

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.12.12

兽用消毒剂申报资料中杀灭微生物效力试验探讨

郭桂芳, 温芳, 刘自扬, 徐倩, 王学伟, 苏富琴, 梁先明*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2020-09-21 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 12-0071-06 [中图分类号] S859.79

[摘要] 概述了兽用化学消毒剂国内外的分类、管理及评审机构。结合国内现阶段兽用消毒剂存在的主要问题, 着重介绍了杀灭微生物效力试验的依据, 兽用消毒剂评价试验中有关中和剂的选择、鉴定的原则及试验要求。对兽用消毒剂定性与定量杀菌试验步骤及评价标准进行了探讨, 为兽用消毒剂研发、申报提供有益的参考。

[关键词] 兽用消毒剂; 评价试验; 研发; 申报

Explore on Germicidal Efficacy Test of Application Data of Veterinary Disinfectants

GUO Gui-fang, WEN Fang, LIU Zi-yang, WANG Xue-wei, XU Qian,

SU Fu-qin, LIANG Xian-ming*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: LIANG Xian-ming, E-mail: lxm990@163.com

Abstract: This article briefly described the classification, management and evaluation agency of veterinary chemical disinfectants at home and abroad. Based on the current problems of domestic veterinary disinfectants, the justification of the antimicrobial efficacy study, the principles of selection, identification and test requirements of neutralizers in the evaluation of veterinary disinfectants were mainly introduced. The procedures of the qualitative and quantitative sterilization tests, and evaluation standards of veterinary disinfectants were discussed, which provided a useful reference for the research, development and registration of veterinary disinfectants.

Key words: veterinary disinfectants; evaluation test; research; declare

从动物的禽流感、猪瘟到人的重症急性呼吸综合征 (SARS)、埃博拉疫情及新型冠状病毒肺炎 (COVID-19), 不断出现的新型传染病和爆发流行, 使得传染病的防治受到前所未有的重视。化学

基金项目: 中国兽医药品监察所“兽药行业公益性重点专项”任务书; 兽药评审技术规范研究项目

作者简介: 郭桂芳, 副研究员, 从事兽药评审工作。

通讯作者: 梁先明。E-mail: lxm990@163.com

消毒剂因其杀菌作用迅速、效果明显、价格低廉、使用方便等特点,使其在控制和预防传染病传播方面得到广泛的应用。因此,化学消毒剂是实现由被动治疗到主动防治的一种重要手段。由于食品动物治疗用药的限制、微生物的耐药性等因素,临床对兽用消毒剂的需求越来越大。因此,探讨兽用化学消毒剂的效力评价试验,对规范和促进环保高效的兽用化学消毒剂开发具有重要指导意义。

1 兽用消毒剂概念、分类及管理类型及评审机构

1.1 兽用消毒剂 系指用于杀灭动物体表、畜舍、运输车辆、兽用手术器械等传播媒介上的微生物使其达到消毒或灭菌的制剂^[1]。消毒(disinfection)系指杀灭或清除传播媒介上病原微生物,使其达到无害化的处理。灭菌(sterilization)系指杀灭或清除传播媒介上一切微生物的处理^[2]。

1.2 消毒剂分类、管理类型及评审机构 在美国,将化学消毒剂分为两种,用于处理低风险医疗器械和医疗器械表面的普通消毒剂(中、低水平消毒剂);用于处理高、中度风险医疗器械的高水平消毒剂。中、低水平消毒剂作为农药—抗菌杀虫剂(Antimicrobial Products)进行管理,评审机构为美国国家环境保护局(EPA),高水平消毒剂作为医疗器械(II)进行管理^[3-5],评审机构为美国食品和药物管理局(FDA),在加拿大,消毒剂按消毒药品(Disinfectant Drugs)管理^[6],评审机构为卫生部—健康产品与食品检验局(Health Products and Food Branch)下属的药物理事会(TPD);在欧洲管理类别为II a 和II b 类,评审机构为第三方认证机构;在澳大利亚管理类别为II b 类^[7],评审机构为卫生和老龄部治疗药物管理局(Department of Health and Ageing Therapeutic Goods Administration);墨西哥和厄瓜多尔(II类)等国家和地区作为医疗器械管理;在中国消毒剂上市审批是由国家卫生和计划生育委员会负责。

依据《兽药管理条例》和《兽药注册办法》,在我国兽用消毒剂是完全按照兽药进行管理^[8-9]。1992 年农业部颁布了《兽用消毒剂鉴定技术规范》,详细介绍了兽用消毒剂对细菌、芽孢、病毒等

微生物作用效果评价的试验方法。其中兽用消毒剂效力评价的试验方法与卫生部颁布的《消毒剂技术规范》(2017 年修订版)基本相同。下面将针对兽用化学消毒剂(简称消毒剂)杀灭微生物的效力试验所必须进行的实验室残留消毒剂(化学因子)的去除试验、定性及定量杀菌试验要求进行探讨。

2 杀灭微生物效力试验的依据

微生物杀灭试验是评价各种用途的消毒剂对微生物的杀灭效果,是对消毒剂的杀菌能力进行验证,《兽药注册办法》规定,所有消毒剂均应进行杀灭微生物效力试验。

2.1 残留消毒剂(化学因子)的去除方法和中和剂的选择 在开展微生物杀灭试验前,必须先按受试微生物的种类分别进行相应的化学中和剂或其它残留消毒剂去除法的鉴定试验,以选出适宜的中和剂。需要说明的是试验前细菌混悬液的制备及菌种的选择至关重要。一般情况下,金黄色葡萄球菌(ATCC 6538)作为细菌繁殖体中化脓菌的代表、绿脓杆菌(ATCC15442)作为感染最常分离的细菌繁殖体的代表;大肠杆菌(8099)作为细菌繁殖体中肠道菌的代表;枯草杆菌黑色变种(ATCC9372)作为细菌芽孢的代表、白色葡萄球菌(8032)作为空气中细菌的代表。在上述规定的菌株基础上,根据消毒剂特定用途或试验特殊需要,还可增选其他菌株。在这里对细菌混悬液的制备不做详细的介绍。

消毒剂杀菌效力评价试验中,消毒剂与靶微生物作用终止后,消毒体系中残留的消毒剂,可能对微生物的生长繁殖具有一定的抑制作用,从而导致对杀菌效果偏高的错误判断,甚至产生假阴性的结果。因此在化学消毒剂的消毒试验中,当达到规定的消毒时间终点时,应立即终止残留消毒剂的继续作用,以便准确检测出消毒体系中残留存活的微生物及其数量。残留消毒剂的去除,可排除残留消毒剂对微生物的抑制,从而使试验获得正确的结果。

2.2 去除残留消毒剂方法的原则要求 可有效去除残留的消毒剂;对微生物无害,不减少微生物应有的回收量;不破坏培养基的营养成份,不影响其透明度;必须按规定方法进行鉴定试验,并认为合

格者方可在相应的消毒试验中使用。

2.3 去除残留消毒剂的方法 化学中和法,又称中和剂法,是指在消毒剂与微生物作用到达规定时间的终点时,取样加于适宜种类和浓度的中和剂中,将残留消毒剂迅速中和,使其不再持续杀灭和抑制微生物的方法^[10]。本方法同时含有稀释作用效果(至少 1:1 稀释,常用 1:10 稀释),是最普遍使用的方法。去除残留消毒剂的方法还有吸附法、连续转种法、稀释法、离心沉淀法或滤膜过滤法^[11]。

2.4 中和剂选择 选择中和剂时,要根据微生物的敏感性来选择,既要考虑微生物对中和剂的耐受能力,同时也要考虑消毒剂有效成分的浓度。中和剂选择试验中应选择适宜浓度的消毒剂。当消毒剂浓度过高时,中和剂无法完全中和,或者在完全中和前残留的消毒剂已经将微生物全部杀灭,无法正确鉴定中和剂;而当消毒剂浓度过低时,则不足以将高浓度消毒剂全部中和。所以,在选择一种合适的中和剂时,要从消毒剂的性质、活性成分组成、试验微生物、消毒试验种类等多方面进行考虑。如含碘消毒剂常用的中和剂硫代硫酸钠,当含量超过 0.5% 时对微生物特别是细菌的生长有明显抑制作用。而复方含碘消毒剂由于含有多种活性物质,单一成分的中和剂可能难以满足要求,需要采用复合中和剂,以中和所有活性物质^[12]。

3 中和剂的鉴定试验

3.1 中和剂的鉴定试验设计原则 通过所设各组试验结果综合分析,应可确定所用中和剂是否对测试消毒剂有良好的中和作用,对试验用细菌及其恢复期培养是否有害或不良影响;在确定用何种中和剂进行鉴定试验有困难时,可对多个中和剂进行初选以确定。所用试剂,培养基及其它材料都应一致;试验中所用消毒剂的浓度应以杀菌试验中使用的最高浓度为准。浓度过低,则不足以显示能否将高浓度消毒剂全部中和;鉴定试验中,消毒后去除残留消毒剂组无菌生长,不能表明中和后细菌是否复苏。此时可适当缩短作用时间再试,但作用时间最短不得少于 30 秒。否则难以控制试验的准确性。若缩短作用时间后仍无菌生长,在排除其他原因的基础

上,可适当下调杀菌试验中消毒剂的浓度,再次进行中和剂鉴定试验;同一消毒剂拟对多种微生物进行杀灭试验时,所用中和剂应按微生物种类分别进行鉴定试验,不得取代。对细菌繁殖体的试验,在大肠杆菌(8099)、金黄色葡萄球菌(ATCC6538)、绿脓杆菌(ATCC15442)中任选其一进行试验即可;对细菌芽孢,以枯草杆菌黑色变种(ATCC9372)芽孢进行。当用其特定微生物进行杀灭试验时,均应以该特定微生物进行中和剂的鉴定试验;鉴定时根据所用杀菌试验方法,使用相应的悬液或载体定量试验。

3.2 中和剂的鉴定试验分组 在进行正式的中和剂的鉴定试验前可进行中和剂的初选试验,选中的中和剂 95% 以上均能通过正式的鉴定试验。如果初选出多种中和剂,则应依次进行正式鉴定试验,选其中效果最好者进行杀菌试验。

以大肠杆菌 8099 和金黄色葡萄球菌 C83707 为指示菌,中和剂拟采用硫代硫酸钠、吐温-80 的营养肉汤,使用前高压灭菌。消毒剂用无菌硬水稀释为一定浓度,稀释液用 0.03 mol/L 的无菌磷酸盐缓冲液,试验一般分六组进行(表 1)。根据试验分组,准备足量试管和平皿,依次进行编号。各组分别用适宜大小的无菌定量吸管按规定程序吸取或添加试剂盒试验样本。

第 1 组:吸取 1.0 mL 试验菌悬液与 4.0 mL 消毒剂置于试管内,旋涡 20 s,混匀,作用至预定时间,吸此样液 0.5 mL 加入含有 4.5 mL 稀释液的试管内,混匀。吸取该最终样液 0.1 mL 涂布于琼脂平皿中,置 37 °C 培养计数。

第 2 组:吸取 1.0 mL 试验菌悬液与 4.0 mL 消毒剂置于试管内,混匀,作用至预定时间,吸此样液 0.5 mL 加入含有 4.5 mL 稀释液的试管内,旋涡 20 s,混匀。作用 10 分钟。吸取该最终样液 0.1 mL 涂布于琼脂平皿中,置 37 °C 培养计数。

第 3 组:吸取 0.1 mL 试验菌悬液与 4.9 mL 中和剂试管内,旋涡 20 s,混匀,作用 10 分钟。吸取该最终样液 0.5 mL,用中和剂做 10 倍系列稀释,分别吸取每个倍数的稀释液 0.1 mL 涂布于琼脂平皿中,置 37 °C 培养计数。

表 1 选择适宜中和剂及其浓度实验方法

试验组别	说明
1. 消毒剂 + 菌悬液→培养	证明消毒剂在试验浓度下是否有杀菌或抑菌作用
2. (消毒剂 + 菌悬液) + 中和剂→培养	证明中和剂能否中和残留消毒剂的抑菌作用
3. 菌悬液 + 中和剂→培养	证明中和剂有无抑菌作用
4. (消毒剂 + 中和剂) + 菌悬液→培养	证明消毒剂与中和剂的反应产物有无抑菌作用
5. 稀释液 + 菌悬液→培养	比对应作用
6. 稀释液 + 中和剂 + 培养基→培养	比对应作用

第 4 组:吸取 0.1 mL 试验菌悬液与 4.9 mL 中和产物溶液(0.4 mL 消毒剂 + 4.5 mL 中和剂,作用 10 min)置试管内,混匀,作用 10 分钟。吸取该最终样液 0.5 mL,用中和剂做 10 倍系列稀释,分别吸取每个倍数的稀释液 0.1 mL 涂布于琼脂平皿中,置 37 ℃ 培养计数。

第 5 组:吸取 0.1 mL 试验菌悬液与 4.9 mL 中和剂试管内,作用 10 分钟。吸取该最终样液 0.5 mL,用稀释液做 10 倍系列稀释,分别吸取每个倍数的稀释液 0.1 mL 涂布于琼脂平皿中,置 37 ℃ 培养计数。

第 6 组:分别取中和剂、稀释液、无菌硬水 0.1 mL 涂布于琼脂平皿中,置 37 ℃ 培养计数。

3.3 评价规定 试验结果符合以下全部条件的,选择的中和剂可判断合格:第 1 组无试验菌,或仅有极少数试验菌菌落生长;第 2 组有较第 1 组为多,但较第 3、4、5(组)为少的试验菌菌落生长,并符合表 2 要求;第 3、4、5(组)有相似量试验菌生长,并在 5×10^5 cfu/mL(片) ~ 5×10^6 cfu/mL(片)之间。其组间菌落数误差率应不超过 15%。第 3、4、5 组间菌落数误差率计算公式如下:组间菌落数误差率 = $\frac{(\text{两组间菌落平均数} - \text{各组菌落平均数})}{3 \times \text{两组间菌落平均数}} \times 100\%$;第 6 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;连续 3 次试验取得合格评价。

表 2 中和剂鉴定试验合格标准对第 1 组与第 2 组菌落数的要求

Tab 2 The requirements of eligibility criteria for the numbers of bacterial colonies in group 1 and group 2 in the identification test of neutralizers	
第 1 组平板平均菌落数	第 2 组平板平均菌落数
0	>5
X(1 ~ 10)	>(X + 5)
Y(> 10)	>(Y + 0.5Y)

3.4 注意事项 试验所分各组均有其特定意义,不得任意删减;严守无菌操作,保持试液和器材的无菌,注意更换吸管,以防止沾染影响试验的准确性;在计算微生物浓度时,须考虑其稀释倍数;试验组序应按本规范所列排列。

4 消毒剂效果鉴定试验

4.1 定性杀菌试验 是测定受消毒剂作用后的样本有无细菌生长的试验方法,用于对消毒剂灭菌效果的鉴定和消毒剂杀灭细菌效果的初步评价。

4.1.1 试验步骤 将制备的菌液进行活菌计数,然后用 0.03 mol/L 的无菌磷酸盐缓冲液稀释,使试验菌液的含菌量为 5×10^5 cfu/mL ~ 5×10^6 cfu/mL。消毒剂用无菌硬水稀释为所需浓度待用。将中号试管 10 支编好号排列于试管架上。第 2 至第 10 的试管中分别加入无菌硬水 2.5 mL。于第 1 管加入稀释并混匀的 5 mL 消毒剂,由第 1 管取 2.5 mL 至第 2 管,旋涡混匀后,再从第 2 管吸 2.5 mL 至第

3 管,以此类推,直至第 9 管,混匀后取出 2.5 mL 弃去,第 10 管不加消毒液作为对照。以每半分钟加 1 管的速度将菌液 2.5 mL 置于每管内,使每管含菌量为 10^6 cfu/mL,旋涡混匀。在室温条件下(20 ℃ 左右)作用 5、10、15、30、60 min,至规定时间后,每管各取 0.5 mL 加入含 4.5 mL 中和剂的试管中旋涡混匀,中和 10 min,再吸取出最终反应液 0.5 mL 加入 4.5 mL 液体培养基试管中。将接种最终反应液的液体培养基置 37 ℃ 培养 24 h,观察细菌生长情况,若发生浑浊即表示有细菌生长。必要时,可移植到固体培养基上,观察菌落形态,或进行涂片染色镜检,以判断生长的是否为试验菌,以排除污染。若肉汤不变浑浊,应继续培养至第七天,若仍不浑浊方可判为无菌生长。

4.1.2 结果判定 以无菌生长管消毒液的最低浓度为最低杀菌有效浓度,以无菌生长管的最短消毒时间为该浓度杀菌最快有效时间。

4.2 定量杀菌试验 在试验室内测定消毒剂杀灭悬液中或载体上细菌繁殖体和细菌芽孢所需剂量,作为制定实用消毒剂量的参考。以杀灭率表示结果,用于对消毒剂杀灭效果的评价。

制备金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、绿脓杆菌和枯草杆菌黑色变种芽孢悬液或菌片。此外,根据消毒药物特定用途或试验特殊需要,准备其他菌种的悬液或菌片。

消毒剂溶液除有特殊规定者外,应使用无菌硬水配制。消毒剂溶液浓度应以所含有有效成份为准。例如,含氯消毒剂以所含有有效氯浓度为准,碘伏以所含有有效碘为准,过氧乙酸以所含过氧乙酸量为准,复方消毒剂浓度以主要杀菌有效成分的量为准。各组消毒剂溶液有效成分浓度的计算,应以菌药混合液中有效成分的最终浓度为准。

4.2.1 试验步骤 将制备的菌液进行活菌计数,然后用 0.03 mol/L 的磷酸盐缓冲液稀释成含菌 $10^6 \sim 10^7$ 个/mL 的试验菌液。消毒剂用无菌硬水稀释至所需浓度。吸取 0.5 mL 试验菌液加到 4.5 mL 待测浓度的消毒剂溶液中。置 20 ℃ 水浴中 5 min。立即吸取上述菌药混合液 0.5 mL,加入 4.5 mL

中和剂试管中旋涡混匀。中和 10 分钟后,取最终反应液 0.1 mL 涂布于琼脂平板,置 37 ℃ 培养计数,进行活菌计数,计算杀菌率和杀菌指数。以 0.03 mol/L 的磷酸盐缓冲液替代消毒液,同时进行上述各步骤,作为对照组。

4.2.2 结果判断 杀菌率的计算:根据活菌计数的结果,计算杀菌率(Pt)。消毒 t 时的杀菌率(Pt) = $[(N_0 - N_t)/N_0] \times 100\%$,式中 N_0 为消毒前或对照组的活菌数。 N_t 为消毒后或实验组的活菌数。杀灭指数的计算:杀灭指数(KI) = N_0/N_t 。

4.2.3 注意事项 在杀菌试验中,每次均应设置阳性对照。试验中所使用的中和剂、稀释液和培养基等,各批次均应进行无菌检查,发现有菌生长,则全部试验需换用未污染试剂或培养基重做。悬液定量杀菌试验时,有机干扰物质一般采用 3% (g/100 mL) 牛血清白蛋白贮存溶液,取 0.5 mL 加入到消毒体系中(稀释 10 倍),进行消毒试验。

4.2.4 判断标准 目的为试验消毒效能,杀菌率应达 99.9% 以上,当低于此指标时,则应提高消毒剂的浓度或延长作用时间。

5 讨论与结论

定量杀菌试验的消毒剂浓度设置是建立在定性杀菌试验的基础上的。由定性杀菌试验结果,可得知将细菌或者芽孢完全杀灭的浓度范围,也就是最低杀菌浓度与其后一个浓度之间。再在这个范围内设置浓度梯度,做定量杀菌试验,将目标浓度确定,准确找到杀菌率在 99.9% 以上的那个最低浓度^[13]。但是在试验过程中发现细菌数量变化对于结果的影响较大,为了保证结果准确性,需进行多次重复试验,并弃去误差率(平板间、稀释度间)超过 10% 的结果,选择可信结果再求其平均数,为最终结果^[14]。

参考文献:

- [1] 梁先明. 兽用消毒剂注册[C]. 农业部兽药评审工作与研讨, 2005:129.
- Liang Xianming. Registration of veterinary disinfectants [C]. Workshop of Veterinary Drug Evaluation Center of Ministry of Ag-

- riculture, 2005;129.
- [2] 中华人民共和国卫生部卫生法制与监督司. 消毒技术规范[S].
Department of health law and supervision, Ministry of Health of the PRC. Technical specification for disinfection[S]. [3] Guidance for industry and FDA reviewers, content and format of pre-market notification [510(k)] submissions for liquid chemical sterilants / high level disinfectants [EB/OL]. 2000
- [4] Memorandum of understanding between the food and drug administration, public health service, department of health and human services and the environmental services and the environmental protection agency, notice regarding matters of mutual responsibility regulation of liquid chemical germicides intended for use on medical devices [EB/OL]. 1994
- [5] The federal insecticide, fungicide, and rodenticide act (FIFRA) [EB/OL]. 2012
- [6] Guidance document disinfectant drugs [EB/OL]. 2014
- [7] Summary of disinfectant regulation [EB. OL]. 2012
- [8] 中华人民共和国国务院令 404 号. 兽药管理条例[S].
Decree No. 404 of the State Council of the people's Republic of China. Regulations on Administration of veterinary drugs[S].
- [9] 中华人民共和国令第 44 号. 兽药注册办法[S].
Decree No. 44 of the State Council of the people's Republic of China. Measures for registration of veterinary drugs[S].
- [10] 中国标准出版社. 消毒技术规范[M]. 2017;18
China Standards Press. Technical specification for disinfection [M]. 2017;18.
- [11] 农业部. 农(牧药)字第 101 号兽用消毒剂鉴定技术规范[Z]. 1992.
Ministry of Agriculture. Technical specification for animal disinfectant disinfection[Z]. 1992.
- [12] 林 凤. 不同中和剂对几种消毒剂的试验效果观察[J]. 预防兽医情报杂志, 2006, 22(2): 241-243.
Lin Feng. Experimental effect of different neutralizers on Several Disinfectants [J]. Journal of Preventive Medicine Information, 2006, 22(2): 241-243.
- [13] Ruano M, El - Attache J, Villegas P. Efficacy comparisons of disinfectants used by the commercial poultry industry[J]. Avian Diseases, 2001, 45(4): 972-977
- [14] Giffel M C, Reumer R R, Vam W F, *et al.* Sporicidal effect of disinfectants on *Bacillus cereus* isolated from the milk processing environment[J]. International Biodeterioration Biodegradation, 1995, 36(3-4): 421-430.

(编辑:陈 希)