**消毒剂对空气喷雾消毒（特定细菌）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）、《喷雾消毒效果评价方法》（GBT38504-2020）、《现场消毒评价标准》（WS/T 797-2022）和《消毒技术规范》（2002年版）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。

**7.2 试验菌株**

白色葡萄球菌（8032）或其他特定细菌的菌种名称、来源等。

**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 中和剂鉴定试验**

**8.1.1 液体冲击式采样法**

**8.1.1.1 菌悬液的制备**

取白色葡萄球菌的营养琼脂培养基斜面新鲜培养物（18h～24h），吸取3.0～5.0ml营养肉汤加入斜面试管内，反复吹洗，洗下菌苔，用无菌脱脂棉过滤后，用营养肉汤稀释成浓度为5×103CFU/ml～3×104CFU/ml的试验用菌悬液。

**8.1.1.2 试验分组及操作**

通过表1所列试验组别鉴定中和剂的有效性。

表1 中和剂鉴定试验内容

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 组别 | 向空气舱中喷洒的液体 | 采样器中10ml液体 | 说明问题 |
| 1 | 无菌水 | 中和剂 | 观察中和剂对试验菌生长有无抑制作用。 |
| 2 | 消毒剂 | 中和剂 | 观察消毒剂与中和剂的反应产物对试验菌生长有无抑制作用。 |
| 3 | 无菌水 | 稀释液 | 菌数对照 |
| 4 | / | / | 阴性对照 |

第1、2、3组：根据预试验及前期研究设计消毒剂用量，在1m3空气舱中喷消毒剂或无菌水，作用至消毒时间，立即用含10ml中和剂或稀释液的液体冲击采样器采样（采样体积与预设消毒效果鉴定试验采样体积相同），作用10min。取0.1ml试验用菌悬液加入上述溶液中，做活菌培养计数。

第4组：分别吸取稀释液、中和剂各1.0ml，直接做活菌培养计数。

**8.1.2** **六级筛孔空气撞击式采样法**

**8.1.2.1菌悬液的制备**

菌悬液配制方法同8.1.1.1，用营养肉汤稀释成浓度为5×102CFU/ml～3×103CFU/ml的试验用菌悬液。

**8.1.2.2试验操作及分组**

通过表2所列试验组别鉴定中和剂的有效性。

表2 中和剂鉴定试验内容

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 组别 | 0.1ml液体 | 营养琼脂平板 | 说明问题 |
| 1 | 菌悬液 | 含中和剂 | 观察中和剂对试验菌生长有无抑制作用 |
| 2 | 菌悬液 | 采集了消毒剂喷雾后的空气，含中和剂 | 观察消毒剂与中和剂的反应产物对试验菌生长有无抑制作用 |
| 3 | 菌悬液 | 不含中和剂 | 菌数对照 |
| 4 | 稀释液 | 含中和剂 | 阴性对照 |

第1、3、4组：分别吸取试验用菌悬液或稀释液0.1ml，均匀涂抹于三块含或不含中和剂的营养琼脂平板，做活菌培养计数。

第2组：根据预试验及前期研究设计消毒剂用量，在20m3空气舱中进行喷雾，作用至消毒时间，立即用含中和剂营养琼脂平板的六级筛孔空气撞击式采样器采样（采样体积与预设消毒效果鉴定试验采样体积相同），作用10min。分别取0.1ml试验用菌悬液，涂抹于上述采样器中的6块平板上，做活菌培养计数。

**8.1.3 评价规定**

试验结果符合以下全部条件，中和剂可判为合格：

1）第1、2、3组菌量在50CFU/平板~300CFU/平板之间，三组间菌落数误差率应不超过15%。

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

2）第4组无菌生长。否则，说明试剂有污染，应更换无污染的试剂重新进行试验。

3）试验重复3次，每次试验均应符合以上要求。

**8.2 实验室试验**

**操作步骤**

（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）设置相邻的一对空气舱（避免日光直射），一个用于消毒试验，一个用于试验对照，所处环境（包括温度、湿度、光照、密闭性和通风条件等）应一致。同时调节两个空气舱的温度、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空气舱内，将门关闭。此后，一切操作和仪器设备的操纵均在舱外通过带有密封袖套的窗口或遥控器进行。直至试验结束，方可将门打开。

（4）按预试验确定的压力、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空气舱分别进行消毒前采样，作为对照组试验开始前和试验组消毒处理前的阳性对照（即污染菌量）。空气舱内空气细菌浓度应达5×104CFU/m3～5×106CFU/m3（按消毒处理前阳性对照样本检测结果计）。

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

（6）根据预试验及前期研究设计消毒剂用量，在试验组空气舱内进行消毒。对照组空气舱同时作相应（不含消毒剂）处理。

 （7）作用至规定时间，对试验组和对照空气舱按前述方法同时采样。继续作用至第二个预定消毒时间，再次按前述方法采样。如此按作用时间分段采样，直至规定的最终作用时间为止。

（8）用六级筛孔空气撞击式采样器采样时，采样平板直接放入36±1℃恒温培养箱中培养48h，观察最后结果，计数生长菌落数。用液体撞击式采样器采集的样本，按细菌（繁殖体/芽孢）悬液定量杀灭效果试验报告中活菌计数方法进行活菌培养计数。

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

（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。每次试验完毕，空气舱应充分通风。必要时消毒冲洗间隔4h后，方可做第二次实验。记录每次试验过程中的温度和相对湿度，以便分析比对。

**判定标准**

分别计算每次试验的杀灭对数值，杀灭对数值均≥3.00时才判为该消毒液有效消毒浓度。当低于此指标时，则应提高消毒剂的浓度或延长作用时间，重新作试验。

消毒前后空气中含菌量计算公式如下:





杀灭对数值为lg(Kt)，计算公式如下：





式中：

Nt: 不同时间空气中细菌的自然消亡率；

V0: 对照组试验开始前的空气含菌量；

Vt: 对照组试验过程中不同时间的空气含菌量；

Kt: 消毒处理对空气中细菌的杀灭率；

V0': 试验组消毒处理前的空气含菌量；

Vt': 试验组消毒过程中不同时间的空气含菌量。

**9 试验结果与分析**

**9.1 中和剂鉴定试验结果**

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。

**9.2消毒试验结果**

以表格形式列出产品试验结果，并分析消毒效果。

**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。