

附件 1：药品微生物实验室消毒剂效力评估指导原则草案公示稿（第一次）

1 **药品微生物实验室消毒剂效力评估指导原则**

2 消毒剂通常是指应用在物品表面去除或杀灭微生物的物理因子或化学试剂。
3 本指导原则中消毒剂指化学消毒剂。本指导原则对制药环境、设施及实验室用消
4 毒剂的效力评估试验进行指导。

5 消毒剂生产规范、原料清单及禁限用物质、卫生要求、腐蚀性评价、安全性
6 毒理学评价等均应符合现行国家标准，以确保消毒剂产品的安全可靠。当使用消
7 毒剂控制微生物时，应证明其效力。消毒剂效力评估方式包括悬液法和载体法，
8 悬液法可用于对消毒剂种类、浓度等进行快速初筛；载体法可用于验证消毒剂在
9 实际物品表面消毒除菌的能力。应根据环境和微生物等实际情况开展试验，进行
10 效力评估。

11 使用方应根据实际情况开展试验，制定适用于自身的消毒规范。

12 制药用水系统的消毒及相关生物膜的去不在本指导原则的讨论范围内。

13 **一、消毒剂**

14 用消毒剂擦拭、喷洒和浸泡，通常可去除和控制设备、地板、墙壁、需要带
15 入洁净区和无菌操作区的物品（例如环境监测培养基的包装材料）等局部表面微
16 生物。可根据被消毒物体表面的性质、消毒剂对物体表面腐蚀性和物体表面污染
17 情况（如被污染微生物的数量和类型）等综合考虑选择使用。

18 **表 1 消毒剂的类型、典型浓度和作用机制**

类型（物理化学性质）	典型品种	典型浓度	作用机制
氧化剂	过氧乙酸	0.3%	氧化作用
	过氧化氢	3%	
	次氯酸钠	0.02%~0.05%	
醇类	异丙醇	50%~70%	蛋白质和核酸变性
	乙醇	75%	
酚类	苯酚	≤5 %	损伤细胞膜功能，蛋白凝固/变性

表面活性剂	苯扎氯铵 苯扎溴铵 苜索氯铵	0.05%~0.2%	蛋白质变性
	盐酸烷基二氨基 乙基甘氨酸	0.05%~0.5%	损伤细胞膜功能，蛋白凝固/变性
双胍类	葡萄糖酸氯己定	0.05%~0.5%	干扰细菌酶或改变/破坏细胞质膜

19 常用的消毒剂及其典型浓度，以及对微生物的作用机制见表 1。其他消毒剂
20 或浓度，经确认安全有效也可使用。

21 消毒剂按杀菌谱范围或作用强度通常可分为杀孢子剂和非杀孢子剂，应分别
22 选用与之相适应的菌株进行效力评估。

23 浓缩型消毒剂可用适宜的稀释剂稀释至实际使用浓度，但消毒剂过度稀释可
24 能会造成消毒效力减弱或丧失。用于无菌操作流程的消毒剂一般用无菌稀释剂稀
25 释，必要时需经除菌过滤去除潜在的微生物。稀释后的消毒剂效期及贮藏条件应
26 验证。

27 消毒剂对微生物杀灭效力受消毒剂种类、浓度、使用温度、接触作用时间、
28 被消毒物体性质及其表面污染微生物的种类及生长状态等情况的影响。具体可以
29 通过消毒剂效力评估试验进行确认，试验过程中除考虑以上影响因素外，载体法
30 还应考虑载体种类、灭菌对载体的影响、载体表面孔径大小及均一性、干燥条件、
31 湿度差异和菌体在载体上的损伤等。

32 为确保更安全、更适当地使用消毒剂，还必须考虑以下事项：消毒剂的抗菌
33 谱、材料对消毒剂的兼容性、有机物（例如蛋白质等）存在时对消毒效力的影响、
34 消毒剂挥发、消毒剂对人体（安全）的影响、消毒剂轮换的必要性及其方法、废
35 弃物处理便易性（中和、灭活）、废弃物对环境的影响等。

36 二、培养基

37 培养基的制备

38 胰酪大豆胨液体培养基、胰酪大豆胨琼脂培养基、沙氏葡萄糖液体培养基、
39 沙氏葡萄糖琼脂培养基、马铃薯葡萄糖琼脂培养基按照无菌检查法（通则 1101）
40 制备。

41 培养基的适用性检查

42 消毒剂效力评估用培养基包括预制培养基、由脱水培养基或按处方配制的培
43 养基均应进行培养基的适用性检查。

44 菌种 试验所用的菌株传代次数不得超过 5 代（从菌种保藏中心获得的干燥
45 菌种为第 0 代），并采用适宜的菌种保藏技术进行保存，以保证试验菌株的生物
46 学特性。培养基适用性检查的菌种及培养物的制备见表 2。

47 表 2 培养基适用性检查、中和剂验证试验、效力评估用的试验菌及制备

分类	试验菌株	试验培养基	培养温度	培养时间
营养体	金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>) [CMCC(B)26 003]	胰酪大豆胨琼脂培养基或胰酪大豆胨液体培养基	30~35℃	18~24 小时
	铜绿假单胞菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) [CMCC(B)10 104]	胰酪大豆胨琼脂培养基或胰酪大豆胨液体培养基	30~35℃	18~24 小时
	大肠埃希菌 (<i>Escherichia coli</i>) [CMCC(B)44 102]	胰酪大豆胨琼脂培养基或胰酪大豆胨液体培养基	30~35℃	18~24 小时
	白色念珠菌 (<i>Candida albicans</i>) [CMCC(F)98 001]	沙氏葡萄糖琼脂培养基或沙氏葡萄糖液体培养基	20~25℃	48 小时
细菌芽孢	枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>) [CMCC(B)63 501]	胰酪大豆胨琼脂培养基或胰酪大豆胨液体培养基	30~35℃	7 天
真菌孢子	黑曲霉 (<i>Aspergillus niger</i>) [CMCC(F)98 003]	马铃薯葡萄糖琼脂培养基或沙氏葡萄糖琼脂培养基	20~25℃	6~10 天或直到获得丰富的孢子

48 菌液制备 取营养体的新鲜培养物，用 0.9% 无菌氯化钠溶液制成适宜浓度的

49 菌悬液。取细菌芽孢培养物，用 0.9% 无菌氯化钠溶液将芽孢进行洗脱，80℃ 水
50 浴加热 10 分钟后用 0.9% 无菌氯化钠溶液制成适宜浓度的芽孢悬液。取真菌孢子
51 培养物，用含 0.05% (ml/ml) 聚山梨酯 80 的 0.9% 无菌氯化钠溶液，将孢子洗脱。
52 然后，采用适宜的方法吸出孢子悬液至无菌试管内，用含 0.05% (ml/ml) 聚山
53 梨酯 80 的 0.9% 无菌氯化钠溶液制成适宜浓度的孢子悬液。

54 新鲜营养体菌液制备后若在室温下放置，应在 2 小时内使用；若保存在 2~
55 8℃，可在 24 小时内使用。细菌芽孢悬液和真菌孢子悬液可保存在 2~8℃，在
56 验证过的贮存期内使用。

57 **适用性检查** 分别接种不大于 100cfu 的细菌营养体菌液、细菌芽孢悬液至胰
58 酪大豆胨琼脂培养基，每株试验菌平行制备 2 个平板，混匀，凝固，置 30~35℃
59 培养不超过 3 天，计数；接种不大于 100cfu 的真菌营养体菌液至沙氏葡萄糖琼
60 脂培养基，平行制备 2 个平板，混匀，凝固，置 20~25℃ 培养不超过 5 天，计
61 数；接种不大于 100cfu 的真菌孢子悬液至马铃薯葡萄糖琼脂培养基，平行制备
62 2 个平板，混匀，凝固，置 20~25℃ 培养不超过 5 天，计数；同时，用对应的对
63 照培养基替代被检培养基进行上述试验。

64 **结果判定** 被检培养基上的菌落平均数与对照培养基菌落平均数的比值应在
65 0.5~2 范围内，且菌落形态大小与对照培养基上的菌落一致。

66 三、消毒剂效力评估

67 **菌种** 一般可参考表 3 选择标准菌株并结合 1~2 株典型环境分离菌株进行消
68 毒剂效力评估试验，也可依据充分的环境微生物菌群信息，针对具体消毒剂类别
69 及微生物控制目标选择类似菌株或适当增减消毒剂效力评估试验菌株数量。

70 表 3 典型试验菌

	标准菌株	典型环境分离菌株举例
杀孢子剂	金黄色葡萄球菌 [CMCC (B) 26 003]； 铜绿假单胞菌 [CMCC (B) 10 104]； 白色念珠菌 [CMCC (F) 98 001]； 黑曲霉 [CMCC (F) 98 003]； 枯草芽孢杆菌 [CMCC (B) 63 501]	苏云金芽孢杆菌；球形芽孢杆菌； 黄青霉菌；适宜的霉菌
非杀孢子剂	金黄色葡萄球菌 [CMCC (B) 26 003]；	藤黄微球菌；表皮葡萄球菌；

	铜绿假单胞菌[CMCC(B)10 104]; 大肠埃希菌[CMCC(B)44 102]; 白色念珠菌[CMCC(F)98 001]	假单胞菌
--	---	------

71 **菌液制备** 试验菌培养物制备见表 2。若为琼脂培养物，洗脱制备菌液。若
72 为液体培养物，离心收集菌体，稀释制备菌液。

73 中和剂验证

74 消毒剂效力评估试验中，在达到设定消毒除菌作用时间后，应立即采用中和
75 剂终止消毒进程以评估消毒除菌效果。常用的中和剂为卵磷脂、聚山梨酯 80 和/
76 或硫代硫酸钠等溶液。中和剂的中和效果应进行验证，以保证中和剂的有效性和
77 对微生物的无毒性。

78 中和剂的有效性：在中和步骤完成后加入待测微生物（1ml 溶液中接菌量为
79 $10\sim 10^2$ cfu），照“非无菌产品微生物限度检查：微生物计数法（通则 1105）”
80 进行菌落计数，试验组的菌落数与菌液组的菌落数的比值应在 0.5~2 范围内。

81 中和剂的无毒性：在中和剂中加入待测微生物（1ml 溶液中接菌量为 $10\sim$
82 10^2 cfu），照“非无菌产品微生物限度检查：微生物计数法（通则 1105）”进行
83 菌落计数，试验组的菌落数与菌液组的菌落数的比值应在 0.5~2 范围内。

84 效力评估试验方法

85 试验方法举例如下，其他经过验证的适宜方法也可以使用。

86 1. 悬液法

87 **供试品接种** 每 1ml 消毒剂接种不少于 10^5 cfu 的试验菌。

88 **存活菌数测定** 在达到设定除菌作用时间后采用适宜的方法（如加入经验证
89 的中和剂或薄膜过滤）消除消毒剂的抑菌作用，照“非无菌产品微生物限度检查：
90 微生物计数法（通则 1105）”分别测定接种微生物和消毒处理后的供试品中所
91 含菌数，测定细菌用胰酪大豆胨琼脂培养基，测定真菌用沙氏葡萄糖琼脂培养基。
92 根据存活菌数测定结果计算每 1ml 供试品中各试验菌的含菌数，并换算成 1g 值。

93 2. 载体法

94 载体的准备：试验用载体应预先清洁处理。

95 **供试品接种** 在载体表面接种试验菌，菌液应在载体表面涂匀。干燥后使得
96 每个载体染菌量不少于 10^5 cfu，滴加消毒剂覆盖染菌区。部分试验菌尤其是革兰

97 氏阴性菌在制备成染菌载体过程中会死亡，可适当提高接菌量。

98 **存活菌数测定** 在达到设定除菌作用时间后，采用振摇法、擦拭法等方法收
99 集载体上的试验菌，收集液采用适宜的方法（如加入经验证的中和剂或薄膜过滤）
100 消除消毒剂的抑菌作用，照“非无菌产品微生物限度检查：微生物计数法（通则
101 1105）”分别测定接种微生物和消毒处理后的供试品中所含菌数，测定细菌用胰
102 酪大豆胨琼脂培养基，测定真菌用沙氏葡萄糖琼脂培养基。根据存活菌数测定结
103 果计算每 1ml 供试品中各试验菌的含菌数，并换算成 1g 值。

104 效力评估用不同载体材料参考表 4，可根据实际使用情况增加其他用于评价
105 的材料。

106 **表 4 载体材料举例**

材质	应用举例
不锈钢	工作台、设备、容器
玻璃	窗户、屏幕、容器
聚碳酸酯（树脂）	屏幕、容器
环氧树脂涂层	地板
氯乙烯	地板、帘布、外包装材料、储液袋
丁腈橡胶	手套

107 **四、结果判断**

108 计算试验菌在消毒处理前后减少的 lg 值：细菌或真菌营养体减少的 lg 值不
109 少于 3，细菌芽孢或真菌孢子减少的 lg 值不少于 2，表明消毒剂对试验菌有效。

110 必要时，可用验证过的对照消毒剂平行试验辅助待测消毒剂效力评估试验结
111 果判断。

112 由于验证试验的菌株与实际环境中可能存在的低微量微生物的生长状态、对
113 消毒剂的耐受能力等不一致，消毒剂效力评估确定的除菌效果可能与实际应用效
114 果存在差异。对消毒剂效力评估结果的接受或应用应充分结合物理擦拭、清洁验
115 证、风险管理需求等进行评估。

起草单位：中国食品药品检定研究院 联系电话：67095969

参与单位：天津市药品检验研究院、上海市食品药品检验研究院、江苏省食品药品监督检验

研究院、浙江省食品药品检验研究院、山东省食品药品检验研究院、四川省药品检验研究院（四川省医疗器械检测中心）（原四川省食品药品检验检测院）、上海生物制品研究所有限责任公司、北京鸿测科技发展有限公司、温州爱默森检测技术服务有限公司、湖北葛店人福药用辅料有限责任公司

行业指南