



中华人民共和国国家标准

GB 19192—2003
idt ISO/DIS 11980:1996
ISO/DIS 11981:1996

隐形眼镜护理液卫生要求

Hygienic requirement for contact
lens care solution

2003-06-13 发布

2004-02-01 实施



中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

前 言

隐形眼镜护理液的卫生质量直接关系到配戴者的眼睛健康。根据《中华人民共和国传染病防治法》、《中华人民共和国传染病防治法实施办法》和《消毒管理办法》，特制定本标准。

本标准等同采用 ISO/DIS 11981:1996 与 ISO/DIS 11980:1996，并根据国际标准的基本原理、试验方法与评价标准，选择适应我国具体情况的技术要求、试验菌株与培养方法，参照采用 ISO/CD 14729:1996、ISO/CD 14730:1996、ISO/DIS 13212:1996 与 ISO/DIS 14534:1996。

本标准第四章(对茄科镰刀霉菌的消毒效果除外)为强制性，其余各章为推荐性。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准由上海市疾病预防控制中心负责起草，苏州中化药品工业有限公司、北京博士伦眼镜护理产品有限公司、眼力健制药有限公司参加起草。

本标准主要起草人：沈伟、何静芳、仲伟鉴、潘希和、王彩娟、桑蔚、孙伟之。

中华人民共和国国家标准

隐形眼镜护理液卫生要求

Hygienic requirement for contact
lens care solution

GB 19192—2003
idt ISO/DIS 11980:1996
ISO/DIS 11981:1996

1 范围

本标准规定了隐形眼镜(硬性镜和/或软性镜)护理液的定义、技术要求、试验方法、检验规则以及包装、标志与使用说明等要求。

本标准适用于隐形眼镜专用护理液产品。

2 引用标准

下列标准所包含的条文,通过在本标准中引用而构成本标准的条文。本标准出版时,所示版本均为有效。所有标准都会被修订,使用本标准的各方应探讨使用下列标准最新版本的可能性。

GB 15979—2002 一次性使用卫生用品卫生标准

ISO/DIS 11980:1996 光学仪器与光学器材——隐形眼镜及其护理产品——临床研究指导

ISO/DIS 11981:1996 光学仪器与光学器材——隐形眼镜和隐形眼镜护理产品——隐形眼镜及其护理产品物理相容性试验方法

中华人民共和国药典 1995年版二部“澄清度检查法”与“无菌检查法”

中华人民共和国卫生部 《消毒技术规范》(第三版)第一分册《实验技术规范》(1999)“消毒剂毒理学实验技术”

3 定义

本标准采用下列定义。

3.1 隐形眼镜护理液 contact lens care solution

专用于隐形眼镜护理的,具有清洁、消毒、冲洗或保存镜片,中和清洁剂或消毒剂,物理缓解(如润滑)隐形眼镜引起的眼部不适等功能的溶液或可配制成溶液使用的可溶性固态制剂,包括使用时可直接或非直接接触眼球的产品。

隐形眼镜护理液可分单一功能型与多功能型。单一功能型隐形眼镜护理液系仅具有上述一种功能的产品;多功能型隐形眼镜护理液系同时具有清洁、消毒、冲洗、保存四种功能的产品。

3.2 多次量产品 multidose products

最小包装容器内的护理液容量能使用一次以上的产品。

3.3 一次量产品 singledose products

最小包装容器内的护理液容量只能使用一次的产品。

3.4 清洁 cleaning

去除蛋白质、有机物、污物等的处理。

3.5 消毒 disinfection

杀灭或清除病原微生物使其达到无害化的处理。

3.6 中和 neutralisation

消除消毒剂和/或抗微生物剂抑/杀菌活性的处理。

3.7 有效成分 active ingredient

产品中具有清洁、消毒、中和等功能的组分。

3.8 抛弃日期 discard date

多次量产品开封后的最长使用期限。

3.9 有效期 valid date

自生产之日起,未开封的具有清洁、消毒、中和等功能的产品保持其上述功能的最长有效使用期限。

3.10 保质期 guarantee date

自生产之日起,未开封的无上述功能的产品维持其最低有效成分含量的最长使用期限。

4 技术要求

隐形眼镜护理液技术要求应符合表1中的要求。

表1 隐形眼镜护理液技术要求

项目名称	要 求	适 用
理化性能		
外观	澄清液体	液态成品原液与固态成品使用液
pH*	6.5~7.8	直接与眼接触的产品原液或使用液
渗透压(mosm/kg·H ₂ O)*	260~340	直接与眼接触的产品原液或使用液
有效成分含量	在标示含量范围内	所有产品
过氧化氢残留量/(mg/kg·H ₂ O)*	≤30	以过氧化氢为有效成分的产品
与镜片的物理相容性	用护理液处理前后,镜片的物理参数应一致	直接与镜片接触的产品原液或使用液
微生物		
活菌计数/(cfu/g)	≤100	不直接接触眼睛的固态产品
致病菌	不得检出	不直接接触眼睛的固态产品
无菌检查	无菌生长	直接接触眼睛的液态产品
消毒效果〔杀灭率/(%)〕		
大肠杆菌	≥99.90	具有消毒功能的产品
金黄色葡萄球菌	≥99.90	
绿脓杆菌	≥99.90	
白色念珠菌	≥90.00	
茄科镰刀霉菌	≥90.00	
安全性		
急性经口毒性	>5 000 mg/kg	所有产品
致突变试验	无致突变性或遗传毒性	

表 1(完)

项目名称	要 求	适 用
皮肤刺激*	无刺激性	直接与眼接触的产品原液或使用液
眼刺激*	无刺激性	
皮肤变态反应*	极轻	
细胞毒性*	无细胞毒性	
稳定性		
成品稳定性	符合产品标识有效期或保质期	所有产品
开封产品抛弃日期	符合产品标识抛弃日期	多次量产品
临床试验	无不良反应	含有新成分的各种产品;或有效成分与已上市产品浓度不一致的产品
* 有效成分为过氧化氢的护理液,用中和后产物进行测定。		

5 试验方法

随机抽取三个批号的最小容量包装产品进行测试,每个批号至少抽取三件,三分之一用于检测,三分之一必要时复测,三分之一留样。

5.1 理化指标

5.1.1 外观

按中华人民共和国药典(1995年版二部)“澄清度检查法”测试,应符合表1中的相应要求。

5.1.2 pH

取试样 20 mL,在温度(25±1)℃时用已校正的酸度计进行测定,应符合表1中的相应要求。

5.1.3 渗透压

取 0.5 mL 试样,用渗透压计测定。以蒸馏水或已知校正值的溶液做校正,以三次读数的平均值为测定结果,应符合表1中的相应要求。

5.1.4 有效成分含量

按国家标准、中华人民共和国药典、行业标准的顺序选择测定方法。每份试样平均测三次,取其平均值,应符合表1中的相应要求。

5.1.5 过氧化氢残留量

将护理液按说明书规定的方法和最短作用时间进行中和,取中和后样液 5.0 mL 至 150 mL 锥形瓶内,加入 10% 硫酸 5 mL 及蒸馏水 10 mL,以 0.002 mol/L 高锰酸钾标准溶液滴定,稳定摇动,滴定至粉红色并至少保持 15 s 为终点。同时作空白对照。按式(1)计算过氧化氢残留量,应符合表1中的相应要求。

$$\text{H}_2\text{O}_2(\text{mg}/\text{kg} \cdot \text{H}_2\text{O}) = \frac{(V - V_0) \times c \times 170.1}{0.002 \times 50} \dots\dots\dots(1)$$

式中: V——样品消耗 0.002 mol/L 高锰酸钾溶液的体积, mL;

V₀——空白消耗 0.002 mol/L 高锰酸钾溶液的体积, mL;

c——高锰酸钾标准溶液的摩尔浓度。

5.1.6 与镜片的物理相容性

按 ISO/DIS 11981 方法测试,应符合表1中的相应要求。

5.2 微生物指标

5.2.1 固态样品处理

精确称取 2.000 g 试样,放入 20.0 mL 0.03 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)内(如产品中含有抑菌成分,则用中和剂代替 PBS),完全溶解后取样按下述方法进行检测。

5.2.2 活菌计数

取 1.0 mL 样液接种营养琼脂培养基,每管平行接种两个平皿,于 35℃~37℃ 培养 48 h,按式(2)计算平板上平均菌落数,应符合表 1 中的相应要求。

$$\text{活菌计数(cfu/g)} = \text{平板上平均菌落数} \times 10 \dots\dots\dots (2)$$

5.2.3 致病菌

按 GB 15979—1995《一次性使用卫生用品卫生标准》附录 A 中的方法进行金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、大肠杆菌检测,应符合表 1 中的相应要求。

注 1: 本试验用中和剂必须通过附录 D(标准的附录)中规定的悬液定量中和剂鉴定试验。

注 2: 如找不到合适中和剂,可按中华人民共和国药典(1995 年版二部)“无菌检查法”中“薄膜过滤法”处理样液,将薄膜直接接种相应的培养基进行检测。

5.2.4 无菌检查

按中华人民共和国药典(1995 年版二部)“无菌检查法”测试(如产品中含有抑菌成分,须先用薄膜过滤法处理),应符合表 1 中的相应要求。

5.3 消毒效果指标

见附录 A(标准的附录),应符合表 1 中的相应要求。

5.4 安全性指标

5.4.1 急性经口毒性试验、致突变试验、皮肤刺激试验、眼刺激试验、皮肤变态反应试验

按中华人民共和国卫生部《消毒技术规范》(第三版)第一分册《实验技术规范》(1999)“消毒剂毒理学实验技术”测试,应符合表 1 中的相应要求。

5.4.2 细胞毒性试验

见附录 B(标准的附录),应符合表 1 中的相应要求。

5.5 稳定性指标

见附录 C(标准的附录),应符合表 1 中的相应要求。

5.6 临床试验

5.6.1 须进行临床试验的产品:

- 含有新成分的各种护理液:须进行 60 位受试者 3 个月的临床试验;
- 有效成分高于已上市产品浓度的各种护理液:须进行 30 位受试者 1 个月的临床试验;
- 有效成分低于已上市产品浓度的眼内溶液以及具有清洁、消毒或中和作用的护理液:须进行 30 位受试者 1 个月的临床试验。

5.6.2 试验对照:必须设与受试者等量的配对对照。

5.6.3 试验方法:按 ISO/DIS 11980 方法进行,应符合表 1 中的相应要求。

6 检验规则

6.1 出厂检验

出厂检验项目,包括外观、pH、渗透压、有效成分含量、活菌计数、致病菌、无菌检查。

6.2 定期检验

定期检验项目,过氧化氢残留量、消毒效果每半年检验一次;安全性、稳定性每两年检验一次。

6.3 型式检验

型式检验项目,包括本标准技术要求的全部内容。在下列情形之一时,应进行型式检验。

——新产品;

——当原料、工艺、配方有重大改变,可能影响产品性能时;

- 停产六个月以上重新恢复生产时；
- 卫生主管部门提出进行型式检验时。

6.4 致突变试验规定

- 6.4.1 我国首创或根据国内外文献报道首次进行生产的新护理液：必须做三项致突变试验。
- 6.4.2 从国外进口在我国销售、或国外已批准生产现由我国生产的护理液：至少做两项致突变试验（基因水平和染色体水平）。
- 6.4.3 与国内已获准生产的护理液属同一类的产品：至少做一项致突变试验。
- 6.4.4 定期检验与型式检验：至少做一项致突变试验。

7 包装、标志与使用说明

7.1 包装

- 7.1.1 与隐形眼镜护理液直接接触的包装材料：应安全无害，不影响产品在有效期内的卫生质量。
- 7.1.2 隐形眼镜护理产品的运输包装：应能保护产品在运输、贮存过程中不受损坏。

7.2 标志

- 7.2.1 销售包装标志：应用中文标明产品名称、主要有效成分、净含量、生产批号、有效期或保质期、制造商名称与地址、批准文号、执行标准号，以及必要的使用说明与注意事项。进口产品还应标明经销商名称与地址。
- 7.2.2 运输包装标志：应用中文标明产品名称、规格与数量、生产批号、有效期或保质期、制造商名称与地址、批准文号、执行标准号，以及必要的注意事项。进口产品还应标明经销商名称与地址。

7.3 使用说明

- 7.3.1 每一销售包装内均应附有使用说明。
- 7.3.2 使用说明必须用明确的中文标明如下内容：产品名称与剂型、主要有效成分与含量、性能、适用范围与禁忌、详细使用方法与步骤、不良反应或副作用、贮存条件、有效期或保质期，以及注意事项。
- 7.3.3 一次性产品的使用说明应写明“只能使用一次”；多次量产品说明应写明“每次使用后必须立即关闭容器”，并标明抛弃日期。

附录 A
(标准的附录)
消毒效果试验方法

A1 目的

用于确定隐形眼镜护理液是否具有消毒功能。

A2 测试方法**A2.1 悬液定量杀菌试验****A2.1.1 试验微生物**

- a) 细菌:大肠杆菌(ATCC 8739 或 8099)
金黄色葡萄球菌(ATCC 6538)
绿脓杆菌(ATCC 9027)
- b) 酵母菌:白色念珠菌(ATCC 10231)
- c) 霉菌:茄科镰刀霉菌(ATCC 36031)

A2.1.2 操作程序

A2.1.2.1 取菌种 3~14 代营养琼脂斜面新鲜培养物(18 h~24 h),用 0.03 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)洗下,稀释成含菌量为 1×10^7 cfu/mL~ 1×10^8 cfu/mL 的菌悬液。

A2.1.2.2 从三批试样中分别吸取 10.0 mL 加入三支灭菌试管中,置 20℃~25℃水浴 5 min。

A2.1.2.3 在试管中分别加入 0.1 mL 菌悬液,使最终含菌量为 1×10^6 cfu/mL~ 1×10^8 cfu/mL,混匀,并开始计时。

A2.1.2.4 分别于四个不同作用时间(推荐最短消毒时间的 25%、50%、75%、100%),各取 1.0 mL 菌药混合液移入 9.0 mL 中和剂中,混匀。

A2.1.2.5 中和 10 min 后,吸取其原液或 10 倍系列稀释液 1.0 mL 分别接种营养琼脂培养基(细菌)、沙堡氏琼脂培养基(酵母菌)或马铃薯葡萄糖琼脂培养基(霉菌),每管接种两块平板,细菌与酵母菌分别于 35℃~37℃培养 48 h(细菌)或 72 h(酵母菌),霉菌于 20℃~25℃培养 10 d~14 d,作活菌计数,取其平均值。

A2.1.2.6 以 0.03 mol/L PBS 代替样品,按上述同样方法加菌进行活菌计数作为阳性对照。取 PBS、中和剂各 1.0 mL 分别接种营养琼脂培养基或沙堡氏琼脂培养基以及未接种的上述培养基作为阴性对照。

A2.1.2.7 按式(A1)计算每种菌每个作用时间点的杀灭率:

$$\text{杀灭率} = \frac{\text{阳性对照组活菌数} - \text{试验组活菌数}}{\text{阳性对照组活菌数}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (A1)$$

A2.1.2.8 试验所选中和剂必须通过附录 D 中规定的悬液定量中和剂鉴定试验,并且阴性对照必须无菌生长,否则重新测试。

A2.2 有机物对消毒效果影响试验**A2.2.1 试验微生物**

任选 A2.1.1 中的一种细菌进行测试。

A2.2.2 操作程序

A2.2.2.1 取菌种 3~14 代营养琼脂斜面新鲜培养物(18 h~24 h),用 0.03 mol/L PBS 洗下并稀释,加入适量无菌小牛血清,使最终含血清量为 10%,含菌量为 1×10^7 cfu/mL~ 1×10^8 cfu/mL 的菌悬液。

A2.2.2.2 以悬液定量杀菌试验确定的最低有效浓度所需的最短作用时间为试验时间起点,以后按等差或等倍组距再选择三个作用时间取样检测。

A2.2.2.3 以下步骤按 A2.1.2.2~A2.1.2.8 进行。

A2.2.3 评价规定

达到合格的最短有效作用时间与悬液定量杀菌试验结果相同,为有机物对产品杀菌作用无明显影响;如最短有效作用时间延长一倍或以上为有影响。

A2.3 模拟现场试验(镜片定量杀菌试验)

A2.3.1 试验微生物

根据悬液定量杀菌试验结果,选择抗力最强的一种细菌与酵母菌进行测试。

A2.3.2 试验镜片

A2.3.2.1 镜片类型:分低含水非离子型与高含水离子型。

A2.3.2.2 试验镜片必须是未使用过的新镜片。

A2.3.2.3 镜片应凹面向上放入无菌培养皿内,在凹凸两面顶点各接种 0.01 mL 菌液。

A2.3.3 操作程序

A2.3.3.1 将试验镜片(每组四片低含水非离子型与四片高含水离子型)以及阳性对照镜片(各两片)分别放置于灭菌培养皿中,取试验菌液 0.02 mL 接种于镜片上(染菌量为 2×10^5 cfu/片~ 1×10^6 cfu/片),于 $20^\circ\text{C} \sim 25^\circ\text{C}$ 吸收 5 min~10 min。

A2.3.3.2 按生产商所提供的镜片消毒的详细说明处理试验镜片,包括清洁、消毒、冲洗、贮存的所有步骤。

A2.3.3.3 处理完毕,立即以无菌操作方法分别将试验镜片移入 5.0 mL 中和剂试管内,振摇,使镜片上的残留菌被充分洗脱在中和剂中。

A2.3.3.4 按 A2.1.2.5 的方法进行活菌计数。

A2.3.3.5 将未经处理的阳性对照镜片以无菌操作方法分别移入 5.0 mL 0.03 mol/L PBS 试管内,振摇,充分洗脱镜片上残留菌,再按 A2.1.2.5 的方法进行活菌计数。

A2.3.3.6 取 0.03 mol/L PBS、中和剂各 1.0 mL 分别接种营养琼脂培养基与沙堡氏琼脂培养基以及未接种的上述培养基作为阴性对照。

A2.3.3.7 按式(A2)计算每种镜片上每种菌的消除率:

$$\text{消除率} = \frac{\text{阳性对照组活菌数} - \text{试验组活菌数}}{\text{阳性对照组活菌数}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (A2)$$

A2.3.3.8 试验所选中和剂必须通过附录 D 中规定的载体定量中和剂鉴定试验,并且阴性对照必须无微生物生长,否则重新测试。

A2.3.4 评价规定

对细菌的消除率 $\geq 99.90\%$,对酵母菌的消除率 $\geq 99.00\%$ 为合格。

附录 B
(标准的附录)
细胞毒性试验与评价方法

B1 目的

将一定量受试物加入细胞培养液中培养细胞,通过对细胞生长和增殖的影响来评价护理液对哺乳动物细胞的潜在毒性作用。

B2 试剂

- a) 阳性对照:64 g/L 苯酚溶液。
b) 阴性对照:下述培养基。
c) 细胞株:推荐使用 L-929 细胞(小鼠成纤维细胞),试验用细胞为传代 48 h~72 h 生长旺盛的细胞。
d) 培养基:Eagle's MEN 加入体积分数为 10% 的小牛血清。

e) 磷酸盐缓冲液(PBS)。

无钙镁磷酸盐缓冲液	100.0 mL
酚红溶液	10.0 mL
200 g/L 氯化镁溶液	0.5 mL
100 g/L 氯化钙溶液	1.0 mL
水	加至 1 000 mL

B3 试验步骤

B3.1 细胞悬液制备:用细胞培养基配制 4 万个/mL 细胞悬液分注于试管内(1 mL/管),阴性对照组 13 管(1 管备用),材料组 10 管(1 管备用),必要时设阳性对照组 3 管,置 37℃ 恒温培养箱中培养 24 h。

B3.2 受试物制备:取 0.2 mL 受试物加入细胞培养液中,37℃ 培养 24 h。

B3.3 受试液交换:24 h 后,每管舍弃原培养液,阴性对照组 9 管用新鲜培养液交换,阳性对照组用含 64 g/L 苯酚的细胞培养液交换,受试物组用含体积分数为 50% 受试液的新鲜培养液进行交换,并对三支阴性对照管进行细胞计数,其余置 37℃ 继续培养。

B3.4 细胞计数与吸光度测定

B3.4.1 分别于 2、4、7 天将对照组和试验组各三管进行细胞计数或吸光度测定,以判断细胞的增殖度。

B3.4.2 细胞计数法:用含枸橼酸钠的结晶紫罗兰染色,血球计数板在显微镜下计数,上下限不得超过 10%,否则重新计数。

B3.4.3 分光光度计测定吸光度法(仲裁法):弃去原细胞培养液,用 PBS 洗涤,体积分数为 10% 的甲醛溶液固定 10 min,水洗(2~3)次,加 5 g/L 结晶紫罗兰 1.5 mL 染色 3 min,水洗(2~3)次,加 10 g/L 十二烷基硫酸钠 3.5 mL,用分光光度计在波长 588 nm 下测定吸光度。

B4 结果计算

B4.1 细胞计数法:细胞计数经 95% 可信度的数理统计,得上限、平均数、下限,通过细胞计数计算相对增殖度(RGR),见式(B1)。

$$\text{RGR} = \frac{\text{试验组平均值}}{\text{阴性对照组平均值}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (\text{B1})$$

B4.2 吸光度测定法,相对增殖度计算见式(B2)。

$$\text{RGR} = \frac{\text{试验组吸光度} - \text{空白对照吸光度}}{\text{阴性对照组吸光度} - \text{空白对照吸光度}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (\text{B2})$$

B4.3 毒性评定:按表 B1 规定把 RGR 值转换成六级反应以评定护理液毒性程度。

表 B1 反应分级标准

反应	相对增殖度
0 级	≥100
1 级	75~99
2 级	50~74
3 级	25~49
4 级	1~24
5 级	0

B5 评价规定

B5.1 试验结果为 0 级或 1 级反应为合格。

B5.2 试验结果为 2 级反应的,应结合细胞形态分析,综合评价。

B5.3 试验结果为 3~5 级反应为不合格。

附录 C
(标准的附录)
稳定性试验方法

C1 成品稳定性试验**C1.1 目的**

用于确定隐形眼镜护理液成品的有效期。

C1.2 测试方法**C1.2.1 自然留样法**

将试样放置 $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 室温条件下, 定期(开始、3月、6月, 以后每6个月一次)取样检测其理化性能(与镜片物理相容性除外)、微生物情况, 以及选择附录 B 中抗力最强的一种细菌进行消毒效果试验。

C1.2.2 加速试验法

将试样放置 $45^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 与相对湿度 $(75 \pm 5)\%$ 条件下, 定期(开始、3月、6月)取样检测, 指标同 C1.2.1。

C1.3 评价规定

C1.3.1 至少应进行6个月的自然留样与加速试验。

C1.3.2 各项检测结果均应符合表1中的相应要求。

C1.3.3 自然留样法可直接确定产品有效期。

C1.3.4 加速试验可根据温度与自然留样法温度差(x)计算加速因数, 计算公式为:

加速因数 $= 2.0^{x/10}$ (当 $x=20$ 时, $2.0^{2.0}=4$)。然后用加速因数乘以试验时间推测产品有效期, 但不得超过两年。

C2 开封产品抛弃日期试验**C2.1 目的**

用于确定多次量隐形眼镜护理产品开封后的抛弃日期。

C2.2 测试方法

C2.2.1 试验微生物: 选择消毒效果试验(附录 B)中抗力最强的一种细菌与一种酵母菌(白色念珠菌)。

C2.2.2 接种日期: 试验开始、第2周, 拟抛弃日期的25%、50%、75%、100%。

C2.2.3 取样日期: 第1、2、3、4周, 拟抛弃日期的25%、50%、75%、100%, 拟抛弃日期后2周。

C2.2.4 操作程序

C2.2.4.1 每种菌每批次取试样 50 mL 于灭菌试管内, 加入 0.5 mL 含菌量为 10^8 cfu/mL 菌悬液, 混匀, 使最终菌量为 10^6 cfu/mL, 置于 $20^{\circ}\text{C} \sim 25^{\circ}\text{C}$ 。如产品对光敏感, 应遮光贮存。

C2.2.4.2 在上述取样日期, 每管吸取 1.0 mL 试样移入 9.0 mL 中和剂中, 混匀。

C2.2.4.3 中和 10 min 后, 取样液或 10 倍系列稀释液 1.0 mL 分别接种营养琼脂培养基(细菌)或沙堡氏琼脂培养基(酵母菌), 每管接种两个平皿, 于 $35^{\circ}\text{C} \sim 37^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h(细菌)或 72 h(酵母菌), 进行活菌计数, 取平均值。

C2.2.4.4 分别以 0.03 mol/L PBS 与中和剂代替试样, 按上述方法加菌进行活菌计数作为阳性对照与中和剂对照; 同时分别用 1.0 mL 0.03 mol/L PBS 与中和剂接种营养琼脂培养基与沙堡氏琼脂培养基以及未接种的上述培养基作阴性对照。

C2.2.4.5 在上述再接种日期(2周及以后), 在试样中加入 0.5 mL 含量为 10^5 cfu/mL 菌悬液, 混匀, 使最终菌量为 10^3 cfu/mL。在再接种前取样进行活菌计数。

C2.2.4.6 计算每种菌的减少率:

$$\text{减少率} = \frac{\text{阳性对照组活菌数} - \text{试验组活菌数}}{\text{阳性对照组活菌数}} \times 100\% \dots\dots\dots(C1)$$

C2.2.5 评价规定

- a) 阴性对照无菌生长,中和剂对照活菌数达到阳性对照活菌数的50%以上,否则应重新测试。
- b) 在第14天,细菌减少率 $\geq 99.90\%$,酵母菌减少率 $\geq 90.0\%$,并且在以后至抛弃日期细菌与酵母菌的活菌计数不再增加。

附 录 D
(标准的附录)
中和剂鉴定试验

D1 目的

用于确定所选用中和剂是否适用于拟进行的细菌或酵母菌杀灭试验。

D2 试验微生物

细菌(以下任选一种):

大肠杆菌(ATCC8739 或 8099)

金黄色葡萄球菌(ATCC6538)

绿脓杆菌(ATCC9027)

酵母菌:白色念珠菌(ATCC10231)

D3 试验分组**D3.1 悬液定量中和剂鉴定试验**

D3.1.1 第1组。吸取试样 10.0 mL 于试管内,置 20℃~25℃水浴中 5 min 后,加入 0.1 mL 菌悬液混匀。作用至预定时间,吸此样液 1.0 mL 加于含有 9.0 mL 0.03 mol/L PBS 的试管中混匀。吸取该最终样液 1.0 mL,接种于平皿中,做活菌计数。

D3.1.2 第2组。吸取试样 10.0 mL 于试管内,置 20℃~25℃水浴中 5 min 后,加入 0.1 mL 菌悬液混匀。作用至预定时间,吸此样液 1.0 mL 加于含有 9.0 mL 0.03 mol/L 中和剂溶液的试管中混匀,作用 10 min。吸取该最终样液 1.0 mL,接种于平皿中,做活菌计数。

如平板生长菌落数超过 300 个,应以 0.03 mol/L PBS 对上述最终样液作适宜稀释后,再次进行活菌计数。

D3.1.3 第3组。吸取中和剂 10.0 mL 于试管内,置 20℃~25℃水浴中 5 min 后,加入 0.1 mL 菌悬液混匀。作用 10 min。吸取该最终样液 1.0 mL,用中和剂做 10 倍系列稀释,选适宜稀释度悬液,各取 1.0 mL,分别接种于平皿中,做活菌计数。

D3.1.4 第4组。吸取中和产物溶液(以 1 份消毒剂加 9 份中和剂,作用 10 min 配制而成)10.0 mL 于试管内,置 20℃~25℃水浴中 5 min 后,加入 0.1 mL 菌悬液混匀。作用 10 min。吸取该最终样液 1.0 mL,用中和产物溶液做 10 倍系列稀释,选适宜稀释度悬液,各取 1.0 mL,分别接种于平皿中,做活菌计数。

D3.1.5 第5组。吸取 0.03 mol/L PBS 10.0 mL 于试管内,置 20℃~25℃水浴中 5 min 后,加入 0.1 mL 菌悬液混匀。作用 10 min。吸取该最终样液 1.0 mL,用 0.03 mol/L PBS 做 10 倍系列稀释,选适宜稀释度悬液,各取 1.0 mL,分别接种于平皿中,做活菌计数。

D3.1.6 第6组。吸取试验所用同批次 0.03 mol/L PBS 1.0 mL,接种于平皿中,做活菌培养计数。

D3.1.7 第7组。吸取试验所用同批次中和剂 1.0 mL,接种于平皿中,做活菌计数。

D3.1.8 第8组。将未接种的试验用培养基平板直接置温箱内培养。

D3.2 载体定量中和剂鉴定试验

D3.2.1 第1组。吸取试样 5.0 mL 于无菌小平皿内,将其置 20℃~25℃水浴中 5 min 后,用无菌镊子夹入一菌片(布载体),并使浸透于试样中。待作用至试验预定的时间,立即用无菌镊子取出菌片移入含 5.0 mL 0.03 mol/L PBS 试管中,作用 10 min。将试管振打 80 次,吸取该最终样液 1.0 mL,接种于平

皿中,做活菌计数。

D3.2.2 第2组。吸取试样 5.0 mL 于无菌小平皿内,将其置 20℃~25℃水浴中 5 min 后,用无菌镊子夹入一菌片,并使浸透于试样中。待作用至试验预定的时间,立即用无菌镊子取出菌片移入含 5.0 mL 中和剂试管中,将试管振打 80 次。作用 10 min。吸取该最终样液 1.0 mL,接种于平皿中,做活菌计数。

如平板生长菌落数超过 300 个,应重新吸取该最终样液 0.5 mL,用 0.03 mol/L PBS 做适当稀释,选适宜稀释度悬液,吸取 1.0 mL,分别接种于平皿中,做活菌计数。

D3.2.3 第3组。吸取中和剂 5.0 mL 于无菌小平皿内,将其置 20℃~25℃水浴中 5 min 后,用无菌镊子夹入一菌片,并使浸透于中和剂内,作用 10 min。立即用无菌镊子取出菌片移入含 5.0 mL 中和剂试管中,将试管振打 80 次,混匀。吸取该最终样液 1.0 mL,用中和剂做 10 倍系列稀释,选适宜稀释度悬液,吸取 1.0 mL,分别接种于平皿中,做活菌计数。

D3.2.4 第4组。吸取中和产物溶液(以浸有消毒剂的载体置 5.0 mL 中和剂内,作用 10 min)5.0 mL 于无菌小平皿内,将其置 20℃~25℃水浴中 5 min 后,用无菌镊子夹入一菌片,并使浸透于中和产物中。作用 10 min,用无菌镊子取出菌片,移入含 5.0 mL 中和产物溶液的试管中,将试管振打 80 次,混匀。吸取该最终样液 1.0 mL,用中和产物溶液做 10 倍系列稀释,选适宜稀释度悬液,吸取 1.0 mL,分别接种于平皿中,做活菌计数。

D3.2.5 第5组。吸取 0.03 mol/L PBS 5.0 mL 于无菌小平皿内,将其置 20℃~25℃水浴中 5 min 后,用无菌镊子夹入一菌片,并使浸透于 0.03 mol/L PBS 中。作用 10 min,立即用无菌镊子取出菌片移入含 5.0 mL 0.03 mol/L PBS 的试管中,将试管振打 80 次,混匀。吸取该最终样液 1.0 mL,用 0.03 mol/L PBS 做 10 倍系列稀释,选适宜稀释度悬液,吸取 1.0 mL,分别接种于平皿中,做活菌计数。

D3.2.6 第6组。吸取试验所用同批次 0.03 mol/L PBS 1.0 mL,接种于平皿中,做活菌计数。

D3.2.7 第7组。吸取试验所用同批次中和剂 1.0 mL,接种于平皿中,做活菌计数。

D3.2.8 第8组。将未接种的试验用培养基平板直接置温箱内培养。

D4 评价规定

试验结果符合以下全部条件,所测中和剂可判为合格:

- a) 第 1 组无试验菌,或仅有极少数试验菌菌落生长;
- b) 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 D1 要求者;

表 D1 中和剂鉴定试验合格标准中对第 1 组与第 2 组菌落数的要求

第 1 组平板平均菌落数	第 2 组平板平均菌落数
0	>5
X	>(X+5)
Y	>(Y+0.5Y)

注 1: X 指在 1~10 之间的菌落数, Y 为大于 10 的菌落数。
注 2: 对抑菌作用不明显消毒剂所用中和剂的鉴定试验中,当第 1 组与第 2 组菌落数相近,难以达到本表要求时,可根据具体情况另行作出判断和评价。

c) 第 3、4、5 组有相似量试验菌生长,并在 1×10^5 cfu/mL(片)~ 1×10^6 cfu/mL(片)之间,其组间菌落数误差率按式(D1)计算,其值应不超过 15%:

$$\text{组间菌落数误差率} = \frac{(\text{三组间菌落平均数} - \text{各组菌落平均数}) \text{的绝对值之和}}{3 \times \text{三组间平均菌落数}} \times 100\% \dots (D1)$$

d) 第 6~8 组无菌生长。否则,说明试剂或培养基有污染,全部试验应换未污染试剂或培养基重做。

e) 连续三次试验取得合格评价。

D5 注意事项

- a) 试验所分各组均有其特定意义,不得任意删减;
- b) 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;
- c) 在计算微生物浓度时,须考虑其稀释倍数;
- d) 第 2 组如在预定时间无菌生长,可适当缩短作用时间,但最短不得少于 30 s。

附录 E
(标准的附录)
试剂和培养基配方

E1 0.03 mol/L PBS(pH7.2)

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

E2 革兰氏染色液

第 1 液: 结晶紫溶液	
结晶紫乙醇饱和溶液	100 mL
结晶紫	4 g~8 g
95%乙醇	100 mL
1%草酸铵溶液	80 mL
第 2 液: 卢戈氏碘液	
碘化钾	2 g
碘	1 g
蒸馏水	200 mL
第 3 液: 脱色剂	
(1) 95%乙醇	100 mL
(2) 丙酮乙醇溶液	
95%乙醇	70 mL
丙酮	30 mL
第 4 液: 稀释石碳酸复红液	
碱性复红乙醇饱和溶液	10 mL
碱性复红	5 g~10 g
5%石碳酸溶液	90 mL
蒸馏水	900 mL

E3 营养琼脂培养基

蛋白胨	10 g
牛肉膏	5 g
氯化钠	5 g
琼脂	20 g
蒸馏水	1 000 mL

E4 沙堡氏琼脂培养基

葡萄糖	40 g
蛋白胨	10 g
琼脂	20 g

蒸馏水	1 000 mL
-----	----------

E5 无钙镁 PBS(pH7.2~7.4)

磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	0.20 g
磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	2.89 g
氯化钾(KCl)	0.20 g
氯化钠(NaCl)	8.00 g
双蒸水	1 000 mL

E6 小牛血清

将过滤除菌后的小牛血清,放入 56℃ 恒温水浴中,保温 30 min 灭活补体。处理后分装,保存于 -20℃ 备用。

E7 马铃薯葡萄糖琼脂培养基

马铃薯	200 g
葡萄糖	20 g
琼脂	20 g
蒸馏水	1 000 mL
