

ICS 11.080.10
C 47

YY

中华人民共和国医药行业标准

YY/T 1495—2016

清洗消毒效果的微生物验证方法

Microbiological test method for demonstrating cleaning and disinfecting efficacy

2016-07-29 发布

2017-06-01 实施



国家食品药品监督管理总局 发布

目 次

前言 III

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 试验材料 1

5 试验用品 2

6 试验菌种的准备 3

7 测试污染物的准备 4

8 染菌载体的准备 4

9 验证清洗消毒效果 5

10 结果评价..... 5

11 屎肠球菌耐热性的确定..... 6

12 生物安全..... 6

附录 A（资料性附录） 培养基和试剂 7

参考文献..... 9

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由国家食品药品监督管理总局提出。

本标准由全国消毒技术与设备标准化技术委员会(SAC/TC 200)归口。

本标准起草单位：国家食品药品监督管理局广州医疗器械质量监督检验中心、山东新华医疗器械股份有限公司、昆山市超声仪器有限公司、倍力曼医疗设备(上海)有限公司。

本标准主要起草人：刘婧红、胡昌明、徐伟雄、屈道银、朱玲燕。



清洗消毒效果的微生物验证方法

1 范围

本标准规定了一种验证清洗消毒效果的微生物试验方法。本标准适用于对外科和麻醉器械等医疗器械进行湿热消毒的清洗消毒器,不适用于采用化学消毒方式且消毒对象不耐热的清洗消毒器。

注:YY/T 0734.1和YY/T 0734.2中规定了验证清洗消毒器的清洁效果和消毒效果的要求和方法。本标准提供了一种可选择的微生物验证方法,但并非验证清洗消毒效果的唯一方法。其他标准提供的方法若证实有效,亦同样适用。

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/T 65 开槽圆柱头螺钉

GB 8599 大型蒸汽灭菌器技术要求 自动控制型

YY/T 0646 小型蒸汽灭菌器 自动控制型

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

标准菌株 type culture strain/reference strain

由国内或国外菌种保藏机构提供的、遗传学特性得到确认和保证并可追溯的菌株。

3.2

标准储备菌株 stocking culture strain/reference stocks

由标准菌株经过复苏并在适宜的培养基中生长后得到的培养物。

3.3

工作菌株 subculture strain/working cultures

由标准储备菌株经传代得到的培养物。

3.4

染菌载体 carrier covered by test microorganism

接种了试验微生物的支持物。

4 试验材料

4.1 染菌载体

——不锈钢螺钉,规格为M6×20 mm,应符合GB/T 65的要求;

——橡胶软管,内径:(6±1)mm,管壁厚度:(2±1)mm,无热原,冷轧。

4.2 测试污染物

- 去纤维蛋白羊血(参照制造商说明);
- 小麦泥;
- 蛋黄液。

5 试验用品

5.1 试验设备

应包括但不仅限于以下设备:

- a) 蒸汽灭菌器,符合 GB 8599 或 YY/T 0646 的要求;
- b) 恒温培养箱;温度恒定在 $(36\pm 1)^{\circ}\text{C}$;
- c) 恒温水浴箱/水浴槽;
- d) 漩涡式振荡器/漩涡混合器;
- e) 集热式磁力搅拌器;
- f) 纯水系统;
- g) 电子加热板;
- h) 微量移液器;10 μL 、20 μL 、100 μL 、200 μL 、1 000 μL 和配套一次性塑料吸头;
- i) 生物光学显微镜;
- j) 玻璃干燥皿;干燥剂为变色硅胶或无水氯化钙;
- k) 冰箱;温度能保持在 $2^{\circ}\text{C}\sim 10^{\circ}\text{C}$;
- l) pH 计;25 $^{\circ}\text{C}$ 时标示 pH 值精确至 0.01 pH 单位;
- m) 电子天平;分辨率 0.001 g;
- n) 秒表;
- o) 超声波清洗器;
- p) 细菌浊度计。

5.2 试验器具

应包括但不仅限于以下器具:

- a) 无菌锥形瓶;500 mL、250 mL 和 150 mL;
- b) 无菌培养皿;玻璃或聚苯乙烯制,直径为 90 mm~100 mm;
- c) 无菌试管;约 20 mm $\times$ 250 mm;
- d) 量筒;500 mL、250 mL 和 100 mL;
- e) 接种环;
- f) 酒精灯;
- g) 玻棒;
- h) 载玻片;
- i) 试管架。

5.3 培养基和试剂

培养基和试剂如下:

- a) 营养肉汤培养基;
- b) 营养琼脂培养基;

- c) 胰蛋白胨-大豆肉汤培养基；
- d) 胰蛋白胨-大豆琼脂培养基；
- e) 0.03 mol/L 磷酸盐缓冲液；
- f) 革兰染色液。

注：制备方法参见附录 A。

6 试验菌种的准备

6.1 试验菌种

屎肠球菌 [*Enterococcus faecium* (ATCC 6057)]。

6.2 菌种复苏

取标准菌株冻干管，在无菌操作下打开，加入适量营养肉汤培养基，轻柔吹吸数次，使菌种融化分散。取含 5.0 mL~10.0 mL 营养肉汤培养基试管，滴入少许菌种悬液，置 $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ 恒温培养箱内培养 18 h~24 h，即为标准储备菌株。必要时，实验室应对标准储备菌株的特性和纯度进行确认。

注：标准储备菌株的保存方法可参考《中华人民共和国药典》(2010 年版)二部。

6.3 菌种分离

用接种环取上述第一代培养物，接种于营养琼脂培养基平板上，置 $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ 恒温培养箱内培养 18 h~24 h。

6.4 菌种纯化

挑取上述第二代培养物中的典型菌落，接种于营养琼脂培养基斜面试管内，置 $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ 恒温培养箱内培养 18 h~24 h，即为第三代培养物。

6.5 菌种保存及转种

将上述斜面试管贮存于冰箱内 4°C ~ 8°C ，作为工作菌株，保存期不超过一个月，每个月应传代一次，传代次数需严格控制，不得超过 5 代，以防止过度传代增加菌种变异的风险。必要时，实验室应对工作菌株的特性和纯度进行确认。

6.6 菌悬液制备

用接种环挑取工作菌株，划线接种在胰蛋白胨-大豆琼脂(TSA)培养基斜面上，置 $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ 恒温培养箱内培养 18 h~24 h；

用 5.0 mL 吸管吸取 3.0 mL~5.0 mL 的 0.03 mol/L 磷酸盐缓冲液，加入上述新鲜培养物试管中，反复吹吸，洗下菌苔。将洗下的菌液移至另一试管中，用旋涡振荡器混匀后，用 0.03 mol/L 磷酸盐缓冲液稀释至所需浓度。

初步制成的菌悬液，先用细菌浓度比浊测定法粗略测其含菌浓度，然后以生理盐水稀释至所需使用的浓度。

如需制备 100 mL 测试指示物，至少准备 12 支斜面培养物试管。

6.7 菌种标识

对使用的菌种应标注如下信息：

- a) 菌种名称、标准号和批号；

- b) 接种日期;
- c) 传代数;
- d) 菌种生长的培养基和培养条件;
- e) 菌种保藏的位置和条件;
- f) 其他需要的信息。

7 测试污染物的准备

7.1 血液测试污染物

无菌条件下,将适量菌悬液(6.5)与无菌去纤维蛋白羊血置于无菌锥形瓶中充分混匀,使血液测试污染物的最终菌浓度 $>10^8$ CFU/mL。染菌 80 个~100 个载体大约需要 50 mL 血液。宜现配现用。

7.2 小麦泥测试污染物

7.2.1 制作

将 10 g 脱脂奶粉加入 100 mL 饮用水中,充分搅拌使奶粉溶解,加入 5 g 细砂糖和 4 g 黄油,加热至滚沸,再加入 4 g 粗粒小麦粉(或杜兰小麦粉),一边搅拌一边继续加热 20 min。完成上述操作后,将制作好的小麦泥置于锥形瓶中,在 121 °C 下蒸汽灭菌 15 min。

7.2.2 染菌

无菌条件下,将适量菌悬液(6.6)与灭菌冷却后的小麦泥充分混匀,使小麦泥测试污染物的最终菌浓度 $>10^8$ CFU/mL。染菌 80 个~100 个载体大约需要 100 mL 小麦泥。

注:在无菌环境中准备的小麦泥(如超净工作台)及染菌载体,可以保存在不会引起二次污染的冰箱中,温度条件为 4 °C~8 °C,这并不会造成载体上初始浓度的明显改变。

7.3 蛋黄液测试污染物

7.3.1 制作

先将鸡蛋置于 20 °C 的恒温水浴槽中 30 min,然后用 100 °C 的蒸汽加热 4 min,再置于 20 °C 的水中冷却 5 min。无菌条件下打开鸡蛋,确保蛋清为固态,蛋黄为液状,将蛋黄分离至一无菌锥形瓶中。约 15 个鸡蛋可制得 100 mL 蛋黄。

7.3.2 染菌

无菌条件下,将适量菌悬液(6.6)与无菌蛋黄液充分混匀,使蛋黄液测试污染物的最终菌浓度 $>10^8$ CFU/mL。染菌 80 个~100 个载体大约需要 50 mL 蛋黄液。建议现配现用。

8 染菌载体的准备

8.1 不锈钢螺钉

8.1.1 清洗

染菌前,应彻底清洗螺钉,建议人工清洗和机器清洗相结合。进行人工清洗时可使用软毛刷充分刷洗,以防残留在螺纹间的油污影响试验菌种的生长。机器清洗可以选择待验证的清洗消毒器或实验室专用超声波清洗器,配合使用实验室专用清洁剂。若选择超声清洗器,需使用中性清洁剂。清洁后,

用蒸馏水充分浸泡螺钉,晾干后 121 ℃ 蒸汽灭菌 15 min,取出恢复室温后贮存在干燥皿中备用。螺钉可重复使用数次。

8.1.2 染菌

使用滴染法染菌。将灭菌后的螺钉置于无菌平皿内,每个螺钉用移液器滴加 1 mL 测试污染物 ($>10^9$ CFU/mL),必要时用接种环涂匀整个螺钉表面。将染好菌的螺钉竖立倒置在一无菌烧杯中,室温下放在干燥皿中 24 h,或 (36 ± 1) ℃ 恒温培养箱内 4 h。

细菌繁殖体在载体上干燥的过程中,可引起部分死亡。因此应提高初始菌浓度,以便达到所需的回收菌量。

8.2 橡胶软管

8.2.1 清洗

橡胶软管应以一截 70 mm 长的管段作为单个染菌载体。染菌前应彻底清洗管段,可采用以下两种方式:置于待验证的清洗消毒器中,温度设置为 93 ℃ 进行清洁,或者置于实验室专用清洁剂中煮沸 10 min。清洁后,用蒸馏水充分浸泡管段,晾干后 121 ℃ 蒸汽灭菌 15 min,取出恢复室温后贮存在干燥皿中备用。管段不可重复使用。

8.2.2 染菌

使用滴染法染菌。将灭菌后的橡胶管段置于无菌平皿内,用移液器取 1 mL 测试污染物 ($>10^9$ CFU/mL)滴染于每个管段内壁,必要时用接种环涂抹均匀。将染好菌的管段水平放在一无菌容器中,室温下放在干燥皿中 24 h,或 (36 ± 1) ℃ 恒温培养箱内 4 h。

细菌繁殖体在载体上干燥的过程中,可引起部分死亡。因此应提高初始菌浓度,以便达到所需的回收菌量。

9 验证清洗消毒效果

9.1 用于清洗外科器械的验证要求

用血液、小麦泥和蛋黄液三种测试污染物分别对螺钉进行染菌,每种污染物至少准备 20 个螺钉。可根据清洗消毒器的实际空间大小有所增加。

将染菌螺钉均匀分布在清洗消毒器的腔体内,启动机器,运行一个完整的清洗消毒程序进行验证。

9.2 用于清洗麻醉器械的验证要求

用血液测试污染物分别对螺钉和管段进行染菌,每种载体至少准备 20 个。可根据清洗消毒器的实际空间大小有所增加。

将染菌管段逐一放置在管道冲洗专用的喷淋嘴上,将染菌螺钉均匀分布在清洗消毒器的腔体内,启动机器,运行一个完整的清洗消毒程序进行验证。

10 结果评价

10.1 结果处理

待程序运行结束后,无菌条件下从清洗消毒器中逐一取出染菌载体。首先目测其清洁度,记录未完成清洁的载体在清洗消毒器内的空间方位。然后置于含 10 mL 胰蛋白酶-大豆肉汤培养基(TSB)的试

管中,在 $(36\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱内培养7 d。若试管中培养基澄清,即无菌生长;若试管中培养基变混浊,即有菌生长。当所有试管均无菌生长时,可判为清洗消毒效果合格。

对难以判定的肉汤管,取其中一环悬液划线接种营养琼脂平板,置 $(36\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养。48 h后做染色镜检,观察菌落形态,或进一步做其他鉴定试验,以判断生长者是否为屎肠球菌。若有非试验菌污染,应查找原因重新进行试验。

10.2 确定载体的回收菌数

无菌操作下,将未经清洗消毒处理的同批染菌载体置于10 mL、0.03 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)的试管中,用旋涡振荡器至少振荡20 s,然后按《消毒技术规范》(2002版)2.1.1.3 活菌培养计数技术确定载体上的回收菌数;螺钉的回收菌数应 $>1\times 10^4$ CFU/个,橡胶管段的回收菌数应 $>1\times 10^4$ CFU/个。

10.3 阴性对照

无菌操作下,将未经染菌的同批载体各2个接种于10 mL TSB 培养基的试管中,与同批次未经接种的 TSB 培养基、PBS 同时放入 $(36\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 培养箱中作定性培养,观察有无细菌生长。阴性对照应无菌生长。

11 屎肠球菌耐热性的确定

至少每半年确认一次屎肠球菌的耐热性,并记录确认结果。取20支含10 mL TSB 的试管置于恒温水槽中加热,当温度达到 70°C 时,按无菌操作在每支试管中加入一染菌载体。继续放置10 min后,取出试管,立即冰敷冷却,或用自来水冲池,随后置于 $(36\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养24 h。如果90%的试管有屎肠球菌生长,可认为现存菌种的耐热性满足验证要求。

12 生物安全

12.1 废弃物处置

被屎肠球菌污染过的血液、试剂、载体和容器等物品必须经过高温高压灭菌后方可处理,具体要求可参照 GB 19489—2005 中的相关信息。

12.2 环境消毒

使用实验室专用消毒剂,对可能污染的环境表面应进行擦拭消毒。

附录 A
(资料性附录)
培养基和试剂

A.1 营养肉汤培养基(Nutrient Broth)

蛋白胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
牛肉膏	3.0 g
蒸馏水	1 000 mL
121 ℃压力蒸汽灭菌 20 min, 调节 pH 值至 7.2~7.4。	
用途: 用于屎肠球菌的增菌培养。	

A.2 营养琼脂培养基(Nutrient Agar)

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏粉	3.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL
121 ℃压力蒸汽灭菌 20 min, 调节 pH 值至 7.2~7.4。	
用途: 用于屎肠球菌的分离、纯化。	

A.3 胰蛋白胨-大豆肉汤培养基(Tryptic Soy Broth)

胰蛋白胨	17.0 g
植物蛋白胨	3.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钾	2.5 g
葡萄糖	2.5 g
蒸馏水	1 000 mL
121 ℃压力蒸汽灭菌 20 min, 调节 pH 值至 7.2~7.4。	
用途: 用于染菌载体的定性培养。	

A.4 胰蛋白胨-大豆琼脂培养基(Tryptic Soy Agar)

胰蛋白胨	15.0 g
大豆蛋白胨	5.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

121 ℃压力蒸汽灭菌 20 min,调节 pH 值至 7.2~7.4。
用途:用于试验菌种的培养。

A.5 0.03 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.2±0.2)

磷酸氢二钠(Na_2HPO_4 ,无水)	2.83 g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	1.36 g
蒸馏水	1 000 mL

121 ℃压力蒸汽灭菌 20 min。
用途:用于菌液和试验样本的稀释。

A.6 革兰染色液

A.6.1 第 1 液:结晶紫溶液

结晶紫	1 g
95%乙醇	20 mL
1%草酸铵溶液	80 mL

将结晶紫溶解于乙醇中,然后与草酸铵溶液混合。

A.6.2 第 2 液:卢戈碘液

碘化钾	2 g
碘	1 g
蒸馏水	200 mL

A.6.3 第 3 液:脱色剂

95%乙醇

A.6.4 第 4 液:复染液

A.6.4.1 沙黄复染液

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10 mL
蒸馏水	90 mL

将沙黄溶解于乙醇中,然后用蒸馏水稀释。

A.6.4.2 稀石炭酸复红液

称取碱性复红 10 g,研细,加 95%乙醇 100 mL,放置过夜,滤纸过滤。取该液 10 mL,加 5%石炭酸水溶液 90 mL 混合,即为石炭酸复红液。再取此液 10 mL,加水 90 mL,即为稀石炭酸复红液。

参 考 文 献

- [1] GB 15979—2002 一次性使用卫生用品卫生标准
 - [2] GB 19489—2008 实验室生物安全通用要求
 - [3] GB/T 20944.1—2007 纺织品 抗菌性能的评价 第1部分:琼脂扩散法
 - [4] GB/T 21510—2008 纳米无机材料抗菌性能检测方法
 - [5] GB/T 27405—2008 实验室质量控制规范 食品微生物检测
 - [6] QB/T 2591—2003 抗菌塑料 抗菌性能试验方法和抗菌效果
 - [7] YY/T 0734.1—2009 清洗消毒器 第1部分:通用要求、术语定义和试验
 - [8] YY/T 0734.2—2009 清洗消毒器 第2部分:对外科和麻醉器械等进行湿热消毒的清洗消毒器 要求和试验
 - [9] YY/T 0734.3—2009 清洗消毒器 第3部分:对人体废弃物容器进行湿热消毒的清洗消毒器 要求和试验
 - [10] 《消毒技术规范》(中华人民共和国卫生部出版,2002版)
 - [11] 《中华人民共和国药典》(2010年版)二部
-