

中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 650—2019

抗菌和抑菌效果评价方法

Evaluating Method for Efficacy of Antibacterial and Bacteriostasis

2019 - 01 - 30 发布

2019 - 07 - 01 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会 发布

前 言

本标准按照GB/T1.1-2009的规定进行编写。

本标准由江苏省疾病预防控制中心、中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所、山东省疾病预防控制中心、黑龙江省疾病预防控制中心负责起草。

本标准主要起草人：徐燕、谈智、张流波、陈越英、吴晓松、林玲、孙启华、崔树玉、赵华伟、吴克、张文生、王裕荣、吴晓、沈瑾、李炎、孙巍、王玲、王嵬、王晓蕾、褚宏亮。

抗菌和抑菌效果评价方法

1 范围

本标准规定了抗菌和抑菌评价方法的选择原则和使用。

本标准适用于具有抗菌和(或)抑菌功能产品的抗菌、抑菌效果的鉴定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB 15979 一次性使用卫生用品卫生标准

FZ/T 73023 抗菌针织品

消毒技术规范 (2002版) 卫生部(卫法监发(2002)282号)

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

抗菌 antibacterial

采用化学或物理方法杀灭或妨碍细菌生长繁殖,可减少其数量以及活性的过程。

3.2

抑菌 bacteriostasis

采用化学或物理方法抑制或妨碍细菌生长繁殖及其活性的过程。

3.3

持续抗菌作用 sustained antibacterial action

具有抗菌作用的消毒产品涂于物体表面,持续7d以上仍具有杀灭或妨碍细菌生长繁殖作用。

3.4

中和剂 neutralizer

在杀灭微生物试验中,用以消除试验微生物与消毒剂的混悬液中,以及微生物表面上残留的消毒剂,使其失去对微生物抑制和杀灭作用的试剂。

4 评价方法的选择原则

4.1 抗菌试验与抑菌试验区别

抗菌试验：测定抗菌产品对细菌和真菌的抗菌作用，试验过程中需要用中和剂终止杀菌作用。

抑菌试验：测定抑菌产品对细菌和真菌的抑菌作用，试验过程中不需要使用中和剂终止抑菌作用。

4.2 根据产品性能选择合适的评价方法

4.2.1 抑菌效果评价方法的选择原则

抑菌类产品选择抑菌效果评价方法。液体抑菌产品选择悬液定量抑菌试验，膏体或半固体凝胶类、黏稠状抑菌产品选择载体浸泡定量抑菌试验，湿巾类或其他自身含有抑菌成分的产品选择载体抑菌试验，肥皂类固体抑菌产品选择抑菌环试验，含有可溶性抑菌成分的纺织品选择浸渍抑菌试验，含有持续抑菌作用的抑菌洗液选择滞留抑菌试验。

4.2.2 抗菌效果评价方法的选择原则

抗菌类产品选择抗菌效果评价方法。液体抗菌产品选择悬液定量杀菌试验，凝胶状或膏状抗菌产品选择载体浸泡定量杀菌试验，湿巾类或其他自身含有抗菌成分的产品选择载体杀菌试验，含有可溶性抗菌成分的纺织品选择浸渍抗菌试验。

含有不可溶抗菌成分的纺织品、无纺布、纤维等，经鉴别不含可溶性抗抑菌成分后，采用烧瓶振荡试验。

含有不可溶抗菌成分的瓷砖、塑料、金属、涂料等，采用贴膜试验；对于涂于表面，干燥后具有持续抗菌作用的产品，进行持续抗菌试验。

5 评价方法

5.1 抑菌效果

5.1.1 悬液定量抑菌试验

5.1.1.1 适用范围

适用于液体抑菌制剂如卫生洗液、抑菌喷雾剂等对微生物抑菌效果的测定。

5.1.1.2 试剂、培养基及器材

5.1.1.2.1 试验菌株

金黄色葡萄球菌（ATCC 6538）、大肠杆菌（8099）、白色念珠菌（ATCC 10231）及根据抑菌剂特定用途所用的其他菌株。

5.1.1.2.2 试剂

稀释液：0.03 mol/L 磷酸盐缓冲液（PBS）（pH7.2~7.4），培养基：金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的培养使用营养琼脂培养基，白色念珠菌的培养使用沙氏琼脂培养基。

5.1.1.2.3 器材

恒温水浴箱、计时器、II级生物安全柜等。

5.1.1.3 试验步骤

取试验菌24h新鲜斜面培养物用PBS洗下，用PBS稀释至约 5.0×10^5 CFU/mL~ 4.5×10^6 CFU/mL菌悬液备用。取无菌试管，先加入5.0 mL样品（根据使用说明书要求使用原液或稀释液），置 $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 水浴中5min后，再加入0.1 mL试验用菌悬液，迅速混匀并立即计时。待试验菌与样品相互作用至说明书的规定时间，分别吸取1.0 mL试验菌与样品混合液接种2个平皿，倾注培养基。菌量无法计数时，以PBS做10倍系列稀释，选适宜稀释度分别吸取1.0 mL接种2个平皿，做活菌培养计数。同时用PBS代替样品，进行平行试验，作为阳性对照。阳性对照回收菌落数在 1.0×10^4 CFU/mL~ 9.0×10^4 CFU/mL之间。取同批次PBS、培养基作阴性对照。所有试验样本和对照样本均在 $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 培养，细菌繁殖体培养48h观察最终结果；白色念珠菌培养72h观察最终结果。试验重复3次，计算抑菌率。

5.1.1.4 抑菌率计算

$$X = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X —抑菌率，%；

A_0 —阳性对照组回收菌量，单位为 CFU/mL；

A_1 —试验组回收菌量，单位为 CFU/mL。

5.1.1.5 结果判定

抑菌率 $\geq 50\%$ ~ 90% ，判有抑菌作用；抑菌率 $\geq 90\%$ ，判有较强抑菌作用。

5.1.2 载体浸泡定量抑菌试验

5.1.2.1 适用范围

适用于膏体或半固体凝胶类、黏稠状抑菌产品对微生物抑菌效果的测定。

5.1.2.2 试剂、培养基及器材

载体为10 mm×10 mm脱脂白平纹布片，脱脂方法依照《消毒技术规范》（2002版）进行，使用前压力蒸汽灭菌备用，电子天平（ $d=0.01\text{g}$ ），其它同5.1.1.2。

5.1.2.3 操作步骤

取试验菌24h新鲜斜面培养物用PBS洗下，用PBS稀释至约 5.0×10^6 CFU/mL~ 5.0×10^7 CFU/mL制成菌悬液备用。用微量移液器滴染10 μl 菌悬液于灭菌载体上， $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 烘干或室温晾干备用。

按5 g/片的量称取样品于无菌平皿内，置 $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 水浴5min，用无菌镊子取染菌载体，使载体完全浸没于样品中，立即计时。待染菌载体与样品相互作用至说明书的规定时间，分别取染菌载体加入5.0 mL PBS试管中，混匀，振荡，将试验菌洗下，分别吸取1.0 mL样液，按活菌培养计数方法测定存活菌数，每管样液接种2个平皿。如平板上生长的菌落数较多时，可用PBS进行10倍系列稀释后，再进行活菌培养计数。取10.0 g与试验样品同质材料不含抑菌成分的对照样品浸泡2片染菌载体进行平行试验，作为阳性对照。阳性对照回收菌量为 1.0×10^4 CFU/片~ 9.0×10^4 CFU/片。取同批次PBS、培养基作阴性对照。所有试验样本和对照样本均在 $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 培养，细菌繁殖体培养48h观察结果；白色念珠菌培养72h观察结果。试验重复3次，计算抑菌率。

5.1.2.4 抑菌率计算

$$X = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

式中：

X —抑菌率，%；

A_0 —对照样品的平均菌落数，单位为 CFU/片；

A_1 —被试样品平均菌落数，单位为 CFU/片。

5.1.2.5 结果判定

抑菌率 $\geq 50\% \sim 90\%$ ，判有抑菌作用；抑菌率 $\geq 90\%$ ，判有较强抑菌作用。

5.1.3 载体抑菌试验

5.1.3.1 适用范围

适用于含溶出性抑菌成分的湿巾、无纺布口罩、卫生巾、护垫、尿布等固体类抑菌产品对微生物抑菌效果的测定。

5.1.3.2 试剂、培养基及器材

见5.1.1.2。

5.1.3.3 试验步骤

取试验菌24h新鲜斜面培养物用PBS洗下，用PBS稀释至约 10^5 CFU/mL $\sim 10^6$ CFU/mL，制成菌悬液备用。用灭菌剪刀在无菌条件下将试验样品和对照样品分别剪成20 mm \times 30 mm样片备用。试验时滴加0.1 mL菌悬液。对照样片染菌前需经压力蒸汽灭菌。取无菌平皿，用无菌镊子取2片试验样片，勿重叠，置 $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 水浴5min，在每一样片上滴加0.1 mL试验用菌悬液，立即计时。待试验菌与样片接触作用至说明书的规定时间，分别夹取染菌样片加于5.0 mL PBS试管中，混匀。振荡洗脱，分别吸取1.0 mL样液，按活菌培养计数方法测定存活菌数，每管样液接种2个平皿。如平板上生长的菌落数较多时，可10倍系列稀释后，再进行活菌培养计数。

同时用与试验样品同质材料不含抑菌成分的对照样片2片代替试验样片进行试验，作为阳性对照，阳性对照回收菌量为 1.0×10^4 CFU/片 $\sim 9.0 \times 10^4$ CFU/片；取同批次PBS、培养基作阴性对照。

所有试验样本和对照样本均在 $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 培养，细菌繁殖体培养48h、白色念珠菌培养72h观察最终结果。试验重复3次，计算抑菌率。

5.1.3.4 抑菌率计算

见式（2）。

5.1.3.5 结果判定

抑菌率 $\geq 50\% \sim 90\%$ ，判有抑菌作用；抑菌率 $\geq 90\%$ ，判有较强抑菌作用。

5.1.4 抑菌环试验

5.1.4.1 适用范围

适用于含溶出性抑菌物质，可制成直径为5 mm片状物的固体抑菌产品的抑菌效果鉴定；也可用于鉴别抗抑菌样品中是否含有可溶性抑菌物质。

5.1.4.2 试剂、培养基及器材

游标卡尺，其它见5.1.1.2

5.1.4.3 试验步骤

将试验菌24h新鲜斜面培养物用PBS洗下，稀释至 5.0×10^5 CFU/mL~ 5.0×10^6 CFU/mL备用。

抑菌片的制备：溶出性固体抑菌产品，直接制成直径为5 mm，厚度不超过4 mm圆片（块），每4片为一组。

阴性对照样片的制备：取同种材质不含抑菌成分的样本，制成与试验组大小相同的圆片（块）。

用无菌棉拭子蘸取浓度为 5.0×10^5 CFU/mL~ 5.0×10^6 CFU/mL试验菌悬液，在适宜的培养基平板表面均匀涂抹3次。每涂抹1次，平板应转动 60° ，最后将棉拭子绕平板边缘涂抹一周。盖好平皿，置室温干燥5min。

每次试验贴放1个染菌平板，每个平板贴放4片试验样片，1片阴性对照样片，共5片。用无菌镊子取样片贴放于平板表面，阴性对照样片贴于平板中心位置，试验样片贴于四周，贴放好后，用无菌镊子轻压样片，使其紧贴于平板表面。各样片中心之间相距25 mm以上，与平板的周缘相距15 mm以上。盖好平板，置 $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 培养16h~18h观察结果，试验重复3次。

用游标卡尺测量抑菌环的直径（包括贴片）并记录，测量抑菌环时，应选均匀而完全无菌生长的抑菌环进行，测量其直径应以抑菌环外沿为界。

5.1.4.4 结果判定

阴性对照样片应无抑菌环产生，试验样品抑菌环直径 >7 mm者，判为有抑菌作用；抑菌环直径 ≤ 7 mm者，判为无抑菌作用。

3次重复试验（共12个样片）均有抑菌作用，则判为合格。

5.1.5 浸渍抑菌试验

5.1.5.1 适用范围

适用于溶出性抑菌织物（如抑菌毛巾、口罩、内衣等）抑菌效果的测定。

5.1.5.2 试剂、培养基及器材

5.1.5.2.1 试验菌株见 5.1.1.2.1

5.1.5.2.2 试样

在距试样布边10 cm以上、离布端1 m以上部位，剪取直径为5 cm的圆形试样若干，取3份试样分别装于3个锥形瓶中，盖好瓶口备用（需用试样数量要根据纤维类别及织物织法而定，以能吸收1 mL菌液且锥形瓶中不留残液为度）。另同法剪取与试样相同材质但不含抑菌剂对照织物若干，取2份分别装于2个锥形瓶中，盖好瓶口， 121°C 灭菌15min备用。

5.1.5.2.3 试剂和培养基

0.03 mol/L PBS（pH7.2~7.4），肉汤培养基、营养琼脂培养基、沙氏培养基。

5.1.5.2.4 菌悬液的制备

用接种环将保存的菌种以划线法接种到营养琼脂平板，36℃±1℃培养24h，取典型的菌落移种到含肉汤培养基的锥形瓶中，36℃±1℃培养24 h，用肉汤对培养液进行系列稀释，使菌悬液的含菌量为 1.0×10^5 CFU/mL~ 5.0×10^5 CFU/mL。

5.1.5.3 试验步骤

分别取1 mL菌悬液加入2份准备好的锥形瓶内试样和1份对照织物上，确保其均匀分布，且锥形瓶中不留多余液，封好瓶口，以防蒸发造成细菌死亡。分别在一个盛有已接种菌悬液的试样和对照织物的锥形瓶中加入100 mL PBS，置涡旋振荡器上振荡1min洗涤细菌，分别吸取1.0 mL样液或10倍系列稀释液接种2个平皿，作为“0”接触时间样本和对照织物上的细菌数。

将另一个装有已接种菌悬液试样的锥形瓶于36℃±1℃培养20h±2h，加入100 mL PBS，置涡旋振荡器上振荡1min洗涤细菌，分别吸取1.0 mL样液或10倍系列稀释液接种2个平皿，作为试验组。

阴性对照组，试样不接种菌悬液，在“0”接触时间加入100 mL PBS，置涡旋振荡器上振荡1min取样，接种平皿。

阳性对照组，另取1个装有对照织物的锥形烧瓶，接种1 mL菌悬液后，在36℃±1℃培养20 h±2h，加入100 mL PBS，置涡旋振荡器上振荡1min洗涤细菌，分别吸取1.0 mL样液或10倍系列稀释液接种2个平皿。将阴性和阳性对照样本与试验组样本一并放36℃±1℃培养48h，计数菌落数，试验重复3次。

5.1.5.4 计算抑菌率

$$X = \frac{B \text{ 或 } C \text{ 或 } [(B + C) / 2] - A}{B \text{ 或 } C \text{ 或 } [(B + C) / 2]} \times 100\% \dots\dots\dots (3)$$

式中：

X —抑菌率，%；

A —试验组试样上的细菌数，单位为 CFU/mL；

B —“0”接触时间试样上的细菌数，单位为 CFU/mL；

C —“0”接触时间对照织物上的细菌数，单位为 CFU/mL；

如果“ B ”和“ C ”差别较大时，取较大值；如果“ B ”和“ C ”差别不大时，取平均值。

5.1.5.5 结果判定

试验成立条件要求：“0”接触时间对照织物的平均回收菌量为 1×10^3 CFU/mL~ 5×10^3 CFU/mL；阴性对照应无菌生长，阳性对照菌数比0接触时间的菌数明显增加。

各次试验的抑菌率均≥50%，即可判定该样片具有抑菌作用。

5.1.6 滞留抑菌效果试验

5.1.6.1 适用范围

适用于有持续抑菌作用的抑菌洗液类抑菌产品的滞留抑菌效果鉴定。

5.1.6.2 试剂、培养基及试验器材

试验菌株：金黄色葡萄球菌（ATCC 27217）

试验产品：试验品为25套按顺序编号的样品。每套2瓶，一瓶为测试样品，另一瓶为不含抗（抑）菌剂的对照样品。

不含抑菌剂的用品 25瓶（试验调整阶段用）。

胰蛋白酶大豆肉汤培养基 (TSB)、胰蛋白酶大豆琼脂培养基 (TSA)、羊血、经脱纤维处理、0.075 mol/L的磷酸盐缓冲液、70%酒精、金属筒 (直径2.2 cm、高度3 cm)、一次性接种环 (直径4 mm)、小塑料碗 (直径2.2 cm, 高2.5 mm)、胶带 (Darapore, 3M公司生产)、尼龙刮菌棒、聚乙二醇单辛基苯基醚 (曲拉通X-100; Triton-X 100) 500 mL、外用抗生素软膏、玻璃弯棒、皮肤消毒剂等。

5.1.6.3 试验步骤

5.1.6.3.1 调整阶段

试验开始前7d至14d, 受试者使用不含抗(抑)菌成分的香皂、洗发水和沐浴液进行日常的洗手、洗澡, 此阶段持续至少7d, 但不超过14d。

5.1.6.3.2 清洗阶段

清洗阶段共3d, 受试者每天用有持续抑菌作用的抑菌洗液类样品清洗一侧前臂, 用对照样品清洗另一侧前臂, 清洗过程如下:

先清洗左臂, 用水温为35℃~37℃的流动水润湿前臂内侧; 取样液3 mL于手心中; 从手腕至臂肘上下涂擦60s; 用流动的水冲洗前臂15s, 不要搓擦; 用纸巾沾干前臂, 不要搓擦; 用不含抑菌成分的对照样品重复以上步骤清洗右臂; 按上面所描述的试验步骤每日清洗前臂3次, 每次间隔至少1h, 在最后一次清洗之后, 需记录好时间, 在12h之后, 进行滞留效果检测。在第9次清洗前臂以后, 受试者不能洗澡、淋浴或洗净前臂, 直到试验结束。

5.1.6.3.3 试验阶段

最后一次清洗后的12h或24h, 将在受试者每只前臂上划出一个试验区, 对试验区进行接种、封包和回收存活细菌, 具体步骤如下:

将金黄色葡萄球菌(ATCC 27217)连续转种3代, 取第3代培养物接种于胰蛋白大豆肉汤培养基(TSB)中, 在36℃±1℃的条件下培养20h±2h。然后用TSB适当稀释菌悬液, 使菌悬液浓度约为10⁸ CFU/mL~10⁹ CFU/mL。

接种: 在受试者的每只前臂中间部位(不要在手腕和肘褶皱处), 用带有印墨直径为3.00 cm的玻璃量筒扣在皮肤上, 划分出一个试验区。使用加样器取10 μL上述菌悬液, 接种于前臂试验区(菌落数为10⁶ CFU/试验区~10⁷ CFU/试验区), 用一次性接种环, 把接种物涂成一圆形, 使其与试验区边缘应有4 mm~5 mm的距离。

封包: 细菌接种后立即用小塑料碗扣于染菌区上面, 再用胶带将小塑料碗固定在皮肤上, 记录封包的时间。

回收存活细菌: 接种后2h±5min 对前臂上接种的区域进行取样。将金属筒放置于试验区中间部位, 不要接触到盖有印墨的边缘。将1 mL含0.1% Triton-X 100的0.075 mol/L磷酸盐缓冲液吸移至金属筒内, 用尼龙刮菌棒刮洗金属筒罩住区域内的皮肤60s, 将筒内液体吸移至试管内, 再加1 mL含0.1% Triton X-100的0.075 mol/L磷酸盐缓冲液, 对该区域内的皮肤进行第二次刮洗30s, 将第二次擦洗的液体, 注入含第一次刮洗液体的试管中。

实验区试验后的消毒处理: 对抑菌样品组清洗后的实验区采样之后, 需用70%的酒精对实验区进行消毒。然后对无抑菌成分的对照组清洗后的实验区以同样方法进行采样、消毒。实验结束后, 用皮肤消毒剂对两只前臂进行消毒处理, 处理后清水冲洗, 擦干, 再涂少量的抗生素软膏。

接种与培养: 对每一个取样进行接种, 以0.0375 mol/L磷酸盐缓冲液对样品进行10倍系列稀释, 选适当稀释度取0.1 mL接种于2个含5%羊血的TSA平板表面, 用玻璃弯棒涂匀, 在36℃±1℃的培养箱中培养48h±4h, 计数菌落数。

以试验同批次的稀释液、培养基等分别设阴性对照。

5.1.6.4 抑菌率的计算

$$X = \frac{A-B}{A} \times 100\% \dots\dots\dots (4)$$

式中：

X —抑菌率%

A —对照平均菌落数，单位为 CFU/试验区

B —试验平均菌落数，单位为 CFU/试验区

5.1.6.5 判定标准

各次试验阴性对照菌无菌生长。

实验不得少于16人次，抑菌率均 $\geq 50\%$ ，可判定该产品在规定的时间内有滞留抑菌作用。

5.2 抗菌效果

5.2.1 悬液定量杀菌试验

5.2.1.1 适用范围

适用于液体抗菌产品（如液体抗菌液、抗菌喷雾剂等）对微生物抗菌效果的测定。

5.2.1.2 试剂、培养基及器材

中和剂(用PBS配制)，其它见5.1.1.2。

5.2.1.3 菌悬液配制

取试验菌24h新鲜斜面培养物用PBS洗下，用PBS稀释至约 5.0×10^5 CFU/mL~ 4.5×10^6 CFU/mL菌悬液备用。

5.2.1.4 中和剂鉴定试验

5.2.1.4.1 分组

第1组：5.0 mL中和剂 + 0.1 mL菌悬液 → 培养

第2组：（0.5 mL抗菌剂 + 4.5 mL中和剂）+ 0.1 mL菌悬液 → 培养

第3组：5.0 mL稀释液 + 0.1 mL菌悬液 → 培养

第4组：稀释液 + 中和剂 + 培养基 → 培养

5.2.1.4.2 步骤

根据试验分组，准备试管和平皿，进行编号。

第1组：取5.0 mL中和剂，置 $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 水浴中10min后，加入0.1 mL试验菌悬液，混匀，作用10min，用中和剂做10倍系列稀释，选适宜稀释度分别吸取1.0 mL接种于2个平皿中，做活菌培养计数。

第2组：取4.5 mL中和剂于试管内，加入0.5 mL抗菌剂，混匀，置 $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 水浴中10min制成中和产物，加入0.1 mL试验菌悬液，混匀，作用10min，用中和产物做10倍系列稀释，选适宜稀释度分别吸取1.0 mL接种于2个平皿中，做活菌培养计数。

第3组：取5.0 mL PBS，置20℃±1℃水浴中10min，加入0.1 mL试验菌悬液，混匀，作用10min，用PBS做10倍系列稀释，选适宜稀释度分别吸取1.0 mL接种2个平皿，做活菌培养计数。

第4组：分别吸取稀释液（PBS）、中和剂各1.0 mL于同一无菌平皿内，倒入上述试验同批次的培养基15 mL~20 mL，作为阴性对照组培养观察。

5.2.1.4.3 结果判定

第1、2、3组有相似量试验菌生长，且菌量在 1.0×10^4 CFU/mL~ 9.0×10^4 CFU/mL；计算组间菌落数误差率，其组间菌落数误差率应不超过15%；第4组无菌生长，否则，说明试剂有污染，应更换无污染试剂重新进行试验。

试验重复3次，每次试验均应符合以上要求。

5.2.1.5 试验步骤

取无菌试管，先加入5.0 mL抗菌剂（说明书规定的使用浓度），置20℃±1℃水浴中5min后，再加入0.1 mL试验菌悬液，迅速混匀并立即计时。

待试验菌与抗菌剂相互作用至各预定时间（以说明书规定时间为T，时间分别为0.5T，T，1.5T），分别吸取0.5 mL试验菌与抗菌剂混合液加于4.5 mL中和剂中，混匀。

各管试验菌与抗菌剂混合液经中和剂作用10min后，分别吸取1.0 mL样液，按活菌培养计数方法测定存活菌数，每管样液接种2个平皿。如平板上生长的菌落数较多时，可用PBS进行10倍系列稀释后，再进行活菌培养计数。

同时用PBS代替消毒液，进行平行试验，作为阳性对照。阳性对照回收菌落数在 1.0×10^4 CFU/mL~ 9.0×10^4 CFU/mL。取同批次稀释液、中和剂、培养基作阴性对照。

所有试验样本和对照样本均在36℃±1℃培养，对细菌繁殖体培养48h观察最终结果；对白色念珠菌需培养72h观察最终结果。试验重复3次，计算杀菌率。

5.2.1.6 杀菌率计算

$$X = \frac{A - B}{A} \times 100\% \dots\dots\dots (5)$$

式中：

X —杀菌率，%；

A —阳性对照组回收菌量，单位为 CFU/mL；

B —试验组回收菌量，单位为 CFU/mL。

5.2.1.7 结果判定

说明书规定时间的杀菌率 $\geq 90\%$ ，判有抗菌作用；说明书规定时间的杀菌率 $\geq 99\%$ ，判为较强抗菌作用。

5.2.2 载体浸泡定量杀菌试验

5.2.2.1 适用范围

适用于粘稠状（半固体）抗菌产品如抗菌洗手液、抗菌沐浴露、抗菌凝胶、膏状抗菌产品等对微生物抗菌效果的鉴定。

5.2.2.2 试剂、培养基及器材

中和剂（PBS配制），其它见5.1.2.2。

5.2.2.3 染菌载体制备

取试验菌24h新鲜斜面培养物用PBS洗下，用PBS稀释至约 5×10^6 CFU/mL~ 5×10^7 CFU/mL制成菌悬液备用。用微量移液器滴染10 μ l菌悬液于灭菌载体上， $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 烘干或室温晾干备用。

5.2.2.4 中和剂鉴定试验

5.2.2.4.1 试验分组

第1组：5.0 mL中和剂 + 染菌载体 → 培养

第2组：（含抗菌剂的载体 + 5.0 mL中和剂）+染菌载体→ 培养

第3组：5.0 mL稀释液 +染菌载体→ 培养

第4组：稀释液 + 中和剂 + 培养基 → 培养

5.2.2.4.2 试验步骤

根据试验分组，准备试管和平皿，依次进行编号。

第1组：取5.0 mL中和剂于无菌平皿中，置 $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 水浴5min，加入1片染菌载体，作用10min，取出菌片放入5.0 mL中和剂试管内，作用10min后，置涡旋振荡器上振荡1min或在手掌上用力振打80次，将试验菌洗下，用中和剂做10倍系列稀释后，选择适宜稀释度，分别吸取1.0 mL接种于2个平皿中，做活菌培养计数。

第2组：取5.0 mL中和剂于无菌平皿内，加入1片沾有抗菌样本的载体，混匀，置 $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 水浴作用10min制成中和产物。再用无菌镊子取1片染菌载体，浸于中和产物中作用10min后，用无菌镊子取出染菌载体移入含5.0 mL中和产物试管中，作用10min，振荡，将试验菌洗下，用中和产物做10倍系列稀释，选适宜稀释度分别吸取1.0 mL接种于2个平皿中，做活菌培养计数。

第3组：取5.0 mL PBS于无菌平皿中，置 $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 水浴5min，加入1片染菌载体，作用10min，取出菌片放入5.0 mL PBS试管内，作用10min后，振荡，将试验菌洗下，用PBS做10倍系列稀释，选适宜稀释度分别吸取1.0 mL接种于2个平皿中，做活菌培养计数。

第4组：分别吸取稀释液（PBS）与中和剂各1.0 mL于同一无菌平皿内，倒入同批次的培养基15~20 mL，培养观察。

5.2.2.4.3 结果判定

第1、2和3组有相似量试验菌生长，且菌量在 1.0×10^4 CFU/片~ 9.0×10^4 CFU/片。计算组间菌落数误差率，其组间菌落数误差率应不超过15%。第4组无菌生长，否则，说明试剂有污染，应更换无污染试剂重新进行试验。试验重复3次，每次试验均应符合以上要求。

5.2.2.5 试验步骤

按5 g/片的量称取抗菌样品于无菌平皿内，置 $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 水浴5min，用无菌镊子取染菌载体，使载体完全浸没于抗菌样品中，立即计时。

待染菌载体与抗菌剂相互作用至各预定时间（以说明书规定时间为T，时间分别为0.5T，T，1.5T），分别取染菌载体加入5.0 mL中和剂试管中，混匀。

经中和剂作用10min后，振荡，将试验菌洗下，分别吸取1.0 mL样液，按活菌培养计数方法测定存活菌数，每管样液接种2个平皿。如平板上生长的菌落数较多时，可用PBS进行系列10倍稀释后，再进行活菌培养计数。

取与试验样品同质材料不含抗菌成分的对照样品代替抗菌样品浸泡2片染菌载体，进行平行试验，作为阳性对照。阳性对照回收菌量为 1.0×10^4 CFU/片 $\sim 9.0 \times 10^4$ CFU/片。取同批次稀释液、中和剂、培养基作阴性对照。

所有试验样本和对照样本均在 $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 培养，细菌繁殖体培养48h观察结果；白色念珠菌培养72h观察结果。试验重复3次，计算杀菌率。

5.2.2.6 杀菌率计算

$$X = \frac{A-B}{A} \times 100\% \dots\dots\dots (6)$$

式中：

X —杀菌率，%；

A —对照样品的回收菌量，单位为 CFU/片；

B —试验样本回收菌量，单位为 CFU/片。

5.2.2.7 结果判定

说明书规定时间的杀菌率 $\geq 90\%$ ，判有抗菌作用；说明书规定时间的杀菌率 $\geq 99\%$ ，判有较强抗菌作用。

5.2.3 载体杀菌试验

5.2.3.1 适用范围

适用于添加有杀菌剂的卫生湿巾或可溶性抗菌物质的载体类产品的抗菌性能效果的鉴定。

5.2.3.2 试剂、培养基及器材

中和剂（PBS配制），其它见5.1.1.2

5.2.3.3 菌悬液配制及样片制备

取试验菌24h新鲜斜面培养物用PBS洗下，用PBS稀释至 1.0×10^5 CFU/mL $\sim 9.0 \times 10^5$ CFU/mL，制成菌悬液备用。

用无菌剪刀将抗菌产品和材质相同但不含抗菌成分的对照样品分别剪成20 mm \times 30 mm样片备用。试验时滴加0.1 mL菌悬液。对照样片染菌前需经 121°C 15min灭菌处理。

5.2.3.4 中和剂鉴定试验

5.2.3.4.1 试验分组

第1组：5.0 mL中和剂 + 染菌对照样片 \rightarrow 培养

第2组：（5.0 mL 中和剂 + 抗菌样片）+ 染菌对照样片 \rightarrow 培养

第3组：5.0 mL稀释液 + 染菌对照样片 \rightarrow 培养

第4组：稀释液 + 中和剂 + 培养基 \rightarrow 培养

5.2.3.4.2 试验步骤

根据试验分组，准备试管和平皿，依次进行编号。

第1组：取5.0 mL中和剂于无菌试管内，置 $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 水浴5min，用无菌镊子取1片染菌对照样片加入试管内，作用10min，振荡将试验菌洗下，用中和剂做10倍系列稀释后选择适宜稀释度分别吸取1.0 mL接种于2个平皿中，做活菌培养计数。

第2组：取5.0 mL中和剂于无菌试管内，用无菌镊子取1片抗菌样片加入试管内，振荡混匀置 $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 水浴作用10min制成中和产物，再夹入1片染菌对照样片，作用10min，振荡将试验菌洗下，用中和产物做10倍系列稀释，选择适宜稀释度分别吸取1.0 mL接种2个平皿，做活菌培养计数。

第3组：取5.0 mL PBS于无菌试管内，置 $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 水浴5min，用无菌镊子取1片染菌对照样片加入试管内，作用10min，振荡将试验菌洗下，用PBS做10倍系列稀释后选择适宜稀释度分别吸取1.0 mL接种2个平皿，做活菌培养计数。

第4组：分别吸取稀释液与中和剂各1.0 mL于同一无菌平皿内，倾注同批次的培养基15 mL~20 mL，培养观察。

5.2.3.4.3 结果判定

第1、2和3组有相似量试验菌生长，且菌量在 1.0×10^4 CFU/片~ 9.0×10^4 CFU/片。计算组间菌落数误差率，其组间菌落数误差率应不超过15%。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。

试验重复3次，每次试验均应符合以上要求。

5.2.3.5 试验步骤

取无菌平皿，用无菌镊子取3片试验样片，勿重叠，置 $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 水浴5min，在每一样片上滴加0.1 mL试验用菌悬液，立即计时。

待试验菌与样片相互作用至各预定时间（以说明书规定时间为T，时间分别为0.5T，T，1.5T），分别夹取染菌样片加于5.0 mL中和剂试管中，混匀。

经中和剂作用10min后，振荡将试验菌洗下，分别吸取1.0 mL样液，按活菌培养计数方法测定存活菌数，每管样液接种2个平皿。如平板上生长的菌落数较多时，可10倍系列稀释后，再进行活菌培养计数。

同时用不含杀菌成分，其他成分相同的对照样片2片代替试验样片，进行平行试验，作为阳性对照。阳性对照回收菌落数在 1.0×10^4 CFU/片~ 9.0×10^4 CFU/片。取试验同批次稀释液、中和剂、培养基作阴性对照。

所有试验样本和对照样本均在 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养，细菌繁殖体培养48h、白色念珠菌需培养72h观察最终结果。试验重复3次，计算杀菌率。

5.2.3.6 杀菌率计算

见5.2.2.6。

5.2.3.7 结果判定

说明书规定时间的杀菌率 $\geq 90\%$ ，判有抗菌作用；说明书规定时间的杀菌率 $\geq 99\%$ ，判有较强抗菌作用。

5.2.4 浸渍杀菌试验

5.2.4.1 适用范围

适用于抗菌毛巾、抗菌棉袜、抗菌棉布、抗菌纱布口罩等含有溶出性抗菌材料的抗菌织物对微生物抗菌效果的试验。

5.2.4.2 试剂、培养基及器材

中和剂（PBS配制，针对样品中所含可溶性抗菌成分进行中和剂鉴定试验），其它见5.1.5.2

5.2.4.3 试验步骤

分别取1 mL菌悬液加入2份准备好的锥形瓶内试样和1份对照织物上，确保其均匀分布，且锥形瓶中不留多余液，封好瓶口，以防蒸发，造成细菌死亡。

分别在一个盛有已接种菌悬液的试样和对照织物的锥形瓶中加入100 mL中和剂，置涡旋振荡器上振荡1min洗涤细菌，取1.0 mL做10倍系列稀释，选适当稀释度以倾注法接种平皿，作为“0”接触时间样本和对照织物上的细菌数。

将另一个装有已接种菌悬液试样的锥形瓶于36℃±1℃培养20h±2h，加入100 mL中和剂，置涡旋振荡器上振荡1min洗涤细菌，取1.0 mL做10倍系列稀释，选适当稀释度以倾注法接种平皿，作为试验组。

阴性对照组：试样不接种菌悬液，在“0”接触时间加入100 mL中和剂，置涡旋振荡器上振荡1min取样，接种平皿。

阳性对照组：另取1个装有对照织物的锥形烧瓶，接种1 mL菌悬液后，在36℃±1℃培养20 h±2h，加入100 mL PBS，置涡旋振荡器上振荡1.0min洗涤细菌，取1.0 mL做10倍系列稀释，选适当稀释度以倾注法接种平皿。

将阴性和阳性对照样本与试验组样本一并发36℃±1℃培养48h，计数菌落数。试验重复3次。

5.2.4.4 杀菌率的计算

$$X = \frac{B \text{ 或 } C \text{ 或 } [(B + C) / 2] - A}{B \text{ 或 } C \text{ 或 } [(B + C) / 2]} \times 100\% \dots\dots\dots (7)$$

式中：

X—杀菌率，%；

A—试验组试样上的细菌数，CFU/mL；

B—“0”接触时间试样上的细菌数，CFU/mL；

C—“0”接触时间对照织物上的细菌数，CFU/mL；

如果“*B*”和“*C*”差别较大时，取较大值；如果“*B*”和“*C*”差别不大时，取平均值。

5.2.4.5 结果判定

“0”接触时间对照织物的平均菌落数应在 1.0×10^3 CFU/mL~ 5.0×10^3 CFU/mL。

阴性对照应无菌生长，阳性对照菌数比0接触时间的菌数明显增加。

各次试验的杀菌率均≥90%，即可认定该样品具有抗菌作用；杀菌率≥99%，判有较强抗菌作用。

5.2.5 振荡烧瓶试验

5.2.5.1 适用范围

适用于添加有非溶出性抗菌物质的抗菌产品对微生物抗菌效果的鉴定。

注1：在进行振荡烧瓶试验前，需要鉴定其抗菌成分是否可溶出，如果有溶出性抗菌材料，参照可溶出抗菌材料检测，无溶出性抗菌材料，可选用振荡烧瓶法进行。

注2：非溶出性抗菌材料的鉴定：将样品置于无菌蒸馏水浸泡 24h，取浸泡液参照 5.1.1 检验是否有抑菌效果，或将样品裁成直径 5 mm 圆片参照 5.1.4 检验是否有抑菌环。若无抑菌效果，说明样品属非溶出性抗菌材料，进行振荡烧瓶试验。

5.2.5.2 试剂、培养基及器材

摇床，天平，其它见5.1.1.2

5.2.5.3 试验步骤

5.2.5.3.1 对于抗菌无纺布口罩、卫生巾、卫生护垫、尿布、尿不湿、无纺布一次性内裤等产品，对微生物抑菌效果的试验方法参照 GB15979 进行。

结果判定：不加样片组的菌落数在 1.0×10^4 CFU/mL \sim 9.0×10^4 CFU/mL，且样品振荡前后平均菌落数差值在10%以内，试验有效；被试样片组抑菌率与对照样片组抑菌率的差值 \geq 26%，判产品具有抗菌作用。

5.2.5.3.2 对于抗菌毛巾、抗菌棉袜、抗菌棉布、抗菌纱布口罩等含非溶出性抗菌材料的针织类抗菌织物对微生物抗菌效果按照 FZ/T73023 标准进行检测和评价。

5.2.6 贴膜试验

5.2.6.1 适用范围

适用于PE抗菌底模、PE打孔膜及PE抗菌包装袋、抗菌塑料、抗菌地板、抗菌瓷砖等产品抗菌效果测定。通过将细菌污染于样品表面，然后用塑料薄膜覆盖，使细菌与样品表面充分接触，以测定其抗菌效果。

5.2.6.2 试剂、培养基及试验器材

5.2.6.2.1 试验菌株

金黄色葡萄球菌（ATCC 6538）、大肠杆菌（8099）、白色念珠菌（ATCC10231），也可根据抗菌用品特定用途选用其他菌株。

5.2.6.2.2 试剂

pH7.2 \sim 7.4 的0.03 mol/L PBS，营养琼脂培养基，营养肉汤培养基，沙氏琼脂培养基，沙氏液体培养基。

5.2.6.2.3 试验器材

薄膜为不影响细菌生长和不吸水的材料，厚度不规定，使用面应有较好的粘合性，边长为40 mm \pm 2 mm的正方形；无菌塑料袋、样片：将试样及对照试样（与试样同质不含抗菌组分）分别制成边长为50 mm \pm 2 mm的正方形，其中抗菌样片3个，对照样片6个。

5.2.6.3 实验步骤

将试验菌24h新鲜斜面培养物用PBS洗下制成菌悬液。将菌悬液用1/500的营养肉汤稀释成 2.5×10^5 CFU/mL \sim 1.0×10^6 CFU/mL试验用菌悬液。

将样片试验面朝上放于无菌平皿中，取0.4 mL 菌悬液滴染于样片中央，涂匀。薄膜覆盖，小心触压薄膜，使菌液均匀散开，以免菌液溢出薄膜外。盖上平皿盖。同时取对照样片放于无菌平皿中，取0.4 mL菌悬液滴染于样片中央，涂匀。按试验样片方法用薄膜覆盖，盖上平皿盖。

将装有接种过菌液的试验样片和对照样片的平皿（3个抗菌样片和3个对照样片），置 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度不低于90%的条件下培养24h。

以无菌操作方式用镊子将覆盖膜和样片放入无菌塑料袋中，然后加入10 mL肉汤培养液，用手充分揉搓袋中的样片和覆盖薄膜，将细菌洗下。

吸取1 mL洗下的菌液，取适当稀释度接种2个平皿，加入15 mL~20 mL营养琼脂，待琼脂凝固后，翻转平皿使底向上，置 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养48h。

将另3个对照样片“0”时间接种菌液后，立即用镊子将覆盖膜和样片放入塑料袋中，洗脱和接种方法与试验样片相同；以试验用同批次稀释液接种培养基作为阴性对照，试验重复3次。

5.2.6.4 存活菌数的计算

$$N = C \times D \times V \dots\dots\dots (8)$$

式中：

N —样本上的活菌数，单位为 CFU/样本；

C —2个平板的平均菌落数，单位为 CFU/样本；

D —稀释倍数；

V —洗脱用肉汤培养基的体积数，单位为 mL。

5.2.6.5 结果的计算与判定

5.2.6.5.1 试验成立条件

各次试验阴性对照均无菌生长；对照样片接种后直接求出活菌数的对数值应：

$$(L_{\text{最大值}} - L_{\text{最小值}}) \div L_{\text{平均值}} \leq 0.3 \dots\dots\dots (9)$$

式中：

$L_{\text{最大值}}$ —最大活菌数的对数值；

$L_{\text{最小值}}$ —最小活菌数的对数值；

$L_{\text{平均值}}$ —平均活菌数的对数值；

对照样片“0”时间接种后的活菌数平均值不少于 1.0×10^5 CFU/样片；覆盖了薄膜的对照样片培养24h后的活菌数不少于 1.0×10^4 CFU/样片。

5.2.6.5.2 抗菌活性值的计算

$$R = \lg(B/A) - \lg(C/A) = \lg(B/C) \dots\dots\dots (10)$$

式中：

R —抗菌活性值；

A —对照样片“0”时间接种后的活菌数的平均值，单位为 CFU/样片；

B —对照样片在接种后培养24h的活菌数的平均值，单位为 CFU/样片；

C —抗菌样片在接种后培养24h的活菌数的平均值，单位为 CFU/样片。

5.2.6.5.3 结果判定

各次试验抗菌活性值均 ≥ 1.0 ，可判定该试样具有抗菌作用；各次试验抗菌活性值均 ≥ 2.0 ，可判定该试样具有较强抗菌作用。

5.2.7 持续抗菌试验

5.2.7.1 适用范围

适用于具有长效抗菌作用产品抗菌效果的鉴定。

5.2.7.2 试剂、培养基及器材

试验菌株：金黄色葡萄球菌(ATCC6538)、大肠杆菌(8099)、黑曲霉菌(ATCC16404)等

载体：布片、玻片、不锈钢片等

试剂：稀释液（含0.01%吐温80的0.03mol/L的PBS）、中和剂（PBS配制）、营养琼脂、麦芽浸膏琼脂等。

5.2.7.3 试验步骤

5.2.7.3.1 长效抗菌剂样片的制备：

根据长效抗菌剂所用载体，如木板、金属板、塑料板等裁成50 mm \times 50 mm，制备抗菌样片。按照抗菌剂涂抹要求，将抗菌剂涂布于样片表面，室温干燥备用，作为实验组；未经任何处理的样片（经压力蒸汽灭菌处理）作为对照组；两组样片在室温下存放于实验室。

5.2.7.3.2 中和剂鉴定试验

以长效抗菌剂进行中和剂鉴定试验，方法见 5.2.1.4。

5.2.7.3.3 长效抗菌实验步骤

实验室试验：两组样片于室温存放至长效抗菌剂说明书规定的持续作用时间（如7d，15d和30d等），后，取出实验组和对照组进行试验。将24h新鲜培养的菌悬液染到载体上，实验组染菌载体作用至说明书规定时间后（如2.5min、5min、10min、20min等）投入中和剂中，混匀后稀释接种；同时用对照组样片染菌进行平行试验，对照组染菌载体在相同时间投入稀释液中，混匀后稀释接种。细菌繁殖体36 \pm 1 $^{\circ}$ C培养48h、黑曲霉菌30 \pm 1 $^{\circ}$ C培养72h观察最终结果，对照载体染菌后的回收菌量在1.0 \times 10⁴ CFU/片 \sim 9.0 \times 10⁴ CFU/片。取试验同批次稀释液、中和剂、培养基作阴性对照。试验重复3次，计算杀菌率。

现场实验：选择病房或其他公共场所表面作为试验现场，选择相似场所一组作为对照组，一组作为实验组。对照组不做任何处理，试验组喷涂抗菌剂，对照组以常规方式清洁消毒，实验组喷涂抗菌剂后，日常仅清水擦拭，至规定时间（长效时间如7d，15d、30d）后进行采样。对照组用无菌棉签沾稀释液采样，实验组用无菌棉签沾中和剂采样，采样面积为50 cm²，对照组和实验组均为30个样本。所有试验样本和对照样本经适当稀释接种后，36 \pm 1 $^{\circ}$ C培养48h观察结果，计算杀菌率。

5.2.7.4 杀菌率计算

$$X = \frac{A - B}{A} \times 100\% \dots\dots\dots (11)$$

式中：

X—杀菌率，%；

A—对照样品的回收菌量，单位为 CFU/片（或样本）；

B—试验样本回收菌量，单位为 CFU/片（或样本）。

5.2.7.5 结果判定

杀菌率 $\geq 90\%$ ，判在该段时间内具有持续抗菌作用。
