**消毒剂对细菌（繁殖体/芽孢）悬液定量杀灭效果试验报告（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**

**7.1.1 受试消毒剂**

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。

**7.1.2 对照消毒剂**

提供1～2种对照消毒剂的产品名称、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**

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（经中和剂鉴定试验鉴定合格）的种类、浓度等信息。

**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 试验菌悬液的制备**

**8.1.1 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。

**8.1.2 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。

**8.2 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1.0ml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个～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%

**8.3 定量杀灭细菌试验**

**试验原则或要求**

（1）根据文献报道或前期试验针对每种菌种设置不少于3个作用浓度和3个作用时间，一般选择5个作用浓度和5个作用时间。

 （2）一、二类消毒剂该试验应至少重复10次，三类消毒剂应至少重复3次。

 （3）根据消毒对象的洁净程度选择有机物干扰浓度，与中和剂鉴定试验中所用有机物浓度保持一致。

**操作步骤**

（1）按8.1配制实验用菌悬液，使其浓度为1×106CFU/ml～5×106CFU/ml（回收菌落数为1×105CFU/ml～5×105CFU/ml）。

（2）无特殊说明者，一律使用无菌硬水配制，使菌悬液配制至使用浓度，置20℃±1℃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℃±1℃水浴中5min后，用无菌吸管吸取消毒液4.0ml注入其中，迅速混匀并立即记时。

（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经灭菌的中和剂中，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8.2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36±1℃温箱中培养，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。

**数据统计**

计算各组的活菌浓度（CFU/ml），任选杀菌率或杀灭对数值指标进行评价。

**（1）杀菌率**

杀菌率（Pt）=$\frac{阳性对照组活菌数（No）-试验组活菌数（Nx）}{阳性对照组活菌数（Nx）}$×l00%

式中

No为阳性对照组活菌数。

Nx为试验组活菌数。

 **平均杀菌率（P）的计算：**

 P=[∑（noi-nti）/∑n0i]×100%

 式中

noi为第i次试验的阳性对照组活菌数。

 nti为第i次试验的试验组活菌数。

**杀菌率标准误（Sp）的计算：**



式中

no为m次试验阳性对照组的平均活菌数。

 Pi为第i次试验的杀菌率。

 P为m次试验的平均杀菌率。

  **杀菌率95%可信限的计算：**

 杀菌率95%可信限=P±1.96Sp

**（2）杀灭对数值**

将各组的活菌浓度（CFU/ml），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）＝阳性对照组平均活菌浓度的对数值（No）－试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。如果消毒试验组平均长菌落数小于等于1时，此时其杀灭对数值，即大于等于对照组平均活菌浓度的对数值（KL≥No）。

**判定标准**

杀菌率达99.9%的浓度或杀灭对数值≥3.00才评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。

**9 试验结果与分析**

以表格形式列出所有试验结果，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**

附受试/对照消毒剂实物图、受试/对照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。