**消毒剂中和剂鉴定试验报告（模板）**

# 1 试验目的

简要描述试验目的。

# 2 试验依据

本试验依据《兽用消毒剂鉴定技术规范》（农牧药字﹝1992﹞第101号）、《消毒剂实验室杀菌效果检验方法》（GB/T 38502—2020）设计；本试验遵从《兽药临床试验质量管理规范》（农业部公告﹝2015﹞第2337号）实施。

# 3 试验时间

 描述试验起止时间及各步骤实施时间。

# 4 试验场所

描述试验实施场所的地址。

# 5 试验人员

列明试验参与人员及相应分工。

# 6 总体试验设计

描述试验总体思路，包括试验分组、菌株类型、消毒剂浓度水平、评价指标等试验设计信息。

# 7 试验材料

## 7.1 试验药物

提供受试消毒剂的产品名称、活性成分、含量规格、使用方法、批号、生产单位、生产日期、有效期、储存条件等信息。

## 7.2 试验菌株

提供菌株的名称及来源。

## 7.3主要试剂、仪器和耗材

### 7.3.1 中和剂

提供中和剂配方并描述其制备方法。

### 7.3.2 缓冲液

提供缓冲液配方并描述其制备方法。

### 7.3.3 培养基与试剂

提供名称、批号、生产单位等。

### 7.3.4 仪器与耗材

提供名称、型号（规格）、生产厂家等。

# 8 试验方法

### 8.1 用于细菌和真菌杀灭试验

**试验原则或要求**

（1）结合消毒剂选择中和剂悬液定量鉴定试验或中和剂载体定量鉴定试验。

（2）中和剂鉴定所用消毒剂浓度应为杀菌试验中使用的最高浓度。

（3）同一消毒剂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：

a) 对细菌繁殖体，在金黄色葡萄球菌（ATCC 6538）、大肠杆菌（ATCC 8099）、多杀性巴氏杆菌（禽株）、溶血性链球菌C型中任选其一进行中和剂鉴定试验；

b) 对细菌芽孢[如蜡样杆菌（SSI C1/1）、类炭疽杆菌（8008）、枯草杆菌黑色变种芽孢（ATCC 9372）]、真菌（如白色念珠菌ATCC10231）、分枝杆菌（如单分枝菌）应分别进行鉴定试验。

c) 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鉴定试验。

（4）试验应重复3次。重复性试验不是只在同次试验中增加片数，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。

（5）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%；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%；对用于经过严格清洗或极清洁的消毒对象的消毒剂，可不使用有机干扰物。

**试验分组**

按表1设置中和剂鉴定试验组别。

表1 中和剂鉴定试验内容

|  |  |
| --- | --- |
| 试验组别 | 说明问题 |
| 1 | 消毒剂+菌液 | 证明消毒剂在试验浓度下是否有杀菌或抑菌作用。 |
| 2 | （消毒剂+菌液）+中和剂 | 证明中和剂能否中和残留消毒剂的抑菌作用。 |
| 3 | 中和剂+菌液 | 证明中和剂有无抑菌作用。 |
| 4 | （消毒剂+中和剂）+菌液 | 证明消毒剂与中和剂的反应产物有无抑菌作用。 |
| 5 | 菌液 | 证明菌种与培养基是否适宜。 |
| 6 | 中和剂+培养基 | 证明试验材料或操作过程中是否污染 |

# 8.1.1 中和剂悬液定量鉴定试验

# 8.1.1.1试验菌悬液的制备

**8.1.1.1.1 细菌繁殖体菌悬液的制备**

（1）以无菌操作方式开封冻干菌种管，加入适量营养肉汤培养基使菌种融化分散。吸取少许菌悬液于适量营养肉汤培养基试管中（或菌种融化后直接在营养琼脂平板上接种划线），置36±1℃培养18～24h。取上述第1代培养的菌悬液（或单菌落），划线接种于营养琼脂平板上划线培养，置36±1℃培养18～24h；挑取上述第2代培养物中的典型菌落，接种于营养琼脂斜面，置36±1℃培养18～24h，即为第3代培养物。

（2）取第3代～第8代的新鲜斜面培养物，加3.0ml～5.0ml稀释液[一般用胰蛋白胨生理盐水溶液（TPS），酸化水用生理盐水]加入试管内，反复吹洗，洗下菌苔，随后转移至另一无菌试管中，电动器混匀20s（或在手掌上振打80次）使细菌悬浮均匀。

（3）用细菌浓度比浊度法粗测上述初步制成的菌悬液含菌浓度，然后以稀释液稀释至所需浓度，置4℃冰箱内备用。

**8.1.1.1.2 细菌芽孢悬液的制备**

（1）以无菌操作方式开封冻干菌种管，加入适量营养肉汤培养基使菌种融化分散。吸取少许菌悬液于适量营养肉汤等培养基试管中，置36±1℃培养18～24h。取上述培养的第1代菌悬液，划线接种于营养琼脂平皿上划线培养，置36±1℃培养至24h，挑取上述第2代培养物中的典型单体菌落，接种于营养肉汤培养基，置36±1℃培养至24h，即为第3代培养物。

（2）取第3代～第5代的18～24h营养肉汤培养物，接种于罗氏瓶中（或中管琼脂斜面表面）营养琼脂基表面，将其摇动使菌液布满营养琼脂培养基表面，再将多余肉汤培养物吸出，将罗氏瓶置36±1℃培养5～7天。

（3）用接种环取菌样少许涂于玻片上，固定后以改良芽孢染色法染色，并在显微镜（油镜）下镜检。当芽孢形成率达90%以上时，即可进行后续处理。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用接种环取菌样涂布于玻片上，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5.0%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，用自来水冲洗残留孔雀绿溶液。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无菌蒸馏水于每一罗氏瓶中，以L棒轻轻推刮下菌苔，吸出再加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一含玻璃珠的无菌三角烧瓶中，振摇5min。将烧瓶置45℃水浴中24h，使菌自溶断链，分散成单个芽孢。用无菌棉花或纱布过滤芽孢悬液，清除其中的琼脂凝块。

（5）将过滤后的芽孢悬液，置无菌离心管内，以3000r/min速度离心10min。弃上清液，加蒸馏水吹吸使芽孢重新悬浮，重复3遍。

（6）将洗净的芽孢悬浮液放入含适量小玻璃珠的三角烧瓶内。80℃水浴中10min（或60℃，30min），以杀灭残余的细菌繁殖体。待冷至室温后，保存于4℃冰箱中备用。

**8.1.1.1.3 白色念珠菌悬液的制备**

（1）取冻干菌种管，以无菌操作打开，用毛细吸管吸加适量沙堡液体培养基于管中，轻柔吹吸数次，使菌种融化分散。取含5.0ml～10.0ml沙堡液体培养基试管，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，于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，于37℃培养18h～24h，即为第3代培养物。将其密封后在4℃保存。

2）试验时，取第3代斜面培养物在沙堡琼脂斜面上连续传代，方法与第3代相同。取第5代或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，用电动混合器混合20s，或在手掌上振敲80次，以使白色念珠菌菌悬浮均匀。

3）悬液杀菌试验时，试验用菌悬液的含菌量为1×107CFU/ml～5×107CFU/ml（回收菌量为1×106CFU/ml～5×106CFU/ml）。

### 8.1.1.2 活菌计数

除有特殊规定外，一般使用下列倾注法。

**操作程序**

（1）先将菌液用比浊度法初步估测菌液含菌浓度。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。吸取上述菌悬液0.5ml依次做10倍系列稀释。必要时，还可作某稀释度的1:1或1:4稀释。

（2）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菌悬液1.0 ml加于无菌培养皿中，将15ml～20ml的40℃～45℃的熔化营养琼脂培养基倾注于已加入样液的平皿内。每一稀释度接种3个平皿。一般需接种2～3个不同稀释度。

（3）将平皿盖好，即刻轻轻摇动混匀，平放于台上。待琼脂凝固后，翻转平皿，使底向上，置36±1℃（或特定细菌繁殖体、芽孢适宜生长温度）温箱内培养，至培养规定时间（细菌繁殖体为48h，细菌芽孢为72h），计数最终结果的菌落数。

（4）计数菌落时，一般以肉眼观察，必要时用放大镜检查。以菌落数在30CFU～300CFU的平板为准，每个稀释度3个平板生长菌落数全合乎上述标准，则以该3个平板的菌落平均值作为结果；若有2个符合上述标准，则以该合格的两个平板菌落的平均值为结果。对估计菌量极少的样本（如消毒处理后样本），在培养计数时可不作稀释（未稀释的原液平板菌落数未达15时，亦可用其计算最终结果）。

（5）根据稀释倍数和接种量计算每毫升菌液中的平均菌落数。

**操作误差测定**

平板间、稀释度间误差率不应超过10%。计算公式如下：

平板间误差率=$\frac{\left（平板间菌落平均数-各平板菌落数\right）的绝对值之和}{各平板菌落数之和}$×100%

稀释度间误差率=$\frac{\left（稀释度间菌落平均数-各稀释度菌落数\right）的绝对值之和}{各稀释度菌落数之和}$×100%

### 8.1.1.3 中和剂鉴定试验步骤

根据试验分组，准备足量试管和平皿，依次进行编号。将消毒剂按所需浓度配制好后，置20℃±1℃水浴中待用。

按前述步骤制备试验菌悬液。取2.0ml试验菌悬液于试管中，加入2.0ml有机干扰物质，制成含有机干扰物质的菌悬液，置20℃±1℃水浴中备用。6组鉴定试验如下：

（1）第1组。吸取1.0ml含有机干扰物质的试验菌悬液于试管内，置20℃±1℃水浴中5min后，再吸加4.0ml消毒剂于试管内，混匀。作用××min，吸此样液0.5ml加于含有4.5ml稀释液的试管中，混匀。吸取该最终样液1.0ml，接种于平皿中，做活菌培养计数。

（2）第2组。吸取1.0ml含有机干扰物质试验菌悬液于试管内，置20℃±1℃水浴中5min后，再吸加4.0ml消毒剂于试管内，混匀。作用××min，吸此样液0.5ml加于含4.5ml中和剂溶液管中，混匀，作用10min。吸取该最终样液1.0ml，接种于平皿中，做活菌培养计数。

如平板生长菌落数均超过300个，应对上述最终样液作适宜稀释后，再次进行活菌培养计数。

（3）第3组。吸取0.1ml含有机干扰物质的试验菌悬液于试管内，置20℃±1℃水浴中5min后，加入0.4ml硬水，混匀。加入4.5ml中和剂，作用10min。用中和剂做10倍系列稀释，选适宜稀释度悬液，各吸取1.0ml，分别接种于平皿中，做活菌培养计数。

（4）第4组。吸取0.1ml含有机干扰物质的试验菌悬液于试管内，置20℃±1℃水浴中5min后，吸加4.9ml中和产物溶液（以0.4ml消毒剂加4.5ml中和剂，作用10min配制而成）于试管内，混匀。作用10min，吸取该最终样液0.5ml，用中和产物溶液做10倍系列稀释，选适宜稀释度悬液，各吸取1.0ml，分别接种于平皿中，做活菌培养计数。

（5）第5组。吸取0.1ml含有机干扰物质的试验菌悬液于试管内，置20℃±1℃水浴中5min后，吸加0.4ml硬水于试管内，混匀。加入4.5ml稀释液，作用10min，用稀释液做10倍系列稀释，选适宜稀释度悬液，各吸取1.0ml，分别接种于平皿中，做活菌培养计数。

（6）第6组。分别吸取稀释液与中和剂各1.0ml于同一无菌小平皿内，倒入上述试验同批次的培养基15ml～20ml，培养观察。如出现细菌生长，提示试验材料或操作过程中可能有污染。应重新进行试验。

# 8.1.2 中和剂载体定量鉴定试验

### 8.1.2.1 菌片（染菌载体）的制备

（1）消毒试验中使用的菌片是以菌液滴加于载体上制成。常用的载体材料有金属、玻璃、滤纸、棉布、聚四氟乙烯等。应根据消毒对象选择相应的材料，如手术器械选择不锈钢片，物体表面选择棉布片，非金属管腔选择聚四氟乙烯片（管），光滑表面可选择玻璃片等。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，大小为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30min；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织纱白平纹棉布制作。在剪开前，将脱脂的布块按载体规定的大小，抽去边缘一周的经纬纱各一根，再按抽纱痕剪开。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：制备含菌量约为109CFU/ml的细菌繁殖体、芽孢菌悬液或白色念珠菌悬液，可使用浊度计调整菌液浓度。然后加入等量的3.0%或0.3%的牛血清白蛋白，使菌液的浓度约为5×108CFU/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（不宜过快，避免流散影响染菌的准确性）。必要时用接种环涂匀整个载体表面。置36±1℃恒温培养箱或置室温干燥备用。

（5）每个菌片（载体）的回收菌量应为1×106CFU/片～5×106CFU/片。

### 8.1.2.2 活菌计数

除有特殊规定外，一般使用下列倾注法。

**操作程序**

（1）将菌片（或小型固体样本、或棉拭采样端剪碎）直接投入含5ml稀释液的无菌试管中，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。

（2）将菌液用比浊度法初步估测菌液含菌浓度，然后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。吸取上述菌悬液0.5ml依次做10倍系列稀释。必要时，还可作某稀释度的1:1或1:4稀释。

（3）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菌悬液1.0ml加于无菌培养皿中，将15ml～20ml的40℃～45℃的熔化营养琼脂培养基倾注于已加入样液的平皿内。每一稀释度接种3个平皿。一般需接种2～3个不同稀释度。

（4）将平皿盖好，即刻轻轻摇动混匀，平放于台上。待琼脂凝固后，翻转平皿，使底向上，置36±1℃（或特定细菌繁殖体、芽孢适宜生长温度）温箱内培养，至培养规定时间（细菌繁殖体为48h，细菌芽孢为72h），计数最终结果的菌落数。

（5）计数菌落时，一般以肉眼观察，必要时用放大镜检查。以菌落数在15CFU～300CFU的平板为准，每个稀释度3个平板生长菌落数全合乎上述标准，则以该3个平板的菌落平均值作为结果；若有2个符合上述标准，则以该合格的两个平板菌落的平均值为结果。对估计菌量极少的样本（如消毒处理后样本），在培养计数时可不作稀释（未稀释的原液平板菌落数未达15时，亦可用其计算最终结果）。

（6）根据稀释倍数和接种量计算每毫升菌液中的平均菌落数。

**操作误差测定**

平板间、稀释度间误差率不应超过10%。计算公式如下：

平板间误差率=$\frac{\left（平板间菌落平均数-各平板菌落数\right）的绝对值之和}{各平板菌落数之和}$×100%

稀释度间误差率=$\frac{\left（稀释度间菌落平均数-各稀释度菌落数\right）的绝对值之和}{各稀释度菌落数之和}$×100%

### 8.1.2.3 中和剂鉴定试验步骤

根据试验分组，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。

（1）第1组。吸取消毒剂5.0ml于无菌小平皿内，将其置20℃±1℃水浴中5min后，用无菌镊子夹入一菌片，并使浸透于消毒液中。待作用××min，立即用无菌镊子取出菌片移入含5.0ml稀释液试管中，作用10min。用电动混合器混合20s，或将试管振打80次，吸取该最终样液1.0ml，接种于平皿中，做活菌培养计数。

（2）第2组。吸取消毒剂5.0ml于无菌小平皿内，将其置20℃±1℃水浴中5min后，用无菌镊子夹入一菌片，并使浸透于消毒液中，待作用××min，立即用无菌镊子取出菌片移入含5.0ml中和剂试管中，用电动混合器混合20s，或将试管振打80次。作用10min，吸取该最终样液1.0ml，分别接种于各平皿中，做活菌培养计数。

如平板生长菌落数均超过300个，应重新吸取该最终样液0.5ml，用稀释液做适当稀释，选适宜稀释度悬液，吸取1.0ml，分别接种于平皿中，做活菌培养计数。

（3）第3组。吸取中和剂5.0ml于无菌小平皿中，将其置20℃±1℃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，用电动混合器混合20s，或将试管振打80次，混匀。吸取该最终样液1.0ml，用中和剂做10倍系列稀释，选适宜稀释度悬液，吸取1.0ml，分别接种于平皿中，做活菌培养计数。

（4）第4组。吸取中和产物溶液（以一片浸有消毒剂的载体置5.0ml中和剂内，作用10min）5.0ml于无菌小平皿内，将其置20℃±1℃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，用电动混合器混合20s，或将试管振打80次，混匀。吸取该最终样液0.5ml，用中和产物溶液做10倍系列稀释，选适宜稀释度悬液，吸取1.0ml，分别接种于平皿中，做活菌培养计数。

（5）第5组。吸取稀释液5.0ml于无菌小平皿内，将其置20℃±1℃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，用电动混合器混合20s，或将试管振打80次，混匀。吸取该最终样液0.5ml，用稀释液做10倍系列稀释，选适宜稀释度悬液，吸取1.0ml，分别接种于平皿中，做活菌培养计数。

（6）第6组。分别吸取稀释液与中和剂各1.0ml于同一无菌小平皿内，倒入上述试验同批次的培养基15ml～20ml，培养观察。如出现细菌生长，提示试验材料或操作过程中可能有污染。应重新进行试验。

**判定标准**

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组无试验菌，或仅有极少数试验菌菌落生长。

（2）第2组有较第1组为多，但较第3、4、5（组）为少的试验菌菌落生长，并符合表2要求者。

表2 中和剂鉴定试验合格标准中对第1组与第2组菌落数的要求

|  |  |
| --- | --- |
| 第1组平板平均菌落数 | 第2组平板平均菌落数 |
| 0 | >5 |
| X（1～10） | >（X + 5） |
| Y（>10） | >（Y + 0.5 Y） |

注：对抑菌作用不明显消毒剂（如乙醇）所用中和剂的鉴定试验中，当第1组与第2组菌落数相近，难以达到本表要求时，可根据具体情况另行作出判断和评价。

（3）第3、4、5（组）有相似量试验菌生长，悬液试验在1×107CFU/ml～5×107CFU/ml之间，载体试验在5×105CFU/片～5×106CFU/片之间。其组间菌落数误差率应不超过15%。第3、4、5组间菌落数误差率计算公式其计算公式如下。



（4）第6组无菌生长。否则，说明试剂有污染，应更换无污染的试剂重新进行试验。

（5）连续3次试验取得合格评价。

### 8.2 用于病毒杀灭试验

**试验原则或要求**

（1）结合病毒选择用于鸡胚法或细胞法病毒杀灭试验的中和剂鉴定试验。

（2）将受试消毒剂用灭菌水按一定比例稀释，一般为消毒剂最高使用浓度。利用已制备好的××病毒悬液（依据文献稀释至××EID50/ml），对已制备的中和剂开展各组试验，鉴定所用中和剂是否对测试消毒剂有良好的中和作用，对试验用病毒、鸡胚和细胞株是否有害或不良影响。

（3）试验应重复3次。

### 8.2.1用于鸡胚法病毒杀灭试验

# 8.2.1.1 试验分组

按表2设置中和剂鉴定试验组别。

表3 中和剂鉴定试验内容

|  |  |
| --- | --- |
| 试验组别 | 说明问题 |
| I | （消毒剂+病毒悬液）+中和剂 | 观察残留消毒剂经过中和后病毒能否恢复侵染作用。 |
| II | 病毒悬液+中和剂 | 观察中和剂对病毒有无抑制作用。 |
| III | （消毒剂+中和剂）+病毒悬液 | 观察消毒剂与中和剂的反应产物对病毒有无抑制或灭活作用。 |
| IV | 消毒剂+病毒悬液 | 观察消毒剂在试验浓度下对病毒有无抑制或灭活作用。 |
| V | 病毒悬液 | 观察病毒生长是否正常（阳性对照） |
| VI | 稀释液 | 观察试验用鸡胚生长是否正常（阴性对照） |

注：1）消毒剂的稀释液为灭菌水（灭菌蒸馏水）。

# 8.2.1.2 试验方法

# 8.2.1.2.1鸡胚尿囊液病毒悬液制备

将冻存的××病毒株病毒悬液作100倍稀释，接种于9～11日龄易感鸡胚，每胚经尿囊腔接种0.1ml，置于37℃培养48～72h，弃去24h内死亡鸡胚，收集鸡胚尿囊液即为试验用病毒悬液，放-80℃冰箱备用，试验前测定鸡胚半数感染量（EID50）。

### 8.2.1.2.2鸡胚半数感染量（EID50）测定

参考中国兽药典2020年版（三部）附录3402。

### 8.2.1.2.3中和剂鉴定试验步骤

I组：（消毒剂+病毒悬液）+中和剂 取0.5ml含××EID50/ml的××病毒悬液于10ml试管内，吸取4.5ml受试消毒液加入管内，涡动混匀后置××温度水浴中作用××min；吸取上述混合液1.0ml加入已盛有9.0ml中和剂的试管内涡动混匀；中和××min，测定病毒滴度EID50。

II组：病毒悬液+中和剂 取0.5ml含××EID50/ml的××病毒悬液于10ml试管内，吸取4.5ml灭菌水加入管内，涡动混匀后置××温度水浴中作用××min；吸取上述混合液1.0ml加入已盛有9.0ml中和剂的试管内涡动混匀；中和××min，测定病毒滴度EID50。

III组：（消毒剂+中和剂）+病毒悬液 向已盛有9.0ml中和剂的试管内加入0.9ml受试消毒液和0.1ml病毒悬液稀释液，涡动混匀后作用××min；另取一支10ml试管加入0.09ml含××EID50/ml的××病毒悬液，取已作用至××min的“消毒剂+中和剂”混合液9.0ml加入其内，涡动混匀后置××温度水浴中作用××min，测定病毒滴度EID50。

IV组：消毒剂+病毒悬液 取0.5ml含××EID50/ml的××病毒悬液于10ml试管内，吸取4.5ml受试消毒液加入管内，涡动混匀后置××温度水浴中作用××min；吸取上述混合液1.0ml加入已盛有9.0ml灭菌水的试管内涡动混匀，作用××min，测定病毒滴度EID50。

V组：病毒悬液+灭菌水 取0.5ml含××EID50/ml的××病毒悬液于10ml试管内，吸取4.5ml灭菌水加入管内，涡动混匀后置××温度水浴中作用××min；吸取上述混合液1.0ml加入已盛有9.0ml灭菌水的试管内涡动混匀，作用××min，测定病毒滴度EID50。

VI组：稀释液 取0.5ml病毒悬液稀释液于10ml试管内，吸取4.5ml灭菌水加入管内，涡动混匀后置××温度水浴中作用××min；吸取上述混合液1.0ml加入已盛有9.0ml灭菌水的试管内涡动混匀，作用××min，测定病毒滴度EID50。

# 8.2.1.3 判定标准

第I、IV、VI组的病毒滴度应为0，II、III、V组的病毒滴度应相近。

### 8.2.2用于细胞法病毒杀灭试验

# 8.2.2.1 试验分组

按表4设置中和剂鉴定试验组别。

表4 中和剂鉴定试验内容

|  |  |
| --- | --- |
| 试验组别 | 说明问题 |
| I | （消毒剂+病毒悬液）+中和剂 | 观察残留消毒剂经过中和后病毒能否恢复侵染作用。 |
| II | 病毒悬液+中和剂 | 观察中和剂对病毒有无抑制作用。 |
| III | （消毒剂+中和剂）+病毒悬液 | 观察消毒剂与中和剂的反应产物对病毒有无抑制或灭活作用。 |
| IV | 消毒剂+病毒悬液 | 观察消毒剂在试验浓度下对病毒有无抑制或灭活作用。 |
| V | 病毒悬液 | 观察病毒生长是否正常（阳性对照） |
| VI | 稀释液 | 观察试验用细胞生长是否正常（阴性对照） |

注：1）消毒剂的稀释液为灭菌水（灭菌蒸馏水）。

# 8.2.2.2 试验方法

# 8.2.2.2.1细胞病毒悬液的制备

取冻存的××毒株，37℃水浴融化，用细胞维持液作10倍稀释，然后接种于已经长满单层××细胞的细胞瓶内，置于含5%二氧化碳的37℃培养箱中吸附感染1h，加入适量细胞维持液，继续培养至72h。将细胞反复冻融3次，6000r/min离心15min，保留上清，上清液即为试验用病毒悬液。放-80℃冰箱备用。

# 8.2.2.2.2半数组织感染量（TCID50）的测定

参考中国兽药典2020年版（三部）附录3402。

# 8.2.2.2.3中和剂鉴定试验步骤

I组：（消毒剂+病毒悬液）+中和剂 取0.5ml含××TCID50/ml××病毒悬液于10ml试管内，吸取4.5ml受试消毒液加入管内，涡动混匀后置××温度水浴中作用××min；吸取上述混合液1.0ml加入已盛有9.0ml中和剂的试管内涡动混匀；中和××min，测定病毒滴度TCID50。

II组：病毒悬液+中和剂 取0.5ml含××TCID50/ml的××病毒悬液于10ml试管内，吸取4.5ml灭菌水加入管内，涡动混匀后置××温度水浴中作用××min；吸取上述混合液1.0ml加入已盛有9.0ml中和剂的试管内涡动混匀；中和××min，测定病毒滴度TCID50。

III组：（消毒剂+中和剂）+病毒悬液 向已盛有9.0ml中和剂的试管内加入0.9ml受试消毒液和0.1ml病毒悬液稀释液，涡动混匀后作用××min；另取一支10ml试管加入0.09ml含××TCID50/ml的××病毒悬液，取已作用至××min的“消毒剂+中和剂”混合液9.0ml加入其内，涡动混匀后置××温度水浴中作用××min，测定病毒滴度TCID50。

IV组：消毒剂+病毒悬液 取0.5ml含××TCID50/ml的××病毒悬液于10ml试管内，吸取4.5ml受试消毒液加入管内，涡动混匀后置××温度水浴中作用××min；吸取上述混合液1.0ml加入已盛有9.0ml灭菌水的试管内涡动混匀，作用××min，测定病毒滴度TCID50。

V组：病毒悬液+灭菌水 取0.5ml含××TCID50/ml的××病毒悬液于10ml试管内，吸取4.5ml灭菌水加入管内，涡动混匀后置××温度水浴中作用××min；吸取上述混合液1.0ml加入已盛有9.0ml灭菌水的试管内涡动混匀，作用××min，测定病毒滴度TCID50。

VI组：稀释液 取0.5ml病毒悬液稀释液于10ml试管内，吸取4.5ml灭菌水加入管内，涡动混匀后置××温度水浴中作用××min；吸取上述混合液1.0ml加入已盛有9.0ml灭菌水的试管内涡动混匀，作用××min，测定病毒滴度TCID50。

# 8.2.2.3 判定标准

第I、IV、VI组的病毒滴度应为0，II、III、V组的病毒滴度应相近。

# 9 试验结果与分析

以表格形式列出中和剂鉴定结果，确认所用中和剂适用于本次消毒试验。

# 10 试验结论

 简明列出试验结论。

# 11 试验质量控制

## 11.1 试验人员培训情况

 描述试验人员的培训内容。

## 11.2 试验方案执行情况

描述试验期间是否有任何偏离方案的情况。如有，详细列出，并分析对试验结果的影响。

## 11.3 试验监查与协查情况

描述试验期间的协查时间、次数、内容等。

## 11.4 数据记录与存档情况

简要描述试验数据的记录内容、存档地址等。

# 12 实验室生物安全

描述试验期间是否有任何生物安全问题。如有，详细列出，并说明处置情况。

# 13 参考文献

规范列出本试验所涉及的参考文献。

# 14 附图

附消毒剂实物图、消毒剂检验报告复印件、试验操作照片和视频等。

# 15 附表

附试验结果原始记录等。