**消毒剂对细菌（繁殖体/芽孢）载体定性杀灭效果试验报告（模板）**

**1 适用范围及试验目的**

灭菌试验应用载体定性试验。

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 菌片（染菌载体）的制备**

（1）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。

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的细菌繁殖体或芽孢菌悬液，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。

**8.2 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%

**8.2 定性灭菌试验**

**试验原则或要求**

（1）对于灭菌产品的试验，应用文献报道或前期试验摸索的最低使用浓度（强度）和最短作用时间进行试验。

（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。样本总量应不少于30个，每次试验应设立规定数量的阴性对照和阳性对照。

 （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。

 （4）对于专用于灭菌，不作它用的消毒剂，只需做蜡样杆菌、类炭疽杆菌或枯草杆菌黑色变种芽孢杀灭试验，可不做病毒、真菌、分枝杆菌及细菌繁殖体杀灭试验，但对既用于灭菌，又用于消毒的消毒剂则按上述要求选择相应微生物进行试验。

**操作步骤**

（1）按8.1配制实验用菌片，使每个菌片的回收菌数为1×106CFU/片～5×106CFU/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，将平皿置20℃±1℃水浴箱内5min后，用无菌镊子分别放入预先制备的菌片6片，并使之浸透于消毒液中。

（3）待菌片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含5.0ml中和剂试管中。用电动混合器混合20s（或将试管在手掌上振敲80次），作为试验组样本。混匀后，吸取1.0ml直接接种平皿，每管接种3个平皿，测定存活菌数。

（4）另取一平皿，加入30.0ml标准硬水代替消毒液，放入6片菌片，作用至预定时间，取出3片，分别移入含5.0ml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3片，分别移入一含5.0ml中和剂肉汤试管中，做活菌培养计数，作为菌数对照组样本。

（5）取同批次使用的中和剂和稀释液各1.0ml，分别接种于同批平皿，做活菌培养计数，作为阴性对照组。

（6）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7天观察最终结果。

**判定标准**

阳性对照组有菌生长且菌数符合要求，阴性对照组无菌生长，试验组均无菌生长，才可评定为灭菌浓度的消毒液。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，并分析灭菌效果。

**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。