯己定 0.15g 的溶液，置于预先称重的洁净蒸发皿（重量为 G_1 ）中。置水浴上加热蒸干，称重（ G_2 ）。以 G_2 减去 G_1 即得醋酸氯己定重量。然后，用 30mL 丙酮加 2mL 冰醋酸，分 3 次将蒸发皿上不挥发物洗入碘量瓶中。待不挥发物全部溶解后，按上述方法测定并计算其含量。亦可以水溶液毫升数代入公式中的 m ，计算醋酸氯己定的含量（g/L）。

葡萄糖酸氯己定含量的测定，可参照上述测定步骤，计算公式如下：

$$\omega (\%) = \frac{c \times (V_1 - V_2) \times 0.4489}{m} \times 100\%$$

3.1.2.13 季铵盐含量的测定

(1) 原理 季铵盐可与溴酚蓝等酸性染料形成有色盐，在碱性水溶液中，该有色盐很容易被含氯有机溶剂（如氯仿）提取。由于此盐的结合不及四苯硼钠与季铵盐的结合稳定，所以可利用此盐的性质作为以四苯硼钠滴定季铵盐的指示剂。滴定开始时，季铵盐与溴酚蓝结合，生成蓝色络合物，溶于氯仿层显蓝色。滴定至近终点时，由于四苯硼钠和溴酚蓝结合，并溶于氯仿层显蓝色。滴定接近终点时，溴酚蓝指示剂逐渐从蓝色络合物中被四苯硼钠置换而游离出来，因其不溶于氯仿而转入水层，在剧烈振摇下，氯仿层的蓝色消退而水层呈淡紫色，即为终点。

(2) 试剂配制 氢氧化钠试液 (4.3g 氢氧化钠加蒸馏水溶解成 100mL 溶液)、溴酚蓝指示液 (0.1g 溴酚蓝加 0.05mol/L 氢氧化钠溶液 3mL, 溶解, 再加蒸馏水至 200mL)。备氯仿。配制并标定 0.02mol/L 四苯硼钠滴定液 (3.1.3.7)。

(3) 样品测定 精密称取样品适量 (液体样品取适量体积), 使其相当于季铵盐约 0.25g, 置 250mL 碘量瓶中。加蒸馏水 50mL 与氢氧化钠试液 1mL, 摇匀。再加溴酚蓝指示液 0.4mL 与氯仿 10mL。用四苯硼钠滴定液 (装入 50mL 滴定管中) 滴定, 边滴边摇匀, 接近终点时须强力振摇。待氯仿层的蓝色消失, 记录四苯硼钠滴定液用量。重复测 2 次, 取 2 次的平均值进行以下计算。同时做空白实验。

(4) 计算公式 若消毒剂中有效成分为苯扎溴铵, 因 1mol/L 四苯硼钠滴定液 1mL 相当于 0.3984g 苯扎溴铵, 按下式计算其含量:

固体样品

$$\omega(\%) = \frac{c \times V_{st} \times 0.3984}{m} \times 100\% \quad (1)$$

液体样品

$$\rho(g/L) = \frac{c \times V_{st} \times 0.3984}{V} \times 1000 \quad (2)$$

式中: ω 、 ρ 为苯扎溴铵含量, %或 g/L; c 为四苯硼钠滴定液的浓度, mol/L; V_{st} 为四苯硼钠滴定液样品与空白体积差, mL; m 为碘量瓶中苯扎溴铵质量, g; V 为碘量瓶中含苯扎溴铵原液体积, mL。

(5) 注意事项 本方法适用于测定消毒剂中季铵盐有效成分的总量。若消毒剂中有效成分为苯扎氯铵, 则计算公式中, 系数应为 0.3540。消毒剂中季铵盐有效成分不同, 则系数不同。对于复方消毒剂, 如含多种季铵盐成分, 采用本方法只能测定季铵盐有效成分的总量, 不能分别测定每种季铵盐成分, 表示时可以其中一种季铵盐成分计。

3.1.2.14 甲酚皂 (煤酚皂, C_7H_6O) 含量的测定

(1) 原理 采用色谱柱分离, 氢火焰离子化检测器检测, 根据保留时间定性, 峰高或峰面积定量。

(2) 色谱参考条件与系统适用性试验 以含 2% 磷酸的己二酸乙二醇聚酯为固定相, 涂布浓度为 4%~10%, 氢火焰检测器, 柱温为 145℃, 进样口和检测器温度为 200℃。

(3) 校正因子测定 精密称取水杨醛约 1.3g, 置 50mL 容量瓶中, 加乙醚使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为内标溶液。另精密称取邻位甲酚对照品约 0.65g, 至 25mL 容量瓶中, 加

乙醚使溶解并稀释至刻度，摇匀，作为对照品溶液。精密量取对照品溶液和内标溶液各 5mL，置具塞试管中，密塞，摇匀。取 1 μ L 注入气相色谱仪，计算邻位甲酚的校正因子，再乘以 1.042，即间，对位甲酚的校正因子。

(4) 样品测定 精密称取本品 1.0g，置分液漏斗中，加盐酸 0.1mL，摇匀，加水 3mL，摇匀，精密加入乙醚 20mL，轻轻振摇，静置分层，弃去水层，加水 5mL，轻轻振摇，分层，弃去水层。精密量取乙醚提取液 5mL 和内标溶液 5mL，置具塞试管中，摇匀，取 1 μ L 注入气相色谱仪，测定。

(5) 计算公式

$$\omega (\%) = \frac{(A_1 \times f_1 + A_2 \times f_2) \times m_1}{A \times m} \times 100\%$$

式中： ω 为甲酚皂含量，%； A 为内标物质峰面积； A_1 为邻位甲酚峰面积； A_2 为间、对位甲酚峰面积； f_1 为邻位甲酚校正因子； f_2 为间、对位甲酚校正因子； m_1 为内标物质质量，g； m 样品中甲酚质量，g。

3.1.2.15 苯甲酸、水杨酸和山梨酸含量的测定

(1) 原理 苯甲酸、水杨酸和山梨酸在 280nm 处有紫外吸收，可用高效液相色谱进行分离，并根据保留时间定性，峰面积定量。

(2) 色谱参考条件 色谱柱： C_{18} 柱；流动相：0.05mol/L 磷酸二氢钾/甲醇/三乙胺 (500/500/1，用磷酸调 pH 至 4.3~4.4)。分析前，经 0.45 μ m 滤膜过滤及真空脱气；紫外检测波长：280nm。

(3) 标准溶液的制备 准确称取水杨酸、苯甲酸和山梨酸各 0.25g，置于 100mL 棕色容量瓶中，加甲醇使其溶解并定容至刻度，摇匀。精密吸取 1.00mL 于 50mL 棕色容量瓶中，用流动相稀释至刻度，摇匀，此溶液各成分浓度为 0.05g/L。

(4) 样品溶液的制备 精密称取样品约 0.5g，置于 50mL 棕色容量瓶中，加甲醇 40mL，超声处理 3min，加甲醇至刻度，摇匀，过滤，弃去初滤液，精密吸取滤液 1.00mL 置另一棕色容量瓶中，用流动相定容至刻度，摇匀。

(5) 样品测定 吸取标准溶液和样品溶液各 10 μ L，分别注入液相色谱仪，记录峰面积，与标准溶液比较而定量。

(6) 计算公式

$$X (\%) = \frac{\rho_{\text{标}} \times A_{\text{样}} \times F \times V}{A_{\text{标}} \times m \times 1000} \times 100\%$$

式中： X 为样品中各成分含量，%； $\rho_{\text{标}}$ 为标准溶液质量浓度，g/L； $A_{\text{样}}$ 为样品测定峰面积； F 为样品溶液稀释倍数； V 为样品定容体积，mL； $A_{\text{标}}$ 为标准溶液峰面积； m 为样品质量，g。

3.1.2.16 2, 4, 4'-三氯-2'-羟基二苯醚 (DP300) 含量的测定

(1) 原理 2, 4, 4'-三氯-2'-羟基二苯醚在 280nm 处有紫外吸收，可用反相高效液相色谱 (HPLC) 分离，并根据保留时间定性，峰面积定量。

(2) 试剂配制 甲醇 (色谱纯)；2, 4, 4'-三氯-2'-羟基二苯醚标准溶液：称取 2, 4, 4'-三氯-2'-羟基二苯醚标准品 0.1g，用少量甲醇溶解后并定容至 100mL，此溶液每 1L 含 2, 4, 4'-三氯-2'-羟基二苯醚 1g。

(3) 色谱参考条件 色谱柱： C_{18} 柱 (150mm×4.6mm I.D., 5 μ m)；流动相：甲醇/水 (80/20)，分析前，经 0.45 μ m 滤膜过滤及真空脱气；流量：1.5mL/min；紫外检测波长：280nm；柱温：25 $^{\circ}$ C。

(4) 标准曲线的绘制 用 2, 4, 4'-三氯-2'-羟基二苯醚标准溶液配制质量浓度分别为 0、200、400、600 和 800mg/L 的标准系列。在设定色谱条件下，分别取 5 μ L 进行分析。以标准系列质量浓度为横坐标 C ，峰面积为纵坐标 Y ，进行线性回归处理，得到线性方程。

(5) 样品测定 若消毒剂中 2, 4, 4'-三氯-2'-羟基二苯醚的标示浓度过高，需适当稀释，使其稀释后浓度在标准曲线线性范围内。对于膏体样品应先用流动相配制成溶液。经 0.45 μ m 滤膜过滤备用。在设定的色谱条件下，进 5 μ L 样品溶液进行分析。根据峰面积，从线性方程计算出相应的 2, 4, 4'-三氯-2'-羟基二苯醚浓度。根据取样量和稀释倍数，换算出样品中 2, 4, 4'-三氯-2'-羟基二苯醚的最终浓度。

(6) 注意事项 本方法适用于测定消毒剂中的 2, 4, 4'-三氯-2'-羟基二苯醚有效成分。如果遇到某些有干扰的消毒剂，可适当调整流动相或在流动相中加入适当的添加剂以达到最佳分离效果。

3.1.2.17 对氯间二甲苯酚含量的测定

(1) 原理 对氯间二甲苯酚在 220nm 处有紫外吸收，可用反相高效液相色谱 (HPLC) 分离，并根据保留时间定性，峰面积定量。

(2) 试剂配制 甲醇 (色谱纯)；对氯间二甲苯酚标准溶液：称取对氯间二甲苯酚标准品 0.1g，用少量甲醇溶解后并定容至 100mL，此溶液每 1L 含对氯间二甲苯酚 11g。

(3) 色谱参考条件 色谱柱： C_{18} 柱 (150mm×4.6mm I.D., 5 μ m)；流动相：甲醇/水 (70/30)，分析前，经 0.45 μ m 滤膜过滤及真空脱气；流量：1.00mL/min；紫外检测波长：220nm；柱温：25 $^{\circ}$ C。

(4) 标准曲线的绘制 用对氯间二甲苯酚标准溶液配制质量浓度分别为 0、200、400、600 和 800 mg/L 的标准系列。在设定色谱条件下，分别取 5 μ L 进行分析。以标准系列质量浓度为横坐标 C，峰面积为纵坐标 Y，进行线性回归处理，得到线性方程。

(5) 样品测定 若消毒剂中对氯间二甲苯酚的标示浓度过高，需适当稀释，使其稀释后浓度在标准曲线线性范围内。对于膏体样品应先用流动相配制成水溶液。经 0.45 μ m 滤膜过滤备用。在设定的色谱条件下，进 5 μ L 样品溶液进行分析。根据峰面积，从线性方程计算出相应的对氯间二甲苯酚浓度。根据取样量和稀释倍数，换算出样品中对氯间二甲苯酚的最终浓度。

(6) 注意事项 本方法适用于测定消毒剂中的对氯间二甲苯酚有效成分。如果遇到某些有干扰的消毒剂，可适当调整流动相或在流动相中加入适当的添加剂以达到最佳分离效果。

3.1.2.18 邻苯二甲醛 (O-phthalaldehyde, 简称 OPA) 含量的测定

(1) 原理 样品中邻苯二甲醛经预处理后，以气相色谱法 FID 检测器分析，保留时间定性，外标法峰面积定量。

(2) 试剂配制 乙醇溶液 (1+1): 用量筒量取 100mL 无水乙醇 (优级纯) 于烧杯中，加入 100mL 纯水，混匀。邻苯二甲醛储备液: 称取 0.3g (精确至 0.1mg) 邻苯二甲醛标准物质溶于 100mL 容量瓶中，用乙醇溶液 (1+1) 溶解、稀释、定容，此储备液浓度为 3 000mg/L。

(3) 色谱参考条件 色谱柱: Polyethylene Glycol, 30.0m \times 0.25mm \times 0.25mm; 检测器: 氢火焰离子化检测器 (FID); 温度: 柱温 180 $^{\circ}$ C; 汽化室温度 250 $^{\circ}$ C; 检测器温度 250 $^{\circ}$ C; 柱流速: 1.0mL/min; 分流比: 30:1; 气体流量: 氢气 40mL/min, 空气 450mL/min, 氮气 40mL/min, 进样量: 1 μ L。

(4) 标准曲线的绘制 从储备液中准确移取 0.20、0.50、1.00、3.00、5.00、10.0mL 溶液于 25mL 容量瓶中，以乙醇溶液 (1+1) 定容，则工作溶液浓度依次为 24.00、60.0、120、360、600、1200mg/L。在规定的色谱条件下，测定其响应值，绘制浓度—峰面积校准曲线或计算线性回归方程。

(5) 样品的预处理 样品用乙醇溶液 (1+1) 稀释后，直接用气相色谱仪测定。

(6) 样品测定 将处理好的样品依次进入气相色谱仪，测得响应值，根据其响应值从校正曲线或从线性回归方程中查出相应含量。根据取样量和稀释倍数，换算出样品中邻苯二甲醛的最终浓度。

(7) 最低检出限 本方法的最低检出限 2.0mg/L。

(8) 方法精密度和准确度 标准溶液和实际样品的相对标准偏差均小于 4.00%，加标回收率为 98.5%~102%。

3.1.3 滴定液的配制及其浓度标定

3.1.3.1 硫代硫酸钠 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 滴定液

(1) 配制 0.1mol/L 硫代硫酸钠滴定液时, 称取 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 26 g, 加无水碳酸钠 0.20g, 用蒸馏水溶解成 1000mL, 摇匀。装于棕色玻璃瓶中, 置暗处, 30d 后经过滤并标定其浓度。

(2) 标定浓度时, 称取经 120°C 烘干至恒重的基准重铬酸钾 0.15g (精确至 0.0001g), 置于 250mL 碘量瓶中, 加蒸馏水 50mL 溶解。加 2mol/L 硫酸 15mL 和 200g/L 碘化钾溶液 10mL, 盖上盖并混匀, 加蒸馏水数滴于碘量瓶盖缘, 置暗处 10min 后再加蒸馏水 90mL。在室温 20°C~25°C, 用装于 50mL 滴定管中的硫代硫酸钠滴定液滴定至溶液呈淡黄色, 加 5g/L 淀粉溶液 10 滴 (溶液立即变蓝), 继续滴定到溶液由蓝色变成亮绿色。记录硫代硫酸钠滴定液总毫升数, 并将滴定结果用空白试验校正。若空白试验中有硫代硫酸钠消耗, 则将滴定用去的硫代硫酸钠滴定液毫升数减去空白试验中其用量, 得校正后的硫代硫酸钠滴定液毫升数。因为 1mol/L 硫代硫酸钠滴定液 1mL 相当于 0.04903g 重铬酸钾, 故可按下式计算硫代硫酸钠滴定液浓度:

$$C(\text{mol/L}) = \frac{m}{0.04903 \times V}$$

式中: C 为硫代硫酸钠滴定液浓度, mol/L; m 为碘量瓶中重铬酸钾质量, g; V 为硫代硫酸钠滴定液 (减空白) 体积, mL。

用 0.05mol/L 硫代硫酸钠滴定液时, 在临用前于容量瓶中加蒸馏水稀释 0.1mol/L 该液制成。必要时可标定其浓度。

(3) 注意事项

① 配制的碘化钾溶液及所用碘化钾易被空气氧化, 每次取后应及时加盖。一旦变成黄色即不可再用。

② 用硫代硫酸钠溶液滴定需加淀粉溶液时, 一定待溶液至淡黄色再加。过早加淀粉, 溶液中多量的游离碘易与淀粉生成过多的碘淀粉吸附产物, 影响终点的准确。

3.1.3.2 碘 (0.5I_2) 滴定液

(1) 配制 0.1mol/L 碘 (0.5I_2) 滴定液时, 称取 13g 碘片、36g 碘化钾, 加 100mL 蒸馏水溶解后, 再加浓盐酸 3 滴与蒸馏水使成 1000mL。混匀, 装于带玻璃塞的棕色玻璃瓶中, 保存于暗处备用。

(2) 标定浓度时, 向 100mL 碘量瓶中加已知浓度 (0.05mol/L~0.09mol/L) 的硫代硫酸钠滴定液 25.0mL, 5g/L 淀粉溶液 2mL, 摇匀。用装于 25mL 滴定管中的碘滴定液滴定至溶液变成蓝色, 记录用去的碘滴定液毫升数。因 1mol/L 碘滴定液相当于同容量的 1mol/L 硫代硫酸钠滴

定液，故可按下式计算碘滴定液浓度：

$$C(\text{mol/L}) = \frac{C_1 \times V_2}{V}$$

式中： C 为碘滴定液浓度，mol/L； C_1 为硫代硫酸钠滴定液浓度，mol/L； V_1 为硫代硫酸钠滴定液体积，mL； V 为碘滴定液体积，mL。

用 0.05mol/L 碘滴定液时，在临用前于容量瓶中加蒸馏水稀释 0.1mol/L 该液制成。必要时可标定其浓度。

3.1.3.3 高锰酸钾 (KMnO₄) 滴定液

(1) 配制 0.02mol/L 高锰酸钾滴定液时，称取 3.2g 高锰酸钾，溶于 1000mL 蒸馏水中，煮沸 15min。冷后装于玻璃瓶中，严密塞上塞子。静置 2d 后，用垂熔玻璃滤器滤过，将滤液混匀，装瓶保存。

(2) 标定浓度时，称取经 105℃ 烘干至恒重的基准草酸钠 0.2g (精确至 0.0001g)，置烧杯中，加蒸馏水 250mL 与硫酸 10mL，搅拌使溶解。自 50mL 滴定管中迅速加入高锰酸钾滴定液约 25mL，待褪色后，置水浴上加热至 65℃。继续用高锰酸钾滴定液滴定至溶液显微红色并持续 30s 不褪色时 (此时液温仍 >55℃)，记录用去的高锰酸钾滴定液毫升数。因 1mol/L 高锰酸钾滴定液 1mL 相当于 0.3350g 草酸钠，用下式计算其浓度：

$$C(\text{mol/L}) = \frac{m}{0.3350 \times V}$$

式中： C 为高锰酸钾滴定液浓度，mol/L； m 为草酸钠质量，g； V 为高锰酸钾滴定液体积，mL。

3.1.3.4 硫酸 (H₂SO₄) 滴定液

(1) 配制 0.25mol/L 硫酸滴定液时，取硫酸 15mL，沿盛有蒸馏水的烧杯壁缓缓注入水中。待溶液温度降至室温，再加蒸馏水稀释至 1000mL，摇匀。

(2) 标定浓度时，称取经 270℃~300℃ 烘干至恒重的基准无水碳酸钠 0.4g (精确至 0.0001g)，置 250mL 碘量瓶中，加蒸馏水 50mL 使溶解。加甲基红-溴甲酚绿混合指示液 (1g/L 甲基红乙醇溶液 20mL 与 2g/L 溴甲酚绿乙醇溶液 30mL 混匀) 10 滴，用配制的硫酸滴定液 (装入 50mL 滴定管中) 滴定。待溶液由绿色转变为紫红色时，煮沸 2min。冷却至室温后，继续滴定至溶液由绿色变为暗紫色，记录用去的硫酸滴定液总毫升数。因 1mol/L 硫酸滴定液 1mL 相当于 0.1060g 无水碳酸钠，按下式计算硫酸滴定液浓度：

$$C(\text{mol/L}) = \frac{m}{0.1060 \times V}$$

式中： C 为硫酸滴定液浓度，mol/L； m 为无水碳酸钠质量，g； V 为硫酸滴定液体积，mL。

3.1.3.5 氢氧化钠 (NaOH) 滴定液

(1) 称取 37g 氢氧化钠, 加蒸馏水振摇, 使溶解成 50mL 饱和溶液。冷却后, 置聚乙烯塑料瓶中, 静置数日待澄清。配制 0.1mol/L 氢氧化钠滴定液时, 取澄清的氢氧化钠饱和溶液 5.6mL, 加蒸馏水成 1000mL, 摇匀。

(2) 标定浓度时, 称取经 105℃ 烘干至恒重的基准邻苯二甲酸氢钾 0.4g (精确至 0.0001g), 置 250mL 碘量瓶中。加蒸馏水 50mL 溶解, 加 2 滴酚酞指示液 (1g 酚酞, 加乙醇溶成 100mL 溶液), 用氢氧化钠滴定液 (装于 50mL 碱式滴定管中) 滴定。待溶液呈红色时, 记录用去的氢氧化钠滴定液毫升数。因 1mol/L 氢氧化钠滴定液 1mL 相当于 0.2042g 邻苯二甲酸氢钾, 按下式计算其浓度:

$$C(\text{mol/L}) = \frac{m}{0.2042 \times V}$$

式中: C 为氢氧化钠滴定液浓度, mol/L; m 为邻苯二甲酸氢钾质量, g; V 为氢氧化钠滴定液体积, mL。

3.1.3.6 高氯酸 (HClO₄) 滴定液

(1) 配制 0.1mol/L 高氯酸滴定液时, 取冰醋酸 750mL, 缓缓加入高氯酸 (浓度为 70%~72% 者) 8.5mL, 振摇使混匀。在室温下缓缓滴加醋酐 (边加边摇) 23mL 后, 摇匀。待冷却后, 加冰醋酸使成 1000mL 溶液, 摇匀, 放置 24h 后标定其浓度。

(2) 标定浓度时, 称取经 105℃ 烘干至恒重的基准邻苯二甲酸氢钾 0.4g (精确至 0.0001g), 置 100mL 碘量瓶中, 加冰醋酸 20mL 使溶解, 加结晶紫指示液 (0.5g 结晶紫用冰醋酸溶成 100mL 溶液) 1 滴, 用配制的高氯酸滴定液 (装于 25mL 滴定管中) 滴定。待溶液由紫色变成蓝色时, 记录用去的高氯酸滴定液毫升数。同时, 使用不含邻苯二甲酸氢钾的冰醋酸重复上述操作 (空白对照)。因 1mol/L 高氯酸滴定液 1mL 相当于 0.2042g 邻苯二甲酸氢钾, 用下式计算其浓度:

$$C(\text{mol/L}) = \frac{m}{0.2042 \times (V_1 - V_2)}$$

式中: C 为高氯酸滴定液浓度, mol/L; m 为邻苯二甲酸氢钾质量, g; V_1 、 V_2 为样本组与空白组用去高氯酸滴定液体积, mL。

3.1.3.7 四苯硼钠 [(C₆H₅)₄BNa] 滴定液

(1) 配制 0.02mol/L 四苯硼钠滴定液时, 称取四苯硼钠 7.0g, 加蒸馏水 50mL, 振摇使溶解。加入新配制的氢氧化铝凝胶 (取三氯化铝 1.0g, 溶于 25mL 蒸馏水中。在不断搅拌下缓缓滴

加氢氧化钠试液至 pH 为 8~9) 与氯化钠 16.6g, 充分搅拌均匀。然后, 加蒸馏水 250mL, 振荡 15min。静置 10min, 过滤。取滤液, 并滴加氢氧化钠试液至 pH 为 8~9, 再加蒸馏水稀释至 1000mL, 摇匀。

(2) 标定浓度时, 精确量取本液 10.0mL, 加醋酸-醋酸钠缓冲液(取无水醋酸钠 20g, 加蒸馏水 300mL 溶解。加溴酚蓝指示液 1mL 与冰醋酸 60mL~80mL, 至溶液从蓝色变为纯绿色, 再加水稀释至 1000mL。pH 3.7) 10mL 与溴酚蓝指示液 0.5mL。用 0.01mol/L 羟铵盐滴定液(见 2.2.1.3.8) 滴定至蓝色。同时做不含本液的空白试验滴定。因 1mol/L 四苯硼钠滴定液 1mL 相当于 1mol/L 羟铵盐滴定液 1mL, 故可按下列式计算其浓度:

$$C(\text{mol/L}) = \frac{(V_1 - V_2) \times C}{V}$$

式中: C 为四苯硼钠滴定液浓度, mol/L; V_1 、 V_2 为样本组与空白组用去羟铵盐体积, mL; C_1 为羟铵盐滴定液浓度, mol/L; V 为量取四苯硼钠滴定液的体积, mL。

3.1.3.8 羟铵盐 ($\text{C}_{22}\text{H}_{40}\text{ClN}$) 滴定液

(1) 配制 0.01mol/L 羟铵盐滴定液时, 取氯化二甲基苄基羟铵 3.8g, 加蒸馏水使溶解。再加醋酸-醋酸钠缓冲液 (pH 3.7) 10mL, 并加蒸馏水稀释成 1000mL, 摇匀。

(2) 标定浓度时, 称取经 150°C 烘干 1h 的分析纯氯化钾 0.18g(精确至 0.0001g), 置 250mL 容量瓶中, 加醋酸-醋酸钠缓冲液 (pH 3.7) 使溶解并稀释至刻度, 摇匀。精确吸取稀释液 20.0mL, 置 50mL 容量瓶中, 精确加 0.02mol/L 四苯硼钠溶液 25.0mL, 再加蒸馏水至刻度, 摇匀后经干燥滤纸过滤。弃去初滤液, 精确取续滤液 25.0mL, 置 250mL 碘量瓶中, 加溴酚蓝指示液 0.5mL, 用配制的羟铵盐滴定液滴定。待溶液呈蓝色时, 记录用去的羟铵盐滴定液毫升数。同时, 用不含氯化钾的醋酸-醋酸钠缓冲液重复上述操作(空白对照)。因 1mol/L 羟铵盐滴定液 1mL 相当于 0.07455g 氯化钾, 故可用下列式计算羟铵盐滴定液浓度:

$$C(\text{mol/L}) = \frac{m}{0.07455 \times (V_1 - V_2)}$$

式中: C 为羟铵盐滴定液浓度, mol/L; m 氯化钾质量, g; V_1 、 V_2 为样本组与空白组用去羟铵盐滴定液体积, mL。

3.1.4 pH 值的测定

(1) 样品处理: 原液直接测定 pH 值, 对于需调节 pH 后使用的消毒剂, 加入 pH 调节剂后, 再次测定 pH 值。固体样品按使用最高浓度, 测定其溶液的 pH 值。啫哩, 乳液, 强酸(碱)性样品按样品+纯水=1+9(V/V 或 W/V) 比例准确称取放入 50mL 烧杯中, 搅拌 5min 或超声 1min~

2min 使样品溶液混合均匀，冷却至室温，测定溶液的 pH 值。

(2) 测定方法：水溶液样品经 pH 试纸确定溶液 pH 范围后，用相应的 pH 校正液校正 pH 计，再测定样品的 pH 值。以有机物为溶剂的样品采用 pH 试纸测定 pH 值。

(3) 仪器校正中常用的标准缓冲液：应使用标准缓冲物质配制，配制方法如下。

①邻苯二甲酸氢钾标准缓冲液 (pH4.00, 20℃) 精密称取在 115℃±5℃ 干燥 2h~3h 的邻苯二甲酸氢钾 (KHC₈H₄O₄) 10.12g，加水使溶解并稀释至 1000mL。

②磷酸盐标准缓冲液 (pH6.88, 20℃) 精密称取在 115℃±5℃干燥 2h~3h 的无水磷酸氢二钠 3.533 g 与磷酸二氢钾 3.387 g，加水使溶解并稀释至 1000 mL。

③硼砂标准缓冲液 (pH9.23, 20℃) 精密称取硼砂 (Na₂B₄O₇·10H₂O) 3.80g (注意避免风化)，加水使溶解并稀释至 1000mL，置聚乙烯塑料瓶中，密塞，避免与空气中二氧化碳接触。

3.1.5 氧化还原电位 (ORP) 的测定

样品一般为液体，可采用铂电极，在酸度计“mV”档上直接测定读数。

3.1.6 重金属 (以铅计) 检查

第一法：

具体检验方法参见 GB 9985。

第二法：石墨炉原子吸收法测定铅

(1) 原理 样品注入石墨炉原子化器中经高温原子化，待测元素铅的基态原子吸收同种元素空心阴极灯发出的 283.3nm 共振线，在一定范围内其吸收值与铅含量成正比。

(2) 试剂配制 所用试剂均为优级纯； ρ (HNO₃) =3%；铅标准溶液 (100mg/L)：国家标准物质中心购买。将此溶液用 ρ (HNO₃) =3% 稀释成 1000 μ g/L 铅的标准使用液；基体改进剂 NH₄H₂PO₄ (50g/L)：称取 5.00g 磷酸二氢铵，用水溶解稀释至 100mL。

(3) 仪器参考条件 波长：283.3nm；狭缝：0.5nm；灯电流：4mA；测量模式：峰高；测量方式：标准曲线法；进样体积：标准溶液 10 μ L，样品溶液 10 μ L，基体改进剂 5 μ L。

石墨炉升温程序：

步骤	温度 (°C)	时间 (s)	流量 (L/min)
干燥	85	10.0	3.00
	110	40.0	3.00
灰化	700	15.00	3.00

	700	10.0	3.00
	700	2.0	0.0
原子化	1800	1.0	0.0
	1800	4.00	0.0
烧尽	2200	2.0	3.00

(4) 标准曲线的绘制 分别准确吸取铅标准使用液(1000 $\mu\text{g/L}$) 0.00、0.50、1.00、3.00、5.00、7.00mL 于 100mL 容量瓶中,用 $\rho(\text{HNO}_3)=3\%$ 定容至刻度,配制成标准曲线的浓度为 0.00、5.00、10.0、30.0、50.0、70.0 $\mu\text{g/L}$ 。在给定的仪器条件下,分别将标准曲线溶液和基体改进剂上机测定绘制标准曲线。

(5) 样品预处理 依照各消毒产品使用说明书中的使用方法稀释,取稀释后的使用液 25 mL 于锥形瓶中,放数粒玻璃珠置于电热板上加热赶氯气、氧气,待液体剩 2mL~3mL 时取下稍冷,加入 5mL 硝酸放置电热板上继续消解,直至冒白烟消解完全,消化液呈无色透明或略带黄色取下冷却,冷却后用水将消化液转入 25mL 容量瓶中定容。同时做空白试验

(6) 样品测定 在给定的仪器条件下,分别将样品溶液和基体改进剂上机测定,由标准曲线直接得出样品溶液的浓度。

(7) 计算公式

$$X = \frac{C_1 - C_2}{V_1} \times \frac{V_2}{1000}$$

式中:

X 为被测样品中铅含量, mg/L; C_1 为被测样品溶液的浓度, $\mu\text{g/L}$; C_2 为试剂空白液的浓度, $\mu\text{g/L}$; V_1 为样品体积, mL; V_2 为样品稀释体积, mL。

(8) 注意事项 本方法适用于测定消毒剂中铅的含量。对不含有机化合物及表面活性剂的消毒产品(如:次氯酸钠发生器生产的次氯酸钠消毒剂)可按其使用说明书中使用方法稀释后直接测定,对含有有机化合物及表面活性剂的消毒产品按其方法稀释后经酸消解后测定。消毒剂中含有大量的氯化钠等钠盐,对铅的测定产生严重的干扰,为消除钠盐的干扰需加入基体改进剂。

3.1.7 砷盐检查

第一法:

具体检验方法参见 GB 9985。

第二法:氢化物发生原子荧光法

(1) 原理 样品经预处理后，加入硼氢化钾将砷生成砷化氢，用氩气做载气将砷化氢导入原子化器中进行原子化，以特制砷空心阴极灯做激发光源，使砷原子产生原子荧光，荧光强度与砷的含量成正比。

(2) 试剂配制 所用试剂均为优级纯；盐酸；氢氧化钾；硫脲（100g/L）—抗坏血酸（100g/L）溶液：分别称取硫脲、抗坏血酸各 10g 溶于 100mL 纯水中，用时现配；硼氢化钾（20g/L）：称取 2g 氢氧化钾溶于 200mL 纯水中，加入 20g 硼氢化钾并使之溶解，用水稀释至 1000mL，用时现配；砷标准溶液（储备液 100mg/L）：国家标准物质中心购买；砷标准使用液（1mg/L）：吸取砷标准储备液 1.00mL 于 100mL 容量瓶中，加入 5mL HCl，以水定容，混匀。

(3) 仪器参考条件 灯电流：56mA；负高压：320V；原子化器温度：200℃；原子化器高度：8mm；载气流量：500mL/min；屏蔽气流量：1000mL/min；读数时间：10s；延迟时间：1s。

(4) 标准曲线的绘制 吸取砷标准使用液（1mg/L）0.00、0.50、1.00、3.00、5.00、7.00、10.0mL 于 100mL 容量瓶中，加入 20mL 硫脲（100g/L）—抗坏血酸（100g/L）溶液，5mL HCl，用水定容至刻度，摇匀，配制成含砷为 0.00、5.00、10.0、30.0、50.0、70.0、100μg/L 的标准系列溶液。放置 30 分钟后，在给定的仪器条件下，依次测定标准溶液。

(5) 样品预处理 样品根据性状分为液体和固体。按各消毒产品使用说明书中使用方法稀释。取稀释后的样品使用液 50mL 于锥形瓶中置电热板上加热，赶尽氯气或氧气等气体，待液体剩（5~10）mL 时稍冷后加入 5mL 硝酸消解，直至冒白烟消解完全，消化液呈无色透明或略带黄色取下冷却，冷却后用少许水将消化液转入 50mL 容量瓶中，加入 10mL 硫脲（100g/L）—抗坏血酸（100g/L）溶液，2.5mL HCl，再用水定容至刻度摇匀，放置 30 分钟后测定。同时做空白试验。

(6) 样品测定 在给定的仪器条件下，将样品溶液上机测定，由标准曲线直接得出样品溶液的浓度。

(7) 计算公式

$$X = \frac{C_1 - C_2}{V_1} \times \frac{V_2}{1000}$$

式中：X 为被测样品中砷含量，mg/L；C₁ 为被测样品溶液的浓度，μg/L；C₂ 为试剂空白液的浓度，μg/L；V₁ 为样品体积，mL；V₂ 为样品稀释体积，mL。

(8) 注意事项 本方法适用于测定消毒剂中砷的含量。对不含有机化合物及表面活性剂的消毒产品（如：次氯酸钠发生器生产的次氯酸钠消毒剂）可按其使用说明书中使用方法稀释后直接测定，对含有机化合物及表面活性剂的消毒产品，由于此类样品在仪器的反应池中反应强烈

影响样品的气液分离，干扰测定，甚至有些样品反应生成的气体将反应池的连接管崩开，所以按其方法稀释后经酸消解后测定。

3.2 复方消毒剂有效成分含量测定的指导原则

3.2.1 分析方法的选择

首选仪器分析法，如色谱分析法、光学分析法以及电化学分析法等；化学分析法经证实可靠者，也可以采用。

3.2.2 分析方法的可靠性论证

- (1) 专属性 经试验验证，除有效成分以外的其它成分均不得干扰有效成分的测定。
- (2) 准确性 以加标回收百分率表示。回收百分率一般在平均值 $X \pm 10.0\%$ 之间 ($n \geq 6$)。
- (3) 重复性 某已知含量的模拟样品，用该法连续测定 n 次，其 RSD 应 $\leq 5.00\%$ ($n \geq 6$)。
- (4) 回归方程的线性 配制一系列已知浓度的模拟样品五份（高、低浓度之间的倍数一般为 5 倍~10 倍），用某法测定。以测定信号（如色谱峰面积或峰高、吸光度等）对其浓度（或质量）进行线性回归，其相关系数应满足 $r \geq 0.999$ ($n \geq 5$)。
- (5) 灵敏度 即用某法测定某样品的最低检出浓度 ($S/N=3$)。

3.3 消毒剂稳定性测定

3.3.1 外观检查

除测定有效成分含量或杀灭微生物效果外，还应观察记录消毒剂有无颜色变化；并且对液体消毒剂应观察记录有无沉淀或悬浮物产生，对片剂应观察记录外观性状是否完好。性状变化的记录应写进检测报告。

3.3.2 化学测定法

3.3.2.1 加速试验法

(1) 取包装完好的消毒剂，置 37°C （对粉剂、片剂要求相对湿度 $>75\%$ ）恒恒温培养箱内 3 个月，或 54°C （对粉剂、片剂要求相对湿度 $>75\%$ ）恒恒温培养箱内 14d。于放置前、后分别测定消毒剂杀菌有效成分含量（具体方法见 3.1）。

(2) 加速试验法结果评价以有效成分下降率超过 15% 为不符合要求。若经 37°C 存放 3 个月的样本，其杀菌有效成分含量下降率 $\leq 15\%$ ，可将贮存有效期定为 2 年；经 54°C 存放 14 天者，杀菌有效成分下降率 $\leq 15\%$ ，则贮存有效期可定为 1 年。

(3) 未通过本试验的消毒剂，或欲观察 2 年以上储存有效期的消毒剂，可按下述室温留样法（3.3.3.2）测定其储存有效期。

(4) 测定结果应对其性状变化进行描述，若因有颜色等性状变化而无法进行有效成分经验

法测定时，以室温留样法结果为准。

3.3.2.2 室温留样法

取已测有效成分含量并包装完好的消毒剂，放置温度为 $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 环境（记录温度），按产品保存期时限（企业提供），取样测定有效成分含量，有效成分含量下降率 $\leq 15\%$ 为合格。

3.3.3 微生物测定法

(1) 贮存方法和取样要求同化学测定法（3.3.2）。

(2) 在杀灭或抑制微生物试验中，所用试验微生物应为使用说明书中拟杀灭或抑制微生物中抗力最强者。

(3) 对只使用原液消毒的消毒剂，直接用其原液进行杀菌或抑菌试验。对需稀释后使用的消毒剂，则以其使用说明书中杀菌合格最低浓度的溶液进行试验。

(4) 该实验作用时间、分组及其他试验条件均应与原杀灭试验相同。

(5) 贮存后样品增加 15% 的浓度，对微生物的杀灭效果仍能达到消毒要求的，可判为合格，比照 3.3.2.1 和 3.3.2.2 判定有效期是否合格。

3.4 消毒剂对金属腐蚀性的测定

3.4.1 目的

测定消毒剂对各种金属的腐蚀程度，以能注明在使用时是否需给予应有的注意。

3.4.2 常用器材

(1) 金属片 圆形，直径 24.00mm，厚 1.0mm，穿一直径为 2.0mm 小孔，表面积总值约为 9.80cm^2 （包括上、下、周边表面与小孔侧面）。光洁度为 6。原料如下：

碳钢（规格见 GB 700） 铜（规格见 GB 2060）

铝（规格见 GB 1173） 不锈钢（规格见 GB 1220）

碳钢易氧化生锈，应保存于油中

(2) 浸泡容器（玻璃制，带盖，容积为 800mL~1000mL）

(3) 砂纸（120 号粒度水砂纸，GB 2477）

(4) 称量杯

(5) 天平（感量 0.1 mg）

3.4.3 操作程序

(1) 在有表面活性作用的清洁剂中浸泡 10min，充分去油，洗净；亦可用氧化镁糊剂涂抹除油后洗净；以 120 号粒度水砂纸磨去金属片两面和周边表面的氧化层，再用自来水冲净。测量片的直径、厚度、孔径（精确至 0.1mm）。用无水丙酮或无水乙醇再次脱脂。置 50°C 恒温培养

箱中干燥 1h, 待其温度降至室温后称重 (每金属片待天平回零后称重 3 次, 精确至 0.1mg, 取其平均值作为试验前重量。称重时, 应戴洁净手套, 勿以手直接接触样片。

(2) 按消毒剂最高使用浓度配制试验用消毒液, 用以浸泡试验样片。浸泡时, 每一金属片需浸泡在 200mL 消毒液中。

(3) 金属样片用塑料线系以标签, 编号和注明日期, 悬挂于消毒液中。一次性浸泡 72h。易挥发性或有效成分不稳定的消毒剂, 根据情况, 酌情定时更换消毒液, 直至浸泡 72h。

(4) 每种金属每次试验放置 3 片样片。浸泡时, 若同种金属每一样片相隔 1cm 以上, 可在同一容器内 (含 600mL 消毒液) 进行。

(5) 浸泡到规定时间后, 取出金属片, 先用自来水冲洗, 再用毛刷或其它软性器具去除腐蚀产物。如仍有清除不掉的腐蚀产物, 可按 GB 10124 所介绍的下列方法清除:

铜片: 在室温下浸泡于盐酸溶液 (500mL 36%~38% 盐酸加蒸馏水至 1000mL, 盐酸比重为 1.19) 中 1min~3min。

碳钢片: 置含锌粉 200g/L 的氢氧化钠溶液中, 煮沸 5min~30min。

铝片: 浸泡于三氧化铬磷酸溶液 (三氧化铬 20g, 磷酸 500mL, 加蒸馏水至 1000mL。磷酸比重为 1.69) 中, 升温至 80℃, 持续 5min~10min。如还未清除干净, 可在室温浸于硝酸 (比重 1.42) 溶液中 1min。

不锈钢: 浸泡于 60℃ 硝酸溶液 (66%~68% 硝酸 100mL 加蒸馏水至 1000mL) 20min。或浸于 70℃ 柠檬酸铵溶液 (柠檬酸铵 150g 加蒸馏水至 1000mL) 中 10min~60min。

(6) 金属样片除去腐蚀产物并清洗后, 用粗滤纸吸干水分, 置于垫有滤纸的平皿中, 放入 50℃ 恒温培养箱, 干燥 1h, 用镊子夹取, 待其温度降至室温后分别在天平上称重。天平回零后称 3 次, 以其平均值作为试验后重量。

称重时, 与试验前相同, 应戴洁净手套, 勿以手直接接触样片 (下同)。

(7) 样片在用化学法去除腐蚀物时, 需设相应空白对照以校正误差。空白对照样片与试验组样片同样进行表面处理、洗净和称重, 但不经消毒剂浸泡。事后随同试验组样片用相同方法进行化学处理、水冲洗、干燥、称重, 并计算其平均失重值。

(8) 试验的全过程应同时设不锈钢片浸泡蒸馏水的对照, 浸泡前后的重量差应 < 0.3mg。否则, 在找出原因后, 全部试验重做。

(9) 试验结果, 观察与纪录金属片颜色变化, 并以金属腐蚀速率 (R) 平均值表达, 在计算时应减去空白对照组样片的失重值。计算公式如下:

$$R = \frac{8.76 \times 10^7 \times (m - m_t - m_k)}{S \times t \times d}$$

[R 为腐蚀速率, mm/a (毫米/年); m 为试验前金属片重量, g; m_t 为试验后金属片重量, g; m_k 为化学处理去除腐蚀产物样片失重值, g, 试验中未进行化学清除处理者, 计算时在公式中删去 m_k 值; S 为金属片的表面积总值, cm^2 ; t 为试验时间, h; d 为金属材料密度, kg/m^3 。]

3.4.4 腐蚀性分级标准

腐蚀速率 R (mm/a)	级 别
<0.0100	基本无腐蚀
$0.0100 \sim <0.100$	轻度腐蚀
$0.100 \sim <1.00$	中度腐蚀
≥ 1.00	重度腐蚀

3.4.5 注意事项

- (1) 每张砂纸只能磨一种金属材料。一个容器盛的消毒液只能浸泡同一种金属。
- (2) 称重关系到结果的准确性, 必须认真进行。接触样片的器具不得带有油垢。
- (3) 所用金属片大小、厚薄应严格一致, 表面需磨光。
- (4) 试验期间, 需换消毒剂溶液时, 操作应迅速, 勿使样片暴露空气中过久。
- (5) 金属样片仅可使用一次, 否则影响试验的准确性。
- (6) 试验在 $20^\circ\text{C} \sim 25^\circ\text{C}$ 条件下进行。
- (7) 在报告其结果时, 应对试验后金属样片的外观变化等现象进行描述。

4 毒理学实验技术

Technical specifications for toxicological testing

4.1 急性经口毒性试验

4.1.1 目的

- (1) 检测消毒剂对实验动物的急性毒性作用和强度。
- (2) 为亚急(慢)性毒性等试验提供剂量选择的依据。

4.1.2 实验动物

小鼠或大鼠任选一种,雌雄各半。小鼠体重 18g~22g,大鼠体重 180g~220g,根据不同的计算 LD_{50} 方法,选用适当的动物数量,一般每组选用 10 只动物,动物总数不少于 40 只。

4.1.3 试验分组

如应用概率单位-对数图解法计算 LD_{50} ,随机分为 5~6 个剂量组。通常最高剂量组的动物死亡率应 $\geq 90\%$,最低剂量组动物死亡率应 $\leq 10\%$ 。可先以较大的组距较少量动物进行预试,找出其粗略致死剂量范围,然后再设计正式试验的剂量分组。

如应用霍恩法,则可先通过预试验找出其粗略致死剂量范围,然后按照 1.0、2.15、4.64 乘以 t^{10} ($t=0, \pm 1, \pm 2, \pm 3$),或者按照 1.0、3.16 乘以 t^{10} ($t=0, \pm 1, \pm 2, \pm 3$) 的方法设 4~5 个剂量组。

4.1.4 操作程序

- (1) 动物的准备:试验前,一般禁食过夜,不限制饮水。
- (2) 受试物的配制:常以水或食用植物油为溶剂配制成溶液,或采用 0.5% 羧甲基纤维素配制成混悬液。灌胃给予受试物的最大容量,小鼠不超过 0.2ml/10g 体重,大鼠不超过 1.0ml/100g 体重。
- (3) 染毒方法:用灌胃方式将受试物一次给予动物。若受试物毒性很低,一次灌胃容量太大,可在 24h 内分成 2~3 次给予,其总剂量作为一日剂量计算。
- (4) 染毒后观察动物的中毒表现和死亡数及死亡时间,并对死亡动物和观察期满处死动物进行尸体解剖,肉眼观察,发现有异常的组织或脏器,尚需进一步作组织病理学检查。观察时间 14 天。

4.1.5 LD_{50} 的计算方法

根据给受试物后 14 天内的各剂量组动物死亡率计算 LD_{50} (半数致死剂量)。

4.1.5.1 概率单位-对数图解法:

(1) 根据各剂量组动物死亡率, 从表 4-8 中查各组的概率单位。因死亡率为 0% 和 100% 的概率单位, 与所试动物数有关, 故需另在表 4-9 中查找。

例如: 对死亡率为 45% 的概率单位, 可查表 4-8。先在表的左侧纵标目上找到 40, 而后在表的上行横标目处找到 5, 两者交叉点处的 4.87, 即为 45% 的概率单位。

又如: 某组用 10 只实验动物, 如果全部存活(死亡率为 0%), 查表 4-9, 其概率单位为 3.04。

表 4-8 百分率-概率单位换算表

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	..	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.001	4.005	4.008	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.003	5.005	5.008	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	2.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33

注: 横标目数字为死亡率的个位数, 纵标目数字为死亡率的十位数。

表 4-9 相应于反应率为 0% 及 100% 的概率单位

该组动物数	反应率		该组动物数	反应率	
	0%	100%		0%	100%
...	11	3.00	7.00
2	3.85	6.15	12	2.97	7.03
3	3.62	6.38	13	2.93	7.07
4	3.47	6.53	14	2.90	7.10
5	3.36	6.64	15	2.87	7.13
6	3.27	6.73	16	2.85	7.15
7	3.20	6.80	17	2.82	7.18
8	3.13	6.87	18	2.80	7.20
9	3.09	6.91	19	2.78	7.22
10	3.04	6.96	20	2.76	7.24

(2) 用方格纸绘散点图, 横轴表示剂量的对数值 (X), 纵轴为概率单位值 (Y), 将各组数值点在图上。

(3) 按各点的分布趋势, 用直尺绘出一条最适合于各点的直线, 使线上方的点到线的总距离与线下方的点到线的总距离相近, 此线应尽量靠近概率单位为 5 的点及附近的点。

(4) 查出求概率单位 5 处的剂量对数, 其反对数即为 LD_{50} 。

(5) 按下列公式计算 LD_{50} 的 95% 可信限。

$$S = (X_2 - X_1) / (Y_2 - Y_1)$$

$$S_m = S / (N' / 2)^{-1/2}$$

$$LD_{50} \text{ 对数值的 95\%可信限} = \log LD_{50} \pm 1.96Sm$$

(上式结果, 经反对数变换后, 可得 LD_{50} 的 95%可信限)

[Sm 为 LD_{50} 的标准误; S 为标准差; X_1 、 X_2 分别为机率单位等于 4 (Y_1) 和 6 (Y_2) 时相应的剂量对数值; N' 为 Y_1 (=4) 及 Y_2 (=6) 相应的死亡率间所用的动物数。]

4.1.5.2 霍恩 (Horn) 法:

根据各剂量组动物死亡率, 从表 A1 或 A2 查出其相应的 LD_{50} 值和 95% 可信限。

表 A1 用于每组 5 只动物, 其剂量递增公比为 $\sqrt[3]{10}$, 意即 $10 \times \sqrt[3]{10} = 21.5$, $21.5 \times \sqrt[3]{10} = 46.4 \dots$, 余此类推。此剂量系列排列如下:

$$\left. \begin{array}{l} 100 \\ 21.5 \\ 4.62 \end{array} \right\} \times 10^t \quad t = 0, \pm 1, \pm 2, \pm 3, \dots$$

表 A1

				剂量 1=0.464 剂量 2=1.00 剂量 3=2.15 剂量 4=4.64		剂量 1=1.00 剂量 2=2.15 剂量 3=4.64 剂量 4=10.0		剂量 1=2.15 剂量 2=4.64 剂量 3=10.0 剂量 4=21.5	
				$\times 10^t$		$\times 10^t$		$\times 10^t$	
组 1	组 2	组 3	组 4	LD_{50}	可信限	LD_{50}	可信限	LD_{50}	可信限
0	0	3	5	2.00	1.37~2.91	4.30	2.95~6.26	9.26	6.36~13.5
0	0	4	5	1.71	1.26~2.33	3.69		7.94	5.84~10.8
0	0	5	5	1.47	—	2.71~5.001		6.81	—
0	1	2	5	2.00	1.23~3.24	3.16	—	9.26	
0	1	3	5	1.71	1.05~2.78	4.30	2.65~6.98	5.70~15.00	
0	1	4	5	1.47	0.951~2.27	3.69	2.27~5.99	7.94	4.89~12.9
0	1	5	5	1.26	0.926~1.71	3.16	2.05~4.88	6.81	4.41~10.5
0	2	2	5	1.71	1.01~2.91	2.71	2.00~3.69	5.84	4.30~7.94
0	2	3	5	1.47	0.862~2.50	3.69	2.17~6.28	7.94	4.67~13.5
0	2	4	5	1.26	0.775~2.05	3.16	1.86~5.38	6.81	4.00~13.5
0	2	5	5	1.08	0.741~1.57	2.71	1.69~4.41	5.84	3.60~9.50
0	3	3	5	1.26	0.740~2.14	2.33	1.60~3.99	5.001	3.44~7.30
0	3	4	5	1.03	0.665~1.75	2.71	1.59~4.62	5.84	3.43~9.95
1	0	3	5	1.96	1.22~3.14	2.33	1.43~3.78	5.001	
1	0	4	5	1.62	1.07~2.43	4.22	2.63~6.76	3.008~8.14	
1	0	5	5	1.33	1.05~1.70	3.48	2.31~5.24	9.09	5.66~14.6
1	1	2	5	1.96	1.06~3.60	2.87	2.26~3.65	7.50	4.98~11.3
1	1	3	5	1.62	0.866~3.001	4.22	2.29~7.75	6.19	4.87~7.87
1	1	4	5	1.33	0.737~2.41	3.48	1.87~6.49	9.09	4.94~1.67
1	1	5	5	1.10	0.661~1.83	2.87	1.59~5.20	7.50	4.002~16.7

1	2	2	5	1.62	0.818~3.19	2.37	1.42~3.95	6.19	3.42~11.2
1	2	3	5	1.33	0.658~2.70	3.48	1.76~6.37	5.11	3.007~8.51
1	2	4	5	1.10	0.550~2.20	2.87	1.42~5.82	7.50	3.80~14.8
1	3	3	5	1.10	0.523~2.32	2.37	1.19~4.74	6.19	3.005~12.5
2	0	3	5	1.90	1.00~3.58	2.37	1.13~4.99	5.11	2.55~10.2
2	0	4	5	1.47	0.806~2.67	4.008	2.16~7.71	5.11	2.43~10.8
2	0	5	5	1.14	0.674~1.92	3.16	1.74~5.76	8.80	4.66~16.6
2	1	2	5	1.90	0.839~4.29	2.45	1.45~4.13	6.81	3.74~12.4
2	1	3	5	1.47	0.616~3.50	4.008	1.81~9.23	5.28	3.13~8.89
2	1	4	5	1.14	0.466~2.77	3.16	1.33~7.53	8.80	3.89~19.9
2	2	2	5	1.47	0.573~3.76	2.45	1.00~5.98	6.81	2.86~16.2
2	2	3	5	1.14	0.406~3.18	3.16	1.24~8.10	5.28	2.16~12.9
0	0	4	4	1.96	1.18~3.26	2.45	0.875~6.85	6.81	2.66~17.4
0	0	5	4	1.62	1.27~2.05	4.22	2.53~7.02	6.28	1.89~14.8
0	1	3	4	1.96	0.978~3.92	3.48	2.74~4.42	9.09	5.46~15.1
0	1	4	4	1.62	0.893~2.92	4.22	2.11~8.44	7.50	5.90~9.53
0	1	5	4	1.33	0.885~2.01	3.48	1.92~6.30	9.09	4.54~18.2
0	2	2	4	1.96	0.930~4.12	2.87	1.91~4.33	7.50	4.14~13.6
0	2	3	4	1.62	0.797~3.28	4.22	2.00~8.88	6.19	4.11~9.33
0	2	4	4	1.33	0.715~2.49	3.48	1.72~7.06	9.09	4.31~19.1
0	2	5	4	1.10	0.686~1.77	2.87	1.54~5.36	7.50	3.70~15.2
0	3	3	4	1.33	0.676~2.63	2.37	1.48~3.80	6.19	3.32~11.5
0	3	4	4	1.10	0.599~2.02	2.87	1.46~5.67	5.11	3.19~8.19
1	0	4	4	1.90	0.969~3.71	2.37	1.29~4.36	6.19	3.14~12.2
1	0	5	4	1.47	1.02~2.11	4.008	2.09~7.99	5.11	2.78~9.39
1	1	3	4	1.90	0.757~4.75	3.16	2.20~4.54	8.80	4.50~17.2
1	1	4	4	1.47	0.654~3.30	4.008	1.63~10.2	6.81	4.74~9.78
1	1	5	4	1.14	0.581~2.22	3.16	1.41~7.10	8.80	3.51~22.0
1	2	2	4	1.90	0.706~5.009	2.45	1.25~4.79	6.81	3.003~15.3
1	2	3	4	1.47	0.564~3.82	4.008	1.52~11.0	5.28	2.70~10.3
1	2	4	4	1.14	0.454~2.85	3.16	1.21~8.24	8.80	3.28~23.6
1	3	3	4	1.14	0.423~3.005	2.45	0.997~6.13	6.81	2.62~17.7
2	0	4	4	1.78	0.662~4.78	2.45	0.912~6.57	5.28	2.11~13.2
2	0	5	4	1.21	0.583~2.52	3.83	1.43~10.3	5.28	1.97~14.2
2	1	3	4	1.78	0.455~6.95	2.61	1.26~5.42	8.25	3.007~22.2
2	1	4	4	1.21	0.327~4.48	3.83		5.62	2.71~11.7
2	2	2	4	1.78	0.410~7.72	0.980~15.00		8.25	2.11~32.3
2	2	3	4	1.21	0.266~5.52	2.61	0.705~9.66	5.62	1.52~20.8
0	0	5	3	1.90	1.12~3.20	3.83	0.883~16.6	8.25	1.90~35.8
0	1	4	3	1.90	0.777~4.63	2.61	0.573~11.9	5.62	1.23~25.6

0	1	5	3	1.47	0.806~2.67	4.008	2.42~6.89	8.80	5.22~14.8
0	2	3	3	1.90	0.678~5.30	4.008	1.67~9.97	8.80	3.60~21.5
0	2	4	3	1.47	0.616~3.50	3.16	1.74~5.76	6.81	3.74~12.4
0	2	5	3	1.14	0.602~2.15	4.008	1.46~11.4	8.80	3.15~24.6
0	3	3	3	1.47	0.573~3.76	3.16	1.33~7.53	6.81	2.86~16.2
0	3	4	3	1.14	0.503~2.57	2.45	1.30~4.62	5.28	2.79~9.96
1	0	5	3	1.78	0.856~3.69	3.16	1.24~8.10	6.81	2.66~17.4
1	1	4	3	1.78	0.481~6.58	2.45	1.08~5.54	5.28	2.33~11.9
1	1	5	3	1.21	0.451~3.25	3.83	1.85~7.96	8.25	3.98~17.1
1	2	3	3	1.78	0.390~8.11	3.83	1.04~14.2	8.25	2.23~30.5
1	2	4	3	1.21	0.310~4.74	2.61	0.972~7.01	5.62	2.09~15.1
1	3	3	3	1.21	0.279~5.26	3.83	0.840~17.5	8.25	1.81~37.6
						2.61	0.668~10.2	5.62	1.44~22.0
						2.61	0.602~11.3	5.62	1.30~24.4

表 A2 用于每组 5 只动物, 其剂量递增公比为 $\sqrt{10}$, 意即 $10 \times \sqrt{10} = 31.6$, $31.6 \times \sqrt{10} = 100 \dots$, 余此类推。此剂量系列排列如下:

$$\left. \begin{array}{l} 1.00 \\ 3.16 \end{array} \right\} \times 10^t \quad t = 0, \pm 1, \pm 2, \pm 3, \dots$$

表 A2

组 1	组 2	组 3	组 4	剂量 1=0.316	} $\times 10^t$	剂量 1=1.00	} $\times 10^t$
		或		剂量 2=1.00		剂量 2=3.16	
				剂量 3=3.16		剂量 3=10.0	
				剂量 4=10.0		剂量 4=31.6	
				LD ₅₀	可信限	LD ₅₀	可信限
0	0	3	5	2.82	1.60~4.95	8.91	5.007~15.7
0	0	4	5	2.24	1.41~3.55	7.08	4.47~11.2
0	0	5	5	1.78	—	5.62	—
0	1	2	5	2.82	1.36~5.84	8.91	4.30~18.5
0	1	3	5	2.24	1.08~4.64	7.08	3.42~14.7
0	1	4	5	1.78	0.927~3.41	5.62	2.93~10.8
0	1	5	5	1.41	0.891~2.24	4.47	2.82~7.08
0	2	2	5	2.24	1.01~4.97	7.08	3.19~15.7
0	2	3	5	1.78	0.801~3.95	5.62	2.53~12.5
0	2	4	5	1.41	0.682~2.93	4.47	2.16~9.25
0	2	5	5	1.12	0.638~1.97	3.55	2.02~6.24
0	3	3	5	1.41	0.636~3.14	4.47	2.01~9.92
0	3	4	5	1.12	0.542~2.32	3.55	1.71~7.35

1	0	3	5	2.74	1.35~5.56	8.66	4.26~17.6
1	0	4	5	2.05	1.11~3.80	6.49	3.51~12.0
1	0	5	5	1.54	1.07~2.21	4.87	3.40~6.98
1	1	2	5	2.74	1.10~6.82	8.66	3.48~21.6
1	1	3	5	2.05	0.806~5.23	6.49	2.55~16.5
1	1	4	5	1.54	0.632~3.75	4.87	2.00~11.9
1	1	5	5	1.15	0.537~2.48	3.65	1.70~7.85
1	2	2	5	2.05	0.740~5.70	6.49	2.34~18.0
1	2	3	5	1.54	0.534~4.44	4.87	1.69~14.1
1	2	4	5	1.15	0.408~3.27	3.65	1.29~10.3
1	3	3	5	1.15	0.378~3.53	3.65	1.20~11.2
2	0	3	5	2.61	1.01~6.77	8.25	3.18~21.4
2	0	4	5	1.78	0.723~4.37	5.62	2.29~13.8
2	0	5	5	1.21	0.554~2.65	3.83	1.75~8.39
2	1	2	5	2.61	0.768~8.87	8.25	2.43~28.1
2	1	3	5	1.78	0.484~6.53	5.62	1.53~20.7
2	1	4	5	1.21	0.318~4.62	3.83	1.00~14.6
2	2	2	5	1.78	0.434~7.28	5.62	1.37~23.00
2	2	3	5	1.21	0.259~5.67	3.83	0.819~17.9
0	0	4	4	2.74	1.27~5.88	8.66	4.003~18.6
0	0	5	4	2.05	1.43~2.94	6.49	4.53~9.31
0	1	3	4	2.74	0.968~7.75	8.66	3.006~24.5
0	1	4	4	2.05	0.843~5.00	6.49	2.67~15.8
0	1	5	4	1.54	0.833~2.85	4.87	2.63~9.01
0	2	2	4	2.74	0.896~8.37	8.66	2.83~26.5
0	2	3	4	2.05	0.711~5.93	6.49	2.25~18.7
0	2	4	4	1.54	0.604~3.92	4.87	1.91~12.4
0	2	5	4	1.15	0.568~2.35	3.65	1.80~7.42
0	3	3	4	1.54	0.555~4.27	4.87	1.76~13.5
0	3	4	4	1.15	0.463~2.88	3.65	1.47~9.10
1	0	4	4	2.61	0.953~7.15	8.25	3.001~22.6
1	0	5	4	1.78	1.03~3.006	5.62	3.27~9.68
1	1	3	4	2.61	0.658~10.4	8.25	2.08~32.7
1	1	4	4	1.78	0.528~5.98	5.62	1.67~18.9
1	1	5	4	1.21	0.442~3.32	3.83	1.40~10.5
1	2	2	4	2.61	0.594~11.5	8.25	1.88~36.3
1	2	3	4	1.78	0.423~7.48	5.62	1.34~23.6
1	2	4	4	1.21	0.305~4.80	3.83	0.966~15.2
1	3	3	4	1.21	0.276~5.33	3.83	0.871~16.8
2	0	4	4	2.37	0.539~10.4	7.50	1.70~33.00

2	0	5	4	1.33	0.446~3.99	4.22	1.41~12.6
2	1	3	4	2.37	0.307~18.3	7.50	0.970~58.0
2	1	4	4	1.33	0.187~9.49	4.22	0.592~30.0
2	2	2	4	2.37	0.262~21.4	7.50	0.830~67.8
2	2	3	4	1.33	0.137~13.00	4.22	0.433~41.0
0	0	5	3	2.61	1.19~5.71	8.25	3.77~18.1
0	1	4	3	2.61	0.684~9.95	8.25	2.16~31.5
0	1	5	3	1.78	0.723~4.37	5.62	2.29~13.8
0	2	3	3	2.61	0.558~12.2	8.25	1.76~38.6
0	2	4	3	1.78	0.484~6.53	5.62	1.53~20.7
0	2	5	3	1.21	0.467~3.14	3.83	1.48~9.94
0	3	3	3	1.78	0.434~7.28	5.62	1.37~23.00
0	3	4	3	1.21	0.356~4.12	3.83	1.13~13.00
1	0	5	3	2.37	0.793~7.10	7.50	2.51~22.4
1	1	4	3	2.37	0.333~16.9	7.50	1.05~53.4
1	1	5	3	1.33	0.303~5.87	4.22	0.958~18.6
1	2	3	3	2.37	0.244~23.1	7.50	0.771~73.00
1	2	4	3	1.33	0.172~10.3	4.22	0.545~32.6
1	3	3	3	1.33	0.148~12.1	4.22	0.467~38.1

4.1.5.3 一次最大限度试验:

如 20 只动物（雌雄各半）一次灌胃剂量 5000mg/kg 体重，在 14 天内又无死亡，可判定 LD_{50} 大于 5000mg/kg 体重。

4.1.5.4 其他方法：也可采用其他方法如寇氏（Karber）法、固定剂量法（Fixed dose method）及上下法（Up and down procedure）等。

4.1.6 评价规定

消毒剂的毒性评价：

$LD_{50} > 5000\text{mg/kg}$ 体重者属实际无毒；

$LD_{50} > 500\text{mg/kg} \sim 5000\text{mg/kg}$ 体重者属低毒；

$LD_{50} > 50\text{mg/kg} \sim 500\text{mg/kg}$ 体重者属中等毒；

$LD_{50} \geq 1\text{mg/kg} \sim 50\text{mg/kg}$ 体重者属高毒；

$LD_{50} < 1\text{mg/kg}$ 体重者属剧毒。

注：为评价消毒剂在实际应用时对人的安全性，当产品原形 $LD_{50} \leq 5000\text{mg/kg}$ 体重时，需增做消毒剂最高应用液浓度 5 倍溶液的急性经口毒性试验，并计算其 LD_{50} 。

4.2 急性吸入毒性试验

4.2.1 目的

检测消毒剂对实验动物的急性吸入毒性作用和强度。

4.2.2 实验动物

小鼠或大鼠任选一种，雌雄各半。小鼠体重为 18g~22g，大鼠体重为 180g~200g。

4.2.3 操作程序

染毒可采用静式染毒法或动式染毒法。

4.2.3.1 静式染毒法

静式染毒是将实验动物放在一定体积的密闭容器（染毒柜）内，加入一定量的消毒剂，并使其挥发，造成实验需要消毒剂浓度的空气，一次吸入性染毒 2h。

(1) 染毒柜的容积以每只染毒小鼠每小时不少于 3L 空气计，每只大鼠不少于 30L 计。

(2) 染毒浓度的计算：染毒浓度一般应采用实际测定浓度。在染毒期间一般可测 4-5 次，求其平均浓度。在无适当测试方法时。可用下式计算染毒浓度

$$C = \frac{a \times d}{V} \times 10^6$$

式中：C— 染毒浓度 (mg/m³)

a— 加入消毒剂量 (ml)

d— 消毒剂比重

V— 染毒柜容积 (L)

4.2.3.2 动式染毒法

动式染毒是采用机械通风装置，连续不断地将含有一定浓度消毒剂的空气均匀不断地送入染毒柜，并排出等量的染毒气体，维持相对稳定的染毒浓度。一次吸入性染毒 2h。

(1) 消毒剂气化（雾化）和输入的常用方法

1) 气体消毒剂，经流量计与空气混合成一定浓度后，直接输入染毒柜。

2) 易挥发液体消毒剂，通过空气鼓泡或适当加热促使挥发后输入染毒柜。

3) 若消毒剂现场使用采取喷雾法时，可采用喷雾器或超声雾化器使其雾化后输入染毒柜。

(2) 染毒浓度计算 染毒浓度一般应采用动物呼吸带实际测定浓度，每半小时一次，取其平均值。若无适当的测试方法，也可采用以下公式计算染毒浓度：

$$C = \frac{a \times d}{V} \times 10^6$$

$$V_1 + V_2$$

- 式中： C— 染毒浓度 (mg/m^3)
a— 气化或雾化消毒剂量 (ml)
d— 消毒剂比重
 V_1 — 输入染毒柜风量 (L)
 V_2 — 染毒柜容积 (L)

4.2.3.3 观察和记录染毒过程和观察期内的动物症状和死亡情况。关于染毒浓度的设计、动物分组、观察期限、观察指标和 LC_{50} (半数致死浓度) 的计算等可参照急性经口毒性试验 (4.1)。

在预试验的基础上, 如 20 只动物 (雌雄各半) 一次 2h 吸入染毒浓度 $10000\text{mg}/\text{m}^3$, 在 14 天内无死亡, 可判定 LC_{50} 大于 $10000\text{mg}/\text{m}^3$ 。

4.2.4 评价规定

消毒剂的毒性评价:

$\text{LC}_{50} 2\text{h} > 10000\text{mg}/\text{m}^3$ 者属实际无毒;

$\text{LC}_{50} 2\text{h} > 1000\text{mg}/\text{m}^3 \sim 10000\text{mg}/\text{m}^3$ 者属低毒;

$\text{LC}_{50} 2\text{h} > 100\text{mg}/\text{m}^3 \sim 1000\text{mg}/\text{m}^3$ 者属中等毒;

$\text{LC}_{50} 2\text{h} \geq 10\text{mg}/\text{m}^3 \sim 100\text{mg}/\text{m}^3$ 者属高毒;

$\text{LC}_{50} 2\text{h} < 10\text{mg}/\text{m}^3$ 者属剧毒。

4.3 急性经皮毒性试验

4.3.1 目的

- (1) 检测消毒剂能否经皮肤吸收及短期作用所产生的毒性反应和强度。
- (2) 为亚急 (慢) 性经皮毒性等试验提供剂量选择的依据。

4.3.2 实验动物

首选大鼠, 雌雄各半。体重 $200\text{g} \sim 300\text{g}$, 根据不同的计算 LD_{50} 方法, 选用适当的动物数量。

4.3.3 试验分组

根据不同的试验方法进行试验分组的设计。原则上应设 4~6 个剂量组, 每组 10 只动物, 雌雄各半。通常最高剂量组的动物死亡率应 $\geq 90\%$, 最低剂量组动物死亡率应 $\leq 10\%$ 。可先以较大的组距较少量动物进行预试, 找出其粗略致死剂量范围, 然后再设计正式试验的剂量分组。如果受试物毒性很低, 可采用一次限量法, 即用 20 只动物 (雌雄各半) 皮肤涂抹受试物, 剂量为 $5000\text{mg}/\text{kg}$ 体重, 如未引起动物死亡, 可考虑不再进行多个剂量的急性经皮毒性试验。

4.3.4 操作程序

(1) 动物的准备：试验前 24h，剪去或剃除动物躯干背部拟染毒区域的被毛，去毛时应小心，避免损伤皮肤。涂皮面积约占动物体表面积的 10%，通常体重为 200g~300g 的大鼠涂皮面积为 30 cm²~40cm²。

(2) 受试物的配制：常以水或食用植物油为溶剂配制成溶液。

(3) 染毒方法：将受试物均匀涂敷于动物背部皮肤染毒区，然后用一层玻璃纸覆盖，再以纱布和绷带进行固定。封闭接触 24h 后用水或其它适宜的溶液清洗残留受试物。

(4) 染毒后观察动物的中毒表现和死亡数及死亡时间，并对死亡动物和观察期满处死动物进行尸体解剖，肉眼观察，发现有异常的组织或脏器，尚需进一步作组织病理学检查。观察时间 14 天。

4.3.5 LD₅₀ 的计算方法

根据给受试物后 14 天内的各剂量组动物死亡率计算 LD₅₀（半数致死剂量）。计算方法同 4.1.5 的方法。

4.3.6 评价规定

消毒剂的毒性评价：

LD₅₀ > 5000mg/kg 体重者属实际无毒；

LD₅₀ > 2000mg/kg~5000mg/kg 体重者属低毒；

LD₅₀ > 200mg/kg~2000mg/kg 体重者属中等毒；

LD₅₀ ≤ 200mg/kg 体重者属高毒；

4.4 皮肤刺激试验

4.4.1 目的

检测消毒剂对实验动物皮肤的刺激/腐蚀作用和强度。

4.4.2 实验动物

每次试验至少需 3 只皮肤完好的健康家兔或豚鼠。

4.4.3 操作程序

4.4.3.1 一次完整皮肤刺激试验

(1) 在试验前 24h，用脱毛剂或剪刀将家兔或豚鼠背部脊柱两侧的毛去掉，不得损伤皮肤。去毛范围，左、右各约 3cm×3cm。

(2) 次日将受试物（浓度一般为皮肤消毒应用液的 5 倍或原液 0.5ml (g) 直接滴于面积为 2.5cm×2.5cm 的一侧去毛完整皮肤上，或滴于同样大小的 2~4 层纱布上并敷贴在一侧去毛皮肤表面，然后用一层无刺激塑料膜或油纸覆盖，再用无刺激胶布固定。另一侧去毛皮肤作为空白

对照（或溶剂对照）。敷贴时间为 4h。对于用后清洗的消毒剂，敷用时间至 2h。试验结束后，用温水或无刺激性溶剂除去残留受试物。

(3) 分别于去除受试物后 1h、24h 和 48h 观察皮肤局部反应，并按表 4-10 进行刺激反应评分。

4.4.3.2 一次破损皮肤刺激试验

(1) 涂受试物前，在 2.5cm×2.5cm 的去毛皮肤上，用 75%酒精清洁、消毒暴露皮肤，待酒精挥发后，用灭菌刀片或注射针头在皮区内划一个“井”形的破损伤口，并在该破损皮区内染毒。注意皮肤破损仅达表皮，不要伤及真皮。

(2) 手术前的皮肤准备，手术后受试物涂抹和局部皮肤反应的观察，评分方法同 4.4.3.1 注意鉴别感染和原发性刺激反应的区别，若有感染可疑，应进行重复测试。

4.4.3.3 多次完整皮肤刺激试验

(1) 试验前动物皮肤准备同 4.5.3.1 (1)。

(2) 次日将受试物[浓度同 4.5.3.1 (2)] 0.5ml (g) 涂在一侧皮肤上，另一侧涂溶剂作为对照，在涂抹后 4h，用水或无刺激的适宜溶剂清洗，除去残留物。每天涂抹一次，连续涂抹 14d。在每次涂抹后 24h 观察结果，按表 4-10 评分。为了便于受试物的涂抹和结果观察，必要时应剪毛。对照区的处理方法同试验区。

4.4.4 评价规定

4.4.4.1 一次皮肤刺激试验

在各个观察时间点，按照表 4-10 对动物的皮肤红斑与水肿形成情况进行评分，并分别按时间点将 3 只动物的评分相加，除以动物数，获得不同时间点的皮肤刺激反应积分均值(刺激指数)。取其中最高皮肤刺激指数，按表 4-11 评定该受试物对动物皮肤刺激强度的级别。

4.4.4.2 多次皮肤刺激试验

按下列公式计算每天每只动物平均积分（刺激指数），并以表 4-11 判定皮肤刺激强度。

$$\text{每天每只动物平均积分} = \frac{\Sigma (\text{每只动物 14 天的红斑和水肿总积分})}{\text{受试动物数} \times 14}$$

表 4-10 皮肤刺激反应的评分标准

皮肤刺激反应	皮肤刺激反应评分
红斑形成:	
无	0
勉强可见	1
明显	2
严重	3
紫红色红斑, 并有焦痂	4
水肿形成:	
无	0
勉强可见	1
皮肤隆起, 轮廓清楚	2
水肿隆起约 1mm	3
水肿隆起超过 1mm	4

表 4-11 皮肤刺激强度分级

皮肤刺激指数	刺激强度级别
0~<0.5	无刺激性
0.5~<2.0	轻刺激性
2.0~<6.0	中等刺激性
6.0~8.0	强刺激性

4.5 急性眼刺激试验

4.5.1 目的

检测消毒剂对实验动物眼睛的急性刺激和腐蚀作用。

4.5.2 实验动物

使用 3 只家兔。试验前检查家兔双眼, 有异常者不能用于试验。

4.5.3 操作程序

(1) 受试物一般为黏膜或空气消毒应用液的 5 倍浓度的溶液或原液。吸取受试物 0.1ml, 滴入家兔一侧眼结膜囊内。另一侧眼以生理盐水作为正常对照。

(2) 滴受试物后, 将眼被动闭合 4s, 30s 后用生理盐水冲洗。于滴眼后 1h、24h、48h、72h、7d、14d 和 21d, 肉眼观察家兔眼结膜、虹膜和角膜的损伤与恢复情况。如果 72h 内未出现刺激反应, 或第 7 天或第 14 天, 眼睛刺激反应完全恢复, 即可提前终止试验。必要时, 用 2% 荧光素钠溶液或裂隙灯、放大镜检查角膜及虹膜变化。

4.5.4 评价规定

按表 4-12 对家兔眼角膜、虹膜和结膜的急性刺激反应进行评分, 并分别计算每只动物在三个不同观察时间(24h、48h 和 72h)的角膜损害、虹膜损害、结膜充血和结膜水肿四方面的“平均评分”(即每只动物的 24h、48h 和 72h 评分之和除以观察数 3)。分别以动物眼角膜、虹膜和

结膜充血、水肿的平均评分和恢复时间，按表 4-13、4-14 眼刺激反应分级标准判定受试物对眼睛的刺激强度。

表 4-12 家兔急性眼刺激反应的评分标准

眼损害表现	评分
角膜损害:	
无溃疡形成或混浊	0
散在或弥漫性混浊，虹膜清晰可见	1
半透明区易分辨，虹膜模糊不清	2
出现灰白色半透明区，虹膜细节不清，瞳孔大小勉强可见	3
角膜不混浊，虹膜无法辨认	4
虹膜损害:	
正常	0
皱褶明显加深，充血、肿胀、角膜周围有中度充血，瞳孔对光仍有反应	1
出血、肉眼可见破坏，或瞳孔对光无反应	2
结膜（睑结膜、球结膜）充血	
血管正常	0
血管充血呈鲜红色	1
血管充血呈深红色，血管不易分辨	2
弥漫性充血呈紫红色	3
结膜（睑结膜、球结膜）水肿	
无水肿	0
轻微水肿（包括瞬膜）	1
明显水肿，伴有部分眼睑外翻	2
水肿至眼睑近半闭合	3
水肿至眼睑大半闭合	4

表 4-13 眼刺激性反应分级标准

可逆性损伤	无刺激性	3 只动物的平均评分：角膜损害<1、虹膜损害<1、结膜充血<2 和结膜水肿<2 或 3 只动物中至少有 2 只动物的平均评分符合上述标准。另外 1 只动物的刺激反应在 21 天内完全恢复。
	轻刺激性	3 只动物中有 2 只动物的平均评分：角膜损害≥1；虹膜损害≥1；结膜充血≥2；结膜水肿≥2，且 7 天内全部动物的刺激反应完全恢复。
	刺激性**	3 只动物中有 2 只动物的平均评分：角膜损害≥1；虹膜损害≥1；结膜充血≥2；结膜水肿≥2，且 21 天内全部动物的刺激反应完全恢复。
不可逆性损伤	腐蚀性***	至少有 1 只动物的角膜、虹膜或结膜的刺激反应在 21 天的观察期内未完全恢复或/和在 3 只动物中有 2 只动物的平均评分：角膜损害≥3；虹膜损害≥1.5。

注：完全恢复是指动物的眼刺激反应评分：角膜损害=0，虹膜损害=0，结膜充血=0 或 1，结膜水肿=0 或 1。

** 刺激性：接触受试物后所产生的可逆性炎性反应。

*** 腐蚀性：接触受试物后所产生的不可逆性组织损伤。

表 4-14 眼刺激性反应分级标准

平均评分	动物数（只）	恢复时间（天）*	损伤类型	
角膜损害<1 和 虹膜损害<1 和 结膜充血<2 和 结膜水肿<2	≥2	≤21	可 逆 性 损 伤	无刺激性
角膜损害≥1 或 虹膜损害≥1 或 结膜充血≥2 或 结膜水肿≥2	≥2	≤7		轻刺激性
		≤21		刺激性
角膜损害≥3 或 虹膜损害≥1.5	≥2		不 可 逆 性 损 伤	腐蚀性**
角膜损害≥1 或 虹膜损害≥1 或 结膜充血≥1 或 结膜水肿≥1	≥1	>21		

*:恢复时间：为动物刺激反应评分恢复至角膜损害=0，虹膜损害=0，结膜充血=0 或 1，
结膜水肿=0 或 1 的时间。

**：腐蚀性：至少有 1 只动物于 21d 尚存在角膜粘连或血管翳，也可判为腐蚀性。

4.6 阴道黏膜刺激试验

4.6.1 目的

检测消毒剂对实验动物阴道黏膜的刺激作用和强度。

4.6.2 实验动物

选用健康、初成年的雌性白色家兔，同一品系，体重 2.0kg~2.5kg。试验前应检查动物阴道口有无分泌物、充血、水肿和其它损伤情况。如有炎症或（和）损伤，应弃用。最好选择未交配的动物的进行试验。

4.6.3 试验分组

分为染毒组和对照组，每组 3 只。

4.6.4 操作程序

(1) 稀释使用的消毒剂采用黏膜消毒时应用液 5 倍浓度的溶液作为受试液。若应用液为原液的消毒剂则用原液作受试液。对照组采用生理盐水。

(2) 将长度为 8cm 左右的钝头软管与 2mL 的注射器连接。注射器和导管注满受试液备用。每只动物各准备一套。

(3) 一次阴道黏膜刺激试验的染毒方法：将动物仰面固定，暴露出会阴和阴道口。将导管用受试液或对照液湿润后轻柔地插入阴道（4cm~5cm），并用注射器缓慢注入 2mL 受试液，抽出

导管，完成染毒。对照组动物用生理盐水作同样处理。

(4) 多次阴道黏膜刺激试验的染毒方法：按上述 4.7.4 (3) 的染毒方法，每隔 24h 重复染毒一次，连续 5 天。对照组动物用生理盐水作同样处理。

(5) 由于动物阴道容积的个体差异，有时受试液注入后可能有溢出，可用消毒棉或软纸拭去。

(6) 末次染毒后 24h，采用气栓法处死动物，剖腹取出完整的阴道，纵向切开，肉眼观察是否有充血、水肿等表现，供病理取材时参考。然后将阴道放入 10% 福尔马林溶液中固定 24h 以上，选取阴道的两端和中央三个部位的组织制片，HE 染色后，进行组织病理学检查。

4.6.5 结果评价

(1) 组织病理学检查结果，按表 2-15 规定对阴道黏膜的刺激反应进行评分。

(2) 将试验组 3 只动物三个部位的刺激反应积分相加后，再除以观察总数（动物数×3），得出试验组阴道黏膜刺激反应的平均积分，最大记分为 16（见表 4-15）。对照组评分方法同上。

(3) 将试验组平均积分减去对照组平均积分得出刺激指数后，按表 4-16 进行刺激强度分级。

(4) 当对照组动物阴道黏膜刺激反应平均积分大于 9 时，应采用 6 只动物进行复试，以鉴别是否与操作损伤有关。

表 4-15 阴道黏膜刺激反应评分标准

阴道组织反应	反应评分
A. 上皮组织	
完整—正常	0
细胞变性或变扁平	1
组织变形	2
局部糜烂	3
广泛糜烂或溃疡	4
B. 白细胞浸润（每个高倍视野）	
无	0
极少 <25 个	1
轻度 25~50 个	2
中度 51~100 个	3
重度 >100 个	4
C. 血管充血	
无	0
极少	1
轻度	2
中度	3
重度伴血管破裂	4

D. 水肿	
无	0
极少	1
轻度	2
中度	3
重度	4

刺激反应积分=A+B+C+D

表 4-16 阴道黏膜刺激强度分级

阴道黏膜刺激指数	阴道黏膜刺激反应强度
<1	无
1~<5	极轻
5~<9	轻度
9~<12	中度
≥12	重度

4.7 皮肤变态反应试验

4.7.1 目的

检测消毒剂重复接触后，实验动物产生皮肤变态反应的可能性及其强度。

4.7.2 实验动物

选用皮肤完好的健康白色豚鼠，雌雄各半，体重 200g~300g。

4.7.3 试验分组

将豚鼠随机分为试验组、阴性对照组和阳性对照组，每组动物至少 16 只。

4.7.4 操作程序

(1) 对试验组豚鼠，给予受试物诱导和激发处理。阳性对照组给予阳性致敏物（如：2, 4-二硝基氯苯）诱导和激发处理。阴性对照组仅给以受试物激发处理。

(2) 诱导处理浓度允许引起皮肤轻度刺激反应。激发浓度可低于诱导浓度，并不得引起原发性刺激反应。如果原液不引起皮肤刺激反应，诱导和激发均使用原液。

(3) 于试验前 24h 将豚鼠背部左侧 3cm×3cm 范围内去毛。取诱导浓度的消毒剂溶液（或原液）0.5ml (g)，直接涂在 2cm×2cm 左侧去毛皮肤上或滴于同样大小的 2~4 层纱布上，再将其敷贴在左侧去毛区。用一层无刺激塑料膜或油纸复盖，再以无刺激胶布固定，持续 6h。第 7 天和第 14 天以同样方法重复一次。

(4) 在末次诱导后 14 天，将激发浓度的消毒剂溶液 0.5ml (g) 直接涂在 2cm×2cm 右侧脱毛皮肤上或滴于同样大小的 2~4 层纱布上，敷贴于豚鼠背部右侧 3cm×3cm 去毛区。然后，用一层塑料膜或油纸和无刺激胶布固定，6h 后将敷贴的受试物洗去。24h 和 48h 后观察皮肤反应，

按表 4-17 对皮肤反应进行评分。

(5) 实验室开展皮肤变态反应试验初期, 或使用新的动物种属或品系时, 需同时设阳性对照组, 阳性对照物可使用 2, 4-二硝基氯代苯。为保证试验方法的可靠性, 在进行该类试验时, 每隔半年应使用阳性对照物检查一次。若检测报告中需用非本次阳性对照组的实验数据时, 应注明其实验日期。阳性对照组的操作程序同试验组, 以阳性致敏物替代受试物。

(6) 阴性对照组, 仅对动物给予受试物的激发接触, 每次试验必须设置。

4.7.5 评价规定

化学物质引起的过敏性接触性皮炎, 属迟发型变态反应。对于动物, 仅见皮肤红斑和水肿。

根据表 4-17 标准, 将出现皮肤反应 (评分 ≥ 1) 的动物数除以该组实验动物数, 求得致敏率 (%), 按表 4-18 评定致敏强度。

表 4-17 皮肤反应的评分标准

皮肤反应	评分
A 红斑形成:	
无红斑	0
轻微红斑	1
中度红斑	2
严重红斑	3
水肿性红斑	4
B 水肿形成:	
无水肿	0
轻度水肿	1
中度水肿	2
严重水肿	3

表 4-18 致敏强度分级标准

致敏率 (%)	致敏强度
0~8	极轻度
9~28	轻度
29~64	中度
65~80	强度
81~100	极强度

注: 致敏率为 0% 时, 可判为未见皮肤变态反应。

4.8 亚急性经口毒性试验

4.8.1 目的

(1) 检测消毒剂多次接触对实验动物的蓄积毒性作用及其靶器官, 并确定其最大未观察到有害作用剂量和最小观察到有害作用剂量。

(2) 为亚慢性、慢性毒性或致癌试验的剂量设计提供依据。

4.8.2 实验动物

一般用啮齿类动物, 经口染毒首选大鼠, 所用大鼠应为 6~8 周龄, 每组至少 10 只, 雌雄各半。

4.8.3 试验分组

将实验动物随机分为4组（3个剂量组和1个对照组）。选择受试物剂量时，高剂量组应出现明显的毒性反应，但不引起死亡，如果出现动物死亡应不超过10%；中间剂量组应可观察到轻微的毒性效应；低剂量组应不引起任何毒性效应（属未观察到有害作用剂量）。至于具体的剂量设计，可考虑高剂量为LD₅₀的1/5~1/10，高、中、低3个剂量间的组距以3~5倍为宜，最低不小于2倍。对于LD₅₀>5000mg/Kg的消毒剂，高剂量应用1000mg/Kg。另以受试物溶剂代替受试物进行试验，作为阴性（溶剂）对照组。

4.8.4 操作程序

- （1）采用灌胃方式经口染毒。
- （2）灌胃法每天灌胃一次，每周称体重，并按体重调整受试物的给予量。
- （3）试验期为28天，末次染毒后24h处死实验动物，检测各项观察指标。

4.8.5 观察指标

可因消毒剂毒理作用不同而有差异，一般应包括下列各方面。

- （1）临床检查。观察动物中毒表现，每周称量体重一次。
- （2）血液学检查。包括血红蛋白含量、红细胞数、白细胞数及其分类计数等。
- （3）血液生物化学检查。例如天冬氨酸氨基转移酶、丙氨酸氨基转移酶、尿素氮、肌酐、血清总蛋白和白蛋白、总胆固醇等。必要时，可根据所观察到的受试物毒性效应，或与受试物化学结构相似物质的毒性作用，选择其他一些生化指标。
- （4）脏器重量。测量肝、肾重量，并计算其脏器重量系数。
- （5）病理学检查。实验结束时，处死所有动物，进行全面的肉眼尸检，并将尸检发现的异常组织和主要脏器和组织（如心、肺、肝、肾、脾、脑、肾上腺、睾丸、卵巢和胃肠等）固定保存。当各剂量组动物尸检未发现明显病变，先进行高剂量组和阴性对照组动物的肝、肾、胃肠和其它可能受损的脏器的组织病理学检查。如大体解剖发现异常或高剂量组动物组织病理学检查发现病变，还应对中、低剂量组动物相应的器官进行组织病理学检查。

4.8.6 评价规定

将各试验组动物观察指标与阴性对照组加以比较，并对进行差异统计学检验，注意各剂量组间的剂量-反应（效应）关系。评定受试物的最小观察到有害作用剂量和最大未观察到有害作用剂量及毒性作用的靶器官。

4.9 亚急性经皮毒性试验

4.9.1 目的

(1) 检测消毒剂多次接触对实验动物的蓄积毒性作用及其靶器官，并确定其最大未观察到有害作用剂量和最小观察到有害作用剂量。

(2) 为亚慢性、慢性皮肤毒性或致癌试验的剂量设计提供依据。

4.9.2 实验动物

一般用啮齿类动物，经皮染毒应选择与急性经口毒性试验同一品系的动物，首选大鼠，所用大鼠应为 6~8 周龄，每组至少 10 只，雌雄各半。

4.9.3 试验分组

将实验动物随机分为 4 组（3 个剂量组和 1 个对照组）。受试物剂量设计应参考急性经皮毒性试验的结果，高剂量组应出现明显的毒性反应，但不引起过多死亡，如果出现动物死亡应不超过 10%；中间剂量组应可观察到轻微的毒性效应；低剂量组应不引起任何毒性效应（属未观察到有害作用剂量）。至于具体的剂量设计，可考虑高剂量为经皮 LD_{50} 的 $1/5\sim 1/10$ ，高、中、低 3 个剂量间的组距以 3~5 倍为宜，最低不小于 2 倍。如果受试物引起严重的皮肤刺激反应，则应降低受试物的浓度。对于经皮 $LD_{50} > 5000\text{mg/Kg}$ 的消毒剂，高剂量应用 1000mg/Kg 。另以受试物溶剂代替受试物进行试验，作为阴性（溶剂）对照组。

4.9.4 操作程序

(1) 染毒前 24h，将动物背部染毒区的被毛剪掉或剃除，面积不少于动物体表面积的 10%。剪毛时应注意避免损伤动物的皮肤。实验开始后，每周至少对染毒部位去毛一次。

(2) 受试物应均匀地涂敷于整个染毒区域，可以用玻璃纸和无刺激性胶带将受试物固定，以保证受试物与动物皮肤有良好的接触，并防止动物舔食。

(3) 染毒时间为连续 28 天，末次染毒后 24h 处死实验动物，检查各项观察指标。

4.9.5 观察指标

可因消毒剂毒理作用不同而有差异，一般应包括下列各方面。

(1) 临床检查。观察动物中毒表现，每周称量体重一次。对于经皮染毒的动物，应注意观察皮肤反应。

(2) 血液学检查。包括血红蛋白含量、红细胞数、白细胞数及其分类计数等。

(3) 血液生物化学检查。例如天冬氨酸氨基转移酶、丙氨酸氨基转移酶、尿素氮、肌酐、血清总蛋白和白蛋白、总胆固醇等。必要时，可根据所观察到的受试物毒性效应，或与受试物化学结构相似物质的毒性作用，选择其他一些生化指标。

(4) 脏器重量。测量肝、肾重量，并计算其脏器重量系数。

(5) 病理学检查。实验结束时，处死所有动物，进行全面的肉眼尸检，并将尸检发现的异常

组织和主要脏器和组织（如心、肺、肝、肾、脾、脑、肾上腺、睾丸、卵巢和胃肠等）固定保存。除上述脏器组织外，还应取染毒部位的皮肤组织进行固定。当各剂量组动物尸检未发现明显病变，先进行高剂量组和阴性对照组动物的肝、肾、胃肠和其它可能受损的脏器的组织病理学检查。如大体解剖发现异常或高剂量组动物组织病理学检查发现病变，还应对中、低剂量组动物相应的器官进行组织病理学检查。

4.9.6 评价规定

将各试验组动物观察指标与阴性对照组加以比较，并对进行差异统计学检验，注意各剂量组间的剂量-反应（效应）关系。评定受试物的最小观察到有害作用剂量和最大未观察到有害作用剂量及毒性作用的靶器官。

4.10 致突变试验

4.10.1 L5178Y 细胞基因突变试验

4.10.1.1 目的

检测消毒剂对体外培养的哺乳动物细胞的基因突变作用，以作为评价消毒剂致突变性的依据。

4.10.1.2 试剂

(1) F_{10P}培养液 为完全培养液。以 Fischer 或 RPMI1640 培养液，加入马血清 10%，丙酮酸钠 220μg/ml，青霉素 100IU/ml 和链霉素 100μg/ml 配制而成（pH7.2~7.4）。于 4℃ 冰箱中保存备用

(2) F_{0P}培养液 为无血清培养液。以 Fischer 或 RPMI1640 培养液，加入丙酮酸钠 220μg/ml，青霉素 100IU/ml 和链霉素 100μg/ml 等配制而成（pH7.2~7.4）。于 4℃ 冰箱中保存备用

(3) 马血清 将过滤除菌后的马血清，经 56℃ 作用 30min 灭活补体。分装后，于 -20℃ 保存备用

(4) 集落用培养基 用 Fischer 或 RPMI1640 培养液，加入马血清 20%、丙酮酸钠 220μg/ml、琼脂 0.37% 配制而成

(5) 无钙镁磷酸盐缓冲液（无钙镁 PBS，pH7.2~7.4）：

磷酸二氢钾（KH ₂ PO ₄ ）	0.20g
磷酸氢二钠（Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O）	2.89g
氯化钾（KCl）	0.20g
氯化钠（NaCl）	8.00g
双蒸水（压力蒸汽灭菌）	1000ml

(6) 受试物 最好能直接溶于 F_{10P} 与 F_{0P} 培养液中。否则需先溶于二甲基亚砷 (DMSO), 而后再加于上述培养液内。所加 DMSO 的量应低于 1% (V/V)

(7) 阳性对照物 选用甲基磺酸乙酯 (EMS), 丝裂霉素 C (MMC), 甲基硝基亚硝基胍 (MNNG), 苯并 (a) 芘 (BaP) 等

(8) 三氟胸苷 (TFT) 用生理盐水配成 $100\mu\text{g/ml}$ 溶液, 可冻存 3 个月

(9) 肝微粒体酶混合液 (S9 混合液) 取健康的雄性成年 SD 或 Wistar 大鼠, 体重 150g 左右, 约 5~6 周龄。将多氯联苯 (Aroclor 1254), 溶于玉米油中, 浓度 200mg/ml , 按 500mg/kg 体重一次腹腔注射。5 天后, 断头处死动物, 取出肝脏称重后, 用预冷的 0.15mol/L 氯化钾溶液冲洗肝脏数次。每克肝 (湿重) 加 0.15mol/L 氯化钾溶液 3ml。剪碎肝脏, 在冰浴中用玻璃匀浆器制成肝匀浆。以上操作需注意无菌和局部冷环境。

将肝匀浆用低温 ($0^{\circ}\text{C}\sim 4^{\circ}\text{C}$) 高速离心机, 以 9000g 离心 10min。取上清液即为 S9, 分装于无菌冷冻安瓿中。S9 制成后, 需进行无菌检查, 以及用间接致癌物鉴定其活性。合格者置 -80°C 或液氮中储存备用, 储存期不超过一年。

S9 混合液应以上述 S9 液在临用时按无菌要求配制。一般配成含 10% S9 的混合液。其配方如下:

S9	0.10mL
1.65mol/L 氯化钾 + 0.4mol/L 氯化镁	0.04mL
葡萄糖-6-磷酸.2Na	1.8mg
氧化型辅酶 II (NADP)	3.1mg
用 F_{0P} 培养液补足至 1.0ml	

4.10.1.3 细胞

试验以小鼠淋巴瘤 L5178Y 细胞 [胸苷激酶 (TK) 座位为杂合子 (tk^+/tk^-)] 检测 TK 基因的突变。为减少细胞的自发突变率, 在制备该细胞试验用悬液时, 先将其在加有 THMG 的 F_{10P} 培养液中培养 24h, 杀灭培养液中所存在的自发突变细胞 (tk^-/tk^-), 然后将细胞悬浮于 THG 培养液 (不含氨甲喋呤的 THMG 培养液) 中培养 1~3 天。

[THMG 含下列 4 种成分, 各成分的终末浓度如下:

胸苷	$5\times 10^{-6}\text{mol/L}$
次黄嘌呤	$5\times 10^{-5}\text{mol/L}$
氨甲喋呤	$4\times 10^{-7}\text{mol/L}$
甘氨酸	$1\times 10^{-4}\text{mol/L}$]

4.10.1.4 试验分组

一般设 4 个剂量组。对有细胞毒性的受试物，最高剂量组的细胞存活率为 10%~20%，无细胞毒性受试物最高剂量不超过 10mmol/L 或 5mg/ml。同时应有阴性（溶剂）对照组、未处理对照组和阳性对照组。除未处理对照组外，试验组和其它对照组，还均应包括有加 S9 混合液和不加 S9 混合液两大部分。

4.10.1.5 操作程序

(1) 细胞准备：将新清除了自发突变体的细胞群体，用 F_{10P} 培养液制成悬液。以无菌烧瓶加入细胞悬液和 F_{10P} 培养液至 100mL，细胞终末密度为 7×10^3 个/mL~ 8×10^3 个/mL。培养物以含 5%二氧化碳的空气充气后，加盖密闭，于 37℃ 进行培养。L5178Y 细胞的细胞殖周期约为 10h~11h，在常规培养 24h 后，细胞数将增加约 5 倍。用稀释法维持生长，每天将细胞培养物用 F_{10P} 培养液作 4 倍稀释（或隔天用 F_{10P} 培养液作 24 倍稀释），继续培养。实验前一天用 F_{10P} 培养液和 F_{0P} 培养液各 50% 的对半混合液（马血清终末浓度为 5%）稀释。

(2) 受试物处理：用上述 F_{10P} 和 F_{0P} 的对半混合液将细胞培养物稀释至 1×10^6 个/mL，并分种于 50mL 有盖试管中，每管 6mL，再加 S9 混合液 4mL（总量共 10mL）。不加 S9 混合液管，代之以 F_{0P} 培养液。在上述试管内加入一定浓度的受试物，并以含 5%二氧化碳的空气充气后加盖密闭，于 37℃ 培养 4h。

处理结束后，以 200g 离心 10min，除去含受试物的上清液，收集细胞。细胞用 Hanks 液洗涤，再加入 20mL F_{10P} 培养液充分混悬（细胞浓度为 0.3×10^6 个/mL），以含 5%二氧化碳的空气充气后，加盖密闭，于 37℃ 振荡培养，开始表达。

(3) 表达：细胞的表现型表达时间为 2 天。表达开始后 24h 和 48h 经计数后将细胞稀释至 3×10^5 个/mL。

(4) 选择和集落化：表达结束后，取 10mL 培养物经离心后除去大部分上清液。并将细胞在留下的约 1mL F_{10P} 培养基中混悬。将细胞悬液移入含 100mL 集落培养基的烧瓶中。此时细胞密度为 3×10^4 个/mL。在 37℃ 振荡培养 30min。取出 0.5mL 后，向余下的细胞悬液中加入 1.0mL TFT 贮存液，继续振荡培养 15min。将样本取出，倒于 3 个 10cm 平皿中，每平皿 33mL，含 1×10^6 个细胞（称为 TFT 平板），作突变体的选择。将先前取出的 0.5mL 细胞悬液用集落培养基先作 1:100 稀释，细胞悬液浓度为 3×10^2 个/mL。振荡培养 15min 后，取出 2.0mL 再用集落培养基作 1:50 稀释（此时细胞悬液浓度为 6 个/mL）后振荡培养。经 15min 培养后，倒入 3 个直径为 100mm 的平皿中，每平皿 33mL，含细胞 200 个（称为 VC 平板）。待琼脂凝固后，置二氧化碳培养箱（37℃）中静置培养 10 天。计数各个平皿中出现的集落数，计算集落形成效率（CFE）。

(5) 阳性与阴性对照组的操作程序同试验组，仅阳性对照组用阳性对照物代替受试物，阴性（溶剂）对照组用受试物溶剂代替受试物。另设一未处理对照组。

(6) 按下列公式计算有关指标：

绝对 CFE = (形成集落数 / 接种细胞数)

相对 CFE = (试验组绝对 CFE / 溶剂对照组绝对 CFE) × 100%

突变频率 (MF) = (TFT 平皿集落数 / VC 平皿集落数) × 稀释系数

[在此，稀释系数为 2×10^{-4}]

4.10.1.6 评价规定

(1) 对 L5178Y 细胞，推荐可接受的自发突变频率范围为 $20 \sim 100/10^6$ 个存活细胞。

(2) 用适当的显著性检验方法进行统计学处理，当各剂量组 MF 与阴性（溶剂）对照组者相比突变率，有显著性意义的增加，并呈剂量-反应关系时，或仅一个剂量组有统计学意义的增加并经重复试验证实者，均可判为阳性结果，即受试物对 L5178Y 细胞 TK 系统有致突变性。

4.10.2 V79 细胞基因突变试验

4.10.2.1 目的

检测消毒剂对体外培养的哺乳动物细胞可否引起基因突变，以对消毒剂的致突变性做出评价。

4.10.2.2 试剂

(1) 完全培养液 以 Eagle 最低必需培养液 (EMEM) 或 RPMI1640 培养液加 10% 小牛血清、青霉素 (100IU/mL) 和链霉素 (100 μ g/mL) 配制而成

(2) 小牛血清 将过滤除菌后的小牛血清放入 56 $^{\circ}$ C 水浴中，保温 30min 以灭活补体，而后分装，保存于 -20 $^{\circ}$ C 备用

(3) 无钙镁磷酸盐缓冲液 (无钙镁 PBS) 见 4.10.1.2 (5)

(4) 胰蛋白酶-EDTA 溶液 分别用无钙镁 PBS 配制胰蛋白酶与 EDTA 溶液，胰蛋白酶溶液浓度为 0.05%，EDTA 溶液浓度为 0.02%。两溶液按 1:1 混合。存放于 -20 $^{\circ}$ C 备用

(5) 受试物 最好能直接溶于无血清培养液内。否则，需先溶于二甲基亚砷 (DMSO)，而后加于无血清培养液内。所加 DMSO 溶液量为 0.5% (V/V)

(6) 阳性对照物 可根据受试物的性质和结构选用不同的阳性对照物，例如甲基磺酸乙酯 (EMS)，丝裂霉素 C (MMC)，甲基硝基亚硝基胍 (MNNG)，苯并 (α) 芘 (BaP) 等

(7) 6-硫代鸟嘌呤 (6-TG) 用 0.5% 碳酸氢钠溶液配制为 1.0mg/mL 溶液，保存于 4 $^{\circ}$ C 备用

(8) 肝微粒体酶混合液 (S9 混合液) 见 4.10.1.2 (9)

(9) 姬姆萨染液 取姬姆萨染料 3.8g, 置玛瑙乳钵中, 加少量甲醇研磨。逐渐加甲醇至 375mL, 待完全溶解后, 再加 125mL 甘油, 放入 37°C 恒温培养箱中保温 48h。保温期间振摇数次, 使充分溶解。取出过滤, 两周后使用, 作为姬姆萨染液原液

使用时, 取 1 份姬姆萨染液原液, 与 9 份 1/15mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH6.8) 混合, 配成其应用液。

磷酸盐缓冲液 (1/15mol/L, pH6.8) 配制方法如下:

第一液: 取磷酸氢二钠 9.47g 溶于蒸馏水 1000mL 中, 配成 1/15mol/L 溶液。

第二液: 取磷酸二氢钾 49.07g 溶于蒸馏水 1000mL 中, 配成 1/15mol/L 溶液。

取第一液 49.5mL 加于第二液 50.5mL 中混匀, 即为 pH 6.8 的 1/15mol/LPBS。

4.10.2.3 细胞

以中国仓鼠肺 (V79) 细胞株进行试验。为减少其自发突变, 正式试验前将野生型细胞接种于含 THMG (见 4.10.1.3) 的 MEM 培养液内并在二氧化碳培养箱中培养一周, 以杀灭自发 HGPRT 位点突变体。遂后重新接种于 MEM 培养液中。

4.10.2.4 试验分组

一般设 4 个试验剂量组。对有细胞毒性的受试物, 最高剂量组的细胞存活率为 10%~20%, 无细胞毒性受试物最高剂量不超过 10mmol/L (或 5mg/mL)。同时, 应设阴性 (溶剂) 对照组、未处理对照组和阳性对照组。除未处理对照组外, 各组均应包括加 S9 混合液和不加该液的样本。

4.10.2.5 操作程序

(1) 细胞准备: 将 5×10^5 个细胞接种于含完全培养液的直径为 100mm 的平皿中, 除未处理对照组外, 每组二皿共 13 皿。于二氧化碳培养箱中 (37°C) 培养 24h。

(2) 接触受试物: 吸去上述供试培养皿中的培养液, 用无钙镁 PBS 洗 2 次。将含有细胞的培养皿分为二大组, 一组加 S9 混合液, 另一组不加 S9 混合液。加 S9 混合液组, 在培养皿中加入 2mL S9 混合液, 对不加 S9 混合液组, 则用 2mL 无血清培养液代替, 再加一定量不同浓度受试物的供试液, 最后用不含血清的培养液补足至 10mL。并将培养皿置 CO₂ 培养箱中培养 5h, 处理结束后, 吸去培养皿中液体部分, 用无钙镁 PBS 洗涤细胞 2 次, 再加入完全培养液 10mL, 在 CO₂ 培养箱中培养 19h~22h。阳性和阴性 (溶剂) 对照组也分加与不加 S9 混合液两大组, 操作方法同上。

(3) 表达: 将培养物用胰蛋白酶-EDTA 消化。待细胞脱落后, 加入完全培养液, 终止消化。混匀、计数并进行表达和细胞毒性测定 [见 4.10.2.5 (4)]。表达时, 以 5×10^5 个细胞接种于

直径为 100mm 的平皿中。培养 3 天后，分传一次，仍接种 5×10^5 个细胞，培养 3 天后再进行突变体的选择及集落形成效率（CFE）的测定。

（4）细胞毒性测定：将上述消化计数后的细胞，每平皿接种 200 个，每组 5 个平皿，于二氧化碳培养箱内（37℃）培养 7d。取出样本，固定并进行姬姆萨染色后，计数各平皿的细胞集落数。以相对 CFE 值表示细胞的毒性。

（5）突变体的选择及集落形成率的测定：表达结束后，消化细胞，分别接种，每组 5 个平皿，每平皿种 2×10^5 个细胞。待细胞贴壁后加入 6-TG，终末浓度为 $5 \mu\text{g/mL}$ 。放入二氧化碳培养箱培养 7~10 天。固定后进行姬姆萨染色，计数平皿内集落数，并计算其突变频率（MF）。

（6）阳性与阴性对照组的操作程序同试验组，仅阳性对照组用阳性对照物代替受试物，阴性（溶剂）对照组用受试物溶剂代替受试物。另设一阴性（未处理）对照组。

（7）按下列公式计算有关指标：

绝对 CFE = (形成集落数/接种细胞数)

相对 CFE = (试验组绝对 CFE/溶剂对照组绝对 CFE) × 100%

突变频率 (MF) = (突变集落数/接种细胞数) × (1/绝对 CFE)

4.10.2.6 评价规定

（1）对 V79 细胞，推荐可接受的自发突变频率范围为 $10 \sim 100/10^6$ 个存活细胞。

（2）用适当的显著性检验方法进行统计学处理，当各剂量组 MF 与阴性（溶剂）对照组者相比，突变率有显著性意义的增加，并呈剂量-反应关系时，或仅一个剂量组有统计学意义的增加并经重复试验证实者，均可判为阳性结果，即受试物对 V79 细胞 HGPRT 系统有致突变性。

4.10.3 体外哺乳动物细胞染色体畸变试验

4.10.3.1 目的

用细胞遗传学方法检测体外培养的哺乳动物细胞染色体畸变，评价消毒剂的致突变性。

4.10.3.2 试剂

（1）完全培养液 采用 Eagle 最低必需培养液(EMEM)或 Dulbecco 最低必需培养液 (DMEM) 等，并加入 10% 小牛血清以及青霉素 (100IU/mL) 和链霉素 ($100 \mu\text{g/mL}$)

（2）小牛血清 将过滤除菌后的小牛血清，放入 56℃ 恒温水浴中，保温 30min 灭活补体。处理后分装，保存于 -20℃ 备用

（3）无钙镁磷酸缓冲液 无钙镁 PBS, pH7.2~7.4。见 4.10.1.2 (5)

（4）胰蛋白酶-EDTA 见 4.10.2.2 (4)

（5）受试物 最好能直接溶于无血清完全培养液内。否则，需先溶于二甲基亚砜 (DMSO)，

而后加于完全培养液内。所加 DMSO 溶液量应低于 1.0% (V/V)

(6) 阳性对照物 加 S9 时选用环磷酰胺等, 不加 S9 时选用丝裂霉素 C 等

(7) 肝微粒体酶混合液 (S9 混合液) 见 4.10.1.2 (9)

(8) 秋水仙素溶液 (0.04%) 取 40mg 秋水仙素溶解于 100ml 无菌 0.85%氯化钠溶液中, 过滤除菌

(9) 氯化钾溶液 (0.075mol/L)

(10) 甲醇/冰醋酸 (3:1, V/V) 固定液 临用现配

(11) 姬姆萨染液 见 4.10.2.2 (9)

4.10.3.3 细 胞

可选用中国仓鼠肺 (CHL) 细胞、中国仓鼠肺 (V79) 细胞、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞, 或人外周血淋巴细胞等进行试验。

在一般情况下, 本试验推荐使用 CHL 细胞。使用 CHL 细胞时, 在试验前一天, 将其 1×10^6 个细胞接种于直径为 100mm 平皿中, 置 37℃二氧化碳培养箱内待用。

4.10.3.4 试验分组

所设试验剂量组应不少于 4 个。最高剂量组的细胞存活率应为 10%~20%, 无毒性受试物最高剂量组不超过 10mmol/L (或 5mg/mL)。同时, 应设阴性 (溶剂) 对照组、未处理对照组和阳性对照组。除未处理对照组外, 各组均应包括加 S9 混合液和不加该液的样本。

4.10.3.5 操作程序

(1) 试验时, 吸出细胞培养平皿中的培养液, 加入试验所规定浓度的受试物和 S9 混合物 (10%) 以及不含小牛血清的完全培养液, 放二氧化碳培养箱内作用 2h。结束后, 吸去完全培养液, 用 Hanks 液洗细胞 3 次。加完全培养液, 再置二氧化碳培养箱中培养, 于 24h 收获细胞。收获细胞之前 2h~4h, 加入秋水仙素溶液 (终末浓度为 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$), 阻断细胞于有丝分裂中期相。

(2) 收获细胞时, 用胰蛋白酶-EDTA 溶液消化细胞, 待细胞脱落, 加入培养液并混匀以终止胰蛋白酶作用。离心 ($1000\text{r}/\text{min} \sim 1200\text{r}/\text{min}$, $5\text{min} \sim 7\text{min}$), 弃去上清液后, 加入 0.075mol/L 氯化钾溶液低渗处理 10min~20min。离心后, 再以甲醇/冰醋酸液固定 2 次。按常规滴片干燥, 用姬姆萨应用液染色 15min 左右。

(3) 阳性与阴性对照组的操作程序同试验组, 只是阳性对照组用已知染色体断裂剂替代受试物。阴性 (溶剂) 对照组用受试物的溶剂。另设一未处理对照组。

(4) 观察: 每组各选 100 个染色体分散良好的中期分裂相细胞, 进行染色体畸变分析, 观察和记录染色体结构的异常及数量异常。

染色体结构异常可有：断裂，微小体，有着丝点环，无着丝点环，单体互换，双微小体，裂隙，非特定性型变化（粉碎化等）。染色体数量异常可有：非整倍体，多倍体，内复制。

4.10.3.6 评价规定

用 χ^2 检验或其他适当的显著性检验方法，对所得试验数据进行统计学处理。当各剂量组与阴性（溶剂）对照组相比，畸变细胞率的增加有显著性意义，并有剂量-反应关系时；或仅一个剂量组有显著性意义的增加，并经重复试验证实时，可判为该受试物在本试验中具有致突变性。

4.10.4 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验

4.10.4.1 目的

检测消毒剂对小鼠骨髓嗜多染红细胞微核形成的影响，评价消毒剂的染色体损伤毒性。

4.10.4.2 试剂

- (1) 受试物 用水、植物油或用 0.5% 羧甲基纤维素钠配制成溶液或混悬液
- (2) 阳性对照物 常用环磷酰胺或丝裂霉素 C
- (3) 小牛血清 见 4.10.3.2 (2)
- (4) 姬姆萨染液 见 4.10.2.2 (9)

4.10.4.3 实验动物

选用体重为 25g~30g 的小鼠，雌雄各半，随机分组。

4.10.4.4 试验分组

受试物至少设 3 个剂量组，每个剂量组用 10 只动物，雌雄各半。另设阴性（溶剂）和阳性对照组。剂量组一般取受试物的 $1/2LD_{50}$ 、 $1/5LD_{50}$ 、 $1/20LD_{50}$ 等剂量，以得到剂量-反应关系。高剂量组应不引起动物死亡，不引起明显骨髓抑制。若采用一次最大限度试验测得 LD_{50} 大于 5000mg/kg 体重，即以 5000mg/kg 体重为高剂量。

4.10.4.5 操作程序

- (1) 动物染毒采用经口灌胃 30h 染毒法，即两次染毒间隔 24h，第二次染毒后 6h 取材。
- (2) 用颈椎脱臼法处死动物，取股骨或胸骨。剥除肌肉，擦净血污。切断股骨或胸骨两端，暴露骨髓腔。
- (3) 用注射器吸取 0.1mL 小牛血清，冲洗骨髓腔。用冲洗液常规涂片，晾干或热风吹干。
- (4) 将已干的涂片，在甲醇中固定 5min~10min。用姬姆萨应用液染色 10min~15min，然后用 pH6.8 PBS 液冲洗，晾干。
- (5) 阳性与阴性对照组的操作程序同试验组。阳性组选用环磷酰胺（40mg/kg 体重）或丝裂霉素（1mg/kg~1.5mg/kg 体重）。阴性（溶剂）对照组用受试物溶剂。

(6) 选择细胞分布均匀、完整、着色适当的区域。在油镜下计数含微核的嗜多染红细胞 (PCE) 数。PCE 呈灰蓝色 [成熟红细胞 (NCE) 呈粉红色], 微核多呈圆形、边缘光滑、整齐, 嗜色性与有核细胞核质一致, 呈紫红色或蓝紫色。直径通常为红细胞的 1/20~1/5。

(7) 每只动物计数 1000 个 PCE。微核细胞率指含有微核的 PCE 数, 以千分率表示。一个 PCE 中出现有两个或多个微核, 仍按一个计数。此外, 还应观察 PCE/NCE 比例, 作为对细胞毒性的指标。一般计数 200 个 PCE, 同时记数所见到的 NCE。当 PCE/NCE 小于 0.1 时, 提示对骨髓具有明显抑制作用, 应降低受试物剂量, 重新进行试验。

4.10.4.6 评价规定

阴性对照组小鼠, 微核细胞率一般不超过 0.3%。

用波松分布 μ 检验或其他适当的显著性试验方法, 进行统计学处理。当各剂量组与溶剂对照组相比, 微核细胞率的增加有显著性意义, 并有剂量-反应关系, 或仅一个剂量组微核细胞率增加有显著性意义, 并经重复试验证实时, 均可判为受试物具有体内染色体损伤作用。

4.10.5 哺乳动物骨髓细胞染色体畸变试验

4.10.5.1 目的

用细胞遗传学方法检测实验动物骨髓细胞染色体畸变率, 以评价消毒剂的致突变性。

4.10.5.2 试剂

(1) 阳性对照物 常用环磷酰胺, 丝裂霉素 C 等

(2) 秋水仙素 (0.04%) 取 40mg 秋水仙素溶解于 100ml 无菌的 0.85% 氯化钠溶液中, 过滤除菌

(3) 氯化钾溶液 (0.075mol/L)

(4) 甲醇/冰醋酸 (3:1, V/V) 固定液 临用现配

(5) 姬姆萨染液 见 4.10.2.2 (9)

(6) 磷酸盐缓冲液 (PBS, 1/15mol/L, pH7.4)

4.10.5.3 实验动物

成年小鼠 (体重 25g~30g), 或大鼠 (体重 180g~220g)。动物总数不少于 30 只, 雌雄各半。

4.10.5.4 试验分组

随机分为 5 组。至少 3 个受试物剂量组, 为 1/2LD₅₀、1/5LD₅₀、1/20LD₅₀。若采用一次最大限度试验, 测得 LD₅₀ 大于 5000mg/kg 体重, 即以 5000mg/kg 体重为高剂量。另设阳性对照组和阴性 (溶剂) 对照组, 每组 6 只动物, 雌雄各半。阳性对照组可用环磷酰胺 (40mg/kg 体重) 或丝裂霉素 C (1.5mg/kg~2mg/kg 体重)。阴性 (溶剂) 对照组采用受试物溶剂。

4.10.5.5 操作程序

(1) 用经口灌胃方式，共染毒两次，间隔 24h。于第二次染毒后 6h 处死动物。处死动物前 2~4h 腹腔注射 0.04%秋水仙素溶液，剂量为 4mg/kg 体重。

(2) 用颈椎脱臼法处死动物，取出股骨，剔除肌肉等组织。

(3) 剪去股骨两端，用注射器吸取 5mL 生理盐水，从股骨一端注入，用 10mL 离心管从股骨另一端接取流出的骨髓细胞悬液。

(4) 将骨髓细胞悬液离心 (1000r/min, 5min~7min)，除上清液。加 0.075mol/L 氯化钾溶液 7mL，用滴管将细胞轻轻混匀，置 37℃水浴中低渗处理 7min。

(5) 加入 2mL 甲醇/冰醋酸固定液，混匀。离心 (1000r/min, 5min~7 min)，弃上清液。再加入 7mL 固定液，混匀，固定 7min。离心 (1000r/min, 7min)，弃去上清液。

(6) 用同法再固定 1~2 次，弃上清液，加入数滴新鲜固定液，混匀。

(7) 用悬液滴片，晾干，以姬姆萨应用液染色。

(8) 每组各选 100 个染色体分散良好的中期分裂相细胞，进行染色体畸变分析，观察和记录染色体结构的异常和数量的异常。染色体结构异常可有：断裂、微小体、有着丝点环、单体互换、双微小体、裂隙、粉碎化等。染色体数量的异常可有：非整倍体、多倍体、内复制等。

(9) 计算畸变细胞率。畸变细胞率为 100 个中期分裂相细胞中有染色体畸变的细胞数。一个中期分裂相细胞出现两种或多种畸变，仍按一个有染色体畸变细胞计。

(10) 阳性与阴性（溶剂）对照组的操作程序同试验组。只是阳性组选用环磷酰胺（40mg/kg 体重）或丝裂霉素（1.5mg/kg~2.0mg/kg 体重）作为受试物的替代物。阴性（溶剂）对照组用受试物溶剂作为受试物的替代物。

4.10.5.6 评价规定

用 χ^2 检验或其他适当的显著性检验方法对所得试验数据进行统计学处理。当各剂量组与阴性（溶剂）对照组相比，畸变细胞率的增加有显著性意义，并有剂量-反应关系时；或仅一个剂量组畸变细胞率增加有显著性意义，并经重复试验证实时，可判为该受试物在本试验中具有致突变性。

4.10.6 程序外 DNA 修复合成试验

4.10.6.1 目的

检测受试物是否可引起体外哺乳动物细胞的原发 DNA 损伤。推荐用放射自显影法进行测定。

4.10.6.2 试剂

(1) 完全培养液 用 Eagle 最低要求培养基 (EMEM) 85 份加小牛血清 15 份，青霉素（终

末浓度 100IU/mL) 与链霉素 (终末浓度 100 μ g/mL), pH7.2~7.4。过滤除菌后, 保存于 4 $^{\circ}$ C 冰箱备用

(2) 同步培养液 用不含精氨酸的 EMEM 培养基 98 份, 加小牛血清 2 份, 再加青霉素 (终末浓度 100IU/mL) 与链霉素 (终末浓度为 100 μ g/mL) 配制而成

(3) 小牛血清 见 4.10.2.2 (2)

(4) 无钙镁磷酸盐缓冲液 (无钙镁 PBS) 见 4.10.1.2 (5)

(5) 胰蛋白酶-EDTA 溶液 见 4.10.2.2 (4)

(6) 甲醇/冰醋酸 (3:1, V/V) 固定液 临用现配

(7) 羟基脲 (HU) 贮备液 250mmol/L

(8) 1% 枸橼酸钠溶液。

(9) ^3H -胸腺嘧啶核苷

(10) NTB-2 核乳胶或国产核-4 乳胶。

(11) 肝微粒体酶混合液 (S-9 混合液) 见 4.10.1.2 (9)

(12) 显影液及定影液 包括柯达 (Kodak) D-196 显影液、停显液及 F-5 定影液

4.10.6.3 细 胞

可选用人成纤维细胞、大鼠原代肝细胞、外周血淋巴细胞等进行试验。本规范推荐使用人胚肺成纤维细胞 (2BS)。

4.10.6.4 试验分组

受试物可设 4 个剂量组。最高剂量组应使细胞存活率在 10%~20%之间。无毒性受试物最高剂量不超过 10mmol/mL。同时应有阴性 (未处理、溶剂) 对照组和阳性对照组。

4.10.6.5 操作程序

人胚肺成纤维细胞 (2BS) 放射自显影法操作程序。

(1) 将细胞增殖至所需数量后, 用完全培养液制成单细胞悬液, 浓度为 0.5×10^5 个/mL~ 1.0×10^5 个/mL。将细胞悬液接种置有小盖玻片的 6 孔细胞培养板中, 在 37 $^{\circ}$ C 二氧化碳培养箱内培养 1~3 天, 至细胞 50% 融合。每一剂量组和各对照组分别作 2~3 个平行样本。

(2) 换用同步培养液, 培养 3 天。

(3) 在试验的前一日下午, 加入羟基脲 (HU) 贮备液使 HU 的终末浓度为 10mmol/L。继续在 37 $^{\circ}$ C 下培养 16h, 然后将上述长有细胞之盖片置于含有不同浓度的受试物、HU (10mmol/L) 及 ^3H -胸腺嘧啶核苷 (5~10 μ Ci/mL, 30Ci/mmol) 同步培养液中。在 37 $^{\circ}$ C 培养 5h。

(4) 阳性及阴性对照组的操作程序同试验组, 只是阳性对照组用阳性对照物代替受试物,

阴性（溶剂）对照组用受试物溶剂代替受试物。

（5）处理结束后，用 Hanks 液洗涤 3 次，再用 1% 枸橼酸钠溶液处理 10min。将小盖玻片用甲醇-冰醋酸固定液固定 30min，重复 2 次。干燥过夜，将有细胞的盖玻片用少量中性树胶，粘固于载玻片上，长有细胞的一面朝上。

（6）在暗室中，将适量之 NTB-2 乳胶（或核-4 乳胶）移入浸渍用之玻璃器皿中，置 40℃ 水浴中融化，再加入等量 40℃ 蒸馏水，继续在水浴中加温，用玻璃棒轻轻搅拌 10min~20 min，使气泡逸出。同时将准备做自显影处理的载玻片，置水浴箱平台上预热。而后，将附有样本的载玻片垂直浸渍于乳胶液中约 5s。提出玻片，拭去其背面乳胶并待其干固。

（7）将干固的附有样本的载玻片置于有变色硅胶干燥剂袋的曝光盒中，盒外包黑色避光纸，于 4℃ 冰箱中曝光 10 天。曝光后，将玻片在 D-19 显影液中显影 4min，在停显液中漂洗 30s，在 F-5 定影液中定影 10min，再用水漂洗数小时。

（8）细胞在显影后用姬姆萨染液染色，脱水透明后，用盖片封固。在油镜下，计数各样本细胞核的显影银粒数，每个样本计数 100 个细胞，同时计数相当面积的本底银粒数，两者之差为细胞核净银粒数。计算各试验组和对照组“银粒数/核”的均值及其标准差。

4.10.6.6 评价规定

用 t 检验或其他适当的显著性检验方法进行统计学处理。当各试验剂量组“银粒数/核”均值与阴性（溶剂）对照组者相比，有显著性意义的增加，并呈剂量-反应关系时；或仅一个剂量组有统计学意义的增加，但经重复试验证实者，可判为该受试物诱导了 DNA 修复合成，具有 DNA 损伤作用。

4.10.7 睾丸生殖细胞染色体畸变试验

4.10.7.1 目的

利用细胞遗传学方法，以哺乳动物体内试验检测受试物引起的生殖细胞染色体损伤。试验有小鼠精原细胞染色体畸变试验和小鼠精母细胞染色体畸变试验，可根据情况选做其一，或两者均做。

4.10.7.2 试剂

- （1）受试物 用水、植物油配成溶液，或用 0.5% 羧甲基纤维素钠制成混悬液
- （2）阳性对照物 常用环磷酰胺，或丝裂霉素
- （3）秋水仙素（0.04%） 取 40mg 秋水仙素，溶于 100mL 0.85% 氯化钠溶液中，过滤除菌
- （4）甲醇/冰醋酸（3:1，V/V）固定液 临用现配
- （5）枸橼酸三钠

(6) 姬姆萨染液 见 4.10.2.2 (9)

4.10.7.3 实验动物

选用 3~4 月龄，体重 25g~30g 的雄性小鼠。动物总数不少于 25 只。

4.10.7.4 试验分组

受试物至少设 3 个试验剂量组，每个剂量组 5 只动物。另设阳性对照组和阴性（溶剂）对照组。阳性对照组用环磷酰胺（40mg/kg 体重）或丝裂霉素 C（1.5~2mg/kg 体重），腹腔注射。

4.10.7.5 操作程序

(1) 小鼠精原细胞染色体畸变试验，用经口灌胃方式，共染毒两次，间隔 24h。于第二次染毒后 6h 处死动物。处死动物前 3.5h~5.00h 腹腔注射 0.04% 秋水仙素溶液，剂量为 4mg/kg 体重。

小鼠精母细胞染色体畸变试验，灌胃染毒，每天 1 次，连续 5 天。于第 1 次染毒后的第 12~14 天将受试动物处死。处死动物前 3.5h~5.00h，腹腔注射 0.04% 秋水仙素溶液（4mg/kg 体重）。

(2) 用颈椎脱臼法处死小鼠，取睾丸，去除脂肪。置含 2.2% 枸橼酸三钠溶液平皿中去除睾丸被膜，用针头使曲精小管松散。一个动物的 2 个睾丸可分别或合并处理。

(3) 用吸管尽可能去除 2.2% 枸橼酸三钠溶液，将曲精小管置于含 3mL~4mL 低渗液（1% 枸橼酸三钠）的试管中。10min 后更换低渗液，以去除碎片和精子。在室温下，低渗时间总计不超过 25min。低渗结束后去除低渗液。加入预冷的固定液（甲醇/冰醋酸），固定 10min 后，更换固定液，再固定 10min。第 3 次固定至少 30min，也可在冰箱中过夜。用镊子将已固定的曲精小管移到含 50% 醋酸 5mL 的离心管中，吸管吹打至不透光，离心（1000r/min，5min）。

(4) 将固定液 1.0mL~1.5mL 加至离心所得细胞沉淀物中。滴管吹打后，滴 2 滴至用 70% 乙醇浸湿的玻片，分散后，热风干燥。

(5) 用姬姆萨应用液在室温染色 10min，自来水淋洗两次。

(6) 以油镜检查染色体结构的异常情况。每只动物做两个睾丸，每个睾丸分析 50 个中期分裂相精原细胞（或精母细胞）。记录观察染色体型和染色单体型染色体的结构异常。对精母细胞染色体还观察相互易位、X-Y 和常染色体的单价体。

检查染色体数目异常时，记录非整倍体和多倍体。在小鼠精母细胞染色体畸变试验时，只有当第一次减数分裂中，四倍体生殖细胞有一个被确认为四价体时才有意义。

4.10.7.6 评价规定

用 χ^2 检验，或其他适当的显著性检验方法对所得试验数据进行统计学处理。当各剂量组与阴性（溶剂）对照组相比，畸变细胞率有显著性意义的增加，并有剂量-反应关系时；或仅一个

剂量组有显著性意义的增加，经重复试验证实后，可判为该受试物对哺乳动物睾丸细胞具有致突变性。

4.11 亚慢性毒性试验

4.11.1 目的

(1) 检测消毒剂较长期染毒对实验动物的毒性作用及其靶器官，并确定其最大未观察到有害作用剂量。

(2) 为慢性毒性和致癌试验的剂量设计提供依据。

4.11.2 实验动物

一般用啮齿类动物，首选大鼠。所用大鼠应为 4~6 周龄者。全部试验至少需用 80 只动物。

4.11.3 试验分组

将实验动物随机分为 4 组（3 个剂量组和 1 个对照组），每组 20 只动物，雌雄各半。选择受试物剂量时，高剂量组应出现明显的毒性反应，但不引起死亡，如果出现动物死亡应不超过 10%；中间剂量组应可观察到轻微的毒性效应；低剂量组应不引起任何毒性效应（属未观察到有害作用剂量）。至于具体的剂量选择，可考虑高剂量为 LD_{50} 的 $1/20\sim 1/5$ ，高、中、低 3 个剂量间的组距以 3~5 倍为宜，最低不小于 2 倍。另以受试物溶剂代替受试物进行试验，作为阴性对照组。

4.11.4 操作程序

(1) 采用灌胃方式或将受试物掺入饲料经口染毒。

(2) 灌胃法每天灌胃一次，每周称体重，并按体重调整受试物给予量。如受试物掺入饲料时，应定期称饲料消耗量，计算消毒剂摄入量。

(3) 试验期为 3 个月（90 天），末次染毒后 24h 处死实验动物，检测各项观察指标。

4.11.5 观察指标

观察指标，可因消毒剂毒理作用不同而异，一般至少包含以下方面。

(1) 临床观察：观察动物中毒表现，每周称量体重一次，食物消耗量至少 1~2 次。

(2) 血液学检查：包括血红蛋白含量、红细胞数、白细胞及其分类计数、血小板数、网织红细胞数等。

(3) 血液生物化学检查：例如天冬氨酸氨基转移酶、丙氨酸氨基转移酶、碱性磷酸酶、尿素氮、肌酐、血清总蛋白和白蛋白、总胆固醇、总胆红素等。必要时，可根据所观察到的受试物毒性效应，或与受试物化学结构相似物质的毒性作用，选择其他一些生化指标。

(4) 脏器重量：测量主要脏器（如肝、肾、肾上腺、睾丸等）的脏器重量和脏器系数（脏器重/体重×100%）。

(5) 病理学检查：实验结束时，处死所有动物，进行系统解剖和肉眼观察，并将主要器官和组织（如心、肺、肝、肾、脾、脑、肾上腺、睾丸、卵巢、胃肠和系统解剖时发现的异常组织等）固定、保存。当各剂量组动物尸检未发现明显病变时，先进行高剂量组和阴性对照组动物肝、肾、胃、肠及其它重要的和可能受损的脏器的组织病理学检查。如发现病变，还应对中、低剂量组动物相应的器官进行组织病理学检查。

4.11.6 评价规定

将各试验组动物观察指标与阴性对照组加以比较并进行统计学检验，注意各剂量组间的剂量-反应（效应）关系。评定受试物最小观察到有害作用剂量和最大未观察到有害作用剂量及毒性作用的靶器官。

4.12 致畸胎试验

4.12.1 目的

检测消毒剂对妊娠实验动物有无致畸胎性，确定其未观察到发育毒性的剂量。

4.12.2 试剂

- (1) 1/1000 茜素红溶液 茜素红 0.1g，氢氧化钾 10g，加蒸馏水 1000mL
- (2) 透明液 A 甘油 200mL，氢氧化钾 10g，蒸馏水 790mL
- (3) 透明液 B 甘油与蒸馏水等量混合
- (4) 固定液（Bouins 液） 苦味酸饱和液 75 份，甲醛 20 份，冰醋酸 5 份

4.12.3 实验动物

试验用大鼠或小鼠（必要时可用家兔）。用大鼠和小鼠试验时，取健康、性成熟、未交配过的体重为 200g~250g 的大鼠，或体重为 25g~30g 的小鼠。

4.12.4 试验分组

至少设 4 组，其中 3 个为试验组，1 个为阴性对照组。每组至少有 15 只孕鼠。高剂量组可用雌鼠的 1/10LD₅₀ 作为试验剂量；低剂量组，可用雌性动物的 1/100LD₅₀ 作为试验剂量。其间设中剂量组。阴性对照组以受试物的溶剂代替受试物进行试验。阳性对照组常用阿司匹林(300mg/kg 体重)、敌枯双(1mg/kg 体重)或维生素 A(40000IU)。对于实验室首次进行的动物品种或品系必需设阳性对照组。为了保证试验方法的可靠性，每隔半年需用阳性对照物检查一次。

4.12.5 操作程序

(1) 将雌鼠和雄鼠按 1:1 或 2:1 的比例同笼饲养。每日晨观察阴栓（或阴道涂片）。查出阴栓或精子的当天定为孕期零天。如 5 天内未交配，调换雌鼠。查出的孕鼠按上述随机分组，并进行称重和编号。

(2) 在大、小鼠孕期 6~15 天期间，每天用灌胃法给予受试物。分别于孕期 0、6、10、15 和 20 天称重孕鼠，并根据体重调整受试物给予量。注意观察并记录孕鼠的毒性反应。

(3) 大鼠于孕期第 20 天，小鼠于孕期第 18 天，用颈椎脱臼法处死。剖腹，取出子宫称重，检查活胎、吸收胎、早期死胎和晚期死胎数。

(4) 逐个记录活胎鼠的性别、体重、身长和尾长。外观检查头面部、躯干部、四肢等有无畸形，诸如皮下出血、露脑、脑膨出、眼部畸形（无眼或开眼等）、鼻孔扩大、单鼻孔、唇裂、脊柱裂、四肢和尾畸形、肛门闭锁等。

(5) 每窝取约 1/2~2/3 活胎鼠，用眼科镊剥皮。取出内脏（注意勿拉断肋骨），去掉后颈和两肩胛骨之间的脂肪块。将胎鼠放入茜素红溶液染色。当天摇动玻璃瓶 2~3 次。待骨骼染成红色时为止。将胎鼠换入透明液 A 中 1~2 天，换入透明液 B 中 2~3 天。待胎鼠骨骼已染红，而软组织的紫红色基本褪去，可换置甘油中。

(6) 将染好的标本连同甘油一并倒入含水平皿内，在解剖显微镜下，用透射光源，先观察胎鼠全身，然后逐步检查：①头骨、胸骨、脊椎骨、肋骨和四肢等有无骨化不全、骨化迟缓和其他缺陷。②观察脊椎骨有无缺失、融合、纵裂等畸形；③观察胸骨的发育和数目，有无胸骨缺失等；④检查肋骨有无融合肋、分叉肋、肋骨中断、缺肋、短肋、波状肋、多肋畸形等；⑤最后检查四肢骨畸形。

(7) 每窝取约 1/3~1/2 活胎鼠浸入固定液 2 周，作内脏检查。将已固定的胎鼠用水冲净，仰放于石蜡板上。剪去四肢和尾，用刀片在头颈部常规共切 4 刀，再用剪刀剖开胸、腹腔。着重检查：①有无裂舌、双叉舌、裂腭及眼、鼻和脑部的畸形；②是否出现右位心、心脏过大、肺过大或过小等畸形；③消化系统和泌尿生殖系统各器官的大小、形状以及位置；④有无肾盂积水，双侧有无睾丸，以及子宫发育不全等畸形。

4.12.6 评价规定

主要观察动物畸胎出现率，同时观察其他指标，如着床数、活胎数、晚期死胎数、早期死亡数，以及活胎体重、身长、尾长等。

观察全部结果的剂量-反应关系，确定受试物的母体毒性、发育毒性及致畸性。求出受试物的最小致畸剂量和最大无致畸作用剂量。对致畸强度应以致畸指数表示。

$$\text{致畸指数} = (\text{雌鼠 LD}_{50}) / (\text{最小致畸剂量})$$

致畸指数小于或等于 10 为基本不致畸；大于 10 至 100 为致畸；大于 100 为强致畸。

4.13 慢性毒性试验

4.13.1 目的

检测受试物长期染毒对实验动物所产生的毒性作用，确定其最小观察到有害作用剂量，最大未观察到有害作用剂量及毒性作用的靶器官。

4.13.2 实验动物

试验选用刚离乳的大鼠。在试验结束时，每个剂量组每种性别的动物应不少于 10 只。中间需活杀动物检查时，需相应增加实验动物数量。

4.13.3 试验分组

将实验动物随机分在 3 个剂量组和 1 个阴性对照组。阴性对照组除不接触消毒剂外，其它与实验组相同，若在试验中对受试物使用溶剂或赋形剂时，阴性对照组应给予相应剂量的溶剂或赋形剂。试验剂量根据亚慢性试验结果选择。高剂量应引起明显的毒性效应甚至个别动物死亡，低剂量应不引起毒性效应。

4.13.4 操作程序

(1) 用灌胃法或将受试物掺入饲料或饮水中喂饲。掺入饲料的受试消毒剂的最高浓度一般不超过 5%。饲料中受试消毒剂应定期监测，观察其均匀性和稳定性。

(2) 灌胃法每天给药一次。

(3) 前三个月每周称量体重，三个月后每月称一次体重，调整受试物灌胃量。如受试物掺入饲料，应定期称饲料消耗量。如受试物溶于饮水中喂饲，需记录动物的饮水量。

(4) 试验期限为一般为 6 个月，必要时可延长至 2 年。

4.13.5 观察指标

指标与亚慢性毒性试验基本相同，也可根据受试物对实验动物的亚慢性毒性作用和靶器官，可适当增加或更换一些针对性更强更灵敏的观察指标。

(1) 临床观察：观察中毒表现，体重前 3 个月每周一次，以后每月一次。

(2) 血液学检查：于试验的第 3、6 个月及以后每半年进行一次血液学检查。

(3) 血液生化检查：检查时间同血液学检查。

(4) 病理学检查：

系统解剖：所有实验动物包括试验过程中死亡的动物都应进行完整的系统解剖和详尽的肉眼观察。肉眼可见的异常组织都应留样作进一步组织病理学检查。

脏器重量：称取脑、肝、肾、肾上腺和睾丸重量并计算脏器系数。

组织学检查：对照组、高剂量组动物及系统解剖发现异常的组织均需作详尽的组织学检查。当高剂量组有异常发现时，其它剂量组才进行相应检查。检查脏器一般包括脑、心、肺、肝、脾、肾、胃、肠、肾上腺、甲状腺、垂体、睾丸（卵

巢)和子宫等。

4.13.6 评价规定

比较各剂量组与对照组观察指标的变化。计算分析其剂量-反应关系,并确定受试物最小观察到有害剂量和最大未观察到有害作用剂量,及毒性作用靶器官。

4.14 致癌试验

4.14.1 目的

检测长期接触消毒剂后实验动物出现肿瘤的情况,评价其致癌性。也可将致癌试验和慢性毒性试验结合在一批动物中进行。

4.14.2 实验动物

以刚离乳的大鼠或小鼠进行试验。如与慢性毒性试验结合进行,通常选用大鼠。各剂量组和阴性对照组使用的有效动物数,至少雌雄各50只。如与慢性毒性结合进行,试验中间需处死动物进行检查时,需相应增加实验动物数。

4.14.3 试验分组

实验动物分组同慢性试验,一般设3个剂量组与1个阴性对照组(见4.13.3)。根据亚慢性试验结果选择剂量。最高剂量组为最大耐受剂量,可引起轻度毒性效应,但不能因肿瘤以外因素明显缩短其生命期限。最低剂量组应不影响动物正常的生长、发育和寿命,即不引起任何毒性效应。中间剂量处于最高和最低剂量之间。若在试验中对受试物使用溶剂或赋形剂时,阴性对照组应以相应的溶剂或赋形剂进行试验。

4.14.4 操作程序

(1) 将受试物灌胃或掺入饲料或饮水中喂饲。掺入饲料中的受试物最高浓度,不应超过5%。如用灌胃法,每天给药一次。

(2) 前三个月每周称体重,三个月后每月称体重,并调整受试物的灌胃量。每周称饲料消耗量一次。若受试物溶于饮水中喂饲,需记录饮水量。试验期应包括动物正常寿命期的大部分时间,大鼠为2年以上,小鼠为18个月以上。

(3) 试验过程中,除观察一般临床症状外着重观察动物的肿瘤发生情况。对每一肉眼可见或可触及的肿瘤,其出现的时间、部位、大小、外形和发展情况均应有记录。

(4) 凡在试验过程中死亡或濒死而提前处死,以及试验结束全部处死的动物,均应进行完整的尸检及系统的、全面的、详细的器官和组织的病理学检查。对肉眼可见肿瘤或可疑病变组织,对试验过程中死亡或濒死而提前处死的动物,高剂量组和对照组的全部动物,均需进行全面的病理组织学检查。如果高剂量组肿瘤、癌前病变或增生的发生率和阴性对照组者相比,差别有显著

性时，则中、低剂量组所有动物的有关器官和组织均需进行病理组织学检查。若高剂量组存活动物数显著少于对照组或存在影响肿瘤发生的毒作用时，则中剂量组也应按上述高剂量组的要求进行系统检查。

(5) 若致癌试验和慢性毒性试验结合在一起进行，还应按慢性毒性试验的要求，对有关指标进行观察和记录。

4.14.5 评价规定

(1) 肿瘤发生率：肿瘤发生率是整个实验终了时，患瘤动物总数在有效动物总数中所占的百分率，有效动物总数是指最早出现肿瘤时的存活动物总数。

$$\text{肿瘤发生率} = \frac{\text{实验终了时患瘤动物总数}}{\text{有效动物总数}} \times 100\%$$

(2) 致癌试验阳性的判断标准

按世界卫生组织（WHO，1969）提出的下列 4 条致癌试验阳性标准进行评价：

- ① 阴性对照组动物出现的一种或数种肿瘤，试验组均有发生且发生率超过前者。
- ② 试验组发生阴性对照组未有的肿瘤。
- ③ 试验组肿瘤发生的时间早于阴性对照组者。
- ④ 试验组每个动物的平均肿瘤数超过阴性对照组者。

(3) 致癌试验阴性结果的确立

假如动物试验规模为两种种属、两种性别，至少 3 个剂量，其中一个接近最大耐受剂量，每组动物至少 50 只，实验组肿瘤发生率与对照组无差异。

(4) 试验报告：在结果报告中，应写明所发现肿瘤的部位、数量、性质、癌前病变，其它毒性效应，以及剂量-反应关系及统计学分析结果。

5.1 消毒与灭菌方法

5.1.1 压力蒸汽灭菌

5.1.1.1 适用范围

用于耐高温、耐高湿的医疗器械和物品的灭菌。不能用于凡士林等油类和粉剂的灭菌。

5.1.1.2 压力蒸汽灭菌器

根据排放冷空气的方式和程度不同，分为下排气式压力蒸汽灭菌器和预真空压力蒸汽灭菌器两大类。

5.1.1.3 下排气式压力蒸汽灭菌器

(1) 灭菌原理：利用重力置换原理，使热蒸汽在灭菌器中从上而下，将冷空气由下排气孔排出，排出的冷空气由饱和蒸汽取代，利用蒸汽释放的潜热使物品达到灭菌。

(2) 灭菌方法

1) 手提式压力蒸汽灭菌器灭菌方法：

- ①在主体内加入适量的清水，将灭菌物品放入灭菌器内；
- ②将顶盖上的排气软管插入内壁的方管中，盖好并拧紧顶盖；
- ③将灭菌器的热源打开，开启排气阀排完空气后(约在水沸腾后 10min~15min)关闭排气阀；
- ④压力升至 102.9kPa (1.05kg/cm²)，温度达 121℃时，维持到规定时间(根据物品性质及有关情况确定，一般 20min~30min)；

⑤需要干燥的物品，打开排气阀，慢慢放汽，待压力恢复到零位后开盖取物；

⑥液体类物品，待压力恢复到零位，自然冷却到 60℃以下，再开盖取物。

2) 卧式压力蒸汽灭菌器灭菌方法：

- ①将待灭菌物品放入灭菌柜室内，关闭柜门并扣紧；
- ②打开进气阀，将蒸汽通入夹层预热；
- ③夹层压力达 102.9kPa (1.05kg/cm²)时，调整控制阀到“灭菌”位置，蒸汽通入灭菌室内，柜内冷空气和冷凝水经柜室阻气器自动排出；
- ④柜内压力达 102.9kPa (1.05kg/cm²)，温度达 121℃，维持 20min~30min；
- ⑤需要干燥的物品，灭菌后调整控制阀至“干燥”位置，蒸汽被抽出，柜室内呈负压，维持一定时间物品即达干燥要求。

⑥对液体类物品，应待自然冷却到 60℃以下，再开门取物，不得使用快速排出蒸汽法，以防突然减压，液体剧烈沸腾或容器爆炸。

5.1.1.4 预真空压力蒸汽灭菌器

(1) 灭菌原理：利用机械抽真空的方法，使灭菌柜室内形成负压，蒸汽得以迅速渗透到物品内部进行灭菌。蒸汽压力达 205.8kPa(2.1kg/cm²)，温度达 132℃或以上，开始灭菌，到达灭菌时间后，抽真空使灭菌物品迅速干燥。根据一次性或多次抽真空的不同，分为预真空和脉动真空二种，后者因多次抽真空，空气排除更彻底，效果更可靠。

(2) 灭菌方法

1) 预真空压力蒸汽灭菌方法：预真空压力蒸汽灭菌整个过程约需 30min。

- ①打开总气管开关，排尽供气管路内的冷凝水；
- ②将蒸汽通入夹层，使压力达 107.8kPa(1.1kg/cm²)，预热 4min；
- ③将待灭菌的物品放入灭菌柜内，关好柜门；
- ④启动真空泵，抽除柜室内空气使压力达 2.0 kPa~2.7 kPa；
- ⑤停止抽气，向柜室内输入饱和蒸汽，使柜内压力达 205.8 kPa(2.1kg/cm²)，温度达 132℃，维持灭菌时间 4min；
- ⑥停止输入蒸汽，再次抽真空使压力达 -8.0kPa，使灭菌物品迅速干燥；
- ⑦通入过滤后的洁净干燥空气，使灭菌室压力回复为零，温度降至 60℃以下，即可开门取出物品。

2) 脉动真空压力蒸汽灭菌方法：脉动预真空压力蒸汽灭菌整个过程需 29 min~36min。

- ①打开总气管开关，排尽供气管路内的冷凝水；
- ②将蒸汽通入夹层，使压力达 107.8kPa(1.1kg/cm²)，预热 4min；
- ③将待灭菌的物品放入灭菌柜内，关好柜门；
- ④启动真空泵，抽除柜室内空气使压力达 -8.0 kPa；
- ⑤停止抽气，向柜室内输入饱和蒸汽，使柜室内压力达 49kPa(0.5kg/cm²)，温度达 106℃~112℃，关闭蒸汽阀；
- ⑥抽气，再次输入蒸汽，再次抽气，如此反复 3 次~4 次；
- ⑦最后一次输入蒸汽，使压力达 205.8 kPa(2.1kg/cm²)，温度达 132℃，维持灭菌时间 4 min；
- ⑧停止输入蒸汽，抽气，当压力降到 -8.0kPa，打开进气阀，使空气经高效滤器进入柜室内，使内外压力平衡；
- ⑨重复上述抽气进气操作 2 次~3 次；
- ⑩待柜室内外压力平衡(恢复到零位)，温度降至 60℃以下，即可开门取出物品。

(3) 注意事项:灭菌设备应每日检查一次, 检查内容包括:

1) 检查门框与橡胶垫圈有无损坏、是否平整、门的锁扣是否灵活、有效;

2) 检查压力表在蒸汽排尽时是否到达零位;

3) 由柜室排气口倒入 500ml 水, 查有无阻塞;

4) 关好门, 通蒸汽检查是否存在泄漏;

5) 检查蒸汽调节阀是否灵活、准确、压力表与温度计所标示的状况是否吻合, 排气口温度计是否完好;

6) 检查安全阀是否在蒸汽压力达到规定的安全限度时被冲开;

7) 手提式和立式压力蒸汽灭菌器主体与顶盖必须无裂缝和变形; 无排气软管或软管锈蚀的手提式压力蒸汽灭菌器不得使用;

8) 卧式压力蒸汽灭菌器输入蒸汽的压力不宜过高, 夹层的温度不能高于灭菌室的温度;

9) 预真空和脉动真空压力蒸汽灭菌器每日进行一次 B-D(Bowie-Dick Test) 测试, 检测它们的空气排除效果。具体作法是: B-D 测试包由 100% 脱脂纯棉布折叠成长 30cm \pm 2cm、宽 25cm \pm 2cm、高 25cm~28cm 大小的布包裹; 将专门的 B-D 测试纸, 放入布测试包的中间; 测试包的重量为 4kg \pm 5% 或用一次性 B-D 测试包或 B-D PCD 装置。B-D 测试包水平放于灭菌柜内灭菌车的前底层, 靠近柜门与排气口底前方; 柜内除测试包外无任何物品; 134 $^{\circ}$ C, 3.5min~4min 后, 取出 B-D 测试纸观察颜色变化, 均匀一致变色, 说明冷空气排除效果良好, 灭菌锅可以使用; 反之, 则灭菌锅有冷空气残留, 需检查 B-D 测试失败原因, 进行保压测试, 直至 B-D 测试通过后该锅方能使用。

10) 下排气、预真空及脉动真空压力蒸汽灭菌器的具体操作步骤、常规保养和检查措施, 应按照厂方说明书的要求严格执行。

5.1.1.5 快速压力蒸汽灭菌器

快速压力蒸汽灭菌器可分为: 下排气, 预真空和正压排气法三种。其灭菌参数如时间和温度由灭菌器性质、灭菌物品材料性质(带孔和不带孔)、是否裸露而定(见表 5-1)。一般灭菌时要求灭菌物品裸露。为了加快灭菌速度, 快速灭菌法的灭菌周期一般不包括干燥阶段, 因此灭菌完毕, 灭菌物品往往是湿的; 为了避免污染, 不管是否包裹, 取出的物品应尽快使用, 不能储存, 无有效期。

表 5-1 快速压力蒸汽灭菌(132℃)所需最短时间*

物品种类	灭菌时间(min)		
	下排气	预真空	正压排气法
不带孔物品	3	3	3
带孔物品	10	4	3
不带孔+带孔物品	10	4	3

* 灭菌物品裸露

5.1.1.6 灭菌前物品的准备

(1) 清洗：灭菌前应将物品彻底清洗干净，物品洗涤后，应干燥并及时包装。

(2) 包装

1) 包装材料应允许物品内部空气的排出和蒸汽的透入。市售普通铝饭盒与搪瓷盒，不得用于装放待灭菌的物品，应用自动启闭式或带通气孔的器具装放；

2) 常用的包装材料包括全棉布；一次性无纺布；一次性皱纹纸；一次性复合材料(如纸塑包装)；灭菌容器；带孔的金属或玻璃容器等。对于一次性无纺布、灭菌容器；一次性复合材料必须经国家卫生行政部门批准后方可使用。新包装材料在使用前，应先用生物指示物验证灭菌效果后方可使用。包装材料使用前应放在温度 18℃~22℃，相对湿度 35%~70% 条件下放置 2h，仔细检查有无残缺破损；

3) 布包装层数不少于两层。用下排气式压力蒸汽灭菌器的敷料包，体积不得超过 30cm×30cm×25cm；用于预真空和脉动真空压力蒸汽灭菌器的敷料包，体积不得超过 30cm×30cm×50cm。敷料包不超过 5 kg，金属包的重量不超过 7 kg；

4) 新棉布应洗涤去浆后再使用；反复使用的包装材料和灭菌容器，应经清洗后才可再次使用；

5) 盘、盆、碗等器皿类物品，尽量单个包装；包装时应将盖打开；若必须多个包装在一起时，所用器皿的开口应朝向一个方向；摆放时，器皿间用吸湿毛巾或纱布隔开，以利蒸汽渗入；

6) 灭菌物品能拆卸的必须拆卸如对注射器进行包装时，管芯应抽出。必须暴露物品的各个表面(如剪刀和血管钳必须充分撑开)以利灭菌因子接触所有物体表面。有筛孔的容器，应将盖打开，开口向下或侧放。管腔类物品如导管、针和管腔内部先用蒸馏水或去离子水润湿，然后立即灭菌；

7) 物品捆扎不宜过紧, 外用化学指示胶带贴封, 灭菌包每大包内和难消毒部位的包内放置化学指示物。

(3) 装载

1) 下排气灭菌器的装载量不得超过柜室内容量的 80%; 预真空灭菌器的装载量不得超过柜室容积 90%, 同时预真空和脉动真空压力蒸汽灭菌器的装载量又分别不得小于柜室容积的 10%和 5%, 以防止“小装量效应“, 残留空气影响灭菌效果;

2) 应尽量将同类物品放在一起灭菌, 若必须将不同类物品装放在一起, 则以最难达到灭菌物品所需的温度和时间为准;

3) 物品装放时, 上下左右相互间均应间隔一定距离以利蒸汽置换空气; 大型灭菌器, 物品应放于柜室或推车上的铁丝网搁架上; 无搁架的中小型灭菌器, 可将物品放于铁丝篮中;

4) 难于灭菌的大包放在上层, 较易灭菌的小包放在下层; 金属物品放下层, 织物包放上层, 物品装放不能贴靠门和四壁, 以防吸入较多的冷凝水;

5) 金属包应平放, 盘、碟、碗等应处于竖立的位置; 纤维织物应使折叠的方向与水平面成垂直状态; 玻璃瓶等应开口向下或侧放以利蒸汽进入和空气排出;

6) 启闭式筛孔容器, 应将筛孔的盖打开。

(4) 灭菌处理

1) 蒸汽的质量要求。必须安装汽水分离器, 灭菌过程中蒸汽的饱和度合格;

2) 灭菌操作程序应按压力蒸汽灭菌器生产厂家的操作使用说明书的规定进行;

3) 灭菌循环参数见表 5-2。

4) 灭菌物品需冷却后再从搁架上取下。

表 5-2 压力蒸汽灭菌所需时间

物品种类	灭菌时间 (min)		
	121℃下排气	132℃预真空	132℃脉动真空
硬物(裸露)	15	4	4
硬物(包裹)	20	4	4
织物包	30	4	4

5.1.1.7 灭菌后处理

- (1) 检查包装的完整性, 若有破损不可作为无菌包使用;
- (2) 湿包和有明显水渍的包不作为无菌包使用; 启闭式容器, 检查筛孔是否已关闭;
- (3) 检查化学指示胶带变色情况, 未达到或有可疑点者, 不可作为无菌包发放至科室使用; 开包使用前应检查包内指示卡是否达到已灭菌的色泽或状态, 未达到或有疑点者, 不可作为无菌包使用;
- (4) 灭菌包掉落在地, 或误放不洁之处或沾有水液, 均应视为受到污染, 不可作为无菌包使用;
- (5) 已灭菌的物品, 不得与未灭菌物品混放;
- (6) 合格的灭菌物品, 应标明灭菌日期, 合格标志;
- (7) 每批灭菌处理完成后, 应按流水号登册, 记录灭菌物品包的种类、数量、灭菌温度、作用时间和灭菌日期与操作者等。有温度, 时间记录装置的, 应将记录纸归档备查;
- (8) 运送无菌物品的工具应每日清洗并保持清洁干燥; 当怀疑或发现有污染可能时, 应立即进行清洗消毒; 物品顺序摆放, 并加防尘罩, 以防再污染;
- (9) 灭菌后的物品, 应放入洁净区的柜橱(或架子上, 推车内); 柜橱或架子应由不易吸潮、表面光洁的材料制成, 表面再涂以不易剥蚀脱落的涂料, 使之易于清洁和消毒; 灭菌物品应放于离地高 20cm~25cm, 离天花板 50cm, 离墙远于 5cm 处的搁物架上, 顺序排放, 分类放置, 并加盖防尘罩; 灭菌物品储存在密闭柜橱并有清洁与消毒措施, 专室专用, 专人负责, 限制无关人员出入;
- (10) 储存的有效期受包装材料、封口的严密性、灭菌条件、储存环境等诸多因素影响; 对于棉布包装材料和开启式容器, 一般建议, 温度 25℃ 以下 10d~14d, 潮湿多雨季节应缩短天数; 对于其它包装材料如一次性无纺布、一次性纸塑包装材料, 如证实该包装材料能阻挡微生物渗入, 其有效期可相应延长, 至少为半年以上。

5.1.2 干热灭菌

5.1.2.1 适用范围

用于高温下不损坏、不变质、不蒸发物品的灭菌; 用于不耐湿热的器械的灭菌; 用于蒸汽或气体不能穿透物品的灭菌, 如玻璃、油脂、粉剂和金属等制品的消毒灭菌。

5.1.2.2 灭菌方法

- (1) 烧灼: 用于耐高温物品、小件金属器械的灭菌。
- (2) 干烤: 用干热灭菌箱进行灭菌, 灭菌条件为: 160℃, 2h ; 或者 170℃, 1h; 或者 180℃,

30min。多采用机械对流型烤箱。

(3) 注意事项：待灭菌的物品干热灭菌前应洗净，防止造成灭菌失败或污物炭化；玻璃器皿灭菌前应洗净并干燥；灭菌时勿与烤箱底部及四壁接触，灭菌后要待温度降到 40℃ 以下再开箱，以防止炸裂。

物品包装不能过大，不超过 10 cm×10 cm×20 cm，物品不能超过烤箱高度的 2/3，物品间应留有充分的空间（可放入一只手），油剂、粉剂的厚度不得超过 0.635 cm；凡士林纱布条厚度不得超过 1.3 cm。

温度高于 170℃ 时，有机物会碳化，故有机物品灭菌时，温度不可过高。

5.1.3 低温蒸汽甲醛气体消毒

甲醛是一种灭菌剂，对所有的微生物都有杀灭作用，包括细菌繁殖体、芽孢、真菌和病毒。甲醛气体灭菌效果可靠，使用方便，对消毒、灭菌物品无损害。

5.1.3.1 适用范围

可用于对湿、热敏感、易腐蚀的医疗用品的灭菌。

5.1.3.2 使用方法

医院中常用的甲醛消毒剂有福尔马林和多聚甲醛两种。甲醛气体可通过加热福尔马林或多聚甲醛获得，也可采用甲醛消毒液雾化法得到。

使用甲醛消毒、灭菌，必须在甲醛消毒、灭菌箱中进行，消毒灭菌箱必须有良好的甲醛定量加入和气化装置。甲醛消毒或灭菌箱必须有可靠的密闭性能，消毒、灭菌过程中，不得有甲醛气体漏出。具体操作应按照生产厂家的操作使用说明书的规定执行。

5.1.3.3 注意事项

- (1) 用甲醛消毒箱消毒物品时，不可用自然挥发法。
- (2) 消毒箱内温度和湿度对消毒效果影响较大，消毒时应严格控制在规定范围。
- (3) 被消毒物品应摊开放置，中间应留有一定空隙，污染表面应尽量暴露，以便甲醛气体有效地与之接触。
- (4) 消毒后，一定要去除残留甲醛气体，用抽气通风或用氨水中和法。
- (5) 甲醛有致癌作用，不宜用于室内空气消毒。

5.1.4 环氧乙烷气体灭菌

环氧乙烷又名氧化乙烯，在低温下为无色液体，具有芳香醚味，沸点为 10.8℃，嗅阈值为 760 mg/m³~1064mg/m³，密度为 1.52；环氧乙烷易燃易爆，其最低燃烧浓度为 3%。环氧乙烷气体穿透力强。

环氧乙烷气体杀菌力强、杀菌谱广，可杀灭各种微生物包括细菌芽孢，属灭菌剂。

5.1.4.1 适用范围

环氧乙烷不损害被灭菌的物品，且穿透力很强，故多数不宜用一般方法灭菌的物品均可用环氧乙烷消毒和灭菌。例如，电子仪器、光学仪器、医疗器械、书籍、文件、皮毛、棉、化纤、塑料制品、木制品、陶瓷及金属制品、内镜和一次性使用的诊疗用品等。环氧乙烷是目前主要的低温灭菌方法之一。

5.1.4.2 使用条件

影响环氧乙烷气体灭菌的因素很多，只有严格控制有关因素，才能达到灭菌效果。

5.1.4.3 使用方法

由于环氧乙烷易燃、易爆，且对人有毒，所以必须在密闭的环氧乙烷灭菌器内进行。

(1) 环氧乙烷灭菌器及其应用：

1) 目前使用的环氧乙烷灭菌器种类很多，大型的容器有数十立方米，中等的有 $1\text{m}^3\sim 10\text{m}^3$ ，小型的有零点几至 1m^3 。它们各有不同的用途。

2) 大型环氧乙烷灭菌器：一般用于处理大量物品的灭菌，用药量为 $0.8\text{kg}/\text{m}^3\sim 1.2\text{kg}/\text{m}^3$ ，在 $55^\circ\text{C}\sim 60^\circ\text{C}$ 下作用 6h。

3) 中型环氧乙烷灭菌器：一般用于一次性使用诊疗用品的灭菌。这种灭菌设备完善，自动化程度高，可用纯环氧乙烷或环氧乙烷和二氧化碳混合气体。一般要求灭菌条件为：浓度， $800\text{mg}/\text{L}\sim 1000\text{mg}/\text{L}$ ，温度， $55^\circ\text{C}\sim 60^\circ\text{C}$ ，相对湿度 $60\%\sim 80\%$ ，作用时间 6 h。灭菌物品常用可透过环氧乙烷的塑料薄膜密闭包装。如果在小包装上带有可过滤空气的滤膜，则灭菌效果更好。

4) 小型环氧乙烷灭菌器：多用于医疗卫生部门处理少量医疗器械和用品，目前有 100%纯环氧乙烷或环氧乙烷和二氧化碳混合气体。这类灭菌器自动化程度比较高，可自动抽真空，自动加药，自动调节温度和相对湿度，可自动控制灭菌时间。

5) 对中型和小型环氧乙烷灭菌器的要求：有较好的耐压性能和密闭性能，应能承受 1.25 倍工作压力水压试验，无变性和渗漏，可以抽真空度至 53.3 kPa 以上；加药量准确，保温性能好，可以调节消毒器内的温度和相对湿度；消毒后用外环境空气冲洗时，输入的空气经过高效过滤器，可滤除 $\geq 0.3\mu\text{m}$ 粒子的 99.6% 以上；排出的残余环氧乙烷经无害化处理，灭菌物品中残留环氧乙烷应 $\leq 10\mu\text{g}/\text{g}$ ；灭菌环境中环氧乙烷的浓度应低于 $2\text{mg}/\text{m}^3$ 。

(2) 灭菌前物品准备与包装：需灭菌的物品必须彻底清洗干净，注意不能用生理盐水清洗，灭菌物品上不能有水滴或水份太多，以免造成环氧乙烷稀释和水解。环氧乙烷几乎可用于所有医疗用品的灭菌，但不适用于食品、液体、油脂类、滑石粉和动物饲料等的灭菌。适合于环氧乙烷

灭菌的包装材料有纸、复合透析纸、布、无纺布、通气型硬质容器、聚乙烯等；不能用于环氧乙烷灭菌的包装材料有金属箔、聚氯乙烯、玻璃纸、尼龙、聚酯、聚偏二氯乙烯、不能通透的聚丙烯。改变包装材料应作验证，以保证被灭菌物品灭菌的可靠性。

(3) 灭菌物品装载：灭菌柜内装载物品上下左右均应有空隙(灭菌物品不能接触柜壁)，物品应放于金属网状篮筐内或金属网架上；物品装载量不应超过柜内总体积的 80%。

(4) 灭菌处理：应按照环氧乙烷灭菌器生产厂家的操作使用说明书的规定执行；根据灭菌物品种类、包装、装载量与方式不同，选择合适的灭菌参数。

1) 浓度、温度和灭菌时间的关系：在一定范围内，温度升高、浓度增加，可使灭菌时间缩短。在使用环氧乙烷灭菌时必须合理选择温度、浓度和时间参数。

2) 控制灭菌环境的相对湿度和物品的含水量：细菌本身含水量和灭菌物品含水量，对环氧乙烷的灭菌效果均有显著影响。一般情况下，以相对湿度在 60%~80% 为最好。含水量太少，影响环氧乙烷的渗透和环氧乙烷的烷基化作用，降低其杀菌能力；含水量太多，环氧乙烷被稀释和水解，也影响灭菌效果。为了达到理想的湿度水平，第一步是灭菌物必须先预湿，一般要求灭菌物放在 50%相对湿度的环境条件下至少 2h 以上；第二步可用加湿装置保证柜室内理想的湿度水平。

3) 注意菌体外保护物对灭菌效果的影响：菌体表面含有的有机物越多，越难杀灭；有机物不仅可影响环氧乙烷的穿透，而且可消耗部分环氧乙烷。在无机盐或有机晶体中的微生物，用环氧乙烷难以杀灭。因此进行环氧乙烷灭菌前，必须将物品上有机和无机污物充分清洗干净，以保证灭菌成功。

4) 灭菌程序：

①环氧乙烷灭菌程序需包括预热、预湿、抽真空、通入气化环氧乙烷达到预定浓度、维持灭菌时间、清除灭菌柜内环氧乙烷气体、解析以去除灭菌物品内环氧乙烷的残留。

②环氧乙烷灭菌时可采用 100%纯环氧乙烷或环氧乙烷和二氧化碳混合气体。禁止使用环氧乙烷与氟利昂的混合气体。

③解析可以在环氧乙烷灭菌柜内继续进行，也可以放入专门的通风柜内，不应采用自然通风法。反复输入的空气应经过高效过滤，可滤除 $\geq 0.3\mu\text{m}$ 粒子 99.6%以上。

④环氧乙烷残留主要是指环氧乙烷灭菌后留在物品和包装材料内的环氧乙烷和它的两个副产品氯乙醇乙烷和乙二醇乙烷；接触过量环氧乙烷残留可引起病人灼伤和刺激。环氧乙烷残留的多少与灭菌物品材料、灭菌的参数、包装材料和包装大小、装载量、解析参数等有关。聚氯乙烯导管在 60℃时，解析 8h；50℃时，解析 12h。有些材料可缩短解析时间，如金属和玻璃可立即

使用，有些材料需延长解析时间如内置起搏器。灭菌物品中残留环氧乙烷应 $\leq 10\mu\text{g/g}$ ；灭菌环境中环氧乙烷的浓度应低于 2mg/m^3 。

5) 环氧乙烷排放：医院环氧乙烷排放首选大气，安装时要求：必须有专门的排气管道系统，排气管材料必须为环氧乙烷不能通透如铜管等；距排气口 7.6m 范围内不得有任何易燃物和建筑物的入风口如门或窗；若排气管的垂直部分长度超过 3m 时必须加装集水器，勿使排气管有凹陷或回圈造成水气聚积或冬季时结冰，阻塞管道；排气管应导至室外，并于出口处反转向下，以防止水气留在管壁或造成管壁阻塞；必须请专业的安装工程师，并结合环氧乙烷灭菌器生产厂商的要求进行安装。如环氧乙烷向水中排放，整个排放系统(管道，水槽等)必须密封，否则大量带热的环氧乙烷会由水中溢出，污染周围的工作环境。

5.1.4.4 注意事项

(1) 环氧乙烷灭菌器的安装要求：环氧乙烷灭菌器必须安放在通风良好的地方，切勿将它置于接近火源的地方。为方便维修及定期保养，环氧乙烷灭菌器各侧(包括上方)应预留 51cm 空间。应安装专门的排气管道，且与大楼其它排气管道完全隔离。

(2) 环氧乙烷安全防护原则及注意事项：

1) 保证环氧乙烷灭菌器及气瓶或气罐远离火源和静电。

2) 环氧乙烷存放处，应无火源，无转动之马达，无日晒，通风好，温度低于 40°C ，但不能将其放冰箱内。严格按照国家制定的有关易燃易爆物品储存要求进行处理。

3) 投药及开瓶时不能用力太猛，以免药液喷出。

4) 每半年对灭菌物品环氧乙烷残留量监测并记录；每年对环氧乙烷工作环境进行空气浓度的监测并记录。

5) 应对环氧乙烷工作人员进行专业知识和紧急事故处理的培训。过度接触环氧乙烷后，迅速将患者移离中毒现场，立即吸入新鲜空气；皮肤接触后，用水冲洗接触处至少 15min，同时脱去脏衣服；眼接触液态环氧乙烷或高浓度环氧乙烷气体至少冲洗眼 10min，遇前述情况，均应尽快就诊。

6) 按照生产厂商要求定期对环氧乙烷灭菌设备进行清洁、维修和调试。

7) 环氧乙烷遇水后可形成有毒的乙二醇，故不可用于食品的灭菌。

5.1.5 紫外线消毒

5.1.5.1 适用范围

用于室内空气、物体表面、水及其它液体的消毒。

5.1.5.2 紫外线消毒灯和紫外线消毒器

(1) 消毒使用的紫外线是C波紫外线，其波长范围是 200nm~275nm，杀菌作用最强的波段是 250nm~270nm，消毒用的紫外线光源必须能够产生辐照值达到国家标准的杀菌紫外线灯。

(2) 制备紫外线消毒灯，应采用等级品的石英玻璃管，以期得到满意的紫外线辐照强度。(3) 紫外线消毒灯可以配用对紫外线反射系数高的材料如抛光铝板制成的反射罩。

(4) 要求用于消毒的紫外线灯在电压为 220V、环境相对湿度为 60%、温度为 20℃时，辐射的 253.7nm 紫外线强度(使用中的强度)不得低于 $70\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ，测定的距离：普通 30W 直管紫外线灯在距灯管 1 m 处测定，特殊紫外线灯在使用距离处测定；使用的紫外线测强仪必须经过标定，且在有效期内；使用的紫外线强度监测指示卡，应取得卫生许可批件，并在有效期内使用。

(5) 紫外线灯使用过程中其辐照强度逐渐降低，故应定期测定消毒紫外线的强度，一旦降到要求的强度以下时，应及时更换。

(6) 紫外线消毒灯的使用寿命，即由新灯的强度降低到 $70\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 的时间(功率 $\geq 30\text{W}$)，或降低到原来新灯强度的 70% (功率 $< 30\text{W}$) 的时间，应不低于 1000h。紫外线灯生产单位应提供实际使用寿命。

(7) 目前我国使用的紫外线消毒灯有下述几种：

1) 普通直管热阴极低压汞紫外线消毒灯：灯管采用石英玻璃或其它对紫外线透过率高的玻璃制成，功率为 40W、30W、20W、15W 等。要求出厂新灯辐射 253.7nm 紫外线的强度(在距离 1m 处测定，不加反光罩)为：功率 $> 30\text{W}$ 灯， $\geq 90\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ；功率 $> 20\text{W}$ 灯， $\geq 60\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ；功率 15W 灯， $\geq 20\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 。由于这种灯在辐射 253.7nm 紫外线的同时，也辐射一部分 184.9nm 紫外线，故可产生臭氧。

2) 高强度紫外线消毒灯：要求辐射 253.7nm 紫外线的强度(在距离 1m 处测定)为：功率 30W 灯， $> 170\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ；11W 灯， $> 40\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 。

3) 低臭氧紫外线消毒灯：热阴极低压汞灯，可为直管型或H型，由于采用了特殊工艺和灯管材料，故臭氧产量很低，要求臭氧产量 $< 1\text{mg}/\text{h}$ 。

4) 高臭氧紫外线消毒灯：由于采取了特殊工艺，这种灯产生较大比例的波长 184.9nm 的紫外线，故臭氧产量较大。

(8) 紫外线消毒器：

1) 紫外线空气消毒器：采用低臭氧紫外线杀菌灯制造，可用于有人条件下的室内空气消毒。

2) 紫外线表面消毒器：采用低臭氧高强度紫外线杀菌灯制造，以使其能快速达到满意的消毒效果。

3) 紫外线消毒箱：采用高臭氧高强度紫外线杀菌灯或直管高臭氧紫外线灯制造，利用紫外

线和臭氧的协同杀菌作用，同时利用臭氧对紫外线照射不到的部位进行消毒。

5.1.5.3 适用范围及条件

(1) 紫外线可以杀灭各种微生物，包括细菌繁殖体、芽孢、分枝杆菌、病毒、真菌、立克次体和支原体等，凡被上述微生物污染的表面、水和空气均可采用紫外线消毒。

(2) 紫外线辐照能量低，穿透力弱，仅能杀灭直接照射到的微生物，因此消毒时必须使消毒部位充分暴露于紫外线。

(3) 用紫外线消毒纸张、织物等粗糙表面时，要适当延长照射时间，且两面均应受到照射。

(4) 紫外线消毒的适宜温度范围是 20℃~40℃，温度过高过低均会影响消毒效果，可适当延长消毒时间；用于空气消毒时，消毒环境的相对湿度低于 80% 为好，否则应适当延长照射时间。

(5) 用紫外线杀灭被有机物保护的微生物时，应加大照射剂量。空气和水中的悬浮粒子也可影响消毒效果。

5.1.5.4 使用方法

(1) 对物品表面的消毒：

1) 照射方式：最好使用便携式紫外线消毒器近距离移动照射，也可采取紫外灯悬吊式照射，对小件物品可放紫外线消毒箱内照射。

2) 照射剂量和时间：不同种类的微生物对紫外线的敏感性不同，用紫外线消毒时必须使用照射剂量达到杀灭目标微生物所需的照射剂量。

杀灭一般细菌繁殖体时，应使照射剂量达到 $10\ 000\mu\text{W}\cdot\text{s}/\text{cm}^2$ ；杀灭细菌芽孢时应达到 $100\ 000\mu\text{W}\cdot\text{s}/\text{cm}^2$ ；病毒对紫外线的抵抗力介于细菌繁殖体和芽孢之间；真菌孢子的抵抗力比细菌芽孢更强，有时需要照射到 $600\ 000\mu\text{W}\cdot\text{s}/\text{cm}^2$ ，但一般致病性真菌对紫外线的抵抗力比细菌芽孢弱；在消毒的目标微生物不详时，照射剂量不应低于 $100\ 000\mu\text{W}\cdot\text{s}/\text{cm}^2$ 。辐照剂量是所用紫外线灯在照射物品表面处的辐照强度和照射时间的乘积。因此，根据紫外线光源的辐照强度，可以计算出需要照射的时间。例如，用辐照强度为 $70\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 的紫外线表面消毒器近距离照射物品表面，选择的辐照剂量是 $100\ 000\mu\text{W}\cdot\text{s}/\text{cm}^2$ ，则需照射的时间是：

$$100\ 000\mu\text{W}\cdot\text{s}/\text{cm}^2 \div 70\mu\text{W}/\text{cm}^2 = 1429\text{s} \div 60\text{s} \cong 24\text{min}。$$

(2) 对室内空气的消毒：

1) 间接照射法：首选高强度紫外线空气消毒器，不仅消毒效果可靠，而且可在室内有人活动时使用，一般开机消毒 30min 即可达到消毒合格。

2) 直接照射法：在室内无人条件下，可采取紫外线灯悬吊式或移动式直接照射。采用室内悬吊式紫外线消毒时，室内安装紫外线消毒灯（30W 紫外灯，在 1.0m 处的强度 $>70\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ）

的数量为平均每 m^3 不少于 1.5W，照射时间不少于 30min。

(3) 对水和其他液体的消毒：可采用水内照射或水外照射，采用水内照射法时，紫外光源应装有石英玻璃保护罩，无论采取何种方法，水层厚度均应小于 2cm，根据紫外光源的强度确定水流速度，消毒后水必须达到国家规定标准。

5.1.5.5 注意事项

(1) 在使用过程中，应保持紫外线灯表面的清洁，一般每两周用酒精棉球擦拭一次，发现灯管表面有灰尘、油污时，应随时擦拭。

(2) 用紫外线灯消毒室内空气时，房间内应保持清洁干燥，减少尘埃和水雾，温度低于 20°C 或高于 40°C ，相对湿度大于 60% 时应适当延长照射时间。

(3) 用紫外线消毒物品表面时，应使照射表面受到紫外线的直接照射，且应达到足够的照射剂量。

(4) 不得使紫外线光源照射到人，以免引起损伤。

(5) 紫外线强度计至少一年标定一次。

5.1.6 臭氧

臭氧在常温下为强氧化性气体，其密度为 1.68 (空气为 1)。臭氧在水中的溶解度较低 (3%)。臭氧稳定性极差，在常温下可自行分解为氧。所以臭氧不能瓶装贮备，只能现场生产，立即使用。

5.1.6.1 适用范围

臭氧是一种广谱杀菌剂，可杀灭细菌繁殖体和芽胞、病毒、真菌等，并可破坏肉毒杆菌毒素。在医院消毒方面，臭氧的用途主要有以下几种。

(1) 水的消毒：医院污水和诊疗用水的消毒。

(2) 物品表面消毒：饮食用具、理发工具、食品加工用具、衣物等放密闭箱内消毒。

(3) 空气消毒：用于无人的情况下，室内空气的消毒。

5.1.6.2 使用方法

(1) 诊疗用水消毒：一般加臭氧量 $0.5\text{ mg/L}\sim 1.5\text{mg/L}$ ，水中保持剩余臭氧浓度 $0.1\text{ mg/L}\sim 0.5\text{mg/L}$ ，维持 5min~10min。对于质量较差的水，加臭氧量应在 $3\text{ mg/L}\sim 6\text{mg/L}$ 。

(2) 医院污水处理：用臭氧处理污水的工艺流程：污水先进入一级沉淀池，净化后进入二级净化池，处理后进入调节储水池，通过污水泵抽入接触塔，在塔内与臭氧充分接触 10 min~15min 后排放。

一般 300 张床位的医院，建一个污水处理能力 $18\text{t/h}\sim 20\text{t/h}$ 的臭氧处理系统，采用 $15\text{ mg/L}\sim 20\text{mg/L}$ 臭氧投入量，作用 10min~15min，处理后的污水清亮透明，无臭味，细菌总数

和大肠菌数均可符合国家污水排放标准。

(3) 医院游泳池水的处理：臭氧消毒游泳池水的优点：杀菌力强，速度快，对肠道菌和病毒均有杀灭作用；对游泳池设施不造成腐蚀和毁坏；能改善水质，脱色、除臭，处理后的水晶莹清澈；对游泳者无刺激性。缺点：臭氧在水中分解快，消毒作用持续时间短，不能清除持续污染。

一般来说，臭氧的投入量为 1 mg/L~1.7mg/L，接触时间 1min~2min，即可获得理想的消毒效果，水质也会有明显的改善，用于游泳池循环水处理，投入臭氧量为 2mg/L。

(4) 空气消毒：臭氧对空气中的微生物有明显的杀灭作用，采用 20mg/m³ 浓度的臭氧，作用 30min，对自然菌的杀灭率达到 90% 以上。

用臭氧消毒空气，必须是在封闭空间，且室内无人条件下进行，消毒后至少过 30min 才能进入。可用于病房等场所的空气消毒。

5.1.6.3 注意事项

(1) 臭氧对人有毒，国家规定大气中允许浓度为 0.2mg/m³。

(2) 臭氧为强氧化剂，对多种物品有损坏，浓度越高对物品损害越重，可使铜片出现绿色锈斑、橡胶老化，变色，弹性降低，以致变脆、断裂，使织物漂白褪色等，使用时应注意。

(3) 多种因素可影响臭氧的杀菌作用，包括温度、相对湿度、有机物、pH、水的浑浊度、水的色度等，使用时应加以控制。

5.1.7 液体化学消毒剂使用规范

5.1.7.1 戊二醛

(1) 概述：戊二醛属灭菌剂，具有广谱、高效杀菌作用。对金属腐蚀性小，受有机物影响小等特点。经典的戊二醛常用灭菌浓度为 2%。增效的复方戊二醛也可使用卫生行政机构批准使用的浓度。

(2) 适用范围：适用于不耐热的医疗器械和精密仪器等消毒与灭菌。

(3) 使用方法：

1) 灭菌处理：常用浸泡法。将清洗、干燥待灭菌处理的医疗器械及物品浸没于装有戊二醛的容器中，加盖，浸泡 10h 后，无菌操作取出，用无菌水冲洗干净，无菌方法擦干。

2) 消毒：用浸泡法，将清洗、干燥待消毒处理医疗器械及物品浸没于装有戊二醛的容器中，加盖，一般 20min~45min，取出后用无菌水冲洗干净，无菌方法擦干。

(4) 注意事项：

1) 戊二醛对手术刀片等碳钢制品有腐蚀性，使用前应先加入 0.5% 亚硝酸钠防锈。

2) 使用过程中应对戊二醛浓度进行监测。

3) 戊二醛对皮肤、粘膜有刺激性，接触戊二醛溶液时应戴橡胶手套，防止溅入眼内或吸入体内。

4) 盛装戊二醛消毒液的容器应加盖，放于通风良好处。

5.1.7.2 过氧乙酸

(1) 概述：过氧乙酸属灭菌剂，具有广谱、高效、低毒、对金属及织物有腐蚀性，受有机物影响大，稳定性差等特点。其浓度为 16%~20%(W/V)。

(2) 适用范围：适用于耐腐蚀物品、环境等的消毒与灭菌。

(3) 使用方法

1) 消毒液配制：对二元包装的过氧乙酸，使用前按产品使用说明书要求将 A、B 两液混合净置至规定时间。根据有效成份含量按稀释定律用灭菌蒸馏水将过氧乙酸稀释成所需浓度。具体步骤是：

- ① 测定过氧乙酸原液的有效含量 (C)；
- ② 确定欲配制过氧乙酸使用液的浓度(C')和 ml 数(V')；
- ③ 计算所需过氧乙酸原液的 ml 数(V), $V=(V' \times C')/C$ ；
- ④ 计算所需灭菌蒸馏水的 ml 数(X), $X=V' -V$ ；
- ⑤ 取过氧乙酸原液 V ml，加入灭菌蒸馏水 X ml 后混匀。

2) 消毒处理：常用消毒方法有浸泡、擦拭、喷洒等。

① 浸泡法：将待消毒的物品放入装有过氧乙酸的容器中，加盖。对一般污染物品的消毒，用 0.05% (500mg/L)过氧乙酸溶液浸泡；对细菌芽孢污染物品的消毒用 1% (10000mg/L) 过氧乙酸浸泡 5min，灭菌时，浸泡 30min。取出，诊疗器材用灭菌蒸馏水冲洗干净、无菌方法擦干。

② 擦拭法：对大件物品或其它不能用浸泡法消毒的物品用擦拭法消毒。消毒所有药物浓度和作用时间参加浸泡法。

③ 喷洒法：对一般污染表面的消毒用 0.2%~0.4% (2000 mg/L~4000mg/L) 过氧乙酸喷洒作用 30 min~60min。

(4) 注意事项：

1) 过氧乙酸不稳定，应贮存于通风阴凉处，用前应测定有效含量，原液浓度低于 12% 时禁止使用。

2) 稀释液不稳定，临用前配制。

3) 配制溶液时，忌与碱或有机物相混合。

4) 过氧乙酸对金属有腐蚀性，对织物有漂白作用。金属制品与织物经浸泡消毒后，即时用

清水冲洗干净。

- 5) 使用浓溶液时，谨防溅入眼内或皮肤粘膜上，一旦溅上，即时用清水冲洗。
- 6) 消毒被血液、脓液等污染的物品时，需适当延长作用时间。

5.1.7.3 过氧化氢

(1) 概述：过氧化氢属高效消毒剂，具有广谱、高效、速效、无毒、对金属及织物有腐蚀性，受有机物影响很大，纯品稳定性好，稀释液不稳定等特点。

(2) 适用范围：适用于丙烯酸树脂制成的外科埋植物，隐形眼镜、不耐热的塑料制品、餐具、服装、饮水和空气等消毒和口腔含漱、外科伤口清洗。

(3) 使用方法

1) 消毒液配制：根据有效含量按稀释定律用灭菌水将过氧化氢稀释成所需浓度。具体步骤按 3.1.7.2 (3) 1) 进行。

2) 消毒处理：常用消毒方法有浸泡、擦拭等。

① 浸泡法：将清洗、干燥的待消毒物品浸没于装有 3% 过氧化氢的容器中，加盖，浸泡 30 min。

② 擦拭法：对大件物品或其它不能用浸泡法消毒的物品用擦拭法消毒。所用药物浓度和作用时间参见浸泡法。

③ 其它方法：用 1.0%~1.5% 过氧化氢嗽口；用 3% 过氧化氢冲洗伤口；复方过氧化氢空气消毒剂喷雾等。

(4) 注意事项

- 1) 过氧化氢应贮存于通风阴凉处，用前应测定有效含量。
- 2) 稀释液不稳定，临用前配制。
- 3) 配制溶液时，忌与还原剂、碱、碘化物、高锰酸钾等强氧化剂相混合。
- 4) 过氧化氢对金属有腐蚀性，对织物有漂白作用。
- 5) 使用浓溶液时，谨防溅入眼内或皮肤粘膜上，一旦溅上，即时用清水冲洗。
- 6) 消毒被血液、脓液等污染的物品时，需适当延长作用时间。

5.1.7.4 二溴二甲基乙内酰胺（二溴海因）

(1) 概述：二溴海因是一种释放有效溴的消毒剂，可杀灭各种微生物，包括细菌繁殖体、芽孢、真菌和病毒。属高效、广谱消毒剂。

(2) 适用范围：可用于饮水、污水和游泳池水消毒、医疗卫生单位环境物体和诊疗用品消毒，餐具、茶具、水果、蔬菜消毒等。

(3) 使用方法

1) 消毒液的配制: 加有助溶剂的国产二溴海因消毒剂, 有效溴含量 50%, 易溶于水, 使用时可用去离子水配成消毒液, 或将浓的二溴海因消毒液用去离子水配成所需浓度的消毒液。采用浸泡、擦拭或喷洒法消毒。

2) 浸泡法: 将洗净的待消毒物品浸没于消毒液内, 加盖, 作用至预定时间后取出。对一般污染物品, 用 250mg/L~500mg/L 二溴海因, 作用 30min, 对致病性芽孢菌污染物品, 用 1000mg/L~2000mg/L 浓度, 作用 30min。

3) 擦拭法: 对大件不能用浸泡法消毒的物品, 可用擦拭法。消毒液浓度和作用时间参见浸泡法。

4) 喷洒法: 对一般物品表面, 用 500mg/L~1000mg/L 二溴海因, 均匀喷洒, 作用 30min; 对致病性芽孢和结核分枝杆菌污染的物品, 用 1000mg/L~2000mg/L 浓度消毒液喷洒, 作用 60min。

5) 对水的消毒: 消毒剂用去离子水溶解后, 倒入消毒水中, 用量为 5mg/L~10mg/L, 视水质污染情况而定。用作游泳池水消毒和污水消毒时, 应视水质决定用量和作用时间。

(4) 注意事项

- 1) 消毒剂应于阴凉、干燥处密封保存。
- 2) 消毒液现用现配, 并在有效期内用完。
- 3) 用于金属制品消毒时, 可适当加入防锈剂亚硝酸钠。
- 4) 对餐具果蔬消毒后, 应用净水冲洗。

5.1.7.5 二氧化氯

(1) 概述: 二氧化氯属高效消毒剂, 具有广谱、高效、速效杀菌作用。对金属有腐蚀性, 对织物有漂白作用, 消毒效果受有机物影响很大的特点, 二氧化氯活化液和稀释液不稳定。

(2) 适用范围: 适用于医疗卫生、食品加工、餐(饮)具、饮水及环境表面等消毒。

(3) 使用方法:

1) 消毒液配制: 使用前, 在二氧化氯稳定液中先加活化剂。根据有效含量按稀释定律, 用去离子水将二氧化氯稀释成所需浓度。具体步骤按 3.1.7.2 (3) 1) 进行。

2) 消毒处理: 常用消毒方法有浸泡、擦拭、喷洒等方法。

① 浸泡法: 将清洗、干燥的待消毒或灭菌物品浸没于装有二氧化氯溶液的容器中, 加盖。对细菌繁殖体污染物品的消毒, 用 100mg/L~250mg/L 二氧化氯溶液浸泡 30min; 对肝炎病毒和结核分枝杆菌污染物品的消毒, 用 500mg/L 二氧化氯浸泡 30min; 对细菌芽孢污染物品的消毒,

用 1000mg/L 二氧化氯浸泡 30min。

② 擦拭法：对大件物品或其它不能用浸泡法消毒的物品用擦拭法消毒，消毒所有药物浓度和作用时间参见浸泡法。

③ 喷洒法：对一般污染的表面，用 500mg/L 二氧化氯均匀喷洒，作用 30min；对肝炎病毒和结核杆菌污染的表面，用 1000mg/L 二氧化氯均匀喷洒，作用 60min。

④ 饮水消毒法：在饮用水源水中加入 5mg/L 的二氧化氯，作用 5min，使大肠杆菌数达到饮用水卫生标准。

(3) 注意事项：

1) 二氧化氯活化液不稳定，应现配现用。

2) 配制溶液时，忌与碱或有机物相混合。

3) 二氧化氯对金属有腐蚀性，金属制品经二氧化氯消毒后，应迅速用清水冲洗干净并沥干。

5.1.7.6 含氯消毒剂

(1) 概述：含氯消毒剂属高效消毒剂，具有广谱、高效、低毒、有强烈的刺激性气味、对金属有腐蚀性、对织物有漂白作用，受有机物影响很大，消毒液不稳定等特点。常用的含氯消毒剂有①液氯，含氯量>99.5%(W/W)。②漂白粉，含有效氯 25%(W/W)。③漂白粉精，含有效氯 80%(W/W)。④三合二，含有效氯 56%(W/W)。⑤次氯酸钠，工业制备的含有效氯 10%(W/W)。⑥二氯异氰尿酸钠，含有效氯 60%(W/W)。⑦三氯异氰尿酸，含有效氯 85%~90% W/W)。⑧氯化磷酸三钠，含有效氯 2.6% (W/W)。

(2) 适用范围：适用于餐(饮)具、环境、水、疫源地等消毒。

(3) 使用方法

1) 消毒液配制：根据有效氯含量，用去离子水将含氯消毒剂配制所需浓度溶液。

2) 使用方法：常用的消毒方法有浸泡、擦拭、喷洒与干粉消毒等方法。

① 浸泡法：将洗净、干燥待消毒的物品放入装有含氯消毒剂溶液的容器中，加盖。对细菌繁殖体污染的物品消毒，用含有效氯 250mg/L 的消毒液浸泡 10min 以上；对经血传播病原体、分枝杆菌和细菌芽孢污染物品的消毒，用含有效氯 500mg/L~1000mg/L 消毒液浸泡 30min 以上。

② 擦拭法：对大件物品或其它不能用浸泡法消毒的物品用擦拭法消毒。消毒所有药物浓度和作用时间参见浸泡法。

③ 喷洒法：对一般污染的物品表面，用 500mg/L 的消毒液均匀喷洒，作用 30min 以上；对经血传播病原体、结核杆菌等污染表面的消毒，用含有效氯 1000mg/L 的消毒液均匀喷洒，作用 60min 以上。喷洒后有强烈的刺激性气味，人员应离开现场。

④ 干粉消毒法:对排泄物的消毒,用含氯消毒剂干粉加入排泄物中,使含有有效氯 10000mg/L,略加搅拌后,作用 2h~6h,对医院污水的消毒,用干粉按有效氯 50mg/L 用量加入污水中,并搅拌均匀,作用 2h 后排放。

(3) 注意事项:

1) 粉剂应于阴凉处避光、防潮、密封保存;水剂应于阴凉处避光、密闭保存。所需溶液应现配现用。

2) 配制漂白粉等粉剂溶液时,应戴口罩、橡胶手套。

3) 未加防锈剂的含氯消毒剂对金属有腐蚀性,不应做金属器械的消毒;加防锈剂的含氯消毒剂对金属器械消毒后,应用无菌蒸馏水冲洗干净,无菌方法擦干。

4) 对织物有腐蚀和漂白作用,不应做有色织物的消毒。

5) 用于消毒餐具,应即时用清水冲洗。

6) 消毒时,若存在大量有机物时,应提高使用浓度或延长作用时间。

7) 用于污水消毒时,应根据污水中还原性物质含量适当增加浓度。

5.1.7.7 乙醇

(1) 概述:乙醇属中效消毒剂,具有中效、速效、无毒、对皮肤粘膜有刺激性、对金属无腐蚀性,受有机物影响很大,易挥发、不稳定等特点。其含量为 95%(V/V)。

(2) 适用范围:适用于皮肤、环境表面及医疗器械的消毒等。

(3) 使用方法

1) 消毒液配制:根据有效含量按稀释定律用灭菌蒸馏水将乙醇稀释成所需浓度。具体步骤按 3.1.7.2 (2) 1) 进行。

2) 消毒处理:常用消毒方法有浸泡法和擦拭法。

① 浸泡法:将待消毒的物品放入装有乙醇溶液的容器中,加盖。对细菌繁殖体污染医疗器械等物品的消毒,用 75%的乙醇溶液浸泡 10min 以上。

② 擦拭法:用于皮肤的消毒,用 75%乙醇棉球擦拭。

3) 注意:乙醇易燃,忌明火;必须使用医用乙醇,严禁使用工业乙醇消毒和作为原材料配制消毒剂。

5.1.7.8 碘伏

(1) 概述:碘伏属中效消毒剂,具有中效、速效、低毒,对皮肤粘膜无刺激、无黄染,对铜、铝、碳钢等二价金属有腐蚀性,受有机物影响很大,稳定性好等特点。

(2) 适用范围:适用于皮肤、粘膜等的消毒。

(3) 使用方法

1) 消毒液配制：根据有效碘含量用灭菌蒸馏水将碘伏稀释成所需浓度。

2) 消毒处理：常用消毒方法有浸泡、擦拭、冲洗等方法。

① 浸泡法：将清洗、干燥的待消毒物品浸没于装有碘伏溶液的容器中，加盖。对细菌繁殖体污染物品的消毒，用含有效碘 500mg/L 的消毒液浸泡 30min。

② 擦拭法：对皮肤、粘膜用擦拭法消毒。消毒时，用浸有碘伏消毒液的无菌棉球或其它替代物品擦拭被消毒部位。对外科手消毒用含有效碘 2500mg/L~5000mg/L 的消毒液擦拭作用 3min。对于手术部位及注射部位的皮肤消毒，用含有效碘 2500mg/L~5000mg/L 的消毒液局部擦拭 2 遍，作用共 2min；对口腔粘膜及创口粘膜创面消毒，用含有效碘 500 mg/L~1000mg/L 的消毒液擦拭，作用 3min~5min。

③ 冲洗法：对阴道粘膜及伤口粘膜创面的消毒，用含有效碘 250mg/L 的消毒液冲洗 3min~5min。

(4) 注意事项：

1) 碘伏应于阴凉处避光、防潮、密封保存。

2) 碘伏对二价金属制品有腐蚀性，不应做相应金属制品的消毒。

3) 消毒时，若存在有机物，应提高药物浓度或延长消毒时间。

4) 避免与拮抗药物同用。

5.1.7.9 胍类消毒剂

(1) 概述：包括醋酸氯己定和葡萄糖酸氯己定和聚六亚甲基胍等。均属低效消毒剂，具有速效杀菌作用，对皮肤粘膜无刺激性、对金属和织物无腐蚀性，受有机物影响轻微，稳定性好等特点。

(2) 适用范围：适用于外科手消毒、手术部位皮肤消毒和粘膜消毒等。

(3) 使用方法

1) 消毒液配制：根据有效含量用灭菌蒸馏水将醋酸氯己定稀释成所需浓度。

2) 消毒处理：常用消毒方法有浸泡、擦拭和冲洗等方法。

① 擦拭法：手术部位及注射部位的皮肤的消毒，用 5000mg/L 醋酸氯己定-乙醇(70%)溶液局部擦拭 2 遍，作用 2min；对伤口创面消毒，用 5000mg/L 醋酸氯己定水溶液擦拭创面 2 遍~3 遍，作用 2min。外科手消毒可用相同浓度和作用时间。

② 冲洗法：对阴道、膀胱或伤口粘膜创面的消毒，用 500mg/L~1000mg/L 醋酸氯己定水溶液冲洗，至冲洗液变清为止。

(4) 注意事项

- 1) 勿与肥皂、洗衣粉等阴离子表面活性剂混合使用或前后使用。
- 2) 冲洗消毒时，若创面脓液过多，应延长冲洗时间。

5.1.7.10 季胺盐类消毒剂

(1) 概述：本类消毒剂包括单链季胺盐和双长链季胺盐两类，前者只能杀灭某些细菌繁殖体和亲脂病毒，属低效消毒剂，例如新洁尔灭；后者可杀灭多种微生物，包括细菌繁殖体，某些真菌和病毒。季胺盐类可与乙醇或异丙醇配成复方制剂，其杀菌效果明显增加。季胺盐类消毒剂的特点是对皮肤粘膜无刺激，毒性小，稳定性好，对消毒物品无损害等。

(2) 适用范围：皮肤粘膜消毒，环境物品消毒。

(3) 使用方法

1) 皮肤消毒：单链季胺盐消毒剂 500mg/L~1000mg/L，皮肤擦拭或浸泡消毒，作用时间 3min~5min，或用双链季胺盐 500mg/L，擦拭或浸泡消毒，作用 2min~5min。

2) 粘膜消毒：用 500mg/L 单链季胺盐作用 3min~5min，或用双链季胺盐 100mg/L~500mg/L，作用 1min~3min。

3) 环境表面消毒：根据污染微生物的种类选择用双链还是用单链季胺盐消毒剂，一般用 1000mg/L~2000mg/L，浸泡、擦拭或喷洒消毒，作用时间 30min。

(4) 注意事项

- 1) 阴离子表面活性剂，例如肥皂，洗衣粉等对其消毒效果有影响，不宜合用。
- 2) 有机物对其消毒效果有影响，严重污染时应加大使用剂量或延长作用时间。
- 3) 近年来的研究发现，有些微生物对季胺盐类化合物有抗药作用，对有抗性微生物消毒时，应加大剂量。

5.1.7.11 酸性氧化电位水

酸性氧化电位水是由添加了 0.05% NaCl 的自来水，通过酸性氧化电位水生成机中带有高密度离子隔膜的组合电解槽电解而成的一种无色透明的液体，具有氯味，其氧化还原电位（ORP）大于或等于 1100mV，pH 值在 2.7 以下，有效氯含量一般为 25 mg/L~50mg/L。其具有杀菌速度快、安全可靠、不留残毒、有利于环保等特点。目前主要用于手、皮肤粘膜的消毒；也可用于餐饮具、瓜果蔬菜的消毒和物品表面的消毒以及内镜的冲洗消毒。

酸性氧化电位水在室温、密闭、避光的条件下，较稳定，可保存 1 个月。但在室温暴露的条件下，不稳定，故不宜长期保存，最好现用现制备。

消毒时只能使用其原液。卫生手消毒，冲洗浸泡 1min ~3min。皮肤粘膜的消毒，冲洗浸泡

3min~5min。餐饮具的消毒，冲洗浸泡 10min，瓜果蔬菜的消毒，冲洗浸泡 3 min~5 min。消化道内镜的消毒，按卫生行政部门批准的使用说明书进行。环境和物品表面的消毒，擦拭浸泡 10min~15min，肝炎病毒污染的物品消毒，冲洗浸泡 15min。

5.1.8 物品与器械的清洗

清洗就是通过物理和化学方法将被洗物品与器械上的有机物、无机物和微生物尽可能地降低到比较安全的水平。清洗彻底是保证消毒或灭菌成功的关键。

5.1.8.1 影响清洗效果的因素

(1) 物品本身的复杂性，如管腔和表面不光滑的物品很难清洗；一般情况下，复杂物品必须尽可能拆开，用含酶洗涤剂浸泡后手工仔细刷洗。

(2) 污染微生物的数量和类型。

(3) 物品上残留有机物的数量和状况；有机物会影响灭菌的成功，有机物越多，则灭菌成功的可能性越小；如物品上有机物变干，则清洗时很难将有机物彻底去除。

5.1.8.2 清洗的方法

(1) 自来水清洗：可保持血等污染物潮湿，但对软化或去除干的污物无效；自来水只适用于污染较轻、无有机物污染、表面光滑物品的清洗。

(2) 清洁剂：可保持血等污染物潮湿，松解干的污物，但需配合其它机械活动去除污物。注意很多清洁剂尤其是家用洗涤剂有一定腐蚀性，使用时应防止对金属器械尤其是一些精密医疗仪器的破坏。

(3) 酶清洗剂：酶可有效地分解和去除干和湿润的污物；酶有单酶和多酶，前者只能分解污物中的蛋白质，后者可分解所有的有机污物。如配合使用自动清洗器、超声波等，则清洗效果更佳。酶主要用于污染较重、尤其是有机物污染、物品结构复杂表面不光滑物品的清洗。

(4) pH < 7 的洗涤剂主要用于无机污物的清洗；pH > 7 的洗涤剂主要用于有机污物如血、脂肪和粪的清洗；金属器械主要选择弱碱性洗涤剂。

5.1.8.3 清洗的过程

包括 6 个步骤：分类、浸泡、清洗、用自来水漂洗、用去离子水漂洗、干燥：

(1) 分类：最好使用完毕即进行分类，尽量不要直接用手进行分类；锐利物品必须放在防刺容器内进行运输；污物要保持湿润防止干燥，如不能在 1h~2h 之内及时清洗，须将物品浸于冷水或含酶液体中。

(2) 浸泡：浸泡可防止污物变干和软化或去除污物；对于有大量有机物污染或污染物已干可先用酶清洗剂浸泡至少 2min 以上。

(3) 清洗：有手工清洗、清洗机清洗、超声波清洗。

1) 手工清洗：对于无机器清洗设备或一些复杂物品如各种内镜、导管等必须手工清洗；清洗人员必须注意自身防护，包括戴厚的橡胶手套、面罩，穿防水衣服或围裙和袖套；头套完全遮盖头发。需有专门的清洗槽和清洗空间；清洗时应避免水的泼溅和气溶胶的形成。

2) 清洗机清洗：有全自动和半自动清洗机和专用清洗消毒设备；这些清洗机一般包括冷水清洗、洗涤剂清洗、漂洗和最后热水消毒(水温为 80℃~90℃，至少可达中等水平消毒)和干燥过程。因此机器清洗勿需先预处理消毒。

3) 超声波清洗：超声波主要是用于去除医疗器械内小的碎屑，为此超声清洗前必须先初步清洗以除去大的污物；在使用前应让机器运转 5min~10min 以排除溶解的空气；机器内加酶可大大提高超声清洗的效率；清洗水至少每 8h 应更换。

4) 自来水漂洗：手工清洗完毕可先用自来水漂洗，接着用去离子水漂洗。

5) 干燥：漂洗完毕后，应尽快将湿的物品擦干或烘干。

(4) 注意事项：

1) 保证每次清洗彻底，否则污物凝固影响以后清洗效果和破坏物品；

2) 清洗前避免污物变干；

3) 复杂物品必须手工清洗，有机物污染较重、污物已干、物品较复杂应预先用酶洗涤剂浸泡 2min 以上；

4) 一般情况下应先清洗，但应注意自身防护；不要直接用手对尖锐物分类和清洗；避免污物与身体的直接接触；

5) 医院消毒供应中心（室）必须具备专门的污物处理间，对于科室内清洗应有专门的空间并配备专门的洗涤槽。

5.2 手术器械和用品的灭菌

5.2.1 适用范围

适用于各种手术器械和用品的灭菌。

5.2.2 手术器械的灭菌

5.2.2.1 灭菌前的准备

(1) 去除污染：一般情况下使用后的手术器械应先按照 3.1.8 的方法进行彻底清洗。

特殊感染（如气性坏疽、破伤风感染等）病人使用过的手术器械应采用物理或化学消毒方法处理，可选用洗净灭菌装置或用 2000mg/L 含氯或含溴消毒剂浸泡作用 30min 后进行常规清洗。

清洗时，先用洗涤剂溶液浸泡擦洗，去除器械上的血垢等污染，有关节、缝隙、齿槽的器

械，应尽量张开或拆卸，进行彻底刷洗，然后用流水冲净，干燥，并尽快打包。盛装和运送洁污器械的工具，必须严格区分，并有明显标志，不得混用。盛装和运送工具应每日清洗消毒，遇污染应随时清洗消毒。

(2) 包装。见 5.1.1.5. (2)。手术器械包的体积不超过 30cm×30cm×50cm。手术器械包捆扎不宜过紧，用化学指示胶带贴封，包外必须有明显标记，注明名称，打包人、打包日期；手术包内放置化学指示物，包打好后应尽快进行灭菌；因故不能及时处理，应存放在洁净、干燥的柜橱中。

(3) 装放。见 5.1.1.5 (3)。

5.2.2.2 灭菌方法

(1) 预真空压力蒸汽灭菌方法见 5.1.1.4。

(2) 脉动真空压力蒸汽灭菌方法见 5.1.1.5。

(3) 下排气式压力蒸汽灭菌方法见 5.1.1.3。

(4) 快速压力蒸汽灭菌或正压排气快速灭菌方法见 5.1.1.7，此法特别适用于应急锐利器材的灭菌。

(5) 环氧乙烷气体灭菌：环氧乙烷用于不耐热手术包的灭菌。具体方法见 5.1.4。

5.2.3 手术缝线的灭菌

手术缝线根据不同用途分为吸收型肠线，非吸收型丝线，尼龙线，金属线等。手术缝线是密封的，灭菌后可长期保存使用的一次性灭菌手术用品，也可在使用前随时灭菌。

(1) 环氧乙烷灭菌：手术缝线用环氧乙烷灭菌时，按 5.1.4 执行。

(2) 快速压力蒸汽灭菌：1 号丝线等张力较高的非吸收型手术缝线可采用快速压力蒸汽灭菌。

具体操作：参见 5.1.1.7。

5.2.4 锐利手术器械的灭菌

锐利手术器械是手术器械中一类最具有代表性的器械，这类手术器械各专业手术科室均有，包括普通手术刀、剪、锯及眼科、耳鼻喉科的精密锐利手术器械。这类器械清洗见 5.2.2.1。灭菌方法参见 5.2.2.2。

5.2.5 不耐热手术用品的灭菌

大量高分子材料被广泛应用于医疗用品，其中有相当一部分是手术用品，包括心脏起搏器，人工心肺机，人工瓣膜，整复手术材料，外科手术刀具，麻醉器材，各种导管，各种内镜，节育器材等。这类用品，不能采用热力灭菌，只能用低温灭菌方法或化学灭菌处理。

(1) 环氧乙烷气体灭菌法：参见 5.1.4 执行。

(2) 戊二醛灭菌：戊二醛可用于不耐热手术器械的灭菌。如麻醉机附件等灭菌。2%碱性、中性、强化酸性戊醛均可应用，浸泡 10h 可达到灭菌。具体操作参照 5.1.7.1 执行。

5.2.6 手术用敷料的灭菌

传统手术敷料分为纱布类、棉布类和布类三种，包括手术用纱布、纱条、棉球、手术巾、孔巾等。近年来，医用纺织新材料得到广泛应用，如聚丙烯伤口敷布，无纺布等，使用方便，安全。手术用敷料都是透气性能好的材料，要求灭菌后干燥保存；一般建议，温度 25℃ 以下保存 10d~14d，潮湿多雨季节应缩短天数；过期应重新灭菌方能使用。

(1) 压力蒸汽灭菌：除极少数不宜用湿热灭菌的敷料外，手术敷料首选压力蒸汽灭菌。

1) 灭菌前准备：方纱、孔布和敷料用贮槽或包布包裹。

2) 灭菌程序：参照 5.1.2.1 执行。下排气压力蒸汽灭菌敷料包的条件为：121℃，30min。灭菌后迅速排气，敷料包干燥后方可取出。预真空和脉动真空灭菌敷料包的条件为：132℃~134℃，4min，脉动次数需 3 次。

(2) 干热灭菌：凡士林油纱布、纱条的灭菌，蒸汽不易穿透，适宜于干热灭菌。将准备好的纱布、纱条放入盒内，倒入融化的凡士林，待灭菌。需干热灭菌的凡士林纱布、纱条装放不宜太多太厚。厚度不超过 1.3cm。置干热灭菌器内，温度 160℃，2h。具体参照 5.1.2.2 执行。

5.3 输注器材的灭菌

5.3.1 适用范围

适用于非一次性使用的注射、输液器具的灭菌要求。

5.3.2 注射器、输液器的灭菌

5.3.2.1 灭菌前准备

(1) 清除污染：注射器、输液器用后，立即用清水冲洗。放入转运箱内，由消毒供应中心（室）回收统一处理。消毒供应中心（室）回收后应全部拆开，整个洗涤过程应包括酶洗、去热源、精洗 3 个环节。克雅病和特异性感染性疾病（如炭疽、破伤风等）使用后的输液器材按医疗废物处置。

(2) 注射器、输液滴管、玻璃接头洗涤方法

1) 手工清洗：用自来水冲洗后，采用酶制剂洗刷，再将酶制剂冲净；浸泡在 2% 三效热源灭活剂中 4h，用去离子水洗净，再用蒸馏水冲洗两次。

2) 自动清洗：将注射器、输液滴管、玻璃接头放入清洗筐中采用超声清洗机清洗，先用自来水冲洗、酶洗、再用蒸馏水或去离子水漂洗 3 次、烘干。

(3) 针头的清洁方法

1) 拆下的针头用自来水清洗。

放入加有酶制剂的超声清洗机内，超声清洗 30min，或放入 2%~3% 碳酸钠或碳酸氢钠溶液中煮沸 15min，用针头机加压冲洗；或用铜丝贯擦针孔，用棉签卷擦针栓，除去残留血块及药液，检查针孔是否通畅。

2) 用过滤蒸馏水或去离子水冲洗；逐个检查针头的锋利度或有无内外钩后，再用 95% 酒精或 3% 双氧水冲洗针头管腔。

(4) 包装：注射器用有筛孔容器或双层平纹细布（应清洗后使用）包装。包布应放在专用洗衣机中或专锅洗净、干燥。注射器等从最后一次用蒸馏水洗净至灭菌开始不应超过 2h。

5.3.2.2 压力蒸汽灭菌

(1) 灭菌方法参见 5.1.2.1 执行。

(2) 注意事项：注射器包装时，管芯应抽出，普通铝饭盒无论加盖与否均不能用于装放注射器进行灭菌。

灭菌后的注射器、输液器放在洁净专用柜中，干燥条件下贮存。建议有效期在温度 25℃ 以下：布类或包装盒包装贮存期 14d；包装纸包装贮存期 3 个月；纸塑包装贮存期 6 个月；潮湿多雨季节应缩短天数。

5.4 内镜的消毒与灭菌

5.4.1 适用范围

适用于各种内镜的消毒与灭菌。

5.4.2 内镜消毒、灭菌的基本原则

5.4.2.1 根据内镜在人体内使用部位的不同，要求对其进行消毒或灭菌处理。

(1) 凡进入人体无菌组织、器官或经外科切口进入无菌腔室的内镜及其附件，如腹腔镜、关节镜、脑室镜、膀胱镜、宫腔镜等，用前应达到灭菌水平。

(2) 凡进入破损粘膜的内镜附件也应达到灭菌水平，如活检钳、高频电刀等。

(3) 凡进入人体自然通道与管腔粘膜接触的内镜及其附件，如喉镜、气管镜、支气管镜、胃镜、肠镜、乙状结肠镜、直肠镜等，用前应达到高水平消毒。

5.5.2.2 选择内镜消毒、灭菌方法的原则：内镜的消毒、灭菌应首选物理方法，对不耐湿热的内镜可选用化学方法消毒、灭菌。

(1) 压力蒸汽灭菌：具体方法见消毒、灭菌常用方法；使用快速压力蒸汽灭菌器进行灭菌则按生产厂家得使用说明进行操作。主要适于能耐湿热内镜的灭菌，如金属直肠镜、直接喉镜金属

部分的灭菌，以及能耐湿热的腹腔镜、关节镜、脑室镜等的灭菌。

(2) 环氧乙烷灭菌：具体方法见消毒、灭菌常用方法；适于各类内镜的消毒、灭菌。

(3) 2%碱性戊二醛浸泡消毒、灭菌：消毒需浸泡 20min，灭菌需浸泡 10h。适于各类内镜的消毒、灭菌，注意必须保证有效浓度和在有效期内，低于有效浓度和/或超过有效期应及时更换。

(4) 氧化电位水消毒：适用于胃肠内镜的消毒。ORP \geq 1100mV，pH 在 2.7 以下，有效氯含量一般为 50mg/L。在清洗干净的条件下，消毒作用 15min，或按照卫生行政部门批准的方法进行。

(5) 煮沸消毒：煮沸 20min，可用于内镜金属部分和某些附件的消毒。

(6) 其它消毒、灭菌方法：经卫生部门批准的内镜消毒剂和消毒器，具体使用方法按产品使用说明。

(7) 内镜及附件用后立即清洗，应用专用含酶洗液浸泡；洗净、干燥后消毒、灭菌，应注意对所有的通道进行清洗、浸泡消毒和冲洗。

(8) 采用化学法灭菌的内镜，用前应用灭菌水彻底冲洗，以去除残留的消毒剂。

5.4.3 内镜的清洗

5.4.3.1 软式内镜的清洗

内镜及其附件使用后立即用纱布（或其它清洗用品）在流动水下擦洗，以防分泌物干燥，所有孔道应以大量清水冲洗，使残留有机物软化、潮解和稀释，并用清洁刷充分刷洗所有孔道；为保证孔道的充分刷洗，应在被刷洗孔道的两端见到刷头；所有可拆卸部件如保护盖、吸引阀等，均应拆下进行彻底清洗；为使清洗彻底，流水清洗时间不得少于 3min。纱布（或其它清洗用品）和清洁刷应一用一消毒，或每天至少进行一次高水平消毒（如用 500mg/L 的二氧化氯或二溴海因，2000 mg/L 的过氧乙酸或 2% 的戊二醛浸泡消毒 30min）。

5.4.3.2 其他内镜的清洗

如关节镜、腹腔镜、脑室镜、膀胱镜等，使用后应立即用清水彻底清洗，以除去血液、粘液等，彻底清洗内镜各部件，可拆卸部分应拆开清洗，并用超声清洗器清洗 5~10 分钟；器械的轴节部、弯曲部、管腔内应用软毛刷彻底刷洗，刷洗时防止划伤镜面。管腔应当用高压水枪彻底冲洗。

5.4.3.3 酶洁液清洗与干燥

清洗后的内镜，应使用专用清洁内镜的含酶洗液浸泡，以防有机物和蛋白质凝固、注水注气孔道堵塞和内镜表面发黄、结痂，含酶洗液浸泡时间按产品使用说明进行，注意各孔道应灌满含

酶洗液；浸泡结束，清水冲洗干净。内镜的附件如活检钳、细胞刷等使用后，用小刷刷洗钳瓣内面和关节处，有条件的医院应用超声振荡器清洗。冲洗干净后的内镜及其附件，干燥，待消毒。

5.4.4 内镜的消毒

5.4.4.1 软式内镜的消毒

(1) 软式内镜采用化学消毒剂进行消毒或者灭菌时，应当按照使用说明进行，并进行化学监测和生物学监测。

(2) 采用 2%碱性戊二醛浸泡消毒或者灭菌时，应当将清洗擦干后的内镜置于消毒槽并全部浸没消毒液中，各孔道用注射器灌满消毒液。非全浸式内镜的操作部，必须用清水擦拭后再用 75%乙醇擦拭消毒。采用 2%碱性戊二醛消毒或灭菌，浸泡时间为：

- 1) 胃镜、肠镜、十二指肠镜浸泡不少于 10 分钟；
- 2) 支气管镜浸泡不少于 20 分钟；
- 3) 结核杆菌、其他分枝杆菌等特殊感染患者使用后的内镜浸泡不少于 45 分钟。
- 4) 需要灭菌的内镜采用 2%碱性戊二醛灭菌时，必须浸泡 10 小时。
- 5) 当日不再继续使用的胃镜、肠镜、十二指肠镜、支气管镜等需要消毒的内镜采用 2%碱性戊二醛消毒时，应当延长消毒时间至 30 分钟。

(3) 软式内镜消毒后，应当按照以下方法、步骤进行冲洗和干燥：

① 内镜从消毒槽取出前，清洗消毒人员应当更换手套，用注射器向各管腔注入空气，以去除消毒液。

② 将内镜置入冲洗槽，流动水下用纱布清洗内镜的外表面，反复抽吸清水冲洗各孔道。

③ 用纱布擦干内镜外表面，将各孔道的水分抽吸干净。取下清洗时的各种专用管道和按钮，换上诊疗用的各种附件，方可用于下一病人的诊疗。

④ 支气管镜经上述操作后，还需用 75%的乙醇或者洁净压缩空气等方法进行干燥。

(4) 采用化学消毒剂浸泡灭菌的内镜，使用前必须用无菌水彻底冲洗，去除残留消毒剂。

(5) 自动清洗消毒器：经卫生部批准的内镜消毒器，具体操作按使用说明，注意用该法消毒前，内镜应先用手工彻底清洗，操作方法和要求见 5.4.3.1 和 5.4.3.2。

(6) 其它消毒剂：经卫生行政部门批准的消毒剂，具体消毒方法见使用说明。

5.4.4.2 硬式内镜的消毒

(1) 能耐受压力蒸汽灭菌的内镜部分或全部，首选压力蒸汽灭菌；不能承受压力蒸汽灭菌的内镜或其部分，首选环氧乙烷灭菌；或用 2%的碱性戊二醛浸泡 10h。达到消毒要求的硬式内镜，如喉镜、阴道镜等，可采用煮沸消毒 20 分钟的方法。在消毒灭菌时，有轴节的器械应充分打开

轴节，带管腔的器械腔内应充分注入消毒液。

(2) 其它消毒剂与消毒器：经卫生行政部门部批准的消毒剂与消毒器械，具体消毒方法见使用说明。

5.4.5 消毒后内镜的冲洗

采用化学消毒剂浸泡消毒的硬式内镜，消毒后应当用流动水冲洗干净，再用无菌纱布擦干。采用化学消毒剂浸泡灭菌的硬式内镜，灭菌后应当用无菌水彻底冲洗，再用无菌纱布擦干。

5.4.6 内镜附件的消毒

5.4.6.1 内镜附件的消毒

内镜的附件如活检钳、细胞刷、切开刀、导丝、碎石器、网篮、造影导管、异物钳等应做到一用一灭菌，消毒方法首选压力蒸汽灭菌，也可用环氧乙烷灭菌或用 2%碱性戊二醛浸泡 10h 灭菌，或用经卫生行政部门批准的消毒剂与消毒器械进行灭菌，具体方法见使用说明。

5.4.6.2 其它物件的消毒

(1) 口圈、弯盘、敷料缸等首选压力蒸汽灭菌；或用高水平化学消毒剂（如 500mg/L 的含氯消毒剂或 2000 mg/L 的过氧乙酸或 2%的碱性戊二醛）浸泡消毒 30min，用水彻底冲净残留消毒液，干燥备用。

(2) 注水瓶及连接管的消毒：用高水平以上的化学消毒剂（如 500mg/L 的含氯消毒剂或 2000 mg/L 的过氧乙酸或 2%的戊二醛）浸泡消毒 30 min，用水彻底冲净残留消毒液，干燥备用；注水瓶内的用水应为灭菌水，每天更换。

(3) 吸引瓶、吸引管的消毒：检查结束后，先清洗吸引瓶，之后用 500mg/L 的含氯消毒剂或 2000 mg/L 的过氧乙酸浸泡消毒 30min，刷洗干净，干燥备用。

(4) 软式内镜的槽或容器：消毒软式内镜的槽或容器应每天清洁，再用 500mg/L 的含氯消毒剂，或 2000 mg/L 的过氧乙酸擦拭，用于浸泡灭菌的容器应清洁后作灭菌处理。

5.4.7 内镜消毒与灭菌的注意事项

5.4.7.1 软式内镜消毒

软式内镜在每天使用前应用 2%碱性戊二醛浸泡消毒 20min，用水充分冲洗后使用；当天检查结束彻底消毒（2%碱性戊二醛浸泡消毒 30min）后将内管充分吹干或用 75%的乙醇进行冲洗、干燥，用擦镜纸蘸少许硅腊油涂擦端部镜面、导光束端面和钳瓣以防锈，储存于专用洁净柜内，镜体应悬挂，弯角固定钮应置于自由位，活检钳瓣应张开。储柜内表面应光滑，便于清洁，储柜或镜房应每周清洁消毒一次；内镜及附件的清洗、消毒或者灭菌时间应当使用计时器控制；禁止

使用非流动水对内镜进行清洗；内镜室应当做好内镜清洗消毒的登记工作，登记内容应当包括就诊病人姓名、使用内镜的编号、清洗时间、消毒时间以及操作人员姓名等事项。

5.4.7.2 人体不同部位的内镜的检查

人体不同系统的内镜检查，应分室进行，内镜的清洗容器应分开。上消化道、下消化道内镜的诊疗工作不能分室进行的，应当分时间段进行。

5.4.7.3 医务人员的自我防护

医务人员应做好自我防护，采取适当的措施如加强通风，防止消毒剂如戊二醛对医务人员的危害；操作时应穿戴一次性口罩、帽子、专用工作服、防渗透围裙以及手套，手套应每例病人更换，脱去手套后应洗手，必要时消毒双手；有条件的医院可采取主动免疫，提高医务人员的抵抗力。

5.4.7.4 工作结束后的消毒：每天工作结束后，应对内镜室的环境包括空气、物体表面进行清洁与消毒。

5.5 口腔诊疗器具及环境的消毒与灭菌

5.5.1 适用范围

适用于综合医院口腔科、口腔医院、口腔诊所等开展口腔科诊疗科目服务的医疗机构。

5.5.2 基本要求

5.5.2.1 制定并落实有关制度：制定并落实口腔诊疗器械消毒工作的各项规章制度，建立、健全消毒管理责任制，切实履行职责，确保消毒工作质量。掌握口腔诊疗器械消毒及个人防护等医院感染预防与控制方面的知识，遵循标准预防的原则，严格遵守有关的规章制度。

5.5.2.2 医务人员的防护：进行口腔诊疗操作时，应戴口罩、帽子，可能出现病人血液、体液飞溅时，应当戴护目镜。每次操作前及操作后应当严格洗手或者手消毒。医务人员戴手套操作时，每治疗一个病人应当更换一付手套并洗手或者手消毒。

5.5.2.3 其它要求：口腔诊疗区域和口腔诊疗器械清洗、消毒区域应当分开，布局合理，能够满足诊疗工作和口腔诊疗器械清洗、消毒工作的基本需要。医疗机构应当根据口腔诊疗器械的危险程度及材质特点，选择适宜的消毒或者灭菌方法。口腔诊疗过程中产生的医疗废物应当按照《医疗废物管理条例》及有关法规、规章的规定进行处理。

5.5.3 口腔器材的消毒与灭菌

进入病人口腔内的所有诊疗器械，必须达到“一人一用一消毒或者灭菌”的要求。口腔器材按照其危害程度及材质的不同进行不同的处理。外科器械及其它穿破口腔软组织或骨组织的器械（牙钳、解剖刀、骨凿、钻针、根管器械等）必须灭菌；不穿破口腔软组织但与组织有接触的器

械（银汞充填器、塑料器械）应当进行灭菌；与皮肤接触、可能暴露在体液或唾液飞沫中的器械以及可能被污染的手接触的器械（物理测量仪器、混汞机）应当进行消毒。接触病人完整粘膜、皮肤的口腔诊疗器械，包括口镜、探针、牙科镊子等口腔检查器械、各类用于辅助治疗的物理测量仪器、印模托盘、漱口杯等，使用前必须达到消毒。凡接触病人体液、血液的修复、正畸模型等物品，送技工室操作前必须消毒。

5.5.3.1 消毒工作程序及要点

（1）口腔诊疗器械消毒工作包括清洗、器械维护与保养、消毒或者灭菌、贮存等工作程序。

（2）口腔诊疗器械清洗工作要点是：

1) 口腔诊疗器械使用后，应当及时用流动水彻底清洗，其方式应当采用手工刷洗或者使用机械清洗设备进行清洗。

2) 有条件的医院应当使用加酶洗液清洗，再用流动水冲洗干净；对结构复杂、缝隙多的器械，应当采用超声清洗。

3) 清洗后的器械应当擦干或者采用机械设备烘干。

（3）口腔诊疗器械清洗后应当对口腔器械进行维护和保养，对牙科手机和特殊的口腔器械注入适量专用润滑剂，并检查器械的使用性能。

（4）根据采用的消毒与灭菌的不同方式对口腔诊疗器械进行包装，并在包装外注明消毒日期、有效期。

采用快速卡式压力蒸汽灭菌器灭菌器械，可不封袋包装，裸露灭菌后存放于无菌容器中备用；一经打开使用，有效期不得超过4小时。

（5）牙科手机和耐湿热、需要灭菌的口腔诊疗器械，首选压力蒸汽灭菌的方法进行灭菌，或者采用环氧乙烷、等离子体等其他灭菌方法进行灭菌。

对不耐湿热、能够充分暴露在消毒液中的器械可以选用化学方法进行浸泡消毒或者灭菌。在器械使用前，应当用无菌水将残留的消毒液冲洗干净。

（6）每次治疗开始前和结束后及时踩脚闸冲洗管腔30秒，减少回吸污染；有条件可配备管腔防回吸装置或使用防回吸牙科手机。

5.5.3.2 一般诊疗用品的消毒

参照 5.6.2.5（3）执行。

5.5.4 诊疗环境的消毒

口腔诊疗区域内应当保证环境整洁，每日对口腔诊疗、清洗、消毒区域进行清洁、消毒；每日定时通风或者进行空气净化；对可能造成污染的诊疗环境表面及时进行清洁、消毒处理。每周

对环境进行一次彻底的清洁、消毒。

5.6 一般诊疗用品的消毒

5.6.1 适用范围

适用于一般常规使用的诊疗用品如体温表、听诊器、血压计袖带、压舌板、开口器、舌钳子、吸引器、引流瓶、胃肠减压器、氧气湿化瓶、呼吸机及麻醉机的螺纹管、氧气面罩、麻醉口罩、扩阴器等，包括接触皮肤及浅表体腔、黏膜的器材的消毒。

5.6.2 清洁与消毒方法

5.6.2.1 接触未破损皮肤的器具清洁与消毒方法

接触皮肤的一般诊疗用品如血压计袖带、听诊器等，保持清洁，遇污染应随时以清洁剂与水清洁。血压计袖带若被血液、体液污染应在清洁的基础上使用含有效氯或有效溴 250mg/L~500mg/L 的消毒剂浸泡 30min 后再清洗干净，晾干备用。听诊器可在清洁的基础上用乙醇擦拭消毒。腋下体温表每次用后应在清洁的基础上选用 75%乙醇或含有效溴 500mg/L~1000mg/L 的二溴海因浸泡 30min 或过氧乙酸 1000mg/L 浸泡 10min~30min 后，清水冲净，擦干，保存备用。

5.6.2.2 接触未破损黏膜的器具清洁与消毒方法

接触未破损黏膜的器具如扩阴器、开口器、舌钳子、压舌板、口表、肛表等器具，用后应先清洗去污，擦干，耐高温的器具如扩阴器、开口器、舌钳、压舌板可选择压力蒸汽灭菌。不耐高温的器具如口表、肛表等可在清洁的基础上采用 75%乙醇或含氯消毒剂 500mg/L 浸泡 30min 或过氧乙酸 1000mg/L 浸泡 10min~30min 后，清水冲净，擦干，保存备用。

5.6.2.3 通过管道间接与浅表体腔黏膜接触的器具清洁与消毒方法

通过管道间接与浅表体腔黏膜接触的器具如氧气湿化瓶、呼吸机和麻醉机的螺纹管、氧气面罩、麻醉口罩、胃肠减压器、吸引器、引流瓶等器具，在清洁的基础上，耐高温的管道与引流瓶可采用压力蒸汽灭菌，不耐高温的部分可清洁后浸泡在含氯或含溴消毒剂 500mg/L 浸泡 30min 后，清水冲净，干燥，封闭保存备用。有条件的医院可采用清洗消毒装置进行清洗、80℃~93℃热力消毒、烘干自动完成，保存备用。

5.6.3 注意事项

- (1) 任何物品在消毒灭菌前均应充分清洗干净。
- (2) 清洗：可采用流动水冲洗，清洁剂去污，管道可采用酶制剂浸泡，再流动水冲洗干净，再浸泡在相应的消毒剂中浸泡消毒或灭菌。
- (3) 使用的消毒剂：应严格检测其浓度，有效期内使用，确保消毒灭菌效果。
- (4) 消毒灭菌后的医疗用品：应保持干燥，封闭保存，避免保存过程中再污染。

5.7 医务人员手的消毒

5.7.1 适用范围

适用于医疗机构医务人员卫生手消毒和外科手消毒。

5.7.2 手消毒

5.7.2.1 外科手消毒

(1) 外科洗手方法与要求：应认真清洗双手、前臂及上臂下 1/3。具体步骤是：

- 1) 洗手之前应当先摘除手部饰物，并按要求修剪指甲；
- 2) 取适量的肥皂或者皂液清洗双手、前臂和上臂下 1/3。清洁双手时，应注意清洁指甲下的污垢和手部皮肤的皱褶处；
- 3) 流动水冲洗双手、前臂和上臂下 1/3；
- 4) 使用清洁布巾彻底擦干双手、前臂和上臂下 1/3。

(2) 外科手消毒方法：

1) 按照产品的使用说明要求，取适量的手消毒剂认真揉搓至双手的每个部位、前臂和上臂下 1/3，揉搓时间按照产品的使用说明，一般揉搓 2~6 分钟，用洁净流动水冲净双手、前臂和上臂下 1/3，用无菌巾彻底擦干；若厂家推荐，可以按照产品的使用说明重复上述操作步骤。

2) 采用免冲洗外科手消毒剂进行外科手消毒的方法：按照产品的使用说明要求，取适量的免冲洗外科手消毒剂认真揉搓至双手的每个部位、前臂和上臂下 1/3，直至消毒剂干燥；若厂家推荐，可以按照产品的使用说明重复上述操作步骤。

(3) 外科手消毒注意事项：

- 1) 医务人员进行外科手消毒时不应佩戴假指甲、戒指等手部饰物；
- 2) 手消毒可使用海绵、其他揉搓用品或双手相互揉搓；
- 3) 在整个手消毒过程中应保持手指朝上，让手的位置高于肘部，使水由手指流向肘部，不能使水倒流，并且避免碰到刷手衣；
- 4) 摘除外科手套应清洁双手后，再进行其他操作。
- 5) 用后的指甲清洁器、揉搓用品如海棉等，应放到指定的容器中，一用一灭菌；如果揉搓使用刷子，则应注意刷子毛应柔软，以免损伤医务人员的皮肤，并定期检查，剔除不合格产品。
- 6) 术后摘除外科手套后用皂液或其他清洁剂清洁双手，然后再进行其他的操作。

5.7.2.2 连续进行手术的外科手消毒：若连续进行下一台手术时，需重新按外科手消毒法进行。

5.7.3 卫生手消毒

5.7.3.1 卫生手消毒原则

(1) 当手部有可见污物，或被蛋白性物质污染，或有血液或其它体液污染的明显痕迹时，应用清洁剂和水或抗菌皂/液和水洗手；

(2) 如果手部没有可见污染，建议使用速干手消毒剂清洁双手代替洗手。

5.7.3.2 洗手

(1) 洗手指征

- 1) 直接接触病人前后，接触不同病人之间，从同一病人身体的污染部位移动到清洁部位时；
- 2) 接触病人黏膜、破损皮肤或伤口前后，接触病人的血液、体液、分泌物、排泄物、伤口敷料之后；
- 3) 穿脱隔离衣前后，摘手套后；
- 4) 进行无菌操作前后，处理清洁、无菌物品之前，处理污染物品之后；
- 5) 当医务人员的手有可见的污染物或者被病人的血液、体液等蛋白性物质污染后。

(2) 洗手方法

- 1) 采用流动水洗手，使双手充分淋湿；
- 2) 取适量肥皂或者皂液，均匀涂抹至整个手掌、手背、手指和指缝；
- 3) 认真揉搓双手至少 15 秒钟，应注意清洗双手所有皮肤，包括清洗指背、指尖和指缝和大拇指。
- 4) 在流动水下彻底冲净双手，擦干，取适量护手液护肤。

(3) 注意事项：医务人员洗手时应彻底清洗容易污染微生物的部位，如指甲、指尖、指甲缝、指关节及配戴饰物的部位等。

5.7.3.3 手消毒

(1) 手消毒指征

- 1) 检查、治疗、护理免疫功能低下的病人之前；
- 2) 出入隔离病房、重症监护病房、烧伤病房、新生儿重症病房和感染性疾病科病房等重点部门前后；
- 3) 接触具有传染性的血液、体液和分泌物以及被传染性致病微生物污染的物品后；
- 4) 双手直接为传染病病人进行检查、治疗、护理或处理传染病病人污物之后；
- 5) 需双手保持较长时间抗菌活性时。

(2) 手消毒方法：

- 1) 取适量的速干手消毒剂于掌心；
- 2) 严格按照洗手揉搓的步骤双手相互揉搓，揉搓时保证手消毒剂完全覆盖手部皮肤，直至

手部干燥，使双手达到消毒目的。

5.7.3.4 对污染手的处理：医务人员手被感染性物质污染以及直接为传染病病人进行检查、治疗、护理或处理传染病病人污染物之后，应当先用流动水洗手、擦干，然后使用速干手消毒剂消毒双手。

5.7.3.5 手套的使用：医务人员进行侵入性操作时应戴无菌手套，戴手套前、脱手套后应洗手。一次性无菌手套不得重复使用。

5.7.3.6 注意事项

(1) 洗手时应用肥皂/皂液和流动水将手洗净。

(2) 当手与病人接触前后或微生物污染源接触后（包括脱掉手套后）必须用肥皂/皂液和流动水洗净双手或用速干手消毒剂消毒双手，包括手部皮肤和指甲的所有表面。

5.7.4 常用手消毒剂

(1) 75%乙醇溶液或 70%异丙醇溶液。

(2) 醇类和胍类{醋酸氯己定等}复配的手消毒液。

(3) 有效碘含量为 5000mg/L 的碘伏溶液。

(4) 卫生行政部门批准用于手消毒的其它消毒剂。

5.8 皮肤与黏膜的消毒

5.8.1 适用范围

适用于诊疗活动中医护人员和病人皮肤、黏膜的消毒。

5.8.2 穿刺部位的皮肤消毒

5.8.2.1 注射部位皮肤消毒

一般肌肉、静脉或其它部位注射与穿刺前的皮肤消毒，其具体方法为：

(1) 用医用洗必泰碘棉签消毒，按生产厂家的使用说明书进行操作。

(2) 用无菌棉签浸润 2%碘酊，涂擦注射部位皮肤 1 遍，作用 1min 后，再用 75%乙醇擦拭 2 遍，擦净残余碘，干燥后，即可注射。

(3) 用无菌棉签浸润含有有效碘 5000mg/L 的碘伏，直接涂擦注射部位皮肤 2 遍，待干燥，即可注射。静脉注射时，可用 75%酒精棉签脱碘。

5.8.2.2. 消毒范围：肌肉、皮下及静脉注射、针灸部位，各种诊疗性穿刺等消毒方法主要是涂擦，以注射或穿刺部位为中心，由内向外缓慢旋转，逐步涂擦，共 2 次，消毒皮肤面积不小于 5cm × 5cm。血管内留置导管及其他部位分流导管和引流处每日按要求处理后用无菌敷料封盖。

5.8.3 病人手术切口部位的皮肤消毒

5.8.3.1. 准备

(1) 手术部位的皮肤应先清洁。

(2) 器官移植手术和处于重度免疫抑制状态的病人，术前可用除菌皂液擦拭洗净全身皮肤。

5.8.3.2 消毒方法：可按 5.8.2.1 要求进行，消毒范围应在手术野及其外 10cm 以上部位由内向外擦拭。

5.8.4 病原微生物污染皮肤的消毒

5.8.4.1 彻底清洗。

5.8.4.2 消毒：采用含有效碘 5000mg/L 的碘伏擦拭作用 3min~5min，或用乙醇、异丙醇与醋酸氯己定配制成的消毒液等擦拭消毒，作用 3min~5min。

5.8.5 黏膜消毒

5.8.5.1 会阴部及阴道手术消毒

(1) 先用 5000mg/L 碘伏皂液棉球依次擦洗大、小阴唇、两侧大腿内侧上 1/3，会阴及肛门周围，备皮处理后，用 5000mg/L 碘伏液棉球涂擦外阴，待碘液完全干燥后（约需 3 min~5min）同上法再次涂擦消毒。

(2) 子宫切除手术前一天晚上用有效碘 250mg/L 的碘伏或 5000mg/L 醋酸氯己定溶液擦洗阴道一次，手术前 2h，重复擦洗一次，阴道冲洗消毒用含有效碘 250mg/L 或醋酸氯己定水溶液消毒。

(3) 氧化电位水冲洗消毒。

5.8.5.2 口腔和咽部消毒

(1) 取含有效碘 500mg/L 的碘伏液或 1%过氧化氢液含漱消毒。也可用氧化电位水含漱。

(2) 过氧化氢溶液、复方硼酸溶液等漱口，5000mg/L 碘伏或 3000mg/L~5000mg/L 醋酸氯己定溶液的局部涂抹。

5.8.6 新生儿脐带消毒：用碘酊和 75%乙醇处理，也可用 5000mg/L 有效碘的碘伏处理。

5.8.7 常用消毒剂

已获卫生行政部门批准用于皮肤黏膜消毒的含碘类消毒剂、醋酸氯己定—醇类消毒剂等。

5.9 医院室内空气的消毒

5.9.1 适用范围

适用于GB15982—1995中规定的 I、II、III、IV类环境室内空气的消毒。

5.9.2 I类环境的空气消毒

I类环境包括层流洁净手术室和层流洁净病房。环境要求空气中的细菌总数 $\leq 10\text{cfu/m}^3$ ，

采用层流洁净技术，才能达到 I 类环境标准。

5.9.3 II 类环境的空气消毒

II 类环境包括普通手术室、产房、婴儿室、早产儿室、普通保护性隔离室、消毒供应中心（室）检查打包区及无菌物品储存区、烧伤病房、重症监护病房。空气细菌总数 $\leq 200\text{cfu}/\text{m}^3$ ，可选用下述方法：

5.9.3.1 循环风紫外线空气消毒器：消毒器由高强度紫外线灯和过滤系统组成，可以有效地滤除空气中的尘埃，并可进入消毒器的空气中的微生物杀死。按产品说明书安装消毒器，消毒器必须采用低臭氧紫外线灯制备，消毒环境中臭氧浓度低于 $0.1\text{mg}/\text{m}^3$ 。

5.9.3.2 静电吸附式空气消毒器：这类消毒器采用静电吸附原理，加以过滤系统，不仅可过滤和吸附空气中带菌的尘埃，也可吸附微生物。在一个 $20\text{m}^2\sim 30\text{m}^2$ 的房间内，使用一台大型静电式空气消毒器，消毒 30min 后，应达到国家卫生标准。可用于有人在房间内空气的消毒。

5.9.3.3 光催化空气消毒器：消毒器采用半导体氧化物通过特种光源催化在设备内消毒反应区对空气中微生物杀灭，同时可消毒有机化学污染和异味，安装方式可采用单机或中央空调通风系统使用。适用于人员活动状态下的持续动态消毒。

5.9.3.4 注意事项

- (1) 所用消毒器的循环风量 (m^3/h) 必须是房间体积的8倍以上。
- (2) 有些小型的上述消毒器，经试验证明不能达到上述消毒效果，则不宜用于 II 类环境空气的消毒。用户可查验其检测报告和经卫生行政部门发证时批准的使用说明书。
- (3) II 类环境均为有人房间，必须采用对人无毒无害，且可连续消毒的方法。

5.9.4 III 类环境的空气消毒

这类环境包括儿科病房，妇产科检查室，注射室、换药室、治疗室、急诊室、化验室、各类普通病室和房间，这类环境要求空气中的细菌总数 $\leq 500\text{cfu}/\text{m}^3$ 。可采用下述方法。

5.9.4.1 人员活动状态 上述5.8.3.1、5.8.3.2和5.8.3.3 介绍的方法均可采用。

5.9.4.2 无人状态

(1) 臭氧消毒：市售的管式、板式和沿面放电式臭氧发生器均可选用。要求达到臭氧浓度 $\geq 20\text{mg}/\text{m}^3$ ，在 $\text{RH}\geq 70\%$ 条件下，消毒时间 $\geq 30\text{min}$ 。消毒时人必须离开房间。消毒后待房间内闻不到臭氧气味时才可进入（大约在关机后 30min 左右）。

(2) 紫外线消毒：可选用产生较高浓度臭氧的紫外线灯，以利用紫外线和臭氧的协同作用。一般按每 m^3 空间装紫外线灯瓦数 $\geq 1.5\text{W}$ ，计算出装灯数。空气消毒照射时间一般均应大于 30min 。新灯的辐照强度不得低于 $90\mu\text{w}/\text{cm}^2$ ，使用中紫外线的辐照强度不得低于 $70\mu\text{w}/\text{cm}^2$ 。测定紫外线

强度应采用经过计量部门检定的紫外线强度计，按5.1.5.2 测定；或用紫外线强度监测指示卡进行监测，监测方法按5.17.4。使用紫外线灯直接照射消毒，人不得在室内。

(3) 薰蒸或喷雾消毒：可采用化学消毒剂或中草药空气消毒剂喷雾或薰蒸消毒，常用的化学消毒剂有：

1) 过氧乙酸：将过氧乙酸稀释成0.5%~1.0%水溶液，加热蒸发，在60%~80%相对湿度，室温下，过氧乙酸用量按 $1\text{g}/\text{m}^3$ 计算，薰蒸时间 2h。

2) 过氧化氢复方空气消毒剂：市售品以过氧化氢为主要成份，配以增效剂和稳定剂等，一般用量按过氧化氢 $50\text{mg}/\text{m}^3$ 计算，采用喷雾法，在相对湿度60%~80%，室温下作用30 min。

3) 季铵盐类消毒液：采用双链和单链季铵盐，配以增效剂和稳定剂制成的空气消毒剂。每 m^3 喷1.2ml（折合药物浓度 $10\text{mg}/\text{m}^3$ 左右），作用30min。

4) 中草药空气消毒剂喷雾消毒。按生产厂家的使用说明书进行操作。

5) 注意事项：所用消毒剂必须有卫生许可批件且在有效期内；消毒时室内不可有人；甲醛不宜用于空气消毒，因有致癌作用。

5.9.5 IV类环境的消毒

5.9.5.1 根据消毒状态选择，参照3.9.4人员活动状态下或无人状态下采用不同消毒方式。

5.9.5.2 中草药消毒剂：有些中草药消毒剂对空气中微生物有杀灭作用，可用于IV类环境消毒，使用方法和用量可按生产厂家使用说明书进行。

5.10 物体和环境表面消毒

5.10.1 适用范围

适用于 GB15982—1995 中规定的 I、II、III、IV类环境室内物体表面的消毒及医院各环境表面消毒。

5.10.2 I、II类物体表面的消毒

I类环境包括层流洁净手术室、层流洁净病房；II类环境包括普通手术室、产房、婴儿室、早产儿室、普通保护性隔离室、消毒供应中心（室）检查打包区及无菌物品储存区、烧伤病房、重症监护病房。I、II类环境要求物体表面的细菌总数 $\leq 5\text{cfu}/\text{cm}^2$ 。

5.10.2.1 地面消毒

医院地面经常受到病人排泄物、呕吐物、分泌物的污染，由于人员的流动量大，如果不能及时清除地面污染，极易造成病原菌的扩散。

(1) 当地面无明显污染情况下，通常采用湿拭清洁，用清水或清洁剂拖地每日 1 次~2 次，清除地面的污秽和部分病原微生物。

(2) 当地面受到病原菌污染时，通常采用含氯消毒剂或二溴海因消毒剂 250mg/L~500mg/L 消毒，作用 30min，致病性芽孢菌污染用 1000mg/L~2000mg/L 作用 30min。

(3) 对结核病人污染的地面，可用 0.2%过氧乙酸或含氯消毒剂或二溴海因消毒液擦洗。对甲类或按甲类管理的传染病病原体污染的地面，如霍乱、炭疽等可用有效氯或有效溴 1000mg/L~2000mg/L 作用 30min 消毒。

5.10.2.2 墙面消毒

医院墙面在一般情况下污染情况轻于地面，通常不需要进行常规消毒。当受到病原菌污染时，可采用化学消毒剂喷雾或擦洗，墙面消毒一般为 2.0m~2.5m 高即可。

对细菌繁殖体、肝炎病毒、芽孢污染者，分别用含有效氯或有效溴 250mg/L~500mg/L、2000mg/L 与 2000 mg/L~3000mg/L 的消毒剂溶液喷雾和擦洗处理，有较好的杀灭效果。喷雾量根据墙面结构不同，以湿润不向下流水为度，一般 50ml/m²~200ml/m²。

5.10.2.3 病房各类用品表面的消毒：病房内用品有桌子、椅子、凳子、床头柜等。一般情况下室内用品表面只进行日常的清洁卫生工作，用清洁的湿抹布，每日 2 次擦拭各种用品的表面，可去除大部分微生物。当室内各种用品的表面受到病原菌的污染时必须及时进行消毒。

(1) 化学消毒：用 250mg/L~500mg/L 含氯或含溴消毒剂溶液擦拭或喷洒室内各种物品表面。

(2) 紫外线灯照射：紫外线灯离污染表面距离≤1m，消毒有效区为灯管周围 1.5m~2m，照射时间根据灯管强度及所杀灭病原微生物而定，时间≥30min。

5.10.2.4 其它表面的消毒

包括病历夹、门把手、水龙头、门窗、洗手池、卫生间、便池等物体表面，这些地方容易受到污染。通常情况下，每天用洁净水擦抹刷洗处理，保持清洁。当受到病原微生物污染时参照 5.10.2.1 与 5.10.2.3 的方法进行。

5.10.2.5 床单位的消毒：

床单位包括病床、床垫、枕芯、毛毯、棉被、床单等。

(1) 化学消毒：采用床单位臭氧消毒器进行消毒，按生产厂家的使用说明书进行操作。

(2) 热力消毒：床单位清洗消毒器可对病床进行清洗和消毒，对床垫、枕芯、毛毯、棉被等进行热力消毒。

5.10.3 III类环境物体表面的消毒

III类环境包括儿科病房、妇产科检查室、注射室、换药室、治疗室、急诊室、化验室、各类普通病房和房间。III类环境要求物体表面的细菌总数≤10cfu/cm²。可以采用以下消毒方法。

5.10.3.1 消毒方法：上述 5.10.2 介绍方法均可采用。

5.10.3.2 喷洒或擦洗：配制 1000mg/L 洗必泰溶液，对各种污染的表面进行喷洒或擦洗。

5.10.3.3 各种物表及台面消毒 治疗室、注射室、换药室、化验室的各种物体表面及台面等每日用 300mg/L~500mg/L 含氯或含溴消毒剂擦拭，湿拖把拖地。

5.10.4 IV类环境物体表面的消毒

IV类环境包括传染病科及病房，IV类环境要求物体表面细菌总数 $\leq 15\text{cfu}/\text{cm}^2$ 。消毒方法参照 5.10.2 方法执行。

5.10.5 检验科污染区的消毒

检验科污染区的各种表面消毒包括：

(1) 桌椅等表面的消毒：每天开始工作前用湿布抹擦一次，地面用湿墩布擦一次，禁用干抹干扫，抹布和墩布等清洁工具各室专用，不得混用，用后洗净晾干。下班前用 250mg/L~500mg/L 含氯或含溴消毒液或 0.1%~0.2% 过氧乙酸抹擦一次。

(2) 各种表面也可用高强度紫外线消毒器距表面 $\leq 1\text{m}$ 照射消毒。

(3) 若被明显污染，如具有传染性的标本或培养物外溢、溅泼或器皿打破、洒落于表面，先尽快清除污物，再立即用消毒液消毒，用 1000mg/L~2000mg/L 有效氯或有效溴溶液，或 0.2%~0.5% 过氧乙酸溶液擦拭污染表面，保持 30min~60min，抹布或拖把用后浸于上述消毒液内 1h。

5.11 餐具和卫生洁具的消毒

5.11.1 适用范围

适用于病人日常生活的一些用品(餐具、脸盆等)，分泌物和排泄物盛具(尿壶、便器、痰杯等)，清洁用具(抹布、拖把等)的消毒。应按照污染程度及潜在危险性，采用清洁或消毒处理。

5.11.2 餐具的清洁和消毒

影响餐具消毒效果的重要因素之一，是清洗的洁净度，这些器具清洗不彻底，留有食物残渣和油腻时，对消毒效果影响很大。为保证餐具的消毒效果，要严格执行一洗，二涮，三冲，四消毒，五保洁的工作程序。

5.11.2.1 配膳室餐具的消毒：餐具用后首先彻底清洗去污再消毒。消毒方法有：

(1) 流通蒸汽消毒 20min (温度为 100℃)；

(2) 煮沸消毒 15 min；

(3) 远红外线消毒箱，温度达到 125℃，维持 15min，消毒后温度应降至 40℃ 以下再开箱，以防止碗盘炸裂；

(4) 自动冲洗消毒洗碗机消毒；

(5) 化学消毒：不具备热力消毒的单位或不能使用热力消毒的食具可采用化学消毒法。

- 1) 含氯制剂: 250mg/L 有效氯消毒液或二氧化氯溶液浸泡 20min ~30 min;
- 2) 含溴制剂: 250mg/L 有效溴的消毒液浸泡 20 min ~30 min
- 3) 过氧化物: 0.1%过氧乙酸溶液浸泡 15 min。

消毒后的餐具不可再用抹布重新擦抹, 应用自来水冲洗, 去除残留消毒剂后, 存放在清洁密封的容器内, 以免再次污染。

5.11.2.2 病人餐具的消毒: 个人专用, 用后清洗干净, 晾干, 自己保存, 儿科病人的餐具应由配膳室收回, 按配膳室餐具清洗、消毒常规处理, 患儿不应自己保管餐具。一次性餐具用后统一收集无害化处理。

5.11.2.3 婴儿奶瓶等消毒: 婴儿奶瓶、盛奶器等奶具清洗干净后, 经压力蒸汽灭菌后备用。奶头用清水冲净, 煮沸消毒。煮沸时间从水沸腾时算起, 不得小于 15min, 干燥贮存, 24h 更换。

消毒处理后的餐具要求: 清洁, 干爽, 无油腻, 无油垢, 无污物, 不得检出大肠菌群、致病菌。

5.11.2.4 传染病人餐具消毒: 传染病区餐具应单独处理, 个人专用。可按下列程序进行:

- (1) 煮沸 15 min ~20 min, 剩余食物煮沸 15min~20 min 后方可弃倒。
- (2) 清洗去污。

(3) 煮沸 30 min 或流通蒸汽消毒 30 min 或 1000mg/L 有效氯消毒液浸泡 30min (消毒后清水冲洗)保存备用。

5.11.3 痰杯(盂)的消毒

5.11.3.1 公用痰盂: 浸泡于 500mg/L 有效氯的含氯消毒液或 500mg/L 有效溴的二溴海因中 30min 冲洗干净, 备用。

5.11.3.2 个人专用痰杯: 根据痰量及时更换, 非一次性痰杯用后洗净, 煮沸消毒 20min 或以 1000mg/L 有效氯或有效溴的消毒液浸泡 30min, 洗净, 干燥保存备用。一次性痰杯用后焚烧。

5.11.4 脸盆的消毒

个人专用, 平时保持清洁, 患者出院后, 先清洗去污后, 浸泡于 500mg/有效氯消毒剂内, 消毒 20min, 取出冲洗干净, 或煮沸消毒 20min, 备用。传染病人脸盆先用 1000mg/L 有效氯浸泡 30min, 取出冲洗干净, 或煮沸消毒 30min, 备用。

5.11.5 便器的消毒

5.11.5.1 手工清洗与消毒

(1) 病房便器: 用毕倒掉粪尿, 有污垢时用清洁剂去污, 清水冲净后, 浸泡于 500mg/L 有效氯或二溴海因消毒液内 30min 取出冲洗干净, 干燥保存备用。

(2) 重症病人便器：个人专用，每次用毕倒掉粪尿，刷洗干净继续使用，每周消毒二次，方法同普通病人便器常规消毒法。

5.11.5.2 自动清洗与消毒

便器用毕倒掉粪尿，放入冲洗消毒器内。程序：清水冲洗，90℃热水冲洗 1min，烘干。传染病人的便器，清水冲洗，90℃热水冲洗 5min，烘干。

5.11.5.4 公用坐式便器：每日用 500mg/L 有效氯或有效溴消毒液抹洗坐板及盖板，便器外表面再用清水冲洗干净。

5.11.6 抹布、墩布的消毒

5.11.6.1 手工清洗与消毒

(1) 擦床抹布：采取一床一巾湿扫法，用后在 250mg/L 有效氯或有效溴消毒液中浸泡消毒 30min，清洗干净，干燥备用。

(2) 用于治疗室、换药室、办公室等抹布：分别使用，不得混用。用后 250mg/L 有效氯或有效溴消毒液浸泡 30min，再用清水洗净，干燥备用。

(3) 墩布：应有明显标记，严格分区使用。

① 一般病室、办公室、治疗室、换药室走廊每次使用后清水冲洗，干燥备用。

② 病室、治疗室、换药室等地面有血液、分泌物、排泄物时，先按有关要求清除污染物，再用浸泡含有 1000mg/L 有效氯或有效溴消毒剂的墩布擦拭，墩布用 500mg/L 有效氯或溴消毒液浸泡 30min 后，清洗干净，干燥备用。

③ 传染病区使用后的墩布，清洗后用 500mg/L 有效氯或有效溴消毒液浸泡 30min，干燥备用。

5.11.6.2 自动清洗与消毒

使用后的抹布、墩布等物品放入清洗机内，水洗、洗涤剂洗、清洗、烘干。做到一床一巾；一桌一布；一室一墩布。

传染病房使用的抹布、墩布应单独清洗与消毒。

5.12 检验相关物品的消毒

5.12.1 适用范围

适用于检验科器材、检验单、废弃标本及相关人员的消毒。检验科的工作场所分为清洁区、半污染区和污染区。清洁区包括办公室、会议室、休息室、储藏室、培养基室和试剂室；半污染区指卫生通道、更衣室、缓冲间；污染区包括标本收集、存放、处理室和检测室。

5.12.2 消毒原则

清洁区、半污染区和污染区应分别进行常规清洁、消毒处理。清洁区和污染区的消毒要求、方法和重点有所不同，若清洁区和污染区无明显界限，按污染区处理。

清洁区若无明显污染，应每天开窗通风换气，湿式清洁台面、地面一次；污染区在每天开始工作前及结束工作后，台面、地面应用含有效氯250mg/L的含氯消毒液各擦拭一次，空气采用循环风动态消毒法消毒处理，废弃标本应分类按照医疗废物管理条例进行处置。半污染区环境消毒同污染区，工作衣、帽每周换洗2次，拖鞋每天用含有效氯或有效溴250 mg/L的含氯消毒剂或二溴海因浸泡或擦拭一次。所有清洁消毒器材（抹布、墩布、容器），各区不得共用。工作人员每次下班前应洗手或卫生手消毒。结核病专业检验室工作人员，每次连续佩戴口罩不得超过4h，工作衣若有明显致病菌污染或从事甲类传染病或按甲类管理的传染病的标本检验后，应随时更换，及时进行消毒灭菌。

5.12.3 检验单的消毒

污染检验单送出前，用便携式高强度紫外线消毒器距检验单面不高于3.0cm缓慢移动，照射3s~5s，必须两面照射；也可用经卫生部批准的专用甲醛消毒器薰蒸消毒。

5.12.4 特殊操作的处理

对污染区内明显产生传染性气溶胶的操作（搅拌、研磨、离心等），特别是可通过呼吸道传播又含有高度传染性微生物（SARS冠状病毒、禽流感病毒、炭疽杆菌、分枝杆菌、球孢子菌、组织胞浆菌、军团菌、流行性感冒病毒等）的操作，应在生物安全柜(负压)内进行，使空气经细菌过滤器或热力杀菌通道排出室外，柜内形成负压。要求严格无菌的操作如倾倒培养基、菌种转种和细胞转瓶等，应在100级洁净间或100级生物安全柜内进行，使空气经初效、中效及高效过滤器进入室（柜）内，形成正压，极大限度地减少污染。但应注意及时更换滤器，定时检测滤效。

5.12.5 器材的消毒

除已知无传染性器材外，凡直接接触或间接接触过临床检验标本的器材均视为具有传染性，应进行消毒处理。

5.12.5.1 金属器材

(1) 小的金属器材如接种环，用酒精灯烧灼灭菌。当接种环上有较多污染物时，应先在火焰上方，把接种环烤干后再缓慢伸入火焰烧灼，以免发生爆裂或溅泼而污染环境；

(2) 较大的金属器材或锐利的刀剪受污染后，不宜烧灼灭菌，可用2%碱性/中性戊二醛溶液浸泡2h后，洁净水冲洗、沥干，再用干热或压力蒸汽灭菌。

5.12.5.2 玻璃器材

(1) 采集标本的器材如玻片、吸管、玻璃瓶要做到一人一份一用一消毒。污染的吸管、试管、

滴管、离心管、玻片、玻棒、玻瓶、平皿等，应立即浸入含有效氯1000mg/L含氯消毒剂中浸泡4h，再清洗干净、烘干。也可浸入洗涤剂或肥皂液中煮沸15min~30min，反复洗刷，沥干，37℃~60℃烘干；

(2) 接种培养过的琼脂平板，应压力蒸汽灭菌，趁热将琼脂倒弃，再刷洗；

(3) 用于生化检验或免疫学检验者，刷洗后浸泡于重铬酸钾—浓硫酸清洁液内24h，彻底冲洗，最后用蒸馏水冲洗3遍，沥干，烘干；

(4) 用于微生物检验者，吸管一端应塞少量棉花，管或瓶应有塞，再用牛皮纸包好，可用于干热160℃2h灭菌，待冷至40℃以下才能开烤箱的门，以免玻璃炸裂；若箱内易燃物品冒烟或发生焦味，应立即切断电源并关闭气孔，切勿开启箱门以免导致燃烧；也可用压力蒸汽121℃, 102.9kPa (1.05kg/cm²) 灭菌15min~30min，吸管应直放，空吸管和空瓶口应朝下，且不能完全密闭，带螺旋帽的管瓶，灭菌时应将螺旋帽放松。

5.12.5.3 塑料制品

(1) 一次性使用的塑料制品使用后应立即放入医疗废物袋集中进行无害化处理；

(2) 耐热的塑料如聚丙烯、聚碳酸酯、尼龙及聚四氟乙烯制的器材，可用肥皂或洗涤剂溶液煮沸15min~30min，洗净后，用压力蒸汽121℃ 102.9Kpa 灭菌20min~30min；

(3) 不耐热的聚乙烯、聚苯乙烯，可用0.5%过氧乙酸或1000mg/L有效氯的溶液浸泡30min~60min，再洗净，晾干；也可用环氧乙烷灭菌器灭菌，800mg/L，于37℃~68℃和相对湿度40%~80%，作用6h；若为薄膜或板也可用高强度紫外线消毒器照射1s~3s。

(4) 一般血清学反应使用过的塑料板可直接浸入1%盐酸溶液内2h以上或过夜；对肝炎检验的反应板可用0.5%过氧乙酸或2000mg/L有效氯或有效溴消毒液浸泡2h~4h后，洗净再用。

5.12.5.4 橡胶制品：橡胶制品如手套、吸液管（球）受污染后可用肥皂或0.5%洗涤剂溶液煮沸15min~30min，煮时吸液管(球)应全部浸入水内，清洗后晾干；必要时再用压力蒸汽，115℃灭菌40min。

5.12.5.5 纺织品：无纺布帽子、工作衣、口罩等用后放污物袋内集中进行无害化处理；棉质工作服、帽子、口罩、鞋套等放专用污物袋内，送洗衣房清洗，每周2次，有明显污染时，可随时用有效氯或有效溴500mg/L的消毒液，作用30 min~60 min，或压力蒸汽121℃20min。

5.12.5.6 贵重仪器

(1) 显微镜、分光光度计、离心机、天秤、酶标检测仪、细胞计数器械、积压液系列化分析仪、气相色谱仪、冰箱、培养箱等局部轻度污染，可用2%碱性或中性戊二醛溶液或0.5%醋酸氯己定-乙醇溶液擦拭；污染严重时，可用环氧乙烷消毒，见3.1.6。

(2) 若离心时离心管未密闭，试管破裂，液体外溢，应消毒离心机内部，特别是有可能受肝炎病毒或分枝杆菌污染时，宜戴上手套用2%碱性或中性戊二醛溶液擦拭消毒，作用30 min~60 min；或整机用环氧乙烷消毒，按照3.1.4的方法进行。

5.12.6 手的消毒

工作前后、或检验同类标本后再检验另一类标本前，均须洗手或卫生手消毒，若手上有伤口，应戴手套接触标本。水龙头应用非手触式开关；肥皂应保持干燥或使用液体肥皂，干手纸巾擦干，不应设置公用擦手巾；

肝炎或结核专业检验室工作人员应戴手套，摘手套后洗手或手消毒。

5.12.7 废弃标本及其容器的消毒处理

(1) 采集检验标本或接触装有检验标本的容器，特别是装有肝炎和结核病的检验标本者，应戴手套，一次性使用的手套用后放收集袋内，按医疗废物处置；可反复使用者用后放消毒液内集中消毒；无手套可用纸套使皮肤不直接与容器表面接触，用后的纸按医疗废物处置；

(2) 夹取标本的工具，如钳、镊、接种环、吸管等用后均应清洁消毒，进行微生物检验时，应重新灭菌，金属工具可烧灼灭菌或消毒液浸泡；玻璃制品可干热或压力蒸汽灭菌；

(3) 废弃标本如胸水、腹水、脑脊液、唾液、胃液、肠液、关节腔液等每100mL加漂白粉5g或二氯异氰尿酸钠2g，搅匀后作用2h~4h 倒入厕所或粪池内；痰、脓、血及其它固形标本，按医疗废物处置或加2倍量漂白粉溶液或二氯异氰尿酸钠溶液，拌匀后作用2h~4h；若为肝炎或结核病者则作用时间应延长至6h后倒厕所或化粪池；

(4) 盛标本的容器，若为一次性使用纸质容器及其外面包被的废纸，按医疗废物处置；对可再次使用的玻璃、塑料或搪瓷容器，可煮沸15min，也可用1000mg/L有效氯的漂白粉澄清液或二氯异氰尿酸钠溶液浸泡2h~6h，消毒液每日更换，消毒后用水洗净或流水刷洗，沥干；用于微生物培养采样者，用压力蒸汽灭菌后备用；

(5) 废弃标本及其容器应有专门密闭不漏水的污物袋（箱）存放，专人集中、消毒或按医疗废物处理，每天至少处理一次。

5.13 织物的消毒

5.13.1 适用范围

适用于医疗机构织物的消毒。包括全院病人衣服、被单和医护人员的一般工作服清洗消毒工作，但不负责手术衣和隔离衣的灭菌。

洗衣房分为污染区包括收集、分检、清点、处理及清洗衣服、被单的区域及清洁区包括供晾或烘干、缝补、熨烫、摺叠、储存及发送洗净衣被和办公的区域。污染衣被未经洗涤不得进入清

洁通道及清洁区，各区受污染程度不同，消毒方法也有所不同。

5.13.2 衣被收集袋和接送车的清洁与消毒

5.13.2.1 衣被收集袋：每个病区应有3个衣被收集袋，分别收放有明显污染的病人衣被、一般病人衣被及医护人员的工作衣服、帽子和口罩。衣被收集袋应保持密闭直至清洗。也可定时、限时收集工作人员衣物，及时发送至洗衣房。衣被收集袋应定期清洗与消毒，遇污染时及时进行清洗与消毒。一次性使用衣被收集袋主要用于收集特殊感染或传染病病人的衣被，用后按医疗废物处置。非一次性者用1%洗涤剂，90℃以上热水在洗衣机中消毒25min。

5.13.2.2 污染推车与清洁推车：接送衣被均用推车，洗衣房有污染推车与清洁推车，分别用于接衣与送衣，接衣后及送衣前的推车均应用清水或1%洗涤剂溶液擦拭一次；接运传染病房、结核病房、烧伤病房及有明显污染衣被后的推车应用0.5%过氧乙酸或500mg/L有效氯或有效溴消毒液擦拭消毒；也可用500mg/L二氧化氯溶液擦拭。

5.13.2.3 注意事项：严禁在病房内清点或处理传染病人特别是肝炎、结核病人及传染性物质所污染的衣被；甲类或按甲类管理的传染病人的衣服应先消毒或灭菌后，再送洗衣房洗涤，或使用一次性物品，用后按医疗废物处置。清点传染病人衣被的工作人员应戴手套和口罩，穿工作衣。

5.13.3 衣被的洗涤与消毒

病人衣被和医护人员的工作服应分机或分批洗涤。婴儿衣被应单独洗涤，不可与其它衣被混洗。根据衣被受污染程度可分别用专机洗涤，特别是传染病人（肝炎、结核等）、烧伤病人的衣服应专机洗涤，无条件时也应先洗工作人员的工作服、帽子和口罩，再洗一般病人衣被、污染衣被，最后洗传染性病人、烧伤病人的衣被。

5.13.3.1 一般衣被的洗涤消毒：一般衣被指无明显污染及无传染性的衣被，将衣被收集袋打开，棉质衣被用1%消毒洗涤剂70℃以上温度（化纤衣被只宜40℃～45℃）在洗衣机内洗25min，再用清水漂洗。

5.13.3.2 传染病房和烧伤病房的衣被：应用含二氧化氯或有效氯500mg/L的消毒洗衣粉溶液洗涤30 min～60 min，然后用清水漂净。

5.13.3.3 有传染性的衣被：有明显血、脓、便污染的衣被，视为传染性的衣被。在用热水洗涤前，先用冷洗涤剂或1%～2%冷碱水将血、脓、便等有机物洗净，再按3.13.3.2洗涤消毒。

5.13.3.4 衣被储存：衣被应烘干、熨烫、摺叠后储存。工作人员、病人和新生儿、婴儿衣被应分置储存。

5.13.4 洗衣池（机）的消毒

洗衣池（机）洗衣后，特别是洗可能有传染性的衣被后，应用90℃以上的热水或消毒剂消毒。

5.13.5 洗衣房的环境清洁与消毒

5.13.5.1 洗衣房污染区的清洁消毒：保持良好通风，下班时污染区地面用0.2%过氧乙酸溶液或含有效氯或有效溴500g/L的消毒剂溶液拖地一次。

5.13.5.2 洗衣房清洁区的保洁：保持开窗通风，清水擦拭桌、椅、工作台面、地面，保持清洁。下班时关闭门窗，减少灰尘和风沙，地面用清水拖擦一次。

5.13.6 洗衣房人员的卫生

洗衣房工作人员工作前后，特别是处理了污染衣被或具有传染性的衣被后，应洗手或卫生手消毒；摘手套后洗手或手消毒。污染区的工作人员工作时应穿工作服，每天换洗一次，工作完后脱下工作服。下班前应进行淋浴。熨烫、折叠衣被的工作人员不能患有化脓性皮肤病。

5.14 污水的消毒处理

5.14.1 适用范围

适用于医院污水和污泥的消毒处理。

5.14.2 医院污水处理原则

国家环境保护总局2003年《医院污水处理技术指南》规定：

5.14.2.1 全过程控制原则：对医院污水产生、处理、排放的全过程进行控制。

5.14.2.2 减量化原则：严格医院内部卫生安全管理体系，在污水和污物发生源处进行严格控制和分离，医院内生活污水与病区污水分别收集，即源头控制、清污分流。

严禁将医院的污水和污物随意弃置排入下水道。

5.14.2.3 就地处理原则：为防止医院污水输送过程中的污染与危害，在医院必须就地处理。

5.14.2.4 分类指导原则：根据医院性质、规模、污水排放去向和地区差异对医院污水处理进行分类指导。

5.14.2.5 达标与风险控制相结合原则：全面考虑综合性医院和传染病医院污水达标排放的基本要求，同时加强风险控制意识，从工艺技术、工程建设和监督管理等方面提高应对突发性事件的能力。

5.14.2.6 生态安全原则：有效去除污水中有毒有害物质，减少处理过程中消毒副产物产生和控制出水中过高余氯，保护生态环境安全。

5.14.3 污水处理站

医院污水处理一般应建造污水处理站（小型医院污水处理不需要，建消毒池即可）。污水处理站通常由设备间、控制室、泵房、贮药间、休息室、化验室和厕所、浴室等组成；处理构筑物

根据处理工艺不同有格栅池、集水井、调节池、定量池、消毒池、沉淀池、生化池、污泥池等组成。处理站位置的选择应根据医院总体规划、排出口位置、环境卫生要求、风向、工程地质及维护管理和运输等因素来确定，应按有关规定进行规划和建设。

5.14.4 污水处理工艺

5.14.4.1 工艺选择原则

医院污水处理所用工艺必须确保处理出水达标，主要采用的三种工艺有：加强处理效果的一级处理、二级处理和简易生化处理。

(1) 传染病医院必须采用二级处理，并需进行预消毒处理。

(2) 处理出水排入自然水体的县及县以上医院必须采用二级处理。

(3) 处理出水排入城市下水道(下游设有二级污水处理厂)的综合医院推荐采用二级处理，对采用一级处理工艺的必须加强处理效果。

(4) 对于经济不发达地区的小型综合医院，条件不具备时可采用简易生化处理作为过渡处理措施，之后逐步实现二级处理或加强处理效果的一级处理。

5.14.4.2 加强处理效果的一级处理工艺

(1) 对现有一级处理工艺进行加强处理效果的改造：改造应根据实际情况，充分利用现有处理设施，对现有医院中应用较多的化粪池、接触池在结构或运行方式上进行改造，必要时增设部分设施，尽可能地提高处理效果，以达到医院污水处理的排放标准。

(2) 一级强化处理：对于综合医院(不带传染病房)的污水处理可采用“预处理→一级强化处理→消毒”的工艺。通过混凝沉淀(过滤)去除携带病毒、病菌的颗粒物，提高消毒效果并降低消毒剂的用量，从而避免消毒剂用量过大对环境产生的不良影响。医院污水经化粪池进入调节池，调节池前部设置自动格栅，调节池内设提升水泵。污水经提升后进入混凝沉淀池进行混凝沉淀，沉淀池出水进入接触池进行消毒，接触池出水达标排放。调节池、混凝沉淀池、接触池的污泥及栅渣等污水处理站内产生的垃圾集中消毒外运。消毒可采用巴氏蒸汽消毒或投加石灰等方式。

5.14.4.3 二级处理工艺

(1) 二级处理工艺流程为“调节池→生物氧化→接触消毒”。医院污水通过化粪池进入调节池。调节池前部设置自动格栅。调节池内设提升水泵，污水经提升后进入好氧池进行生物处理，好氧池出水进入接触池消毒，出水达标排放。调节池、生化处理池、接触池的污泥及栅渣等污水处理站内产生的垃圾集中消毒外运焚烧。消毒可采用巴氏蒸汽消毒或投加石灰等方式。

(2) 传染病医院的污水和粪便宜分别收集。生活污水直接进入预消毒池进行消毒处理后进入调节池，病人的粪便应先独立消毒后，通过下水道进入化粪池或单独处理(如虚线所示)。各

构筑物须在密闭的环境中运行，通过统一的通风系统进行换气，废气通过消毒后排放，消毒可采用紫外线消毒系统。

5.14.4.4 简易生化处理工艺

简易生化处理工艺的流程为“沼气净化池→消毒”。沼气净化池分为固液分离区、厌氧滤池和沉淀过滤区。三区的主要功能分别为去除悬浮固体，吸附胶体和溶解性物质，进一步去除和降解有机污染物，最后通过沉淀和过滤单元去除剩余悬浮物和降解有机污染物，保证出水质量。所产生沼气根据气量大小作不同的处理，当 1m^3 污泥制取沼气达 15m^3 以上时，收集利用；当 1m^3 污泥制取沼气不足 15m^3 时，收集燃烧处理。

5.14.5 污水的消毒

医院污水消毒是医院污水处理的重要工艺过程，其目的是杀灭污水中的各种致病菌。医院污水消毒常用的消毒工艺有氯消毒(如氯气、二氧化氯、次氯酸钠)、氧化剂消毒(如臭氧、过氧乙酸)、辐射消毒(如紫外线、 γ 射线)。

5.14.5.1 氯及二氧化氯消毒

(1) 氯消毒接触池：

- 1) 医院污水消毒按运行方式可分为连续消毒和间歇消毒两种方式。
- 2) 接触消毒池的容积应满足接触时间和污泥沉积的要求。传染病医院污水接触时间不宜小于1.5小时，综合医院污水接触时间不宜小于1.0小时。
- 3) 连续式消毒的接触池有效容积为污水部分容积和污泥部分容积之和。
- 4) 间歇式消毒时，接触池的总有效容积应根据工作班次、消毒周期确定，一般宜为调节池容积的1/2。
- 5) 接触消毒池一般分为两格，每格容积为总容积的一半。池内应设导流墙(板)，避免短流。导流墙(板)的净距应根据水量和维修空间要求确定，一般为600mm~700mm。接触池的长度和宽度比不宜小于20:1。接触池出口处应设取样口。
- 6) 设计时应按设计选定的处理工艺流程的实际运行情况，按最不利情况进行组合，校核实际接触时间，以满足设计要求。

(2) 氯消毒设计要点

当污水采用氯消毒工艺时，其设计加氯量可按下列数据确定：

- 1) 液氯消毒系统参照《室外排水设计规范》GBJ14-87有关章节进行设计。
- 2) 加强处理效果的一级处理出水的设计加氯量以有效氯计，一般为30-50mg/L。
- 3) 二级处理出水的设计参考加氯量一般为10-15 mg (有效氯) /L。

- 4) 当污水采用其他方法消毒时，其设计投加量应根据具体水质确定。
- 5) 加药设备至少为 2 套，1 用 1 备。
- 6) 氯投加量为参考值，运行中应根据余氯量和实际水质水量实验确定投加量。

5.14.5.2 臭氧消毒

臭氧在水中产生氧化能力极强的单原子氧(O)和羟基(OH)，羟基(OH)对各种致病微生物有极强的杀灭作用，单原子氧(O)具有强氧化能力，对各种病毒、细菌均有很强的杀灭能力。臭氧制备法有电晕放电法、紫外线法、化学法和辐射法等，工程一般采用电晕放电法。

(1) 医院污水臭氧处理站应设置空压机房、臭氧发生器设备间和操作间。空压机房安放空压机，空压机应防震和防止噪声。臭氧发生器间应留有设备检修空间。臭氧接触塔在寒冷地区应设在室内，尾气处理后设排气管排出室外。

(2) 医院污水消毒的主要工艺参数如表 5-3 所示。

表 5-3 医院污水臭氧消毒的主要工艺参数

项 目	一级处理出水	二级处理出水
臭氧投加量/mg·L ⁻¹	30~50	10~20
接触时间/min	30	5~15
大肠菌去除率/%	99.99	99.99

(3) 在选择臭氧发生器时，要根据污水水质及处理工艺确定臭氧投加量，再根据臭氧投加量和单位时间处理水量确定臭氧使用量，按每小时使用臭氧量选择臭氧发生器台数及型号。

(4) 臭氧与污水接触方式一般采用鼓泡法，气泡分散越小，臭氧利用率越高，消毒效果越好。因此要选择气水混合效果好的臭氧进气装置。

(5) 臭氧系统设备管道应做防腐处理与密封。

(6) 臭氧设备间应设置通风设备，通风机应安装在靠近地面处。

(7) 在工艺末端必须设置尾气处理或尾气回收装置，反应后排出的臭氧尾气必须经过分解破坏或回收利用，达到排放标准。

5.14.5.3 紫外线消毒

污水紫外线消毒技术是利用特殊设计的高功率、高强度和长寿命的 C 波段紫外光发生装置产生的强紫外光照射流水，使水中的各种细菌、病毒、寄生虫、水藻以及其他病原体受到一定剂量的紫外 C 光辐射后，其细胞组织中的 DNA 结构受到破坏而失去活性，从而杀灭水中的细菌、病毒以及其它致病体，达到消毒杀菌和净化的目的。紫外线杀菌速度快，效果好，不产生任何二次污

染。但要求水中悬浮物浓度较低，以保证良好的透光性。

(1) 采用紫外线消毒时要求被处理的水中悬浮物浓度 $<10\text{mg/L}$ ，在此条件下推荐的照射强度为 $25\text{--}30\mu\text{W/cm}^2$ ，照射时间 $>10\text{s}$ 。

(2) 紫外线消毒系统可采用明渠型或封闭型。相对而言，明渠型比封闭型更容易监测和维护，对水流阻力也小。

(3) 紫外系统内还应包括清洗设施。医院污水应采用设置自动清洗装置。

(4) 紫外系统用于医院污水处理过程中排放的气体消毒时，采用循环式紫外空气消毒装置。

(5) 紫外灯管应专业回收。

5.14.6 污水排放标准

本节参照《GB 18466-2005 医疗机构水污染物排放标准》执行。

5.14.6.1 医疗卫生机构污水的排放质量

(1) 传染病和结核病医疗机构污水排放执行表 5-4 的规定。

(2) 县级及县级以上或 20 张床位及以上的综合医疗机构和其他医疗机构污水排放执行表 5-5 的规定。直接或间接排入地表水体和海域的污水执行排放标准，排入终端已建有正常运行城镇二级污水处理厂的下水道的污水，执行预处理标准。

(3) 县级以下或 20 张床位以下的综合医疗机构和其他所有医疗机构污水经消毒处理后方可排放。

(4) 禁止向 GB 3838 I、II 类水域和 III 类水域的饮用水保护区和游泳区，GB3097 一、二类海域直接排放医疗机构污水。

(5) 带传染病的综合医疗机构，应将传染病房污水与非传染病房污水分开。传染病房的污水、粪便经过消毒后方可与其他污水合并处理。

(6) 采用含氯消毒剂进行消毒的医疗机构污水，若直接排入地表水体和海域，应进行脱氯处理，使总余氯小于 0.5mg/L 。

表 5-4 传染病、结核病医疗机构水污染物排放限值（日均值）

序号	控制项目	标准值
1	粪大肠菌群数 (MPN/L)	100
2	肠道致病菌	不得检出
3	肠道病毒	不得检出
4	结核杆菌	不得检出
5	pH	6-9

6	化学需氧量 (COD)	
	浓度 (mg/L)	60
	最高允许排放负荷 (g/床位)	60
7	生化需氧量 (BOD)	
	浓度 (mg/L)	20
	最高允许排放负荷 (g/床位)	20
8	悬浮物 (SS)	
	浓度 (mg/L)	20
	最高允许排放负荷 (g/床位)	20
9	氨氮 (mg/L)	15
10	动植物油 (mg/L)	5
11	石油类 (mg/L)	5
12	阴离子表面活性剂 (mg/L)	5
13	色度 (稀释倍数)	30
14	挥发酚 (mg/L)	0.5
15	总氰化物 (mg/L)	0.5
16	总汞 (mg/L)	0.05
17	总镉 (mg/L)	0.1
18	总铬 (mg/L)	1.5
19	六价铬 (mg/L)	0.5
20	总砷 (mg/L)	0.5
21	总铅 (mg/L)	1.0
22	总银 (mg/L)	0.5
23	总A (Bq/L)	1
24	总B (Bq/L)	10
25	总余氯 ^{1) 2)} (mg/L)	0.5
(直接排入水体的要求)		
注: 1) 采用含氯消毒剂消毒的工艺控制要求为: 消毒接触池的接触时间 ≥ 1.5 h, 接触池出口总余氯 6.5-10 mg/L。		
2) 采用其他消毒剂对总余氯不作要求。		

表 5-5 综合医疗机构和其他医疗机构水污染物排放限值 (日均值)

序号	控制项目	排放标准	预处理标准
1	粪大肠菌群数 (MPN/L)	500	5000
2	肠道致病菌	不得检出	-
3	肠道病毒	不得检出	-
4	pH	6-9	6-9
5	化学需氧量 (COD)		
	浓度 (mg/L)	60	250
	最高允许排放负荷 (g/床位)	60	250

6	生化需氧量 (BOD)		
	浓度 (mg/L)	20	100
	最高允许排放负荷 (g/床位)	20	100
7	悬浮物 (SS)		
	浓度 (mg/L)	20	60
	最高允许排放负荷 (g/床位)	20	60
8	氨氮 (mg/L)	15	-
9	动植物油 (mg/L)	5	20
10	石油类 (mg/L)	5	20
11	阴离子表面活性剂 (mg/L)	5	10
12	色度 (稀释倍数)	30	-
13	挥发酚 (mg/L)	0.5	1.0
14	总氰化物 (mg/L)	0.5	0.5
15	总汞 (mg/L)	0.05	0.05
16	总镉 (mg/L)	0.1	0.1
17	总铬 (mg/L)	1.5	1.5
18	六价铬 (mg/L)	0.5	0.5
19	总砷 (mg/L)	0.5	0.5
20	总铅 (mg/L)	1.0	1.0
21	总银 (mg/L)	0.5	0.5
22	总A (Bq/L)	1	1
23	总B (Bq/L)	10	10
24	总余氯 ^{1) 2)} (mg/L)	0.5	-
注：1) 采用含氯消毒剂消毒的工艺控制要求为： 一级标准：消毒接触池接触时间 $\geq 1\text{h}$ ，接触池出口总余氯 3-10 mg/L。 二级标准：消毒接触池接触时间 $\geq 1\text{h}$ ，接触池出口总余氯 2-8 mg/L。 2) 采用其他消毒剂对总余氯不作要求。			

5.14.7 医院污泥处理

5.14.7.1 污泥处理工艺流程

污泥处理工艺以污泥消毒和污泥脱水为主。水处理工艺产生的剩余污泥在污泥消毒池内，投加石灰或漂白粉作为消毒剂进行消毒。若污泥量很小，则消毒污泥可排入化粪池进行贮存；污泥量大，则消毒污泥需经脱水后封装外运，作为危险废物进行焚烧处理。处理放射性污水的化粪池或处理池每半年清掏一次，清掏前应监测其放射性达标方可处置。

5.14.7.2 污泥消毒

(1) 污泥首先在消毒池或储泥池中进行消毒，消毒池或储泥池池容不小于处理系统 24h 产泥量，但不宜小于 1m^3 。储泥池内需采取搅拌措施，以利于污泥加药消毒。

(2) 每天湿污泥产量小于 2m^3 的医院污水处理系统，污泥可在消毒后排入化粪池，此时化粪

池的容积应考虑到此部分的污泥量。每天湿污泥产量大于 2m³ 的医院污水处理系统，污泥可在消毒后进行脱水。

(3) 污泥消毒的最主要目的是杀灭致病菌，避免二次污染，可以通过化学消毒的方式实现。化学消毒法常使用石灰和漂白粉。

1) 石灰投量每升污泥约为 15g，使污泥 pH 达 11-12，充分搅拌均匀后保持接触 30 min -60min，并存放 7 天以上。

2) 漂白粉投加量约为泥量的 10%-15%。

3) 有条件的地区可采用紫外线辐照消毒。

5.14.7.3 污泥脱水

(1) 污泥脱水的目的是降低污泥含水率，脱水过程必须考虑密封和气体处理。

(2) 污泥脱水宜采用离心脱水机。离心分离前的污泥调质一般采用有机或无机药剂进行化学调质。

(3) 脱水后的污泥应密闭封装、运输。

5.14.7.4 污泥的最终处置

污泥根据国家环境保护总局危险废物分类，属于危险废物的范畴，应按医疗废物处理要求进行无害化处置。

5.14.7.5 污泥的监测

污泥清淘前应进行监测，达到表 5—6 要求。

表 5—6 医疗机构污泥控制标准

医疗机构类别	粪大肠菌群数 (MPN/g)	肠道致病菌	肠道病毒	结核杆菌	蛔虫卵死亡率 (%)
传染病医疗机构	≤100	不得检出	不得检出	—	>95
结核病医疗机构	≤100	—	—	不得检出	>95
综合医疗机构和 其它医疗机构	≤100	—	—	—	>95

5.15 污物的消毒处理

5.15.1 适用范围

本节所称“污物”是指医疗卫生机构在诊断、治疗、卫生处理过程中产生的废物和患者生活过程中产生的排泄物及垃圾，这些废物均有病原微生物污染的可能，也可能对公众健康造成危害，本节规范主要提供了对污物—消毒的方法和要求，也对医疗卫生机构产生的其他有害废物的处理

提供了方法。

5.15.2 污物的分类

医院的大部分废物是没有危害的普通垃圾，不需特别处理；但一旦这些没有危害性的垃圾与其他具有危害性的或传染性的污物混合在一起，就需特殊的搬运和处理。因此对医院污物进行分类是医院污物有效处理的前提。

5.15.2.1 生活垃圾：在医疗卫生机构的管理、建筑物的维修中产生，按城市垃圾处理原则进行处理。

5.15.2.2 感染性废物：指可能含有病原菌（细菌、病毒、寄生虫或真菌）的废物，其浓度和数量足以对人致病。主要包括以下几类：

- （1）实验室所用的菌落及病原株培养基和保菌液；
- （2）传染病人手术或尸解后的废物如组织、污染的材料和仪器等；
- （3）来自传染病房的废物，如排泄物、手术或感染伤口的敷料、严重污染的衣服；
- （4）传染病人血透析中产生的废物，如透析设备、试管、过滤器、围裙、手套等；
- （5）实验室感染的动物；
- （6）传染病人或动物接触过的任何其他设备和材料。
- （7）使用过的一次性注射器、输液器、输血器等废物。

5.15.2.3 病理性废物：包括组织、器官、部分躯体、死胎和动物尸体、血液、体液。

5.15.2.4 锋利物（锐器）：指能对人扎伤或割伤的物体，包括针头、皮下注射针、解剖刀、手术刀、输液器、手术锯、碎玻璃及钉子。

5.15.2.5 药物性废物：包括过期、被淘汰、压碎或污染的药品、疫苗、血清。

3.15.2.6 遗传毒性废物：包括已明确的抑制细胞的药物，化学或放射治疗病人的呕吐物、尿或粪便。如苯、环孢霉素、环磷酰胺等。细胞毒性药物是这类废物中的主要物质，能杀死或阻碍特定细胞的生长，用于肿瘤的化疗及在器官移植、免疫性疾病的治疗中作为免疫抑制剂。

5.15.2.7 化学性废物：在诊断、试验、清洁、管理、消毒过程中产生的，具有毒性、腐蚀性、易燃性、反应性或遗传毒性的固体、液体、气体。如甲醛、摄影用剂、有机化合物等。

5.15.2.8 放射性废物：包括被放射性核素污染了的固体、液体和气体。如低活度的固体废物（吸收纸、拖把、玻璃器皿、注射器、小药皿）、放置放射性物质容器内的残余物、诊断剂。

5.15.3 污物的处理原则

5.15.3.1 分类收集原则：减少有害有毒废物和带传染性废物的数量，有利废物的回收利用和处理。

5.15.3.2 回收利用原则：避免浪费。

5.15.3.3 减量化原则：通过重复利用、破碎、压缩、焚烧等手段减少固体废物的体积和数量。

5.15.3.4 无公害原则：废物处理必须遵守环保及卫生法规标准要求。

5.15.3.5 分散与集中处理相结合的原则：分类收集的废物分别进行处理。

5.15.4 污物的收集

5.15.4.1 分类收集

(1) 设置三种以上颜色的污物袋，黑色袋装生活垃圾，黄色袋装医疗废物，放射性废物和其他特殊的废物使用有特殊标志的污物袋进行收集。使用的污物袋应坚韧耐用、不漏水，并首选可降解塑料制成的污物袋。

(2) 医院应建立严格的污物分类收集制度，所有废物都应放入标有相应颜色的污物袋（桶）中，应及时清运或在装满 3/4 时有人负责封袋运送。

(3) 锐器不应与其他废物混放，用后必须稳妥安全地置入锐器容器中。高危区的医院废物建议使用双层污物袋，并及时密封。放射性废物应存放在适当的容器中防止扩散。

(4) 分散的污物袋要定期收集集中。污物袋应每日运出病房或科室，也可根据需要决定搬运时间，并运往指定的收集地点。不能移动未标明废物产生地及废物种类的污物袋（箱），应立即补充上新的同类的污物袋（箱），以供使用。应防止污物袋（箱）的泄漏。

5.15.4.2 医院中心废物存放地

(1) 污物袋（箱）在就地处理或异地处理之前，要集中存放在医院中心废物存放地，有害废物和普通垃圾要分开存放，并有明显标识。

(2) 存放地应有遮盖设施，防止污染周围环境；设有冲洗及消毒设施，清洗过程的废水应排入医院污水系统。

5.15.5 感染性废物的消毒处理

5.15.5.1 液体污物：主要指患者吃过的剩饭剩菜、排泄物、呕吐物等。

(1) 可作动物饲料的剩饭剩菜，须煮沸 30min 后才能运出；

(2) 没有利用价值的剩饭剩菜和排泄物、呕吐物，加 1/5 量的漂白粉，搅匀后作用 2h，倒入专用化粪池或运出；

(3) 特殊传染病病人的排泄物、呕吐物参照 5.15.5.3~5.15.5.8 执行。

5.15.5.2 固体污物

(1) 无利用价值的可燃性污物，在条件允许的情况下可采用焚烧处理。

(2) 非可燃性固体污物应先消毒，然后根据物品的再利用价值，送废旧物品收购站或城市

垃圾处理站。消毒方法可选用含有效氯或有效溴 500mg/L~1000mg/L 的消毒液、含 1000mg/L~2000mg/L 二氧化氯的消毒液或 0.5%过氧乙酸消毒液浸泡 60min。

5.15.5.3 感染症病人污物的消毒处理

(1) 病人的粪便加 2 倍量 10%~20%漂白粉乳液；呕吐物加 1/5 量干漂白粉，搅匀后加盖作用 2h，再倒入厕所。

(2) 伤寒病人的尿液每 100ml 加漂白粉 3g，搅匀后加盖，作用 2h。

(3) 患者使用过的便器用 1%漂白粉上清液、含有效氯 2000 mg/L 的消毒液、0.5%过氧乙酸浸泡 30min。

(4) 结核病人的痰盒收集后焚烧；也可加等量 10%~20%漂白粉乳液（或 1/5 量的干粉），作用 2h~4h 或加等量 1%过氧乙酸作用 30 min~60min。

(5) 无经济价值的可燃性污物采用焚烧处理。

5.15.5.4 炭疽病人污物的消毒处理

(1) 尽可能都采用焚烧处理。不能焚烧的，用含有效氯或有效溴 2000mg/L 的消毒液或 2%戊二醛浸泡、擦拭 30 min~60min。

(2) 肠炭疽病人排泄物按 5.15.5.3 (1) 处理，但作用时间需延长至 6h；病人所用便器按 5.15.5.3 (3) 处理，但使用药物浓度应加倍。

5.15.5.5 艾滋病病人污物的消毒处理

(1) 无经济价值的可燃性污物采用焚烧处理。

(2) 病毒携带者和病人分泌物、排泄物用 20%漂白粉乳液 1:2 混合后作用 2h。

(3) 液体污物可煮沸 30min；也可加入含氯消毒剂（使混合液中有效氯达到 1000mg/L）、或过氧乙酸（使混合液中达到 5000mg/L）作用 30min。

5.15.6 一次性使用注射器、输液器、输血器等使用后的处理

使用过的一次性使用注射器、输液器和输血器等物品按医疗废物处置。

5.15.7 放射性废物的处理

5.15.7.1 存放要求：盛放固体废物的容器应在里面衬以耐用的透明塑料袋，可以用胶带或加热密封。液态废物应根据废物的化学和放射性质、体积、处理和贮存方法来选择合适的容器。衰竭的放射源应保存在防护层下。

5.15.7.2 放射性废液

(1) 使用放射性核素量比较大、产生污水比较多的核医学单位，必须有废水专用处理装置或分隔污水池，以存放和排放废水。

(2) 产生放射性核素废液而无废水池的单位, 应将废液注入容器存放 10 个半衰期后, 排入下水道系统。如废液含长半衰期核素, 可先固化, 然后按固体放射性废物进行处理。

(3) 放射性浓度不超过 $1 \times 10^4 \text{Bq/L}$ 的废闪烁液, 或仅含有浓度不超过 $1 \times 10^5 \text{Bq/L}$ 的 ^3H 或 ^{14}C 的废闪烁液, 可按一般废物进行处理。

(4) 对使用放射性药物进行治疗病人的排泄物应实施统一收集和处理。对专用化粪池内的排泄物应贮存 10 个半衰期后排入下水道系统; 对无专用化粪池的单位, 应为病人提供具有辐射防护性能的尿液、粪便收集器, 最初几天的收集物存放 10 个半衰期后作一般废物处理; 对收集含有 ^{131}I 病人排泄物时, 必须同时加入 NaOH 或 10%KI 溶液后密封存放待处理。

(5) 对同时含有病原微生物的病人排泄物, 应备有专用容器单独收集, 经存放衰变、消毒处理后, 排入下水道系统。

5.15.7.3 固体废物的处理

(1) 废物袋、废物包、废物桶及其他存放废物的容器必须在显著位置标有废物类型、核素种类、比活度范围和存放日期的说明。

(2) 内装注射器及碎玻璃等物品的废物袋应附加外套。

(3) 焚化可燃性固体废物必须在具备焚烧放射性条件的焚化炉内进行。

(4) 同时污染有病原微生物的固体废物, 必须先消毒, 然后按固体放射性废物进行处理。

(5) GBq 量级以下且失去使用价值的废弃密封放射源, 必须在具备足够外照射屏蔽能力的设施里存放、待处理。

(6) 比活度小于或等于 $7.4 \times 10^4 \text{Bq/Kg}$ 的医用废物, 或废物经衰变比活度小于 $7.4 \times 10^4 \text{Bq/Kg}$ 以下后, 即可按一般废物进行处理。

(7) 如果可能的话, 将废弃的密封放射源退换给供应商, 或向当地环境保护部门提出申请, 要求处置放射源。

5.15.8 锋利物的处理

锋利物品应尽量焚化, 并且可以和其他感染性废物一起焚化处理。

5.15.9 遗传毒性废物的处理

(1) 返还给供应商;

(2) 高温焚化: 应采用双室热解焚化炉, 最高温度应达到 1200°C 以上。

(3) 对环磷酰胺、异环磷酰胺、硫酸长春新碱等可采用化学降解法。

(4) 也可选择封存或使之自动失效的方法处理。

5.15.10 药物性废物的处理

(1) 少量药物性废物：选择填埋、封存处理，也可和感染性垃圾一起焚化处理。

(2) 大量药物性废物：首选焚化；也可封存后在卫生填埋点处置。静脉注射液可采用排入下水道或填埋方式处置；玻璃安瓿不能焚化处理，可以先压碎，然后与锋利物品一起处理。

5.15.11 化学性废物的处理

(1) 一般的化学性废物，如糖、氨基酸和特定的盐类，可以与市政垃圾一起处置，或者排入下水道。

(2) 少量的危险化学性废物：如包装内的残留化学物，可采用热解焚化炉、封存或填埋处理。

(3) 大量的危险化学性废物：可返还给供应商；某些可燃性的可采用焚化处理（含大量卤代有机溶剂的不能焚化处理）；也可采用化学法处理；但不能排入下水道系统，也不能采取封存或填埋方法处理。

5.16 尸体及其相关环境的消毒

5.16.1 适用范围

适用于尸体及其衣物、尸体运载工具、冷藏箱以及停尸房的空气、台面、地面、门等的消毒。

5.16.2 尸体的清洁与消毒

5.16.2.1 普通病人的死亡尸体：以清水擦洗即可。

5.16.2.2 肝炎、结核、艾滋病等一般传染病死亡尸体：以 1500mg/L 有效氯的含氯消毒剂擦拭或喷洒，消毒滞留 30min~60min；或用 0.2%~0.5% 过氧乙酸擦拭或喷洒滞留 15min~30min。

5.16.2.3 霍乱、鼠疫等甲类传染病及按甲类传染病管理的病人的死亡尸体：应立即消毒，以浸有 2000mg/L~3000mg/L 有效氯的含氯消毒剂或 0.5% 过氧乙酸棉球将口、鼻、肛门、阴道等开放处堵塞；并以浸有上述浓度消毒液的被单包裹尸体后装入不透水的塑料袋内，密封就近焚烧。剧毒体病死者尸体以同样方法处理，但消毒剂改用 1mol/L 的 NaOH 液。

5.16.3 死者衣物的消毒

5.16.3.1 处理原则：首选焚烧方法，传染病死者衣服及有明显脓、血、分泌物污染的衣物应放置于防渗漏的容器内送焚烧；有保存价值的衣物或家属不同意焚烧者，则依据衣物质地、颜色选择对其无损害的方法进行消毒。

5.16.3.2 非传染病死者或抵抗力弱的病原所致的感染病死者衣物的消毒

(1) 日光消毒：在直射阳光下暴晒 3h~6h，消毒时应经常翻动，以便受到均匀照射。本方法适用于非传染病死者或抵抗力弱的病原所致的感染病死者的衣物

(2) 煮沸消毒：耐热、耐湿等棉织物在 0.5% 肥皂液中浸透后，煮沸 30min。注意水要浸没

衣物，并经常搅动。

(3) 含氯消毒剂浸泡：500mg/L 有效氯的含氯消毒剂浸泡 30min。清水漂洗后再晾干。适用于耐漂白材料衣物的消毒。

(4) 环氧乙烷灭菌：环氧乙烷浓度 800mg/L、温度 54℃±2℃、相对湿度 60%~80%，作用 4h。适用于毛织品、皮制品等。

5.16.3.3 传染病死者或抵抗力强的病原所致的感染病死者衣物的消毒

(1) 过氧乙酸熏蒸：用量 3g/m³，20℃作用 60min，如温度低可加热升高温度。将衣物展开、悬挂熏蒸。用于不能煮沸浸泡的毛织品、皮制品等。

(2) 环氧乙烷灭菌：环氧乙烷浓度 800mg/L、温度 54℃±2℃、相对湿度 60%~80%，作用 4h。适用于毛织品、皮制品等。

(3) 压力蒸汽灭菌：耐热耐湿服装入布袋中置压力蒸汽灭菌器内，121℃消毒 30min。布袋体积不得超过 30cm×30cm×25cm。

5.16.4 尸体运载工具的消毒

5.16.4.1 搬运尸体的担架、推车等：用具尽量专用，用后及时消毒处理，一般采用擦拭、喷雾、熏蒸等消毒方法；分别按 5.1.7.2、5.1.7.6、5.9.4.4 处理。

5.16.4.2 注意事项：用以上方法消毒处理时，金属部位及时用清水擦洗，以防腐蝕。

5.16.5 尸体冷藏箱、停尸台的消毒

5.16.5.1 尸体冷藏箱、停尸台的消毒：每取放一具尸体后都应消毒处理，可采用化学消毒剂熏蒸、擦拭、喷雾等方法消毒处理。注意严格掌握消毒剂的浓度和作用时间，避免损坏尸体冷藏箱、停尸台。

5.16.5.2 喷雾消毒：可用 0.2%过氧乙酸按 1g/m³喷雾消毒，作用 30min，及时以自来水冲洗。注意此法对金属有一定腐蚀作用，只有在存放传染病尸体后急需快速消毒时选用。

5.16.5.3 擦拭消毒

用抹布浸湿消毒液均匀擦拭台面，作用 30min~60min，常用消毒液有 0.2%过氧乙酸、500mg/L 有效氯或有效溴的消毒液、500mg/L 二氧化氯消毒液。

5.16.6 停尸房的环境消毒：停尸房的空气污染较为严重；主要来自尸体散发的细菌和异味，工作人员一般不在室内久留，故在选择消毒方法时必须效果可靠，对人的伤害不强要求。可采用下述方法。

5.16.6.1 空气的消毒：按照 5.9.4 的方法进行。

5.16.6.2 墙壁和天花板的消毒：墙壁和天花板很少受到严重污染，一般不需常规消毒，若受到严

重污染，可采用化学消毒剂喷雾或薰蒸消毒。

5.16.6.3 地面的消毒：是极易污染的场地，搬运尸体后应及时清洁和消毒。

(1) 一般情况下：湿式清洁，每天2次，保持地面清洁卫生。

(2) 化学消毒剂擦拭：当地面严重污染或有传染病尸体存放时，应用0.2%过氧乙酸或有效氯500mg/L的含氯消毒剂浸湿拖把拖地。拖把清洗消毒后干燥保存。

5.16.6.4 物体表面的消毒：用抹布浸湿消毒液对门及门把手进行擦拭消毒，作用15min~30min，金属部位需再用清水擦抹。常用消毒液有：0.2%过氧乙酸、500mg/L有效氯的含氯消毒液、500mg/L二氧化氯消毒液。

5.16.7 停尸房工作人员的防护

5.16.7.1 防护用品：停尸房工作人员工作时应戴口罩、帽子、手套、胶鞋，穿隔离衣。

5.16.7.2 手卫生：搬运尸体或进行各项消毒操作后，要及时洗手或手消毒；必要时戴手套，摘手套后应洗手或手消毒。洗手或手消毒方法见5.7.3。

5.17 医院消毒灭菌的效果监测

5.17.1 前言

医院消毒是预防医院感染的重要措施之一，消毒效果的监测是评价其消毒设备运转是否正常、消毒药剂是否有效、消毒方法是否合理、消毒效果是否达标的唯一手段，因而在医院消毒、灭菌工作中必不可少。

医院消毒效果监测时需遵循以下原则：监测人员需经过专业培训，掌握一定的消毒知识，熟悉消毒设备和药剂性能，具备熟练的检验技能；选择合理的采样时间(消毒后、使用前)；遵循严格的无菌操作。

5.17.2 热力灭菌效果的监测方法

5.17.2.1 压力蒸汽灭菌效果监测方法

(1) 化学监测法：

1) 化学指示卡(管)监测方法：将既能指示蒸汽温度，又能指示温度持续时间的化学指示管(卡)放入大包和难以消毒部位的物品包中央，经一个灭菌周期后，取出指示管(卡)，根据其颜色及性状的变化判断是否达到灭菌条件。

2) 化学指示胶带监测法：将化学指示胶带粘贴于每一待灭菌物品包外，经一个灭菌周期后，观察其颜色的改变，以指示是否经过灭菌处理。

3) 对预真空和脉动真空压力蒸汽灭菌，每日进行一次B-D试验。

4) 结果判定：检测时，所放置的指示管(卡)、胶带的性状或颜色均变至规定的条件，判为

灭菌合格；若其中之一未达到规定的条件，则灭菌过程不合格。

5) 注意事项：监测所用化学指示物须经卫生部批准，并在有效期内使用。

(2) 生物监测法

1) 指示菌株：指示菌株为耐热的嗜热脂肪杆菌芽孢(ATCC 7953 或 SSIK 31株), 菌片含菌量为 5.0×10^5 cfu/片~ 5.0×10^6 cfu/片, 在 $121^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ 条件下, D值为 1.3 min~1.9min, 杀灭时间(KT值) ≤ 19 min, 存活时间(ST值)为 ≥ 3.9 min。

2) 培养基：试验用培养基为溴甲酚紫葡萄糖蛋白胨水培养基。

3) 检测方法：将两个嗜热脂肪杆菌芽孢菌片分别装入灭菌小纸袋内，置于标准试验包中心部位。

灭菌柜室内, 排气口上方放置一个标准试验包(由 3 件平纹长袖手术衣, 4 块小手术巾, 2 块中手术巾, 1 块大毛巾, 30 块 10cm×10cm 8 层纱布敷料包裹成 25cm×30cm×30cm 大小)。手提压力蒸汽灭菌器用通气贮物盒(22cm×13cm×6cm) 代替标准试验包, 盒内盛满中试管, 指示菌片放于中心部位的两只灭菌试管内(试管口用灭菌牛皮纸包封), 将贮物盒平放于手提压力蒸汽灭菌器底部。

经一个灭菌周期后, 在无菌条件下, 取出标准试验包或通气贮物盒中的指示菌片, 投入溴甲酚紫葡萄糖蛋白胨水培养基中, 经 $56^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 培养 7d(自含式生物指示物按说明书执行), 观察培养基颜色变化。检测时设阴性对照和阳性对照。

4) 结果判定：每个指示菌片接种的溴甲酚紫蛋白胨水培养基都不变色, 判定为灭菌合格; 指示菌片之一接种的溴甲酚紫蛋白胨水培养基, 由紫色变为黄色时, 则灭菌过程不合格。

5) 注意事项：监测所用菌片须经卫生部认可，并在有效期内使用。

5.17.2.2 干热灭菌效果监测方法

(1) 化学检测法

1) 检测方法：将既能指示温度又能指示温度持续时间的化学指示剂 3个~5 个分别放入待灭菌的物品中, 并置于灭菌器最难达到灭菌的部位。经一个灭菌周期后, 取出化学指示剂, 据其颜色及性状的改变判断是否达到灭菌条件。

2) 结果判定：检测时, 所放置的指示管的颜色及性状均变至规定的条件, 则判为达到灭菌条件; 若其中之一未达到规定的条件, 则判为未达到灭菌条件。

3) 注意事项：检测所用的化学指示剂需经卫生部认可，并在有效期内使用。

(2) 物理检测法(热电偶检测法)：

1) 检测方法：检测时, 将多点温度检测仪的多个探头分别放于灭菌器各层内、中、外各点。

关好柜门，将导线引出，由记录仪中观察温度上升与持续时间。

2) 结果判定：若所示温度（曲线）达到预置温度，则灭菌温度合格。

(3) 生物检测法

1) 指示菌株：枯草杆菌黑色变种芽孢（ATCC 9372），菌片含菌量为 5.0×10^5 cfu/片~ 5.0×10^6 cfu/片。其抗力应符合以下条件：在温度 $160^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 时，其 D 值为 1.3 min~1.9min，存活时间 ≥ 3.9 min，死亡时间 ≤ 19 min。

2) 检测方法：将枯草杆菌芽孢菌片分别装入灭菌中试管内（1片/管）。灭菌器与每层门把手对角线内，外角处放置2个含菌片的试管，试管帽置于试管旁，关好柜门，经一个灭菌周期后，待温度降至 80°C 时，加盖试管帽后取出试管。在无菌条件下，加入普通营养肉汤培养基（5ml/管），以 $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 培养 48h，观察初步结果，无菌生长管继续培养至第七日。

3) 结果判定：若每个指示菌片接种的肉汤管均澄清，判为灭菌合格，若指示菌片之一接种的肉汤管混浊，判为不合格，对难以判定的肉汤管，取 0.1ml 接种于营养琼脂平板，用灭菌L棒涂匀，放 $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 培养48h，观察菌落形态，并做涂片染色镜检，判断是否有指示菌生长，若有指示菌生长，判为灭菌不合格；若无指示菌生长，判为灭菌合格。

4) 注意事项：检测所用的指示菌片需经卫生部认可，并在有效期内使用

5.17.3 环氧乙烷灭菌效果监测

5.17.3.1 灭菌效果监测

每次灭菌均应进行程序监测。每个灭菌物品的外包装应粘贴包外化学指示胶带，作为灭菌过程的标志；包内放置化学指示卡，作为灭菌效果的参考。移植物应等生物监测结果为阴性时方可使用。具体做法，环氧乙烷测试包分挑战性测试包和常规测试包，前者主要用于对灭菌器的考核，后者作为平时的常规生物监测之用。挑战性测试包是将一生物指示剂放于一个 20ml 注射器内，去掉针头和针头套，生物指示剂带孔的塑料帽应朝注射器针头处，再将注射器芯放在原位（注意不要碰及生物指示物）；另选一成人型气管插管或一个塑料注射器（内含化学指示卡），一个琥珀色乳胶管（25.4cm 长，0.76cm 内径，1.6mm 管壁厚）和 4 条全棉清洁手术巾（46 cm×76cm），每条巾单先折叠成 3 层，再对折，即每条巾单形成 6 层，然后将叠好的巾单从下至上重叠在一起，再将上述物品放于巾单中间层，最后选两条清洁布或无纺布包裹，用化学指示胶带封扎成一个测试包。常规测试包的制备方法类似，先将一生物指示剂放于一个注射器内（同前），再用一条全棉小毛巾两层包裹，一起放入一剥离式包装袋内。

5.17.3.2 仪器监测法

按照 GB 18279-2000 医疗器械 环氧乙烷灭菌确认和常规控制 附录 C 中 C3.1 的要求进行。

5.17.3.3 化学监测法

每次消毒过程均用化学指示物监测，只有当消毒工艺符合要求，化学指示物变色符合规定标准色要求的情况下，产品才可放行。

3.17.3.4 生物指示物监测法

生物指示物用枯草杆菌黑色变种芽孢（ATCC 9372），抗力要求为：菌量在 5×10^5 cfu/片～ 5×10^6 cfu/片，在环氧乙烷剂量为 $600\text{mg/L} \pm 30\text{mg/L}$ ，作用温度为 $54^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ ，相对湿度为 $60\% \pm 10\%$ 条件下，其杀灭90%该微生物的D值为 $2.6\text{min} \sim 5.8\text{min}$ ，存活时间应 $\geq 7.8\text{min}$ ，死亡时间应 $\leq 58\text{min}$ 。

在消毒效果用该微生物监测时，菌量为 5×10^3 cfu/片～ 5×10^4 cfu/片。放置菌片的数量应足够多。根据通常做常规微生物学监测的实践经验，采用以下数量的生物指示物较为适宜：

- ①灭菌器柜室可用体积小于 5m^3 时，至少放置 10个菌片；
- ②灭菌器柜室可用体积为 5m^3 至 10m^3 时，每增加 1m^3 ，增加 1个菌片；
- ③灭菌器柜室可用体积大于 10m^3 时，每增加 2m^3 ，增加 1个菌片。

生物指示物应放在那些在性能鉴定时发现是最难灭菌的部位，并均匀分布于整个灭菌物品中。生物指示物应在预处理之前放入被灭菌物品内或被灭菌物品的试件内。应尽量在灭菌周期完成后立即将生物指示物从被灭菌物品中取出并进行培养。应确定任何延迟复苏，特别是暴露于残留环氧乙烷气体中的影响。所以，取出的指示菌片接种于含有复方中和剂的 0.5%的葡萄糖肉汤培养基管中，以未经处理的阳性菌片做相同接种，两者均置于 $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 培养。

5.17.3.5 每次灭菌都应进行灭菌过程监测。见5.2.4.5。

5.17.3.6 结果判定：经培养，阳性对照在24h内有菌生长；监测样品若连续培养观察5天，全部无菌生长，可报告生物指示物培养阴性，灭菌合格。

5.17.3.7 注意事项：检测所用化学和微生物指示物必须经卫生部批准，并在有效期内使用。

5.17.4 紫外线消毒效果的监测

5.17.4.1 紫外线灯管辐照度值的测定

（1）检测方法

1) 紫外线辐照计测定法：开启紫外线灯 5min 后，将测定波长为 253.7nm 的紫外线辐照计探头置于被检紫外线灯下垂直距离 1m 的中央处，待仪表稳定后，所示数据即为该紫外线灯管的辐照度值。

2) 紫外线强度照射指示卡监测法：开启紫外线灯5min后，将指示卡置紫外灯下垂直距离1m处，有图案一面朝上，照射1min（紫外线照射后，图案正中光敏色块由乳白色变成不同程度的淡

紫色)，观察指示卡色块的颜色，将其与标准色块比较，读出照射强度。

(2) 结果判定：普通 30w 直管型紫外线灯，新灯辐照强度 $\geq 90\mu\text{ W/cm}^2$ 为合格；使用中紫外线灯辐照强度 $\geq 70\mu\text{ W/cm}^2$ 为合格；30W 高强度紫外线新灯的辐照强度 $\geq 180\mu\text{ W/cm}^2$ 为合格。

(3) 注意事项：测定时电压 $220\text{V} \pm 5\text{V}$ ，温度 $20^\circ\text{C} \sim 25^\circ\text{C}$ ，相对湿度 $< 60\%$ ，紫外线辐照计必须在计量部门检定的有效期内使用；指示卡应获得卫生许可批件，并在有效期内使用。

5.17.4.2 生物监测法

(1) 空气消毒效果监测：按 5.17.8 的原则执行。

(2) 表面消毒效果监测：监测按 5.17.7 的原则执行。

(3) 注意事项：紫外线消毒效果监测时，采样液(平板)中不加中和剂。

5.17.5 医疗器械灭菌效果的监测

5.17.5.1 采样时间：在灭菌处理后，存放有效期内采样。

5.17.5.2 无菌检验

无菌检验是指检查经灭菌的敷料、缝线、一次性使用的医疗用品、无菌器械以及适合于无菌间查的其它品种是否无菌的一种方法。

无菌检验应在洁净度为 100 级单向流空气区域内进行，应严格遵守无菌操作，避免微生物污染；对单向流空气区域及工作台面，必须进行洁净度验证。

(1) 无菌检验前准备

1) 洗脱液与培养基无菌性试验：无菌试验前 3d，于需-厌氧培养基与霉菌培养基内各接种 1ml 洗脱液，分别置 $30^\circ\text{C} \sim 35^\circ\text{C}$ 与 $20^\circ\text{C} \sim 25^\circ\text{C}$ 培养 72h，应无菌生长。

2) 阳性对照管菌液制备：

① 在试验前一天取金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003]的普通琼脂斜面新鲜培养物，接种 1 环至需-厌氧培养基内，在 $30^\circ\text{C} \sim 35^\circ\text{C}$ 培养 16h~18h 后，用 0.9% 无菌氯化钠溶液稀释至 $10\text{cfu/ml} \sim 100\text{cfu/ml}$ ；

② 取生孢梭菌[CMCC(B)64941]的需氧菌、厌氧菌培养基新鲜培养物 1 接种环种于相同培养基内，于 $30^\circ\text{C} \sim 35^\circ\text{C}$ 培养 18h~24h 后，用 0.9% 无菌氯化钠溶液稀释至 $10\text{cfu/ml} \sim 100\text{cfu/ml}$ ；

③ 取白色念珠菌[CMCC(F)98001]真菌琼脂培养基斜面新鲜培养物 1 接种环种于相同培养基内，于 $20^\circ\text{C} \sim 25^\circ\text{C}$ 培养 24h 后，用 0.9% 无菌氯化钠溶液稀释至 $10\text{cfu/ml} \sim 100\text{cfu/ml}$ 。

(2) 无菌操作：取缝合针、针头、刀片等小件医疗器械 5 件直接浸入 6 管需-厌氧培养管(其中一管作阳性对照)与 4 管霉菌培养管。培养基用量为 15ml/管。

1) 取 5 付注射器，在 5ml 洗脱液中反复抽吸 5 次，洗下管内细菌，混和后接种需-厌氧菌培

养管(共 6 管,其中 1 管作阳性对照)与霉菌培养管(共 4 管)。接种量:1ml注射器为 0.5ml,2ml注射器为 1ml,5ml~10ml 注射器为 2ml,20ml~50ml注射器为 5ml,培养基用量:接种量为 2ml 以下为 15ml/管,接种量5ml为 40ml/管。

2)手术钳、镊子等大件医疗器械取 2 件用沾有无菌洗脱液的棉拭子反复涂抹采样,将棉拭子投入 5ml 无菌洗脱液中,将采样液混匀,接种于需-厌氧培养管(共 6 管,其中 1 管作阳性对照)与霉菌培养基(共 4 管)。接种量为 1ml/管,培养基用量为 15ml/管。

(3)培养:在待检样品的需-厌氧培养管中,接种预先准备的金黄色葡萄球菌阳性对照管液 1:1000 稀释 1ml,将需-厌氧培养管以及阳性与阴性对照管均于 30℃~35℃培养 5d,霉菌培养管与阴性对照管于 20℃~25℃培养 7d,培养期间逐日检查是否有菌生长,如加入供试品后培养基出现混浊或沉淀,经培养后不能从外观上判断时,可取培养液转种入另一支相同的培养基中或斜面培养基上,培养 48h~72h 后,观察是否再现混浊或在斜面上有无菌落生长,并在转种的同时,取培养液少量,涂片染色,用显微镜观察是否有菌生长。

(4)结果判定:阳性对照在 24h 内应有菌生长,阴性对照在培养期间应无菌生长,如需-厌氧菌及霉菌培养管内均为澄清或虽显混浊但经证明并非有菌生长,判为灭菌合格;如需-厌氧菌及霉菌培养管中任何1管显混浊并证实有菌生长,应重新取样,分别同法复试 2 次,除阳性对照外,其他各管均不得有菌生长,否则判为灭菌不合格。

5.17.5.3 注意事项

- (1)送检时间不得超过 6h,若样品保存于 0℃~4℃,则不得超过24h。
- (2)被采样本表面积<100cm²取全部表面;被采样本表面积≥100cm²,取 100cm²。
- (3)若消毒因子为化学消毒剂,采样液中应加入相应中和剂。

5.17.5.4 热原检查法

(1) 鲎试验

本法系利用鲎试剂与细菌内毒素产生凝集反应的机理,以判断供试品中细菌内毒素的限量是否符合规定的一种方法。内毒素的量用内毒素单位(EU)表示。细菌内毒素国家标准品(以下简称RSE)系自大肠杆菌提取精致得到的内毒素。以细菌内毒素国际标准品为基准,经过协作标定,使其与国际标准品单位含义一致。RSE用于标定、复核、仲裁鲎试剂灵敏度和标定细菌内毒素工作标准品(以下简称CSE)。CSE系经RSE为基准进行标定,确定其重量的相当效价。每毫克(1ng)CSE的效价应不小于 2EU,不大于 50EU,并具备均一性和稳定性的实验数据。CSE 用于试验中鲎试剂灵敏度复核、干扰试验及设置的阳性对照。

1)试验准备:试验所用器皿,需经处理,除去可能存在的外源性内毒素,常用的方法是250℃

干烤至少 1h 或 180℃干烤至少2h,也可用其他适宜的方法。试验所用器皿应确证无吸附细菌内毒素的作用。试验操作过程应防止微生物的污染。

2) 鲎试剂灵敏度复核: 根据鲎试剂灵敏度的标示值 (λ), 将RSE或CSE用细菌内毒素检查用水(与批号鲎试剂 24h 不产生凝集反应的灭菌注射用水,以下简称BET水)溶解,在旋涡混合器上混合 15min,然后制备成 2.0 λ 、1.0 λ 、0.5 λ 和 0.25 λ 等 4 个浓度的内毒素标准溶液,每稀释一步均应在旋涡混合器上混合 30s,按“检查法”项下试验,每一浓度平行做 4 管,同时用 BET 水做 4 管阴性对照,如最大浓度(2.0 λ)4 管为阳性,最低浓度(0.25 λ)4 管均为阴性,阴性对照 4 管均为阴性,按下式计算反应终点浓度的几何平均值即为鲎试剂灵敏度的测定值 (λ_c)。

$$\lambda_c = \lg^{-1} (\sum X/4)$$

式中 X 为反应终点浓度的对数值 (lg)。反应终点浓度是系列浓度递减的内毒素溶液中最后一个呈阳性结果的浓度。

当 λ_c 在 0.5 λ ~2.0 λ (包括 0.5 λ 和 2.0 λ) 时,方可用于细菌内毒素检查,并以 λ_c 为该批鲎试剂的灵敏度。每批新的鲎试剂在用于试验前都要进行灵敏度的复核。

鲎试剂灵敏度定义为在本检查法规定的条件下能检测出标准溶液或供试品溶液中的最低内毒素浓度,用 EU/ml 表示。

3) 供试品干扰试验: 按“鲎试剂灵敏度复核”项下试验,用 BET 水和未检出内毒素的供试品溶液或其不超过最大有效稀释倍数 (MVD) 的稀释液分别制成含 CSE 2.0 λ 、 λ 、0.5 λ 和 0.25 λ 等 4 种浓度的内毒素溶液。用 BET 水和供试品溶液或稀释液制成的每一浓度平行做 4 管,另取 BET 水和供试品溶液或稀释液各做 4 管阴性对照。如标准溶液最大浓度(2.0 λ)4 管均为阳性,最低浓度(0.25 λ)4 管均为阴性,两种阴性对照 8 管均为阴性时,按下式计算用 BET 水制成的内毒素标准溶液的反应终点浓度的几何平均值(E_s)和用供试品溶液或稀释液制成的内毒素溶液的反应终点浓度的几何平均值(E_t)。

$$E_s = \lg^{-1} (\sum X_s/4)$$

$$E_t = \lg^{-1} (\sum X_t/4)$$

式中 X_s 、 X_t 分别为用 BET 水和供试品溶液或稀释液制成的内毒素溶液的反应终点浓度的对数值 (lg)。

当 E_t 在 0.5 E_s ~2.0 E_s (包括 0.5 E_s 和 2.0 E_s) 时,则认为供试品在该浓度下不干扰试验,否则需进行适当处理后重复试验,或使用更灵敏的鲎试剂,对供试品进行更大倍数稀释,是排除干扰因素的简单有效的方法。每个品种要求至少对三个批号的供试品进行干扰试验,若鲎试剂的

来源、供试品的配方或生产工艺有变化时，须重复进行干扰试验。

供试品的最大有效稀释倍数（MVD）按下式计算：

$$\text{MVD} = L/\lambda$$

L 为供试品的细菌内毒素限值，以 EU/ml 表示，当正文中的限值以 EU/mg 或 EU/U 表示时，应乘以供试品溶液的浓度，再以所得值代入上式。

4) 检查法：取装有 0.1ml 鲎试剂溶液的 10mm×75mm 试管或 0.1ml/支规格的鲎试剂原安瓿 6 支，其中 2 支加入 0.1ml 或 0.2ml 供试品溶液(其稀释倍数不得超过 MVD)作为供试品管，2 支分别加入 0.1ml 或 0.2ml 用 BET 水将 CSE 制成的 2.0λ 和 0.25λ 浓度的标准内毒素溶液，1 支加入 0.1ml 或 0.2ml BET 水作为阴性对照，1 支加入 0.1ml 或 0.2ml 供试品阳性对照溶液(相当于用供试品溶液将 CSE 制成 2λ 浓度的内毒素溶液)作为阳性对照管。将试管中溶液轻轻混匀后，封闭管口，垂直放入 37℃±1℃ 水浴或适宜恒温器中，保温 60min±2min。保温和拿取试管过程应避免受到振动造成假阴性结果。

5) 结果判断：将试管从水浴中轻轻取出，缓缓倒转 180° 时，管内凝胶不变形，不从管壁滑脱者为阳性，记录为(+)；凝胶不能保持完整并从管壁滑脱者为阴性，记录为(-)。供试品 2 管均为(-)，应认为符合规定。当供试品的稀释倍数等于 MVD 时，如 2 管均为(+)，应认为不符合规定；如两管中 1 管为(+)，1 管为(-)，按上述方法复试，其中供试品管增加为 4 管，供试品 4 管中如有 1 管为(+)，即认为不符合规定。若第一次试验时供试品的稀释倍数小于 MVD 而结果出现 2 管均为(+)或 2管中 1 管为(+)，1 管为(-)时，按同样方法复试和判定，复试时要求将其稀释至 MVD。加入标准内毒素溶液的 2 管中最大浓度(2.0λ)管应为(+)，最低浓度(0.25λ)管应为(-)。供试品阳性对照均应为(+)，阴性对照均应为(-)，否则试验无效。

(2) 动物试验法：

1) 原理：将一定剂量的供试品，在规定的时间内，观察家兔体温升高情况，以判定供试品中所含热原的限度是否符合规定。

2) 供试家兔：试验用的家兔应健康无伤，体重 1.7 kg~3.0kg，雌兔应无孕。预测体温前 7 日起，即应用同一饲料饲养。在此期间内，体重应不减轻，精神、食欲、排泄等不得有异常现象。未经用于热原检查的家兔，或供试品判定为符合规定，但组内升温达 0.6℃ 的家兔；或供试品判定为不符合规定，但其组内家兔平均升温未达 0.8℃，且已休息两周以上的家兔；或三周内未曾使用的家兔，均应在检查供试品前 3d~7d 内预测体温，进行挑选。挑选试验的条件与检查供试品时相同，仅不注射药液，每隔 1h 测量体温 1 次，共测 4 次，4 次体温均在 38.0℃~39.6℃

的范围内，且最高最低体温的差数不超过 0.4℃ 的家兔，方可供热原检查用。用于热原检查后的家兔，如供试品判定为符合规定，至少休息 2d 方可供第 2 次检查用。用于热原检查后的家兔，如供试品判定为不符合规定，且其组内家兔平均升温达 0.8℃ 或更高时，则组内全部家兔不再使用，每一家兔的使用次数，用于一般药品的检查，不应超过 10 次。

3) 试验前的准备：在作热原检查前 1d~2d，供试用家兔应尽可能处于同一温度的环境中，实验室和饲养室的温度相差不大于 5℃，实验室的温度应在 17℃~28℃，在试验全部过程中，应注意室温变化不得大于 3℃，应避免噪音干扰。家兔在试验前至少 1h 开始停止给食并置于适宜的装置中，直至试验完毕。家兔体温应使用精密度为 ±0.1℃ 的肛温计，或其他同样精确的测温装置。肛温计插入肛门的深度和时间各兔应相同，深度一般约为 6cm，时间不得少于 1min，每隔 30 min~60min 测量体温 1 次，一般测量 2 次，两次体温之差不得超过 0.2℃，以此两次体温的平均值作为该兔的正常体温。当日使用的家兔，正常体温应在 38.0℃~39.6℃ 的范围内，且各兔间正常体温之差不得超过 1℃。

4) 试验用的注射器、针头及一切和供试品溶液接触的器皿，应置烘箱中用 250℃ 加热 30min 或用 180℃ 加热 2h，也可用其他适宜的方法除去热原。

5) 检查法：取适用的家兔 3 只，测定其正常体温后 15min 内，自耳静脉缓缓注入规定剂量并温热至约 38℃ 的供试品溶液，然后每隔 1h 按前法测量其体温 1 次，共测 3 次，以 3 次体温中最高一次减去正常体温，即为该兔体温的升高度数。如 3 只家兔中有 1 只体温升高 0.6℃ 或 0.6℃ 以上，或 3 只家兔体温升高均低于 0.6℃，但升高的总数达 1.4℃ 或 1.4℃ 以上，应另取 5 只家兔复试，检查方法同上。

6) 结果判定：在初试 3 只家兔中，体温升高均低于 0.6℃，并且 3 只家兔体温升高总数低于 1.4℃，或在复试的 5 只家兔中，体温升高 0.6℃ 或 0.6℃ 以上的兔数仅有 1 只，并且初试、复试合并 8 只家兔的体温升高总数为 3.5℃ 或 3.5℃ 以下，均认为供试品符合热原检查条例规定。

在初试 3 只家兔中，体温升高 0.6℃ 或 0.6℃ 以上的家兔超过 1 只，或在复试的 5 只家兔中，体温升高 0.6℃ 或 0.6℃ 以上的兔数超过 1 只，或在初试、复合并 8 只家兔的体温升高总数超过 3.5℃，均认为供试品的热原检查不符合规定。

5.17.6 手和皮肤黏膜消毒效果监测

5.17.6.1 采样时间：在消毒后立即采样。

5.17.6.2 采样方法

(1) 手的采样：被检人五指并拢，用浸有含相应中和剂的无菌洗脱液的棉拭子在双手指屈面

从指根到指端往返涂擦 2 次(一只手涂擦面积约 30cm²), 并随之转动采样棉拭子, 剪去操作者手接触部位, 将棉拭子投入 10ml 含相应中和剂的无菌洗脱液试管内, 立即送检。

(2) 皮肤粘膜采样: 用 5cm×5cm 的标准灭菌规格板, 放在被检皮肤处, 用浸有含相应中和剂的无菌洗脱液的棉拭子 1 支, 在规格板内横竖往返均匀涂擦各 5 次, 并随之转动棉拭子, 剪去手接触部位后, 将棉拭子投入 10ml 含相应中和剂的无菌洗脱液的试管内, 立即送检。不规则的粘膜皮肤处可用棉拭子直接涂擦采样。

5.17.6.3 检测方法

(1) 细菌总数检测: 将采样管在混匀器上振荡20s或用力振打 80 次, 用无菌吸管吸取 1.0ml 待检样品接种于灭菌平皿, 每一样本接种2个平皿, 内加入已溶化的 45℃~48℃ 的营养琼脂 15ml~18ml, 边倾注边摇匀, 待琼脂凝固, 置 36℃±1℃温箱培养 48h, 计数菌落数。

采样结果计算方法:

$$\text{细菌总数 (cfu/cm}^2\text{)} = \frac{\text{平板上菌落数} \times \text{稀释倍数}}{\text{采样面积 (cm}^2\text{)}}$$

(2) 致病菌检测: 按3.17.15的原则执行。

5.17.6.4 结果判定

(1) 消毒洗手

I、II类区域工作人员: 细菌总数≤5cfu/cm², 并未检出金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、铜绿假单孢菌为消毒合格。

III类区域工作人员: 细菌总数≤10cfu/cm², 并未检出金黄色葡萄球菌、大肠杆菌为消毒合格。

IV类区域工作人员: 细菌总数≤15cfu/cm², 并未检出金黄色葡萄球菌、大肠杆菌为消毒合格。

母婴同室、婴儿室、新生儿室及儿科病房的工作人员手上, 不得检出沙门菌、大肠杆菌、溶血性链球菌、金黄色葡萄球菌为消毒合格。

(2) 皮肤黏膜: 参照手的卫生学标准执行。

5.17.6.5 注意事项

皮肤粘膜采样处, 若表面不足 5cm×5cm 可用相应面积的规格板采样。

5.17.7 物品和环境表面消毒效果的监测

5.17.7.1 采样时间: 在消毒处理后进行采样。

5.17.7.2 采样方法:用 5cm×5cm 的标准灭菌规格板,放在被检物体表面,采样面积 $\geq 100\text{cm}^2$,连续采样 4 个,用浸有含相应中和剂的无菌洗脱液的棉拭子 1 支,在规格板内横竖往返均匀涂擦各 5 次,并随之转棉拭子,剪去手接触部位后,将棉拭子投入 10ml 含相应中和剂的无菌洗脱液试管内,立即送检。

门把手等不规则物体表面用棉拭子直接涂擦采样。

5.17.7.3 检测方法

(1) 细菌总数检测:检测方法按 5.17.6.3 (1) 执行。小型物体表面的结果计算,用 cfu/件表示。

(2) 致病菌检测:检测方法按5.17.15原则执行。

5.17.7.4 结果判定

I、II类区域:细菌总数 $\leq 5\text{cfu}/\text{cm}^2$,并未检出致病菌为消毒合格。

III类区域细菌:总数 $\leq 10\text{cfu}/\text{cm}^2$,并未检出致病菌为消毒合格。

IV类区域细菌:总数 $\leq 15\text{cfu}/\text{cm}^2$,并未检出致病菌为消毒合格。

母婴同室、早产儿室、婴儿室、新生儿室及儿科病房的物体表面不得检出沙门菌。

5.17.7.5 注意事项

(1) 采样时间:按 5.17.5.1 执行。

(2) 样本量及处理:按 5.17.5.2(1) 执行。

5.17.8 空气消毒效果的监测

5.17.8.1 采样时间:在消毒处理后、操作前进行采样。

5.17.8.2 采样方法:平皿暴露法

(1) 布点方法:室内面积 $\leq 30\text{m}^2$,设内、中、外对角线3点,内、外点布点部位距墙壁1M处;室内面积 $> 30\text{m}^2$,设 4 角及中央 5 点,4 角的布点部位距墙壁 1m 处。

(2) 采样方法:将普通营养琼脂平皿(直径为 9cm)放在室内各采样点处,采样高度为距地面 1.5m 采样时将平皿盖打开,扣放于平皿旁,暴露 5min,盖好立即送检。

5.17.8.3 检测方法:按照2.3 要求进行。

平皿暴露法结果计算公式:

$$\text{细菌总数 (cfu/m}^3\text{)} = 50000N / (A \times T)$$

式中A为平皿面积 (cm^2); T为平皿暴露时间 (min); N为平均菌落数 (cfu)。

5.17.8.4 结果判定

I类区域:细菌总数 $\leq 10\text{cfu}/\text{m}^3$ (或 $0.2\text{cfu}/\text{平皿}$),未检出金黄色葡萄球菌、溶血性链球菌为

消毒合格；

II类区域：细菌总数 $\leq 200\text{cfu}/\text{m}^3$ (或 $4\text{cfu}/\text{平皿}$)，未检出金黄色葡萄球菌、溶血性链球菌为消毒合格；

III类区域：细菌总数 $\leq 500\text{cfu}/\text{m}^3$ (或 $10\text{cfu}/\text{平皿}$)，未检出金黄色葡萄球菌、溶血性链球菌为消毒合格。

5.17.8.5 注意事项

采样前，关好门、窗，在无人走动的情况下，静止10min 进行采样。

5.17.9 消毒液的监测

5.17.9.1 常用消毒液有效成分测定

- (1) 有效氯含量测定：按 3.1.2.1 的方法进行。
- (2) 有效碘含量的测定：按 3.1.2.2 的方法进行。
- (3) 戊二醛 ($\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$) 含量的测定：按3.1.2.9的方法进行。
- (4) 过氧化氢 (H_2O_2) 浓度的测定：按 3.1.2.4 的方法进行。
- (5) 过氧乙酸 ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_3$) 浓度的测定：按 3.1.2.3 的方法进行。
- (6) 二氧化氯 (ClO_2) 含量的测定：按 3.1.2.6 的方法进行。
- (7) 二溴海因含量测定：按 3.1.2.7 的方法进行。
- (8) 乙醇含量测定：按 3.1.2.11 的方法进行。
- (9) 醋酸氯己定 ($\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{Cl}_2\text{N}_{10} \cdot 2\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$) 含量的测定：3.1.2.12 的方法进行。
- (10) 臭氧含量测定：按 3.1.2.5 的方法进行。
- (11) 苯扎溴铵含量测定：按 3.1.2.13 的方法进行。

5.17.9.2 使用中消毒液染菌量测定

(1) 检测方法：

1) 涂抹法：用无菌吸管吸取消毒液 1.0ml，加入 9.0ml 含有相应中和剂的采样管内混匀，用无菌吸管吸取上述溶液 0.2ml，滴于干燥普通琼脂平板，每份样品同时做2个平行样，一平板置 20℃ 培养 7d，观察霉菌生长情况，另一个平板置35℃温箱培养 72h记数菌落数，同时按 3.17.15的原则检测致病菌。

消毒液染菌量 (cfu/ml) = 每个平板上的菌落数 $\times 50$

2) 倾注法：用无菌吸管吸取消毒液 1.0ml，加入到 9.0ml 含相应中和剂的无菌生理盐水采样管中混匀，分别取 0.5ml 放入 2 只灭菌平皿内，加入已熔化的 45℃~48℃ 的普通营养琼脂 15ml~18ml，边倾注边摇匀，待琼脂凝固，一平板置 20℃培养 7d，观察霉菌生长情况；另一个

平板置36℃±1℃培养 72h, 计数菌落数, 同时按 3.17.15的原则检测致病菌。

消毒液染菌量(cfu/ml) = 每个平板上的菌落数 × 20

(2) 结果判断: 消毒液染菌量≤100cfu/ml, 并未检出致病菌为合格。

(3) 注意事项: 采样后 1h 内检测。

5.17.10 餐具消毒效果监测

5.17.10.1 采样时间: 在消毒后、使用前进行采样。

5.17.10.2 采样方法: 将 2.0cm×2.5cm 灭菌滤纸片于无菌洗脱液中浸湿均匀, 贴在食具表面, 经 5min 取下, 每10张滤纸合为一份样本(相当于 50cm²采样面积), 投入含 50ml生理盐水的 100ml 三角烧瓶中, 于 4h 内送检。

5.17.10.3 检测方法

(1) 细菌总数的检测: 按5.17.6.3.(1) 执行。

(2) 大肠菌群的检测: 取 1ml 采样液, 加入相应的单倍或双倍乳糖胆盐发酵管内, 置 37℃ 温箱培养 24h, 若乳糖胆盐发酵管不产酸不产气, 则可报告大肠菌群阴性。如果有疑虑则进行分离培养。

5.17.10.4 结果判定: 细菌总数≤5cfu/cm², 大肠菌群未检出。

5.17.10.5 注意事项: 餐具若用化学消毒剂消毒, 采样液中应加入相应中和剂。

5.17.11 卫生洁具消毒效果监测

(1) 采样时间: 在消毒后、使用前进行采样。

(2) 采样方法: 便器、尿壶等容器可用沾有含相应中和剂的无菌生理盐水的棉拭子, 反复涂擦容器的内表面及内口处, 剪去手接触部位后, 将棉拭子投入 5ml 无菌生理盐水试管中, 立即送检。

拖把、抹布等物品可用无菌的方法剪取 1cm×3cm, 直接投入 5ml 含相应中和剂的无菌生理盐水中, 立即送检。

(3) 检测方法: 将采样管在混匀器上振荡20s或用力振打 80 次, 取采样液按 5.17.15的原则检测致病菌。

(4) 结果判定: 未检出致病菌为消毒合格。

5.17.12 内镜消毒灭菌效果的监测

参照《内镜清洗消毒技术操作规范(2004年版)》执行。

5.17.12.1 采样时间: 在消毒灭菌后、使用前进行采样。

5.17.12.2 采样方法: 采样部位为内镜的内腔面。用无菌注射器抽取10ml含相应中和剂的缓冲液,

从待检内镜活检口注入，用15ml无菌试管从活检出口收集，及时送检，2小时内检测。

5.17.12.3 检测方法

(1)细菌总数的检测：将送检液用旋涡器充分震荡，取0.5ml，加入2只直径90mm无菌平皿，每个平皿分别加入已经熔化的45℃~48℃营养琼脂15ml~18ml，边倾注边摇匀，待琼脂凝固，于35℃培养48小时后计数。

结果计算：菌落数/镜（cfu/件）=2个平皿菌落数平均值×20。

(2)致病菌检测：将送检液用旋涡器充分震荡，取0.2ml分别接种90mm血平皿、中国兰平皿和SS平皿，均匀涂布，35℃培养48小时，观察有无致病菌生长。

5.17.12.4 结果判定

消毒后的内镜，细菌总数 ≤ 20 cfu/件，且不能检出致病菌为合格。

灭菌后内镜，未检出任何微生物为合格。

5.17.13 医用污物消毒效果监测

5.17.13.1 采样时间：在消毒后、清运前进行采样。

5.17.13.2 焚化消毒效果监测：可焚化物品的消毒效果监测，以污物燃烧充分、彻底为标准进行直接检查。

5.17.13.3 碱化消毒效果监测：以熟石灰为消毒剂的碱化消毒，日常监测以pH为指标。消毒后30min 检查 pH 值，若pH =12，继续作用 24h 为消毒合格。

5.17.13.4 氯化消毒效果监测：氯化消毒效果的日常监测，以余氯量为指标，在消毒接触时间 2h 后测定余氯量，余氯量 >200 mg/L，为消毒合格。

5.17.13.5 其它消毒因子消毒效果监测。

(1)采样方法：取 1ml 消毒后待检污物(固体称取 2g)，置于 5ml 含相应中和剂的无菌生理盐水的采样管中，立即送检。

(2)检测方法：将采样管在混匀器上振荡20s或用力振打80次，取采样液按17.15原则检测致病菌。

5.17.13.6 结果判定：未检出致病菌为消毒合格。

5.17.14 织物消毒效果监测

5.17.14.1 采样时间：在消毒烘干后进行采样。

5.17.14.2 采样方法：按5.17.7.2的原则执行。

5.17.14.3 检测方法：按 5.17.15的原则检测致病菌。

5.17.14.4 结果判定：未检出致病菌为消毒合格。

5.17.15 致病菌的检测

5.17.15.1 检测原则：致病菌的检测依据污染情况进行相应指标的检测。

5.17.15.2 金黄色葡萄球菌检测。

(1) 增菌、分离

取采样液 1ml，接种于 5ml SCDLP 液体培养基中，于 $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 增菌 24h。取 1 白金耳上述增菌液，在血平板上作划线分离， $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 24h。

(2) 观察菌落特征：在血琼脂平板上菌落形态为金黄色、圆形凸起、表面光滑、周围有溶血圈。

(3) 镜检：挑取典型菌落作涂片染色镜检，镜下为革兰阳性、成葡萄状排列的球菌。

(4) 生化反应：取可疑菌落作触酶、葡萄糖发酵、血浆凝固酶、甘露醇发酵、新生霉素敏感试验，均为阳性者即为金黄色葡萄球菌。

1) 甘露醇发酵试验：取上述可疑菌落接种于甘露醇培养基，于 $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h，发酵甘露醇产酸者为阳性。

2) 血浆凝固试验：①玻片法：洁净玻片一端滴一滴灭菌生理盐水，另一端滴一滴血浆，用白金耳挑取菌落分别与生理盐水和血浆混匀，5 min 内观察有无固体颗粒状物，若血浆出现凝块，生理盐水均匀混浊为阳性，两者均混浊为阴性。②试管法：吸取 1:4新鲜血 0.5ml，放在灭菌小试管中，再加入等量待检菌 24h 肉汤培养物，混匀后放入 $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 孵箱中，同时以已知血浆凝固酶阳性和阴性菌肉汤培养物作对照，每 30s. 观察一次，6 h 内出现凝块者为阳性。

5.17.15.3 乙型溶血性链球菌检测

(1) 增菌、分离：取样品 1ml，接种于1%葡萄糖肉汤， 37°C 增菌 24h。取 1 白金耳增菌液在血平板上作划线分离， $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 24h。

(2) 观察菌落特征：菌落形态为灰白色、半透明或不透明、针尖状突起、表面光滑、边缘整齐、周围有 β 溶血圈。

(3) 镜检：挑取典型菌落作涂片染色镜检，镜下为革兰阳性、呈链状排列的球菌。

(4) 生化反应：取可疑菌落作如下生化试验，如触酶阴性、链激酶试验阳性、对杆菌肽敏感者，即为乙型溶血性链球菌。

链激酶试验：吸取草酸钾血浆 0.2ml (0.02g 草酸钾加 5ml 人血浆混匀，经离心沉淀，吸取上清)，加入 0.8ml 灭菌生理盐水混匀后再加入待检菌 24h 肉汤培养物 0.5ml和 0.25% 氯化钙 0.25ml，混匀，放入 $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 水浴中，每 2 min 观察一次（一般 10min内可凝固），待

血浆凝固后继续观察并记录溶化的时间，如 2 h 内不溶化，移入孵箱观察 24h 的结果，如全部溶化为阳性；24h 仍不溶解者为阴性。

杆菌肽敏感试验：将被检菌浓菌液涂于血平板上，用灭菌镊子取含菌 0.04 单位杆菌肽纸片放在平板表面上。同时以已知阳性菌株作对照，于 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 18h~24h，有抑菌带者为阳性。

5.17.15.4 沙门菌检测：参照 GB4789.4（食品中沙门菌检测方法）。

5.17.16 试剂与培养基的配制：按附录 A 进行。

6.1 常用消毒方法

6.1.1 煮沸消毒法

6.1.1.1 适用范围：餐（饮）具、服装、被单等耐湿、耐热物品的消毒。

6.1.1.2 操作方法及注意事项：煮锅内的水应将物品全部淹没。水沸开始计时，持续 15min~30min。计时后不得再新加入物品，否则持续加热时间应从重新加入物品再次煮沸时算起。亦可用 0.5% 肥皂水，或 1% 碳酸钠溶液代替清水，以增强消毒效果。

6.1.2 消毒剂溶液浸泡消毒法

6.1.2.1 适用范围：餐（饮）具、服装、污染的医疗用品等的消毒。

6.1.2.2 操作方法及注意事项：消毒剂溶液应将物品全部浸没。对导管类物品，应使管腔内也充满消毒剂溶液。作用至规定时间后，取出用清水冲净，晾干。根据消毒剂溶液的稳定程度和污染情况，及时更换所用溶液。

6.1.3 消毒剂溶液擦拭消毒法

6.1.3.1 适用范围：家具表面的消毒。

6.1.3.2 操作方法及注意事项：用布浸以消毒剂溶液，依次往复擦拭被消毒物品表面。必要时，在作用至规定时间后，用清水擦净以减轻可能引起的腐蚀作用。

6.1.4 消毒剂溶液喷雾消毒法

6.1.4.1 适用范围：室内空气、居室表面和家具表面的消毒。

6.1.4.2 操作方法及注意事项：

6.1.4.2.1 普通喷雾消毒法

用普通喷雾器进行消毒剂溶液喷雾，以使物品表面全部润湿为度，作用至规定时间。喷雾顺序宜先上后下，先左后右。喷洒有刺激性或腐蚀性消毒剂时，消毒人员应戴用防护口罩和眼镜，并将食品、食（饮）具及衣被等物收放好。

6.1.4.2.2 气溶胶喷雾消毒法

喷雾时，关好门窗，喷距以消毒剂溶液能均匀覆盖在物品表面为度。喷雾结束 30min~60min 后，打开门窗，散去空气中残留的消毒剂雾粒。对消毒人员和物品的防护，同普通喷雾消毒法，尤其应注意防止消毒剂气溶胶进入呼吸道。

6.1.5 环氧乙烷简易薰蒸消毒法

6.1.5.1 适用范围：棉衣、书信、皮革制品、电器及电子设备等耐湿、热和易被腐蚀物品的消毒。

6.1.5.2 操作方法及注意事项：将物品放入丁基橡胶消毒袋中，排尽袋中空气，扎紧袋口。通入环氧乙烷气体。待作用至规定时间(16h~24h)，于通风处打开消毒袋，取出物品，使残留环氧乙烷

自然消散。环氧乙烷为易燃易爆药品，使用过程中室内不得有明火或产生电火花。本法不得用于对房间的消毒。

6.2 消毒面积与体积的测算

取卷尺，一人牵卷尺一端，固定在墙壁一角，另一人拉动卷尺测出室内墙壁的周长（m）。在测算面积时，除空气传播传染病对墙壁消毒的高度需到顶外，其他传染病对墙壁消毒的高度均为 2 m。

6.3 消毒剂的应用

6.3.1 消毒剂的杀菌水平

6.3.1.1 高效消毒剂包括戊二醛、过氧乙酸、二溴海因、二氧化氯和含氯消毒剂[漂白粉、次氯酸钠、次氯酸钙（漂粉精）、二氯异氰尿酸钠（优氯净）、三氯异氰尿酸]等。

6.3.1.2 中效消毒剂包括含碘消毒剂（碘伏、碘酊）、醇类及其复配消毒剂、酚类消毒剂等。

6.3.1.3 低效消毒剂包括苯扎溴铵、苯扎氯铵等季铵盐类消毒剂，醋酸氯己定、葡萄糖酸氯己定等双胍类消毒剂等。

6.3.2 常用消毒剂

用于疫源地消毒的消毒剂应具备消毒剂批准文号，使用前应仔细阅读产品使用说明书，明确有效期、使用方法和注意事项。必要时按 3.1.2 要求进行含量检测。常用疫源地消毒用消毒剂的特点如下：

6.3.2.1 漂白粉

是一种混合物，代表分子式 CaOCl_2 ，主要成分是次氯酸钙，还有氢氧化钙、氯化钙、氧化钙。漂白粉为白色颗粒状粉末，有氯臭，溶于水，在光照、热、潮湿环境中极易分解。漂白粉含有效氯 25% 左右。

6.3.2.1.1 杀菌能力：革兰阳性和阴性细菌对含氯消毒剂均高度敏感，真菌和抗酸杆菌中度敏感；高浓度时，亲脂、亲水病毒及芽孢亦敏感。

6.3.2.1.2 影响因素

(1) 酸碱度：溶液 pH 越高，杀菌作用越弱。pH 升至 8 以上，可失去杀菌活性。

(2) 有机物：可消耗有效氯，明显影响含氯消毒剂的杀菌作用，尤其是消毒液浓度较低时，这种影响更为明显。

(3) 温度：每升高 10°C ，杀菌时间可缩短 50%~60%。

6.3.2.1.3 剂型和使用方法：使用漂白粉前应测定有效氯的含量。有效氯含量用% (W/W)表示。用漂白粉配制水溶液时应先加少量水，调成糊状，然后边加水边搅拌成乳液，静置沉淀，取澄清液。

漂白粉干粉可用于铺垫墓葬，地面和人、畜排泄物的消毒，其水溶液可用于餐具消毒、饮水消毒、污水处理、粪便处理、用具擦拭消毒等。

6.3.2.1.4 注意事项：应依测定的有效氯含量，按测定浓度用药。要注意漂白粉对织物的漂白作用和对各类物品如金属制品的腐蚀作用，操作时应做好个人防护。漂白粉应保存在密闭容器内，放在阴凉、干燥、通风处。

6.3.2.2 次氯酸钙（漂粉精）

分子式 $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ ，分子量 197.029。白色粉末，比漂白粉易溶于水且稳定，含杂质少，受潮易分解。有效氯含量为 80%~85%。影响因素、使用方法和注意事项与漂白粉相同。

6.3.2.3 二氯异氰尿酸钠(优氯净)

分子式为 $\text{C}_3\text{O}_3\text{N}_3\text{Cl}_2\text{N}_2$ ，分子量为 219.95。白色晶粉，含有效氯 60%左右，性质稳定，即使贮存于高温高湿条件下，有效氯也丧失极少。溶解度为 25%，水溶液的稳定性较差，在 20℃下，3d 丧失有效氯 5%~7%，7d 丧失 20%。当温度升至 30℃时，1 周可丧失 50%。

6.3.2.3.1 杀菌能力：二氯异氰尿酸钠杀菌谱广，对细菌繁殖体、病毒、真菌孢子及细菌芽孢都有较强杀灭作用。

6.3.2.3.2 影响因素

- (1) 温度：温度低时可降低二氯异氰尿酸钠的杀菌作用。
- (2) 酸碱度：酸性条件下的杀菌作用要比碱性条件下强。
- (3) 有机物：可降低二氯异氰尿酸钠的杀菌能力。

6.3.2.3.3 剂型和使用方法：与漂白粉相同，如水溶液可用于喷洒、浸泡、擦拭消毒。干粉可用于人、畜排泄物和地面的消毒。

6.3.2.3.4 注意事项：使用时应注意其腐蚀和漂白作用。操作时应做好个人防护。应保存在密闭容器内，放在阴凉、干燥、通风处。

6.3.2.4 环氧乙烷

分子式为 $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$ ，分子量为 44.05。沸点为 108℃，冰点为-111.3℃，比空气重。液体环氧乙烷可与水任意比例混合，液体可溶解某些塑料。它的蒸汽压较大，对物品的穿透力强。高浓度环氧乙烷遇明火可发生爆炸。

6.3.2.4.1 杀菌能力：几乎各种微生物对环氧乙烷敏感，而且细菌繁殖体和芽孢之间对环氧乙烷的敏感性差异很小，这是环氧乙烷作为灭菌剂的一个特点。

6.3.2.4.2 影响因素：环氧乙烷杀菌作用主要影响因素是温湿度、药物浓度和微生物的状态。

- (1) 温度和浓度的影响彼此相关，例如温度在 45℃~60℃范围内，浓度高于 450mg/L，再提

高浓度不能改变所需灭菌时间。一般来说，45℃，450mg/L 已发挥药物的最大作用。但是实际应用中，还应考虑药物穿透包装材料时的吸收消耗，宜适当加大药物的用量，提高温度。

(2) 湿度对环氧乙烷的杀菌作用有明显影响，一般以 RH 60%~80%为宜。

(3) 消毒对象对消毒效果亦有明显影响，有些材料可吸收大量环氧乙烷，对于大量吸收环氧乙烷的物品应相应加大剂量。

6.3.2.4.3 注意事项

(1) 环氧乙烷消毒过程中应注意防火防爆。

(2) 要防止灭菌消毒袋、柜泄漏，以保证消毒过程中环氧乙烷的浓度并避免污染环境，要控制温湿度。

(3) 不适用于饮水和食品消毒。

6.3.2.5 过氧乙酸

分子式为 $C_2H_4O_3$ ，分子量为 76.0518。液体透明，弱酸性，易挥发，沸点 110℃。贮存过程中易分解，尤其有重金属离子或遇热时极易分解。高浓度和高温度可引起过氧乙酸爆炸，浓度在 20% 以下一般无爆炸的危险。

6.3.2.5.1 杀菌能力：过氧乙酸可杀灭各种微生物，温度在 0℃ 以下时，仍可保持活性。其杀菌作用强弱的顺序依次为细菌繁殖体、真菌、病毒、结核杆菌（分枝杆菌）和细菌芽孢。

6.3.2.5.2 影响因素

(1) 温度：一般说来，温度越高过氧乙酸的杀菌力越强，但温度降至 -20℃ 时，过氧乙酸仍有明显杀菌作用。

(2) 湿度：当过氧乙酸喷雾消毒时，空气的相对湿度在 20%~80% 时，湿度越大，杀菌效果越好。当相对湿度低于 20% 时，则杀菌作用较差。

(3) 浓度和作用时间：过氧乙酸的杀菌作用随浓度的增高、时间的延长而增强。

(4) 有机物：在用过氧乙酸消毒时，有机物对细菌繁殖体的保护作用较芽孢为明显，但是这种保护作用因菌种和有机物的种类及浓度的不同而有所不同。

6.3.2.5.3 应用：0.1% 的过氧乙酸 1min~10min 可杀灭细菌繁殖体；0.5% 的过氧乙酸 5min 可杀灭结核杆菌和真菌，30min 可杀灭枯草杆菌芽孢。溶液可用于浸泡消毒餐(饮)具、便器、体温计及医务人员手等。过氧乙酸气雾浓度达到 $1g/m^3$ 时，可杀灭物体表面的芽孢，可用于墙壁、地板、家具消毒。

6.3.2.5.3 注意事项

(1) 过氧乙酸性质不稳定，其稀溶液极易分解。因此，应于用前配制。配制的稀溶液应盛

于塑料容器中，避免接触金属离子。

(2) 对多种金属和织物有强烈的腐蚀和漂白作用，使用时应注意。

(3) 接触高浓度过氧乙酸时，工作人员应采取防护措施。物品用过氧乙酸消毒后，应放置 1 h~2h，待残留在物体表面上的过氧乙酸挥发、分解后使用。

6.3.2.6 碘伏

碘伏是碘与表面活性剂（如聚乙烯吡咯烷酮、聚氧基乙醇）的不定型结合物，如聚乙烯吡咯烷酮—碘大约含有 10% (W/W) 碘。由于表面活性剂起到碘的载体和助溶作用，使碘伏溶液逐渐释放碘，延长了碘的杀菌作用时间。碘伏具有广谱杀菌作用，刺激性小，毒性低，无腐蚀性（除银、铝和二价合金）和性质稳定便于贮存等优点，而且碘伏的颜色深浅与杀菌作用成正比，便于判断其杀菌能力。

6.3.2.6.1 杀菌能力：革兰阳性和阴性细菌对碘伏都高度敏感，抗酸杆菌，细菌芽孢、亲脂病毒及亲水病毒等都敏感。

6.3.2.6.2 影响因素：碘伏在酸性和中性条件下杀菌效果最佳，软水或硬水均可用来配制碘伏溶液。有机物对其杀菌作用的影响明显比氯小，温度超过 40℃可使其成为碘蒸汽。

6.3.2.6.3 注意事项：

(1) 稀释液不稳定，2d 后有效碘可降低 50%，因此宜在使用前配制。

(2) 避免接触银、铝和二价合金。

(3) 在用于皮肤消毒时，碘伏虽比游离碘溶液引起过敏反应的频率低、反应轻，但用于敏感组织仍需慎重。

6.3.2.7 苯扎溴铵

分子式为 $C_{21}H_{38}NBr$ ，分子量为 384.46。具有芳香味，呈淡黄色胶状，易溶于水，具有表面活性作用，振摇可产生大量泡沫。

6.3.2.7.1 杀菌能力：对化脓性病原菌有良好杀灭作用，对革兰阳性菌的杀灭作用要大于阴性细菌。

6.3.2.7.2 注意事项：

(1) 苯扎溴铵与其他季胺盐类一样，极易被多种物体吸附，浸泡液的浓度可随消毒物品数量增多而逐渐降低，因此应该及时更换消毒液。

(2) 不得与肥皂或其它阴离子洗涤剂合用。

(3) 不宜用于粪、尿、痰等的消毒。

6.3.2.8 氯己定

分子式为 $C_{22}H_{30}N_{10}Cl_2 \cdot H_2Cl$ ，分子量为 578.4。氯己定是阳离子双缩胍，碱性，可与有机

酸、无机酸形成盐类，如双醋酸氯己定、双盐酸氯己定和葡萄糖酸氯己定等。氯己定性质稳定，难溶于水。盐酸盐基本上不溶于水而溶于醇，醋酸盐和葡萄糖酸的水中溶解度依次增加。

6.3.2.8.1 杀菌能力：氯己定对革兰阳性细菌的杀灭作用较革兰阴性细菌大。

6.3.2.8.2 影响因素与注意事项：

(1)pH 在 5.5~8.0 范围内氯己定具有杀菌活性，偏碱时活性较佳，pH 高于 8.0 时，则出现游离碱基沉淀。

(2)阴离子去污剂、肥皂可与氯己定反应，使其失活。

(3)有机物对氯己定杀菌活性有明显影响，阴离子表面活性剂对其有拮抗作用，所以不可与肥皂合用。

(4)氯己定不可用于芽孢、分枝杆菌及亲水病毒的消毒。

6.3.2.9 二溴海因

二溴海因的化学名为二溴二甲基乙内酰脲，是一种释放有效溴的消毒剂，加有助溶剂的国产二溴海因消毒剂有效溴含量 50%。易溶于水，使用时用去离子水配成所需浓度的消毒液。可用于饮用水、餐饮具、果蔬和各种物体表面等的消毒。

6.3.2.9.1 杀菌能力：能杀灭各种微生物，包括细菌繁殖体、病毒、真菌、分支杆菌和芽孢

6.3.2.9.2 影响因素与注意事项

(1)二溴海因较不稳定，应用液应在使用时配制，并注意有效期。浸泡消毒时宜加盖。

(2)对金属有一定的腐蚀作用，必要时可添加少量防腐剂。

(3)有机物对其杀菌作用有一定影响，一些金属离子可影响消毒效果。

(4)用于果蔬消毒和餐饮具消毒时，在消毒完成后应用清水冲洗。

6.3.2.9.3 应用：对一般细菌繁殖体和病毒污染的物品，用 100mg/L~200mg/L 二溴海因，作用 30min，对结核分支杆菌和致病性芽孢菌污染的物品，用 1000mg/L~2000mg/L 浓度，作用 30min。干扰物较多时应加大剂量。对污水消毒时，视水质污染情况而定，用量一般为 5mg/L~10mg/L，作用 30min。

6.3.2.10 二氧化氯

分子式为 ClO_2 ，性质极不稳定，常在临使用时生产或在二氧化氯稳定液中加入活化剂。二氧化氯的杀菌作用具有广谱、高效、速效等特点，用于饮用水消毒时，一般认为其不产生三卤化物，是一种较含氯消毒剂更安全的新型消毒剂。

6.3.2.10.1 杀菌能力：能杀灭各种微生物，包括细菌繁殖体、病毒、真菌、分支杆菌和芽孢等。

6.3.2.10.2 影响因素和注意事项

- (1) 消毒效果易受有机物影响。
- (2) pH 质明显影响消毒效果, pH 值高时消毒能力下降。
- (3) 二氧化氯活化液和稀释液不稳定, 应现配现用。
- (4) 对金属有腐蚀性, 对织物有漂白作用, 消毒完成后应及时清洗。

6.3.2.10.3 应用: 适用于医疗器械、餐(茶)具、饮用水及环境表面等消毒。常用消毒方法有浸泡、擦拭、喷洒等。对细菌繁殖体污染的物品进行消毒时, 剂量为 100mg/L 作用 30min, 对肝炎病毒和结核杆菌污染物品进行消毒时, 剂量为 500mg/L 作用 30min, 对细菌芽孢污染物品进行消毒时, 剂量为 1000mg/L 作用 30min。用于饮用水消毒时, 剂量为 5mg/L 作用 5min。

6.3.2.11 臭氧

分子式为 O_3 , 是一种强氧化剂, 在常温下为爆炸性气体。其密度为 1.68。在水中的溶解度较低, 约为 3%。臭氧具有杀菌迅速, 消毒后无残留等优点, 因此适于用于饮用水、果蔬、餐饮具等的消毒。臭氧稳定性极差, 在常温下可自行分解为氧, 所以, 臭氧不能瓶装贮备, 只能现场生产, 立即使用。

6.3.2.11.1 杀菌能力: 臭氧可杀灭细菌繁殖体、病毒、真菌等, 并可破坏肉毒杆菌毒素。

6.3.2.11.2 影响因素和注意事项

(1) 多种因素可影响臭氧的杀菌作用, 包括温度、相对湿度、有机物、pH、水的浑浊度、水的色度等。

(2) 高浓度臭氧对人有毒, 大气中允许浓度为 $0.2\text{mg}/\text{m}^3$, 工作场所允许浓度为 $1.0\text{mg}/\text{m}^3$ 。(3)

臭氧为强氧化剂, 对多种物品有损坏, 浓度越高对物品损害越重, 可使铜片出现绿色锈斑; 可使橡胶老化变色, 弹性降低, 以致变脆、断裂; 可使织物漂白褪色。

(4) 臭氧对物品表面上污染的微生物有杀灭作用, 但作用缓慢。

6.3.2.11.3 应用: 臭氧适于用于饮用水、果蔬、餐饮具等的消毒。也可用于各种物品表面消毒和空气消毒。水消毒时一般加臭氧量 $0.5\text{mg}/\text{L}\sim 1.5\text{mg}/\text{L}$, 水中臭氧浓度在 $0.1\text{mg}/\text{L}\sim 0.5\text{mg}/\text{L}$, 维持 5min~10min。对于质量较差的水, 加臭氧量可提高到 $3\text{mg}/\text{L}\sim 6\text{mg}/\text{L}$ 。空气消毒时一般可采用 $30\text{mg}/\text{m}^3$ 的臭氧, 作用 15min~30min。臭氧水用于果蔬、餐饮具和其他物体表面消毒时, 臭氧浓度 $>12\text{mg}/\text{L}$, 作用时间 15min~20min。

6.3.3 消毒剂浓度的表示方法

6.3.3.1 消毒剂溶液浓度

消毒剂溶液浓度的表示应以有效成分的含量为准。常用百分浓度和百万分浓度表示。

6.3.3.1.1 百分浓度: 每一百份消毒剂溶液中含有有效成分的份数, 符号是“%”。百分浓度中的重

量百分浓度即 100g 消毒剂溶液中含有有效成分的克数。容量百分浓度即 100mL 消毒剂溶液中含有有效成分的毫升数。

(2)百万分浓度：每一百万份消毒剂溶液中，含有效成分的份数，单位是 mg/L。

6.3.3.2 消毒剂固体制剂浓度

以百分含量表达（见 6.3.3.1）。

6.3.3.3 气体中消毒剂含量

以消毒剂有效成分在气体中的含量为准，一般以 mg/L 或 g/m³ 为单位表达。

6.3.4 主要消毒剂有效成分含量测定法

6.3.4.1 目的

测定消毒剂有效成分实际含量，用于检查消毒剂原药是否合格，或所配消毒液中杀菌有效成分的含量是否准确。此外，还可在配制所需浓度消毒液时作为计算稀释倍数的依据。

6.3.4.2 消毒剂含量测定

6.3.4.2.1 有效氯含量的测定：见 3.1.2.1。

6.3.4.2.2 有效碘含量的测定：见 3.1.2.2。

6.3.4.2.3 过氧乙酸（C₂H₄O₃）含量的测定：见 3.1.2.3。

6.4 紫外线强度及消毒剂浓度简易测定法

6.4.1 紫外线强度照射指示卡

6.4.1.1 适用范围：监测紫外线灯管在垂直 1m 处的照射强度。

6.4.1.2 使用方法：

- (1)开启紫外线灯 5min 后，将化学卡置紫外线灯下垂直距离 1m 处，有图案一面朝上。
- (2)照射 1min（紫外线照射后，图案正中光敏色块由乳白色变成不同程度的淡紫色）。
- (3)观察指示卡色块的颜色，将其与标准色块比较，读出照射强度。

6.4.1.3 结果判定：

- (1)30w 新灯管，不低于 90μW/cm² 为合格。
- (2)使用中的旧灯管不低于 70μW/cm² 为合格。

6.4.1.4 注意事项：

- (1)紫外线照射时应严格控制时间，否则测定结果不准确。
- (2)指示卡为光敏材料制成，应避光保存。

6.4.2 浓度试纸测定法

6.4.2.1 G-1 型消毒剂浓度试纸

6.4.2.1.1 使用范围：过氧乙酸、含氯消毒剂（如漂白粉、二氯异氰尿酸钠、次氯酸钠、氯化磷酸三钠等）、二氧化氯消毒剂等的现场测定。

6.4.2.1.2 使用方法

(1) 消毒剂溶液有效成分浓度在浓度试纸测定范围内时，取试纸浸于消毒液中，片刻取出，半分钟内在自然光下与标准色块比较，读出溶液所含有效成分含量。

(2) 消毒剂溶液有效成分浓度高于浓度试纸测定范围内时，可用自来水先将消毒剂稀释，使其有效成分浓度在试纸测定范围内，再按上法进行测定。

(3) 对固体消毒剂测定时，应先用自来水将消毒剂配制成溶液，并使其有效成分浓度在试纸测定范围内，再按上法进行测定并计算有效成分浓度。

6.4.2.1.3 结果判定

(1) 直接测定的消毒剂溶液，对应标准色块上所示浓度为该消毒剂溶液的有效成分浓度。

(2) 固体消毒剂或需稀释的消毒剂，其有效成分浓度为比色所得值乘以稀释倍数即为该消毒剂的有效成分浓度。

6.4.2.1.4 注意事项

(1) 溶液有效成分 $>1000\text{mg/L}$ 时准确性较差，浓度在 $20\text{mg/L}\sim 500\text{mg/L}$ 时，测定结果较准确。

(2) 试纸浸湿后时间超过 1min ，颜色逐渐消退，结果不准确。

(3) 本法所测结果不精确。

(4) 用后，剩余试纸应及时放回原塑料袋内包好，以免受到环境中其他药物的影响，影响以后的测定。

6.4.2.2 其他型号浓度试纸

各种浓度试纸应通过检测机构和有关部门的检测与认可。使用时可按照说明书进行操作。

6.4.3 含氯消毒剂中有效氯的简易检测

6.4.3.1 漂白粉中有效氯的简易检测：称取 0.5g 漂白粉于 10mL 比色管中，加入清水至 10mL ，强烈振摇 1min ，放置 5min ，倾出上清液，用吸管吸出 38 滴于白瓷盘中。将此吸管洗净，吸蓝墨水滴加于吸出的漂白粉上清液上，边搅拌边滴加蓝墨水，直至出现稳定的蓝绿色为止。消耗蓝墨水的滴数即为该漂白粉中有效氯的百分含量。

6.4.3.2 漂白粉精中有效氯的简易检测：方法与漂白粉中有效氯的简易检测(6.4.3.1)相同，只是取样品澄清液 19 滴，有效氯的百分含量为蓝墨水滴数的两倍。

6.4.4 水中余氯检验

取经消毒的水样用市售余氯比色器或余氯测定试剂盒测定，也可以用 DPD 比色法或邻联甲苯胺比色法。

6.5 各种污染对象的常用消毒方法

6.5.1 地面、墙壁、门窗：对细菌繁殖体和病毒的污染，用 0.2%~0.5% 过氧乙酸溶液或 500mg/L~1000mg/L 二溴海因溶液或 1000mg/L~2000mg/L 有效氯含氯消毒剂溶液喷雾。泥土墙吸液量为 150mL/m²~300 mL/m²，水泥墙、木板墙、石灰墙为 100mL/m²。对上述各种墙壁的喷洒消毒剂溶液不宜超过其吸液量。地面消毒先由外向内喷雾一次，喷药量为 200mL/m²~300mL/m²，待室内消毒完毕后，再由内向外重复喷雾一次。以上消毒处理，作用时间应不少于 60min。有芽孢污染时应用 0.5%~1.0%过氧乙酸溶液或 30000mg/L 有效氯含氯消毒剂进行喷洒。喷洒量与繁殖体污染时相同，作用时间不少于 120min。

6.5.2 空气：房屋经密闭后，对细菌繁殖体和病毒的污染，每立方米用 15% 过氧乙酸溶液 7mL（1g/m³），对细菌芽孢的污染用 20 mL（3g/m³），放置瓷或玻璃器皿中加热蒸发，薰蒸 2h，即可开门窗通风。或以 2% 过氧乙酸溶液（8mL/m³）气溶胶喷雾消毒，作用 30min~60min。

6.5.3 衣服、被褥：被细菌繁殖体或病毒污染时，耐热、耐湿的纺织品可煮沸消毒 30min，或用流通蒸汽消毒 30min，或用 250mg/L~500mg/L 有效氯的含氯消毒剂浸泡 30min；不耐热的毛衣、毛毯、被褥、化纤尼龙制品等，可采取过氧乙酸薰蒸消毒。薰蒸消毒时，将欲消毒衣物悬挂室内（勿堆集一处），密闭门窗，糊好缝隙，每立方米用 15% 过氧乙酸 7mL（1g/m³），放置瓷或玻璃容器中，加热薰蒸 1h~2h。被细菌芽孢污染时，也可采用过氧乙酸薰蒸消毒。薰蒸消毒方法与被繁殖体污染时相同，用药量为每立方米 15% 过氧乙酸 20mL（3g/m³）；或将被消毒物品置环氧乙烷消毒柜中，在温度为 54℃，相对湿度为 80%条件下，用环氧乙烷气体（800mg/L）消毒 4h~6h；或用高压灭菌蒸汽进行消毒。

6.5.4 病人排泄物和呕吐物：稀薄的排泄物或呕吐物，每 1000mL 可加漂白粉 50g 或 20000mg/L 有效氯含氯消毒剂溶液 2000mL，搅匀放置 2h。无粪的尿液每 1000mL 加入干漂白粉 5g 或次氯酸钙 1.5g 或 10000mg/L 有效氯含氯消毒剂溶液 100mL 混匀放置 2h。成形粪便不能用干漂白粉消毒，可用 20% 漂白粉乳剂（含有效氯 5%），或 50000mg/L 有效氯含氯消毒剂溶液 2 份加于 1 份粪便中，混匀后，作用 2h。

6.5.5 餐（饮）具：首选煮沸消毒 15min~30min，或流通蒸汽消毒 30min。也可用 0.5% 过氧乙酸溶液或 250mg/L~500mg/L 二溴海因溶液或 250mg/L~500mg/L 有效氯含氯消毒剂溶液浸泡 30min 后，再用清水洗净。

6.5.6 食物：瓜果、蔬菜类可用 0.2%~0.5% 过氧乙酸溶液浸泡 10 min，或用 12mg/L 臭氧水冲洗 60min~90min。病人的剩余饭菜不可再食用，煮沸 30min，或用 20% 漂白粉乳剂、50000mg/L 有效氯含氯消毒剂溶液浸泡消毒 2 h 后处理。也可焚烧处理。

6.5.7 盛排泄物或呕吐物的容器：可用 2% 漂白粉澄清液（含有效氯 5000mg/L）、或 5000mg/L 有效氯含氯消毒剂溶液、或 0.5% 过氧乙酸溶液浸泡 30min，浸泡时，消毒液要漫过容器。

6.5.8 家用物品、家俱、玩具：可用 0.2%~0.5% 过氧乙酸溶液或 1000mg/L~2000mg/L 有效氯含氯消毒剂进行浸泡、喷洒或擦洗消毒。布制玩具尽量作焚烧处理。

6.5.9 纸张、书报：可采用过氧乙酸或环氧乙烷气体薰蒸（消毒剂量和方法同 6.5.3），无应用价值的纸张、书报焚烧。

6.5.10 手与皮肤：用 0.5% 碘伏溶液（含有效碘 5 000mg/L）或 0.5% 氯己定醇溶液涂擦，作用 1min~3min。也可用 75% 乙醇或 0.1% 苯扎溴铵溶液浸泡 1min~3min。必要时，用 0.2% 过氧乙酸溶液浸泡，或用 0.2% 过氧乙酸棉球、纱布块擦拭。

6.5.11 病人尸体：对鼠疫、霍乱和炭疽病人的尸体用 0.5% 过氧乙酸溶液浸湿的布单严密包裹，口、鼻、耳、肛门、阴道要用浸过 0.5% 过氧乙酸的棉球堵塞后尽快火化。土葬时，应远离水源 50 m 以上，棺木应在距地面 2m 以下深埋，棺内尸体两侧及底部铺垫厚达 3cm~5 cm 漂白粉，棺外底部铺垫厚 3cm~5cm 漂白粉。

6.5.12 动物尸体：因鼠疫、炭疽、狂犬病等死亡的动物尸体，一经发现立即深埋或焚烧。并向死亡动物周围（鼠为 30cm~50cm，大动物为 2 m）喷撒漂白粉。

6.5.13 运输工具：车、船内外表面和空间，可用 0.5% 过氧乙酸溶液或 10000mg/L 有效氯含氯消毒剂溶液喷洒至表面湿润，作用 60 min。密封空间，可用过氧乙酸溶液薰蒸消毒。对细菌繁殖体的污染，每立方米用 15% 过氧乙酸 7 mL（1g/m³），对细菌芽孢的污染用 20mL（3g/m³）蒸发薰蒸消毒 2h。对密闭空间还可用 2% 过氧乙酸进行气溶胶喷雾，用量为 8mL/m³，作用 60min。

6.5.14 厕所：厕所的四壁和地面的消毒，方法同 6.5.1。粪坑内的粪便可按粪便量的 1/10 加漂白粉，或加其他含氯消毒剂干粉或溶液（使有效氯作用浓度为 20000mg/L），搅匀作用 12h~24h。

6.5.15 垃圾：可燃物质尽量焚烧，也可喷洒 10000mg/L 有效氯含氯消毒剂溶液，作用 60min 以上。消毒后深埋。

6.5.16 污水消毒

6.5.16.1 疫点内的生活污水，应尽量集中在缸、桶中进行消毒。每 10L 污水加入 10000mg/L 有效氯含氯消毒溶液 10mL，或加漂白粉 4g。混匀后作用 1.5 h~2 h，余氯为 4mg/L~6 mg/L 时即可排放。

6.5.16.2 对疫区内污染的生活污水，可使用含氯消毒剂进行消毒。消毒静止的污水水体时，应先测定污水的容积，而后按有效氯 80mg/L~100mg/L 的量将消毒剂投入污水中。搅拌均匀，作用 1h~1.5h。检查余氯在 4mg/L~6mg/L 时，即可排放。对流动污水的水体，应作分期截流。在截流后，测污水容量，再按消毒静止污水水体的方法和要求进行消毒与检测。符合要求后，放流，再引入并截流新来的污水，如此分期依次进行消毒处理。

6.6 疫区饮用水的消毒与管理

在疫区，应加强对集中式给水的自来水厂管理，确保供水安全，同时亦应重视对分散式用水的管理与消毒。

6.6.1 井水消毒

6.6.1.1 水井的卫生要求：水井应有井台、井盖与公用取水桶。水井周围 30m 不得有渗水厕所、粪坑、垃圾堆、渗水井等污染源。

6.6.1.2 井水量的计算

$$\text{圆井水量} = [\text{水面直径(m)}]^2 \times 0.8 \times \text{水深 (m)}$$

$$\text{方井水量} = \text{边长 (m)} \times \text{边宽 (m)} \times \text{水深 (m)}$$

6.6.1.3 直接投加漂白粉消毒法：将所需量漂白粉放入碗中，加少许冷水调成糊状，再加适量的水，静置 10min。将上清液倒入井水中，用取水桶上下振荡数次，30min 后即可使用。一般要求余氯量为 0.5mg/L。井水消毒，一般每天 2 次~3 次。所需用漂白粉量应根据井水量、规定加氯量与漂白粉含有效氯量进行计算。例如：某一园井直径 0.8m，水深 2.5m，消毒时规定加氯量为 2mg/L，所用漂白粉含 25%有效氯，则其用药量可按式计算：

$$\text{井水量} = 0.8^2 \times 2.5 \times 0.8 = 1.28 \text{ m}^3$$

$$\text{应加有效氯量} = 1.28 \text{ m}^3 \times 2 \text{ g/m}^3 = 2.56 \text{ g}$$

$$\text{需用漂白粉量} = 2.56 \text{ g} \div 25\% = 10.24 \text{ g}$$

6.6.1.4 持续加漂白粉法：为减少对井水频繁进行加氯消毒，并持续保持一定的余氯，可用持续消毒法。持续法常用的工具有竹筒、无毒塑料袋、陶瓷罐或小口瓶，可因地制宜选用。

方法是在容器上面或旁边钻 4 个~6 个小孔，孔的直径为 0.2cm~0.5cm。根据水量和水质情况加入漂白粉。一般竹筒装漂白粉 250g~300g，塑料袋装 250g~500g。将加漂白粉容器口塞住或扎紧，放入井内，用浮筒悬在水中，利用取水时的振荡，使容器中的氯慢慢从小孔放出，以保持井水中一定的余氯量。一次加药后可持续消毒 1 周左右。采用本法消毒，应有专人负责定期投加药物，测定水中余氯。

6.6.2 河、湖、塘水防污染管理

6.6.2.1 用河、湖水作为饮用水源时，应先定好取水点。清除取水点周围 100 m 内各种污染源，禁止在该处洗澡、游泳、洗衣等，并防止牲畜进入。较大的水库和湖泊可采用分区用水，河流可采用分段取水。

6.6.2.2 水塘多的地区可采取分塘用水，选择水质较好水量较大易于防护的水塘专供饮用。塘的岸边可修建自然渗滤井或砂滤井，以改善水质。

6.6.2.3 如果在水体中检出肠道传染病病原体，应在沿河、塘边树立警告牌，告诫群众，暂停使用此水。阳性水体中的水生动植物，在水体阳性期间禁止捕捞或移植，直到水体转阴为止。

6.6.3 缸水消毒

6.6.3.1 由于河、湖及塘水的水量大，流动快，饮用水最好采用缸水法处理。当缸水浊度高于 3 度时，应先经洁治处理(混凝沉淀、过滤)后再进行消毒。

6.6.3.2 混凝沉淀时，以一水缸装原水，用明矾混凝沉淀。用一直径 3cm~4cm，长 1m 左右的竹筒（或其它替代物），筒底四周钻几十个小孔，竹筒装入明矾后，在缸水中搅动。通常用量为每 100kg 水加明矾 50g。也可用其他混凝剂。

6.6.3.3 静置沉淀约 1h 后，取上清水至砂滤缸内过滤。砂滤缸中细砂以 0.5mm 粒径为宜，粗砂直径宜为 0.8mm。细砂与粗砂层厚各为 15cm~20cm。每层用棕皮或其他材料隔开，表层与底层都放置石子。砂滤缸使用一定时间后，当滤速减慢或滤出水变浊时，将滤材取出用清水洗净后重新装入可继续使用。

6.6.3.4 将经洁治处理的水引入消毒缸中进行消毒。消毒时，可使用含氯消毒剂，其用量随水的污染程度而定，一般在 4mg/L~8mg/L，作用 30min。使用含氯消毒剂片剂时，用量可按使用说明书投放。消毒后，测量余氯，在 0.3mg/L~0.5mg/L 者，即可饮用。

6.6.3.5 水中余氯量过高，有明显氯臭时，饮用前可用煮沸、吸附和化学中和等方法进行脱氯处理。中和药物的用量，可用递增加药法测试，以刚好使氯臭消失的用量为准。一般情况下，使用硫代硫酸钠进行化学中和时，其用量为余氯量的 1.7 倍以上；用亚硫酸钠时，其用量约为余氯量的 3.5 倍。使用的中和药物应符合有关标准和要求。

为方便工作，将非芽孢污染的各种污染对象常用消毒方法、消毒剂量等列于表 4-1，现场消毒时可参照进行。具体的消毒方法特别是对受芽孢污染的消毒对象的消毒方法和一些特殊的消毒方法和消毒要求应按 6.5，6.6，6.8 所列方法进行。

表 6-1 非芽孢污染场所、污染物品的消毒处理方法与剂量

消毒场所	消毒方法	用 量	消毒时间
室外污染表面	500mg/L~1000mg/L 二溴海因喷洒	500mL/m ²	30min
	1000mg/L~2000mg/L 含氯消毒剂喷洒	500mL/m ²	60min ~120min
	漂白粉喷撒	20g/m ² ~40g/m ²	2h~4h
室内表面	250mg/L~500mg/L 含氯消毒剂擦拭	适量	
	0.5%新洁而灭擦拭	适量	
	0.5%过氧乙酸薰蒸	适量	60min~90min
	500mg/L~1000mg/L 二溴海因喷洒	100 mL/m ² ~500mL/m ²	30min
	1000mg/L~2000mg/L 含氯消毒剂喷洒	100 mL/m ² ~500mL/m ²	60min ~120min
	2%过氧乙酸气溶胶喷雾	8mL/m ³	60min
	0.2%~0.5%过氧乙酸喷洒	350mL/m ²	60min
室内地面	0.1%过氧乙酸拖地	适量	
	0.2%~0.5%过氧乙酸喷洒	200 mL/m ² ~350mL/m ²	60min
	1000mg/L~2000mg/L 含氯消毒剂喷洒	100 mL/m ² ~500mL/m ²	60min~120min
室内空气	紫外线照射	1W/m ³	30min~60min
	臭氧消毒	30mg/m ³	30min
	0.5%过氧乙酸薰蒸	1g/m ³	120min
餐、饮具	蒸煮	100℃	10min~30min
	臭氧水冲洗	≥12mg/L	60min~90min
	含氯消毒剂浸泡	250 mg/L~500mg/L	15min~30min
	远红外线照射	120℃~150℃	15min~20min
被褥、书籍、电 器电话机	环氧乙烷简易薰蒸	1500mg/L	16min~24h
服装、被单	0.2%~0.5%过氧乙酸擦拭	适量	
	煮沸	100℃	30min
	250mg/L~500mg/L 含氯消毒剂浸泡	淹没被消毒物品	30min
游泳池水	0.04%过氧乙酸浸泡	淹没被消毒物品	120min
	加入含氯消毒剂	余氯 0.5mg/L	30min
	加入二氧化氯	5mg/L	5min
污水	10%~20%漂白粉溶液搅匀	余氯 4mg/L~6mg/L	30min~120min
	30000mg/L~50000mg/L 溶液搅匀		
粪便、分泌物	漂白粉干粉搅匀	1: 5	2h~6h
	30000mg/L~50000mg/L 含氯消毒剂	2: 1	2h~6h
尿	漂白粉干粉搅匀	3%	2h~6h
	10000mg/L 含氯消毒剂搅匀	1: 10	2h~6h
便器	0.5%过氧乙酸浸泡	浸没便器	30min~60min
	5000mg/L 含氯消毒剂溶液浸泡	浸没便器	30min~60min
手	2%碘酒、0.5%碘伏、0.5%氯己定醇液	适量	1min~2min
	擦拭	适量	5min
运输工具	75%乙醇、0.1%新洁而灭浸泡		
	2%过氧乙酸气溶胶喷雾	8mL/m ³	60min

6.7 疫源地消毒效果的微生物学评价

6.7.1 目的

用微生物学指标评价各种消毒措施对疫源地中被污染对象的消毒效果,以作为是否达到消毒合格的依据。

6.7.2 器材

(1)磷酸盐缓冲液 (PBS, 0.03mol/L, pH 7.2)

(2)采样液 (在 PBS 中加入相应中和剂)

- (3)中和剂（经鉴定试验合格者）
- (4)采样棉拭
- (5)普通营养肉汤与琼脂，以及其他培养基
- (6)试管与吸管
- (7)水采样瓶（250mL~500mL）
- (8)水样抽滤设备
- (9)酒精灯、记号笔和记录表
- (10)接种环与镊子
- (11)采样规格板（中央空格为 5.0cm×5.0cm）

6.7.3 评价标准

6.7.3.1 随时消毒卫生标准

- (1) 医院随时消毒按GB 15982-1995中第 4 章执行。
- (2) 传染病病家随时消毒是在卫生防疫人员指导下进行的，必要时要进行消毒效果检查，判定标准为：经消毒后不得检出病原微生物，呼吸道传染病经消毒后不得检出病原微生物或溶血性链球菌(间接污染指标)；消毒后自然菌杀灭率须 $\geq 90.00\%$ ，不能用病原微生物或间接指示菌作杀灭效果评价的病种，可参考消毒后比消毒前的自然菌杀灭率 $\geq 90.00\%$ 为标准(若出现消毒后比消毒前菌落数增多的异常现象并超过全部样品的半数以上时，应将全部样品作废并重新采样)。随时消毒应每天进行1~2次。

6.7.3.2 终末消毒卫生标准

- (1) 物体表面消毒后，对自然菌的杀灭率 $\geq 90.00\%$ ，不得检出该疫源地传染病病原微生物；
- (2) 排泄物、分泌物消毒后，不得检出病原微生物；
- (3) 被病原微生物污染的血液等消毒后，不得检出病原微生物，乙型肝炎患者的血液等不得检出乙型肝炎病毒的代表物；
- (4) 空气消毒后，不得检出乙型溶血性链球菌和其他病原微生物，对自然菌的杀灭率 $\geq 90.00\%$ ，可判为消毒合格。
- (5) 污物处理：按GB 15982-1995中 4.4 执行。
- (6) 污水排放标准：按GB 8978-1996执行

6.7.4 检测方法

6.7.4.1 物体表面的检测方法

- 6.7.4.1.1 检测重点对象：以病人经常接触的物品作为检测重点。例如，食（饮）具、门把手、床

头柜、便器等。

6.7.4.1.2 消毒前采样：将无菌棉拭在含 10mL PBS 试管中浸湿，并于管壁上挤压至不出水后，对无菌规格板框定的被检物体表面涂抹采样(采样面积为 5cm × 5cm)，横竖往返各 8 次，使棉拭四周都接触到物体表面。以无菌操作方式将棉拭采样端剪入原 PBS 试管内，充分振打，进行活菌培养计数。对不适宜用规格板采样的物体表面（例如门把手，热水瓶把等）可按实际面积采样。

6.7.4.1.3 消毒后采样：消毒至设定的时间后，在消毒前采样点附近的类似部位进行棉拭涂抹采样。除用采样液代替 PBS 外，其余步骤和方法与消毒前采样相同。

6.7.4.1.4 将消毒前、后样本 4h 内送实验室进行活菌培养计数以及相应致病菌与相关指标菌的分离与鉴定。

活菌培养计数检测要求与程序参见本规范 2 实验技术规范。菌数计算公式为：

$$\text{物体表面菌数}(\text{cfu}/\text{cm}^2) = \text{kN}/\text{SV}$$

式中：k：稀释量；N：平板上菌落数(cfu)；S：采样面积(cm²)；V：接种量(mL)。

6.7.4.1.5 相应致病菌与相关指标菌的采样、分离与鉴定，参见有关传染病诊断、消毒等方面的国家标准和规范，由具备检验能力的专业实验室进行。

6.7.4.2 排泄物、呕吐物的检测方法

6.7.4.2.1 消毒前采样：取 1mL（或 1g）污染物放入含 9mL PBS 的试管。振荡混匀，取 0.5mL 放入另一含 4.5mL PBS 的试管内。在管壁上做好标记。

6.7.4.2.2 消毒后采样：消毒达设定的作用时间时，进行消毒后采样。采样步骤和方法除用采样液代替 PBS 外，其余均与消毒前相同。

6.7.4.2.3 将消毒前、后的样品 4h 内在送实验室进行活菌培养计数以及相应致病菌与相关指标菌的分离与鉴定。

活菌培养计数检测方法参见本规范的实验技术规范。菌数计算公式为：

$$\text{排泄物呕吐物含菌量}(\text{cfu}/\text{g 或 cfu}/\text{mL}) = \text{kN}/\text{WV}$$

式中：k：稀释量；N：平板上菌落数(cfu)；W：试验样本重量或体积(g 或 mL)；V：接种量(mL)。

6.7.4.2.4 相应致病菌与相关指标菌的分离与鉴定，参见有关传染病诊断、消毒等方面的国家标准和规范，由具备检验能力的专业实验室进行。

6.7.4.3 空气的检测方法

6.7.4.3.1 消毒前采样：将拟消毒房间的门窗关好，在无人的条件下经 10min 后，在室内的四角和

中央相当于桌面高度处各放置一个无菌普通营养琼脂平板。打开平皿盖，暴露 5min~10min 后盖好平皿盖。对各平皿应做好标记。

6.7.4.3.2 消毒后采样：空气消毒达到规定的时间后，在消毒前采样的相同位置上，另放一组普通营养琼脂平板。放置方法和暴露时间与消毒前采样相同。同时取 2 个未经采样的普通营养琼脂平板作为阴性对照。

6.7.4.3.3 将消毒前、后的样本和阴性对照样本，尽快送实验室，于 37℃ 培养箱中培养 48h。计数菌落。并按下式计算空气中的菌数：

$$\text{空气中菌数} = \frac{50000N}{AT} (\text{cfu} / \text{m}^3)$$

式中：A：平板面积 (cm²)；T：平板暴露的时间 (min)；N：平均菌落数；cfu：菌落形成单位

6.7.4.3.4 对各种致病菌与相关指标菌的采样、分离与鉴定，参见有关传染病诊断、消毒等方面的国家标准和规范，由具备检验能力的专业实验室进行。

6.7.4.4 水的检测方法

6.7.4.4.1 消毒前采样：取拟消毒水源水样于 2 个无菌采样瓶中，每瓶 100mL。

6.7.4.4.2 消毒后采样：消毒至规定作用时间后，分别将消毒后水样采入 2 个装有与消毒剂相应中和剂的无菌采样瓶中，每瓶 100mL。混匀，作用 10min。

6.7.4.4.3 将消毒前、后的水样 4h 内送实验室进行检测。将水样注入滤器中，加盖，在负压为 0.05 Mpa 的条件下抽滤。滤完后，再抽气 5s，关闭滤器阀门，取下滤器。用无菌镊子夹取滤膜边缘，移放在品红亚硫酸钠琼脂培养基平板上。滤膜的细菌截留面朝上，滤膜与培养基完全紧贴。将平皿倒置，放于 37℃ 恒温箱内，培养 22h~24h，观察结果。计数滤膜上生长的带有金属光泽的黑紫色大肠杆菌菌落。

6.7.4.4.4 评价：饮用水以消毒后水样中大肠菌群下降至 0/100mL 为消毒合格。污水消毒后，大肠菌群 ≤ 500 个/L，连续 3 次采样未检相应致病菌为消毒合格。水中含菌量计算公式为：

$$\text{水中含菌量}(\text{cfu}/\text{mL}) = \text{kN}/\text{WV}$$

式中：k：稀释量；N：平板上菌落数(cf_u)；W：试验样本重量或体积(mL)；V：接种量(mL)。

6.7.4.4.5 对各种致病菌的采样、分离、培养与鉴定，参见有关传染病诊断、消毒等方面的国家标准和规范，由具备检验能力的专业实验室进行。

6.7.5 检验结果报告

由检验人员填写“疫点终末消毒效果检验记录”（见附录 C）。

6.8 各种传染病疫点消毒要求

6.8.1 鼠疫

6.8.1.1 概述

鼠疫是国际检疫传染病之一，并且列于我国传染防治法中甲类传染病之首。该病起病急，传播迅速，病程短，死亡率高，危害大，世界各国广泛重视。鼠疫是自然疫源性疾病，病原体为鼠疫耶尔森氏菌（*Yersinia pestis*）。尽管鼠疫菌离开宿主后适应外环境的能力较差，存活能力不强，但当获得适当的新宿主，则繁殖迅速，毒力极强。鼠疫传染源包括染疫哺乳动物、媒介昆虫和鼠疫患者。因为鼠疫的传播途径除跳蚤叮咬外，还可经直接接触和空气飞沫传播，故消毒在其预防中具有重要意义。

6.8.1.2 消毒人员的个人防护

参加鼠疫消毒的工作人员在工作中要注意个人防护，必需穿着防鼠疫服，严格遵守操作规程和消毒制度，以防受到感染。必要时，可口服抗生素预防。全套的防鼠疫服包括：联身服、三角头巾、防护眼镜、防鼠疫纱布口罩或滤材口罩、橡皮手套、长筒胶靴和罩衫。其穿脱方法如下：先穿联身服和长筒胶靴，戴好普通工作帽，再包头巾，使盖住头发、两耳和颈部，然后戴上口罩，在鼻翼两侧塞上棉花球；戴防护眼镜，再穿上罩衫，最后戴橡皮手套。

在消毒工作后，仍戴着手套在 0.2% 过氧乙酸溶液中浸洗双手 3min，穿着长筒靴站入盛有 0.2% 过氧乙酸溶液深度为 30cm~40cm 的药槽中 3min~5min。然后，戴着手套脱下罩衫浸入 0.2% 过氧乙酸溶液中，取下防护眼镜浸入 75% 酒精中，解下口罩与头巾浸于 0.2% 过氧乙酸溶液中。最后，脱下胶靴、手套，再脱下联身服，用刺激性较轻微的消毒剂进行手的消毒。

6.8.1.3 消毒方法

6.8.1.3.1 对室内地面、墙壁和门窗及暴露的用具；室内空气；衣物、被褥；病人排泄物、呕吐物和分泌物及其容器；餐（饮）具、食物；交通、运输工具；家用物品、家具和玩具；纸张、书报等可按 6.5.1~6.5.9、6.5.13 所列方法进行消毒。

6.8.1.3.2 对手与皮肤的消毒可按 6.5.10 所列方法进行消毒。

6.8.1.3.3 病人尸体的处理可按 6.5.11 所列方法进行

6.8.1.3.4 动物尸体的处理可按 6.5.12 所列方法进行。

6.8.1.3.5 防鼠灭鼠和防蚤灭蚤的方法参考有关规定。

6.8.1.3.6 常用过氧乙酸或含氯消毒剂进行消毒。有时，也可使用其他中、低效消毒剂进行消毒（见表 6-1）。

6.8.2 霍乱

6.8.2.1 概述

霍乱是由霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 引起的烈性肠道传染病, 多见于夏秋季。流行时有大量健康带菌者。病人与带菌者均为霍乱的传染源, 一经发现即应对其疫源地进行消毒处理。霍乱可通过水、食物、苍蝇等传播, 人群普遍易感。

霍乱弧菌现有古典生物型、埃尔托生物型和 O-139 弧菌。霍乱的 3 型病原菌对常用消毒剂及各种物理消毒方法均敏感, 但在硷性环境中生长良好。

6.8.2.2 消毒方法

6.8.2.2.1 对疫点室内地面、墙壁; 衣物、被褥; 病人排泄物、呕吐物及其容器; 餐(饮)具、食物; 家用物品、家具和玩具; 纸张、书报; 运输工具; 厕所、垃圾和污水等的消毒, 可按 6.5.1、6.5.3~6.5.9、6.5.13~6.5.16 中所列方法进行。

6.8.2.2.2 对手与皮肤的消毒可按 6.5.10 所列方法进行。需要时, 亦可使用中效消毒剂。

6.8.2.2.3 对病人尸体可按 6.5.11 中所列方法进行。

6.8.2.2.4 水的消毒可按 6.6 所列方法进行。

6.8.2.2.5 本病疫点消毒主要使用含氯消毒剂与过氧乙酸等高效消毒剂。对部分消毒对象有时也可用中、低效消毒剂。

6.8.2.2.6 在消毒的同时应开展防蝇灭蝇及灭蟑螂的工作, 具体方法参考有关规定。

6.8.3 甲型肝炎和戊型肝炎

6.8.3.1 概述

此两型肝炎的病原体分别为甲型肝炎病毒(Hepatitis A virus, HAV)与戊型肝炎病毒(Hepatitis E virus, HEV), 其传播途径均是粪—口传播为主, 亦见有经血或密切接触感染者, 粪便污染食物或水源可造成流行, 食用生的污染贝类, 如牡蛎、蛤、贻贝与毛蚶, 也可受染。

6.8.3.2 消毒方法

6.8.3.2.1 对室内地面、墙壁、家俱表面; 衣物、被褥; 病人排泄物、呕吐物及其容器; 餐(饮)具; 食物; 家用物品、家具和玩具; 纸张、书报; 运输工具; 厕所与垃圾等的消毒, 可按 6.5.3~6.5.9、6.5.13~6.5.16 所列方法进行。

6.8.3.2.2 对手与皮肤的消毒, 可按 6.5.10 所列方法进行。需要时, 也可使用中效消毒剂。

6.8.3.2.3 对病人遗体可按 6.5.11 所列方法进行。

6.8.3.2.4 对水的消毒可按 6.6 所列方法进行。

6.8.3.2.5 在消毒的同时应开展防蝇灭蝇及灭蟑螂的工作, 具体方法参考有关规定。

6.8.4 乙型肝炎、丙型肝炎、丁型肝炎

6.8.4.1 概述

此 3 型肝炎的病原体分别为乙型肝炎病毒 (Hepatitis B virus, HBV)、丙型肝炎病毒 (Hepatitis C virus, HCV)、丁型肝炎病毒 (Hepatitis D virus, HDV)。这 3 型肝炎病毒均主要经血液传播 (输血、使用血制品、静脉吸毒、通过诊疗器械等), 此外, 亦可经日常生活中的密切接触传播。

6.8.4.2 消毒方法

6.8.4.2.1 对感染者和病人流出的血液与性分泌物应就地进行消毒。方法见 6.8.7.2.1。

6.8.4.2.2 对地面、墙壁; 家用物品、家具、玩具; 衣服、被褥; 餐 (饮) 具的消毒, 按 6.5.1、6.5.3、6.5.5、6.5.8 中的规定进行。

6.8.4.2.3 对手与皮肤的消毒可按 6.5.10 中的规定进行。

6.8.4.2.4 对病人尸体可按 6.5.11 中的规定进行。

6.8.4.2.5 对运输工具可按 6.5.13 中的规定进行。

6.8.4.2.6 发现 HBV、HCV 阳性血液及血制品, 应尽快彻底焚烧。对贮存此类物品的冰箱、冷库解冻后的冰水可用含氯消毒剂溶液 (含有效氯 2000mg/L), 按 1:1 的比例混匀, 作用 30min 后排放。冰箱、冷库内外壁, 亦可用上述含氯消毒剂进行擦拭消毒。

6.8.4.2.7 对实验室污物的处理, 可将用过的针头、注射器、输液管、酒精棉球、棉签、橡胶手套、橡胶管与其它污物装入桶中, 浸以 0.1% 次氯酸钠溶液 (含有效氯 1000mg/L) 消毒。必要时可彻底焚烧。焚烧后的灰烬按一般垃圾处理。

6.8.4.3 注意事项

6.8.4.3.1 处理污物时, 严禁用手直接抓取污物, 尤其是不能将手伸入到垃圾袋中向下压挤废物, 以免被锐器刺伤。

6.8.4.3.2 在运送阳性标本途中, 应携带消毒剂, 以备意外。

6.8.5 细菌性痢疾

6.8.5.1 概述

细菌性痢疾的病原体为痢疾杆菌 (*Shigella dysenteriae*)。主要传染源为痢疾患者和病原体携带者。可由含病原体的粪便直接或间接污染的水、食物、饮料及手等, 经粪—口途径传播, 也可经由携带该类病原体的苍蝇、蟑螂等污染食物而传播。流行或暴发流行主要由水源和食物受到污染所致。痢疾杆菌在外环境中的抵抗力强, 如在水中可存活 90d 以上, 但对理化消毒因子的抗力较低。

6.8.5.2 消毒方法

其疫源地消毒对象和方法同 6.8.2.2。

6.8.6 伤寒和副伤寒

6.8.6.1 概述

伤寒和副伤寒属乙类传染病，伤寒的病原菌为伤寒沙门菌（*Salmonella typhi*），副伤寒的病原菌为副伤寒沙门菌（*Salmonella paratyphi*），后者又分为甲、乙、丙 3 型。主要传染源是病人和带菌者。传播途径主要通过污染的食物、水经口感染。沙门菌对外环境的抵抗力强，在水中能存活 2 周~3 周，粪便中可存活 1 月~2 月，在冰冻土壤中可过冬。但在 60℃ 经 1h，或 65℃ 经 15min~20min 即死亡。

6.8.6.2 消毒方法

其疫源地消毒对象和方法同 6.8.2.2 。

6.8.7 艾滋病

6.8.7.1 概述

艾滋病病原体为人免疫缺陷病毒（human immunodeficiency virus, HIV），主要通过性接触传播（同性或异性间）、血液传播（输血、使用血制品、及静脉吸毒）和母婴传播。日常生活接触，如同桌进餐、共用浴具、握手、拥抱等不会感染艾滋病。离体后的 HIV 抵抗力很弱，几乎所有的消毒剂在短时间内均可将其灭活。

当环境和生活用品或医疗器械被感染者的血液、性分泌物和其它体液污染时，应随时进行消毒。病人迁移或死亡后应进行终末消毒。

6.8.7.2 消毒方法

6.8.7.2.1 感染者和病人流出的血液、性分泌物和炎性分泌物，应就地进行消毒后再做清洁处理。消毒时，应以二氯异氰尿酸钠或漂白粉剂将流出的体液全部覆盖，或用含氯消毒剂溶液（含有效氯 1000mg/L）或 0.5% 过氧乙酸溶液作用 15min~30min。对血液污染的物品，应煮沸 15min，或浸泡于含氯消毒剂溶液（含有效氯 1000mg/L），或 0.5% 过氧乙酸溶液中作用 15min~30min。

废弃的血液污染物品，如卫生巾、卫生护垫、卫生纸等可予焚烧，或经消毒液浸泡消毒后再按生活垃圾处理。

6.8.7.2.2 对地面、墙壁；家用物品、家俱、玩具；衣服、被褥、餐（饮）具等的消毒按 6.5.1、6.5.3、6.5.5、6.5.8 中的规定进行。

6.8.7.2.3 对手与皮肤的消毒可按 6.5.10 中的规定进行，亦可用中、低效消毒剂处理（见表 6-1）。

6.8.7.2.4 感染者和病人粪便应按 6.5.4 所列方法进行消毒处理。

6.8.7.2.5 病人尸体可按 6.5.1 中的规定进行。

6.8.7.2.6 排泄物容器的消毒可按 6.5.7 中的规定进行。抽水马桶盖可用含氯消毒剂溶液（含有效氯 500mg/L）或 0.2% 过氧乙酸溶液或中、低效消毒剂擦拭消毒（见表 6-1）。

6.8.7.2.7 运输工具可按 6.5.13 中的规定进行。

6.8.7.2.8 发现抗-HIV 阳性血液及血制品时，应尽快彻底焚烧，对储存此类物品的冰箱、冷库解冻后的冰水可用含氯消毒剂溶液（含有效氯 1 000mg/L）按 1:1 的比例混匀，作用 30min 后排放。冰箱、冷库内外壁，可用乙醇、苯扎溴铵等擦拭消毒（见表 6-1）。

6.8.7.2.9 对实验室污物的处理，可将用过的针头、注射器、输液管、酒精棉球、棉签、橡胶手套、橡胶管与其它污物装入桶中，浸以 1000mg/L 有效氯含氯消毒剂溶液消毒，作用 30min 以上。必要时可彻底焚烧，焚烧后的灰烬按一般垃圾处理。

6.8.7.3 注意事项

6.8.7.3.1 向生殖器官喷涂消毒剂不能有效预防在性生活中感染艾滋病。

6.8.7.3.2 处理污物时，严禁用手直接抓取污物，尤其是不能将手伸入到垃圾袋中向下压挤废物，以免被锐器刺伤。

6.8.7.3.3 在运送阳性标本途中，应携带消毒剂，以备意外。

6.8.8 淋病和梅毒

6.8.8.1 概述

淋病的病原体为淋病奈瑟氏菌（*Neisseria gonorrhoeae*）。该菌在外界抵抗力弱，55℃湿热下仅可生存数分钟，对常用消毒剂极敏感，低效消毒剂即可将其杀灭。传染源为现症患者及带菌者。

梅毒的病原体为苍白螺旋体（*Treponema pallidum*），对外界环境抵抗力弱。离体后，一般 1h~2h 内死亡。对干燥和热敏感，在 60℃经 3min~5min 即死亡，在 100℃时立即死亡，但对冷抵抗力较强。对消毒剂抵抗力差，低效消毒剂即可将其杀灭。病人是唯一的传染源，一般认为病程初期、二期病人传染性较强。

淋病和梅毒主要是通过性行为传播，此外当皮肤、粘膜有破损时，直接接触病灶或接触有传染性的分泌物也可受染

6.8.8.2 消毒方法

6.8.8.2.1 对居室的家具表面；病人的内衣、内裤、被褥、床单、浴巾、毛巾等的消毒，可按 6.5.1、6.5.3 中的方法进行。

6.8.8.2.2 病人用过的便器特别是坐式马桶，用 0.2% 过氧乙酸或 500mg/L 有效氯含氯消毒剂溶液擦拭即可。也可使用中、低效消毒剂处理（见表 6-1）。

6.8.8.2.3 向生殖器官喷涂消毒剂，不能有效预防在性生活中感染淋病和梅毒。

6.8.9 脊髓灰质炎

6.8.9.1 概述

脊髓灰质炎是由脊髓灰质炎病毒（poliomyelitis virus）引起的肠道传染病。粪-手-口是主要的传播方式，也可通过食物、水及苍蝇传播。脊髓灰质炎病毒按血清型分为 I、II、III 型，均对常用消毒因子敏感。

脊髓灰质炎是世界上继天花之后第二个要消灭的传染病，一经发现要采取严格的防治措施，包括口服疫苗应急接种，采取严格的隔离消毒措施等。

6.8.9.2 消毒方法

对脊髓灰质炎疫源地可参照 6.8.2.2 进行消毒处理。还要注意对患儿所在的托幼机构、学校进行消毒，特别是对玩具、文具、衣物、餐（饮）具、水及地面搞好消毒。

6.8.10 白喉

6.8.10.1 概述

白喉的传染源是病人和带菌者，病原体是白喉棒状杆菌（*Corynebacterium diphtheriae*）。该菌在生长繁殖过程中产生外毒素，引起临床症状。白喉棒状杆菌在阴暗居室内和污染的玩具上可生存 3 个月，在常温下易死亡，在牛奶中可繁殖。易为热、阳光和各种消毒剂杀灭。60℃作用 20min 可使其外毒素破坏。

传播途径主要由飞沫传播，其次通过污染的手、玩具、用具、食具及手帕等物品传播，牛奶也可作为传播媒介，也可经破损的皮肤或粘膜感染。

6.8.10.2 消毒方法

6.8.10.2.1 对室内空气；病人分泌物；玩具、文具；饮食用具；棉织品、皮毛制品与化纤制品等按 6.5.2~6.5.5 所列方法进行消毒处理。

6.8.10.2.2 对消毒牛奶可煮沸 10min。

6.8.10.2.3 在消毒中，主要使用含氯消毒剂与过氧乙酸，部分消毒对象也可使用中、低效消毒剂。

6.8.11 流行性出血热

6.8.11.1 概述

流行性出血热（下简称出血热）是一种自然疫源性疾病，主要病原体为汉坦病毒（Hanta virus）。人普遍易感，动物感染后一般不发病，为健康状态携带病毒。

出血热具有多宿主性，在我国主要传染源有野栖为主的黑线姬鼠和家栖为主的褐家鼠，通常情况下病人成为传染源的情况很少。出血热可经鼠咬或革螨、恙螨、蚤、蚊叮咬传播，也可垂直

传播，还可经感染动物的排泄物(尿、粪)、分泌物(唾液)和血污染空气、尘埃、食物和水后再经呼吸道、消化道、伤口接触感染给人。

6.8.11.2 消毒方法

6.8.11.2.1 对发热期病人的排泄物、分泌物、血；病人的便器；衣物、被褥；餐(饮)具；生活用具；室内空气和污染食物等的消毒，可按 6.5.1~6.5.8 进行消毒处理。有时，可使用中、低效消毒剂进行消毒（见表 6-1）。

6.8.11.2.2 疫点室内、庭院，有鼠隐蔽、栖息场所的地面和杂物堆，用 10000mg/L 有效氯含氯消毒剂或 0.5% 过氧乙酸，按 100mL/m²~200mL/m² 喷洒消毒。

6.8.11.2.3 对发热期病人和疫鼠的排泄物、分泌物、血及其污染物污染伤口，或被鼠咬伤的伤口，用 0.5% 碘伏消毒。

6.8.11.2.4 疫区应开展杀虫、灭鼠。搜集的鼠尸和染疫的实验动物，应就近火焚，或掩埋地下。

6.8.12 狂犬病

6.8.12.1 概述

狂犬病是一种古老的自然疫源性疾病，其病原体为狂犬病毒（rabies virus）。犬是人感染狂犬病的主要传染源，其次为猫、狼、狐、鼠等。动物在发病前一周和整个病程期间，在其唾液、血液、尿、乳汁中出现病毒。人传染人极为罕见。

狂犬病主要通过患兽咬伤或皮肤粘膜接触狂犬病毒感染，也可通过呼吸道、消化道感染和垂直传播。个别情况下，也有被病人咬伤，或被病人唾液污染伤口，或在宰杀患兽、剥制患兽毛皮时感染。

6.8.12.2 消毒方法

6.8.12.2.1 对病人饮食、生活用具；衣服、被褥等纺织品；病人和患兽的唾液、鼻咽分泌物、眼泪、血及其污染物；运送病人、病兽的交通工具；室内地面、墙面及病兽血等污染的地面等，可按一般消毒方法处理（见 6.5）。有时也可用中、低效消毒剂进行消毒。

6.8.12.2.2 对病兽咬伤的伤口应迅速进行紧急处理。以清除含有狂犬病毒的唾液。先用大量的 20% 肥皂水冲洗，再用 0.5% 碘伏对局部伤口进行消毒。

6.8.12.2.3 对病人的尸体和病兽尸体应进行火化处理。

6.8.13 钩端螺旋体病

6.8.13.1 概述

钩端螺旋体病（简称钩体病）是由致病性钩端螺旋体（*Leptospira* sp. 下简称钩体）引起的一种人兽共患病。钩体通过破损的皮肤或粘膜侵入机体。人通过饲养、屠宰接触携带钩体的家畜

或接触被鼠、牛、猪、狗等带有钩体的尿液污染的水或土壤而感染本病。钩体易受理化及生物因素影响而迅速死亡，在血液中能生存 10d 左右，尿液中能生存 1d，但在稀释尿液中生存可长达数月。在水中存活时间，取决于温度与酸碱度等，一般可达数月。

6.8.13.2 消毒方法

6.8.13.2.1 病人尿、咳出的血痰或血液等的消毒，可按 6.5.4、6.8.7.2.1 所列方法处理。

6.8.13.2.2 对猪圈、牛舍、狗窝及牲畜粪尿可按 6.8.15.2.3、6.8.15.2.5、6.8.15.2.6 所列方法处理。

6.8.13.2.3 在疫源地开展室内、野外灭鼠工作。死鼠应焚烧或深埋。

6.8.14 布鲁菌病

6.8.14.1 概述

布鲁菌病是由布鲁菌 (*Brucella* sp.) 引起的以家畜为主的各种动物互为传染源的动物病，其在流行时波及人类，故也是一种宿主广范的人兽共患病。布氏菌可以通过皮肤粘膜、消化道、呼吸道、生殖道侵入机体引起感染。含有布氏菌的食品及各种污染物均可成为传播媒介，如病畜流产物、乳、肉、内脏、皮毛，以及水、土壤、尘埃等。布氏菌对低温和干燥有较强的抵抗力，在适宜条件下能生存很长时间。对湿热、紫外线和各种射线以及常用的消毒剂、抗生素、化学药物均较敏感。

6.8.14.2 消毒方法

6.8.14.2.1 对可能被布氏菌污染的地面和墙壁；病畜的粪便、尿液；可能被布氏菌污染的衣物；餐（饮）具；室内空气；接触疫苗的工作人员所穿工作衣帽；污染的手套、靴子等可按 6.5.1~6.5.5 所列方法进行消毒处理。可使用中、低效消毒剂进行消毒。

6.8.14.2.2 病畜的奶和制品可煮沸 3min，巴氏消毒法（60℃ 作用 30min）消毒。

6.8.14.2.3 对病畜(有临床症状或宰后发现病变者)，其胴体、内脏需经高温处理或腌制 60 天再出售或食用。宰前诊断为病畜但无临床症状，宰后检查又无病变家畜的生殖器官及乳房，只能用作工业原料或销毁。公牛、阉牛及猪的胴体和内脏可不限限制出售。母牛、羊的胴体和内脏需将其煮熟或盐渍 1 月~2 月。

6.8.14.2.4 病畜的皮毛可集中用环氧乙烷消毒(见 6.5.3)。

6.8.14.2.5 病畜圈舍、饲料、粪尿等的消毒按 6.8.15.2.3、6.8.15.2.5、6.8.15.2.6 所列方法进行。

6.8.14.2.6 养牛场污水按 6.5.16 所列方法消毒处理。

6.8.15 炭疽

6.8.15.1 概述

炭疽的传染源是病畜（羊、牛、马、骡、猪等）和病人，人与带有炭疽杆菌的物品接触后，

通过皮肤上的破损处或伤口感染可以形成皮肤炭疽；通过消化道感染可以形成肠炭疽，通过呼吸道感染可以形成肺炭疽。

炭疽杆菌（*Bacillus anthracis*）繁殖体在日光下 12h 死亡，加热到 75℃ 时，1min 死亡。此菌在 12℃~42℃ 间，在有氧气与足量水份的条件下，能形成芽孢。其芽孢抵抗力强，能耐受煮沸 10min，在水中可生存几年，在泥土中可生存 10 年以上。

6.8.15.2 消毒方法

6.8.15.2.1 对居室的地面、墙壁、门窗；衣物、被褥、床单；纸张、书报；餐（饮）具、食物；家用物品、家具和玩具；手和皮肤；排泄物；盛排泄物的容器；运输工具和病人遗体等按 6.5.1、6.5.3~6.5.11 所列方法进行消毒处理。

6.8.15.2.2 肺炭疽病家的空气消毒，可采用过氧乙酸熏蒸，药量为 3g/m³（即 20% 过氧乙酸 15mL，15% 过氧乙酸 20mL），熏蒸 1h~2h；也可采用气溶胶消毒法（见 6.5.2）。

6.8.15.2.3 对病畜圈舍与病畜或死畜停留处的地面、墙面，用 0.5% 过氧乙酸，或 20% 漂白粉澄清液喷洒，药量为 150mL/m²~300mL/m²，连续喷洒 3 次，每次间隔 1h。若畜圈地面为泥土时，应将地面 10cm 的表层泥土挖起，按 1 份漂白粉加 5 份泥土混合后深埋 2m 以下。

6.8.15.2.4 对炭疽病人用过的治疗废弃物和有机垃圾应全部焚烧。

6.8.15.2.5 对病畜污染的饲料、杂草和垃圾，应焚烧处理。

6.8.15.2.6 对病畜的粪尿，按 1 份漂白粉加 5 份粪尿，或最终作用浓度为 40000mg/L 有效氯的其他含氯消毒剂搅匀后消毒作用 2h，深埋 2m 以下。不得用作肥料。

6.8.15.2.7 对已确诊为炭疽的家畜应整体焚烧，严禁解剖。一头 200kg~500kg 的死畜，焚烧时需汽油或柴油 100kg~120kg。先在地下挖一条宽 1m~1.5m，长 3m~3.5m，深 1m 的长沟，用铁条架在沟上，然后在铁条上架木柴 100kg，用长形钢钎，将死畜置木柴上，浇以汽油或柴油后点燃，直到烧成骨灰为止。当畜体腹部胀大时，用钢钎将畜皮刺破，以防内脏物四溅。

6.8.15.2.8 污染的皮毛、皮张可焚毁，或用环氧乙烷熏蒸（见 6.5.3）。畜毛还可用 2% 硝酸或 10% 硫酸溶液浸泡 2h，皮张也可用 2.5% 盐酸溶液加入 15% 食盐使溶液保持 30℃ 以上，浸泡 40h 后取出（每公斤皮张用 10L 溶液），再放入 1% 氢氧化钠溶液中浸泡 2h 以中和盐酸，然后用清水冲洗，晒干。

6.8.15.2.9 对生活污水处理可按 6.5.16 所列方法进行。

6.8.15.2.10 炭疽杆菌可形成芽孢，故在消毒中不得使用中、低效消毒剂。

6.8.15.2.11 疫源地内要同时开展灭蝇、灭鼠工作。消毒人员要做好个人防护，必要时进行 12d 的医学观察。

6.8.16 斑疹伤寒

6.8.16.1 概述

斑疹伤寒分为流行性斑疹伤寒和地方性斑疹伤寒。流行性斑疹伤寒的病原体为普氏立克次体 (*Rickettsia prowazekii*)，传染源为病人，虱子是传播媒介，病原体随虱粪排出，人搔痒时抓破皮肤，病原体即可侵入人体。病原体在虱粪中可存活 5 个月，含虱粪的尘埃可经呼吸道传播本病。

地方性斑疹伤寒的病原体为莫氏立克次体 (*Rickettsia mouseri*) 传染源为病人和鼠类，传播媒介以蚤为主。

普氏与莫氏立克次体对理化因子的抵抗力较弱，56℃ 经 30min 即可灭活。在媒介昆虫的粪便中能抵抗干燥和寒冷，保持传染性半年左右。对常用消毒剂均敏感，在 0.5% 煤酚皂溶液中，经 5min 即被灭活。

6.8.16.2 消毒方法

6.8.16.2.1 对地面、墙壁；餐（饮）具等的消毒，可按 6.5.1、6.5.5 中所列方法进行。可用中、低效消毒剂处理（见表 6-1）。

6.8.16.2.2 对衣物、被褥、床单的消毒，可煮沸 30min。既可消毒又可灭虱。皮衣、毛衣、化纤等物品，可采取过氧乙酸薰蒸消毒(见 6.5.3)。

6.8.16.2.3 皮肤消毒：用 0.2% 过氧乙酸，或 0.5% 碘伏涂擦皮肤伤口。

6.8.16.2.4 消毒的同时，应对疫点中所有人员和环境进行灭虱、灭蚤，其方法见有关灭虱、灭蚤技术资料。

6.8.17 结核病

6.8.17.1 概述

结核病的病原体为结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)，有人型、牛型和非典型分枝杆菌等。人型和牛型致病力受其活力和耐药性等因素影响，对外界环境适应性强。在阴暗处可存活数月甚至数年，在干燥痰核、飞沫中可保持传染力 8d~10d，但在直射阳光下却只能生存 2h~4h。不耐热，60℃ 作用 15min，或 70℃ 作用 3min 可将其杀灭。

结核病的传染源主要为排菌的结核病人。可通过呼吸道、消化道等传播，以呼吸道传播最为常见。食用被结核杆菌污染的食品，饮用病牛的生奶，或使用染有结核杆菌的餐（饮）具等，可经消化道感染。

6.8.17.2 消毒方法

6.8.17.2.1 对室内地面、墙壁、家俱表面；衣物、被褥；病人排泄物、呕吐物及其容器；餐（饮）具；食物；家用物品、家具和玩具；纸张、书报；运输工具；厕所与垃圾等的消毒，可按 6.5.1、

6.5.3~6.5.9、6.5.13~6.5.16 所列方法进行。

6.8.17.2.2 对痰及口鼻分泌物，用纸盒、纸袋盛装后焚烧，或加入等量 1% 过氧乙酸作用 30min~60min 进行消毒。

6.8.17.2.3 对生活污水的处理，可按 6.5.16 所列方法进行。

6.8.17.2.4 结核杆菌细胞壁含大量脂类，对消毒剂抗力较强，故在消毒中只能使用高、中效消毒剂（见表 6-1），不得使用低效消毒剂。

6.8.18 麻风病

6.8.18.1 概述

病原体为麻风杆菌（*Mycobacterium leprae*），属非典型性分枝杆菌。该菌在干燥环境中仍有繁殖能力，0℃时可存活 3 周左右，但在 60℃时 3h 即丧失活力。

瘤形患者可从皮肤病变和鼻腔排出大量麻风杆菌。凡检出本菌者均有传染性。其传播途径尚不清楚，一般需经长期密切接触，可能是通过呼吸道或皮肤伤口感染。

6.8.18.2 消毒方法

6.8.18.2.1 对室内地面、墙壁、家具表面；衣物、被褥；病人排泄物、呕吐物及其容器；餐（饮）具；食物；家用物品、家具和玩具；纸张、书报；运输工具；厕所与垃圾等的消毒，可按 6.5.1、6.5.3~6.5.9、6.5.13~6.5.16 所列方法进行。

6.8.18.2.2 对痰及口鼻分泌物，用纸盒、纸袋盛装后焚烧，或加入等量 1% 过氧乙酸作用 30min~60min 进行消毒。

6.8.18.2.3 麻风杆菌细胞壁含大量脂类，对消毒剂抗力较强，故在消毒中只能使用高、中效消毒剂（见表 6-1），不得使用低效消毒剂。

6.8.19 非典型性肺炎（SARS）

6.8.19.1 概述

6.8.19.2 消毒方法

6.8.20 禽流感

6.8.20.1 概述

6.8.20.2 消毒方法

6.8.21 手足口病

6.8.21.1 概述

手足口病(Hand, foot, and mouth disease, HFMD) 是由肠道病毒引起的传染病, 多发生于 5 岁以下的婴幼儿, 可引起发热和手、足、口腔等部位的皮疹、溃疡, 个别患者可引起心肌炎、肺水肿、无菌性脑膜脑炎等并发症。引发手足口病的肠道病毒有 20 多种, 其中柯萨奇病毒(Coxsackie virus) A16 型(Cox A16) 和肠道病毒 71 型 (Enterovirus71, EV 71) 最常见。

肠道病毒适合在湿、热的环境下生存与传播, 对乙醚、去氯胆酸盐等不敏感, 75%酒精和 5%来苏亦不能将其灭活, 但对紫外线及干燥敏感。各种氧化剂(高锰酸钾、漂白粉等)、甲醛、碘酒都能灭活病毒。病毒在 50℃可被迅速灭活, 但 1mol 浓度二价阳离子环境可提高病毒对热灭活的抵抗力, 病毒在 4℃可存活 1 年, 在-20℃可长期保存, 在外环境中病毒可长期存活。

6.8.21.2 消毒方法

附录 A

试剂和培养基配方

1. 稀释液 本规范中的稀释液包括：胰蛋白胨生理盐水溶液（TPS）、磷酸盐缓冲液（PBS，0.03mol/L，pH7.2）、中和剂溶液、标准硬水（硬度 342mg/L）、生理盐水等

1.1 胰蛋白胨生理盐水溶液（TPS）

胰蛋白胨	1.0g
氯化钠	8.5g

先用 900mL 以上蒸馏水溶解，并调节 pH 值在 7.0 ± 0.2 (20℃)，最终用蒸馏水加至 1000mL，分装后，经 121℃ 压力蒸汽灭菌后使用。

1.2 磷酸盐缓冲液（PBS，0.03mol/L，pH7.2）

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

将各成分加入到 1000mL 蒸馏水中，待完全溶解后，调 pH 至 7.2，于 121℃ 压力蒸汽灭菌 20min 备用。

1.3 标准硬水（硬度342mg/L）

氯化钙（CaCl ₂ ）	0.304g
氯化镁（MgCl ₂ ·6H ₂ O）	0.139g
蒸馏水加至	1000mL

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

1.4 生理盐水

氯化钠	8.5g
蒸馏水加至	1000mL

将氯化钠加入到 1000mL 蒸馏水中，待完全溶解后，于 121℃ 压力蒸汽灭菌 20min 备用。

2. 革兰染色液

第 1 液：结晶紫溶液

结晶紫乙醇饱和溶液	100mL
结晶紫	4g~8g
95%乙醇	100mL
1%草酸胺溶液	

第 2 液：卢戈碘液

碘化钾	2g
-----	----

碘	1g
蒸馏水	200mL
第3液：脱色剂	
(1) 95%乙醇	
(2) 丙酮乙醇溶液	100mL
95%乙醇	70mL
丙酮	30mL
第4液：稀释石炭酸复红液	
碱性复红乙醇饱和溶液	10mL
碱性复红	5g~10g
5%石炭酸溶液	90mL
蒸馏水	900mL

3. 孔雀绿与沙黄芽孢染色液

第1液 5.00%孔雀绿水溶液

第2液 0.5%沙黄水溶液

4. 有机干扰物

牛血清白蛋白 30g 或 3g

蒸馏水 1000mL

溶解后用微孔滤膜（孔径为 0.45 μ m）滤过除菌，冰箱保存备用

5. 营养琼脂培养基

蛋白胨 10g

牛肉膏 5g

氯化钠 5g

琼脂 15g

蒸馏水 1000mL

除琼脂外其他成份溶解于蒸馏水中，调 pH 至 7.2~7.4，加入琼脂，加热溶解，分装，于 121 $^{\circ}$ C 压力蒸汽灭菌 20min 备用。

7. 营养肉汤培养基

蛋白胨 10g

牛肉膏 5g

氯化钠	5g
蒸馏水	1000mL

将各成份溶解于蒸馏水中，调 pH 至 7.2~7.4，分装，于 121℃ 压力蒸汽灭菌 20min 备用。

8. 胰蛋白胨大豆肉汤培养基 (TSB)

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

用蒸馏水配制而成，调节pH为7.2±0.2，经121℃压力蒸汽灭菌后使用。

9. 胰蛋白胨大豆琼脂培养基 (TSA)

胰蛋白胨	1.5% (g/100mL)
大豆蛋白胨	0.5% (g/100mL)
氯化钠	0.5% (g/100mL)
琼脂	1.6% (g/100mL)

用蒸馏水配制而成，调节pH为7.2±0.2，经121℃压力蒸汽灭菌后使用。

10. 品红亚硫酸钠培养基

蛋白胨	10g
酵母浸膏	5g
牛肉膏	5g
乳糖	10g
琼脂	15g~20g
磷酸氢二钾	3.5g
无水亚硫酸钠	5g
5%碱性品红乙醇溶液	20mL
蒸馏水	1000mg

以上各成分蒸馏水溶解，调 pH 至 7.2~7.4，装瓶，经 121℃ 压力蒸汽灭菌后使用。

11. 溴甲酚紫蛋白胨培养液

蛋白胨	10g
葡萄糖	7.5g
蔗糖	2.0g

可溶性淀粉	1.5g
1%溴甲酚紫乙醇溶液	1.3mL
蒸馏水至	1000mL

将蛋白胨、葡萄糖、蔗糖溶解于蒸馏水中，调 pH 至 7.2~7.4，加入 1% 溴甲酚紫乙醇溶液，摇匀后，分装每管 5mL，于 115℃ 压力蒸汽灭菌30min。置 4℃ 冰箱备用。

12. 嗜热脂肪杆菌恢复琼脂培养基

蛋白胨	10g
牛肉膏	3g
可溶性淀粉	1g
葡萄糖	1g
琼脂	20g
蒸馏水	1000mL

以上各成分蒸馏水溶解，调 pH 至 7.0~7.2，装瓶，经 115℃压力蒸汽灭菌 30min 后使用。

13. 沙堡琼脂培养基

葡萄糖	40g
蛋白胨	10g
琼脂	20g
蒸馏水	1000mL

将上述成分混合后，加热至完全溶解，调 pH 至 5.6 ± 0.2 ，于 115℃压力蒸汽灭菌 30min 备用。

14. 沙堡液体培养基

葡萄糖	40g
蛋白胨	10g
蒸馏水	1000mL

将上述成分混合后，加热至完全溶解，调 pH 至 5.6 ± 0.2 ，于 115℃压力蒸汽灭菌 30min 备用。

15. 麦芽浸膏琼脂培养基(MEA)

麦芽浸膏	30g
大豆蛋白胨	3g
琼脂	15g
双蒸馏水	加至 1000mL

将上述成分制成溶液与 121℃, 15min 灭菌, 灭菌后无菌调节 pH 至 6.9 ± 0.2 备用。

16. 麦芽浸膏肉汤培养基(MEB)

麦芽浸膏	30g
双蒸馏水	加至 1000mL

将上述成分制成溶液与 121℃, 15min 灭菌, 灭菌后无菌调节 pH 至 5.6 ± 0.2 备用。

17. 人淋巴细胞维持培养基

1640 干粉培养基	$10 \times 10.4g$
L 谷氨酰胺	2.93g
丙酮酸钠	1.004g
青霉素 80 万单位	
链霉素 100 万单位	
碳酸氢钠	20.0g
Hepes	23.9g
去离子水加至	10000mL

除青霉素、链霉素外, 其余各成分溶于蒸馏水中, 调 pH 至 7.0~7.2, 115℃压力蒸汽灭菌 20min 备用。临用前加入青霉素、链霉素灭菌溶液。

18. 人淋巴细胞完全培养基

在人淋巴细胞维持培养基中加入 10%无菌小牛血清。

附录 B

消毒剂中禁用物质（抗生素、甲硝唑）的测定方法

1 范围

本方法规定了测定消毒剂中盐酸美满霉素、二水土霉素、盐酸四环素、盐酸金霉素、盐酸多西环素、氯霉素 6 种抗生素和甲硝唑的高效液相色谱法，适用于对消毒剂中上述 6 种抗生素和甲硝唑的含量测定。

2 方法提要

盐酸美满霉素、二水土霉素、盐酸四环素、盐酸金霉素、盐酸多西环素、氯霉素和甲硝唑在 268nm 处有紫外吸收，可用反相高效液相色谱分离，并根据保留时间和紫外光谱图定性，峰面积定量。各组分的检出限及取 1g 样品时的检出浓度见表 1。

表 1 各组分的检出限和检出浓度

物质名称	盐酸美满霉素	甲硝唑	二水土霉素	盐酸四环素	盐酸金霉素	盐酸多西环素	氯霉素
检出限 (ng)	50	50	1	1	1	1	1
检出浓度 (μg/g)	50	50	1	1	1	1	1

3 试剂

3.1 甲醇，色谱纯。

3.2 乙腈，色谱纯。

3.3 草酸，分析纯。

3.4 盐酸 (0.1mol/L)：取优级纯浓盐酸 ($\rho_{20}=1.19\text{g/mL}$) 8.3mL 加水至 1L。

3.5 混合标准储备溶液：分别准确称取盐酸美满霉素、二水土霉素、盐酸四环素、盐酸金霉素、盐酸多西环素、氯霉素、甲硝唑各 0.1000g，用少许甲醇 (3.1) 及盐酸 (3.4) 溶解，移入 100mL 容量瓶中，甲醇定容至刻度，摇匀，配成各组分质量浓度为 1.00g/L 的混合标准溶液。

4 仪器

4.1 高效液相色谱仪，具二极管阵列检测器，色谱处理机或色谱工作站。

4.2 微量进样器或自动进样装置。

4.3 超声波清洗器。

5 分析步骤

5.1 样品预处理

准确称取样品约 1g 于 10mL 具塞比色管中，加入甲醇 (3.1) + 盐酸 (3.2) = 1+1 的混合溶液至刻度，振摇，超声提取 20min~30min。经 0.45μm 滤膜过滤，滤液作为待测溶液备用。

5.2 色谱参考条件

色谱柱：C₁₈ 柱，250mm×4.6mm I.D.，5μm；

检测器：二极管阵列检测器，检测波长 268nm；

流动相：0.01mol/L 草酸+甲醇+乙腈=67+11+22 (HPLC 分析前，经 0.45μm 滤膜过滤及真空脱气)；

流量：0.8mL/min；

柱温：室温。

5.3 校准曲线的制备

准确移取不同体积的混合标准溶液（3.5）于 10mL 具塞比色管中，用流动相稀释至刻度，摇匀。经 0.45 μ m 滤膜过滤备用。在设定色谱条件下，分别取 10 μ L 进行分析。根据标准系列质量浓度和峰面积绘制校准曲线。

5.4 样品测定

在设定的色谱条件下进 10 μ L 样品溶液（5.1）进行分析，若样品含量过高，应用流动相稀释后测定。根据峰面积，从校准曲线上查得相应成分的质量浓度。

6 计算

$$\omega(\text{抗生素、甲硝唑}) = \frac{\rho \times V}{m}$$

式中： ω （抗生素、甲硝唑）——消毒剂中抗生素、甲硝唑的质量分数， $\mu\text{g/g}$ ；

ρ ——测试溶液中抗生素、甲硝唑的质量浓度， mg/L ；

V ——样品定容体积， mL ；

m ——样品取样量， g 。

7 色谱图

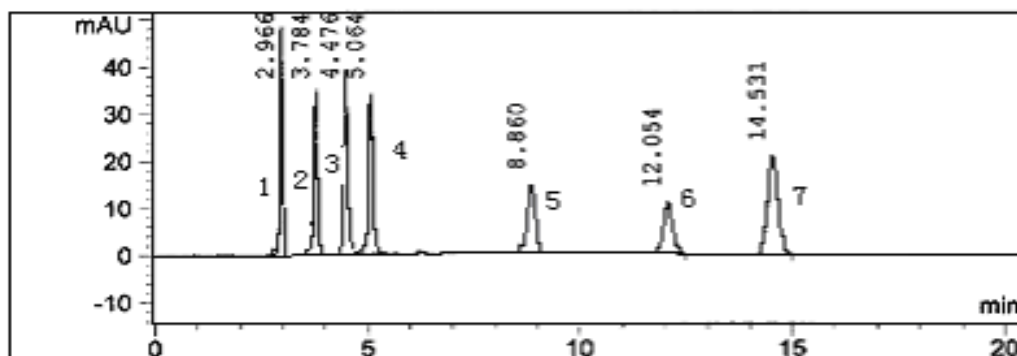


图 1 抗生素、甲硝唑的色谱图

1: 盐酸美满霉素; 2: 甲硝唑; 3: 二水土霉素; 4: 盐酸四环素;

5: 盐酸金霉素; 6: 盐酸多西环素; 7: 氯霉素

表 2 疫点终末消毒效果检验记录

编号:

患者姓名:

传染病诊断名称:

消毒地点:

通知消毒单位:

联系人:

电话:

消毒时间: 年 月 日 时

样本名称	消毒前样本			消毒后样本		
	编号	采样时间	结果	编号	采样时间	结果

完成检验时间:

检验单位:

填报日期:

检验人员:

复核人:

表 3 疫点随时消毒工作记录

编号

患者姓名:

传染病诊断名称:

诊断日期:

消毒地点:

消毒处理对象:

消毒日期	对象	消毒因子	作用浓度或强度	作用时间 (min)	消毒方式
------	----	------	---------	------------	------

备注: 1、消毒剂名称:

有效成分含量:

失效期限:

2、应用浓度的配制:

执行消毒单位:

执行消毒人员:

填表日期: