

1、 验证方案的起草

起草人	部门	日期

2、 验证方案的审批

审核人	部门	日期

3、 验证方案的批准

批准人	批准日期

目 录

- 1 前言
- 2 职责
- 3 验证的方法及步骤
- 4 异常情况偏差处理
5. 验证结果评价及建议
- 6、再验证周期

1. 前言

消毒剂主要使用在洁净控制区域，用于控制生产环境、设备表面等的微生物污染的一种化学剂。由于没有一种消毒剂是完全理想的，因此有必要在实际工作中使用两种以上的消毒剂。交替使用在理论上有利于防止形成相同环境的分离菌或抑制细菌的适应性。本实验方案针对①75%乙醇、②1%新洁尔灭、③3%甲酚皂杀菌剂、④3%的过氧化氢溶液共 4 种消毒剂进行抑制或者杀灭微生物的效果确认。

1.1 验证的目的

本验证的目的在于制定方法及可接受标准，来评价消毒剂对微生物的杀灭效果。

1.3 验证的范围

75%乙醇、1%新洁尔灭、3%甲酚皂溶液、3%的 H₂O₂

1.4 验证内容：

本验证先在实验室对所使用的消毒剂，用六种控制菌做生物指示剂挑战性实验；然后做现场消毒考察实验，即现场消毒后用棉签取样法对消毒后的表面取样，做表面残留微生物限度检查。通过对指示菌的杀灭对数值和现场消毒后洁净区表面微生物的残留限度来确认消毒剂的消毒效果。

2. 职责

2.1 验证小组成员：

部 门		人 员

2.2 职责

2.3 验证进度

3. 验证方法及步骤

3.1 实验材料

3.3.1 菌株

- (1) 细菌：金黄色葡萄球菌(ATCC6538)
- 铜绿假单胞菌(ATCC15442)

大肠杆菌(ATCC25922)

伤寒杆菌(ATCC6539)

(2) 细菌芽孢：枯草杆菌芽孢(ATCC9372)

(3) 真菌：白色念珠菌(ATCC10231)

3.3.2 培养基

无菌大豆胰蛋白胨琼脂培养基(TSA)、营养肉汤培养基。

3.3.3 稀释液：1%蛋白胨-0.03mol/L PBS 溶液

3.3.4 中和剂：0.1%卵磷脂+1%吐温 80 溶液； 0.5%硫代硫酸钠（3%过氧化氢）

3.3.5 无菌试管

3.3.6 无菌平皿(90mm)

3.3.7 消毒剂：75%乙醇、1%新洁尔灭、3%甲酚皂溶液、3%的 H_2O_2

3.3.8 移液器及配套无菌吸头:0-100ul , 100-1000ul

3.2 中和剂效力确认

①中和剂效力及毒性试验目的

在化学消毒试验中，达到规定消毒时间终点时，要求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。因为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抑制作用，从而可导致对杀菌效果偏高的错误判断，甚至产生假阴性结果。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结果。中和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，使其不再持续抑制或杀灭微生物的方法。本试验中所使用的中和剂必须既能有效抑制消毒剂的杀菌性（中和剂的效力试验）同时又不削弱微生物活力的恢复（中和剂的毒性试验）。

②中和剂效力、毒性确认

用稀释剂将试验菌制成 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ cfu/ml 的菌悬液备用。

准备无菌试管 6 支，按表一试验操作步骤表分组进行操作。各组试管充分震荡放置于振荡器震荡至少 20 秒或在手掌上振敲 80 次，然后移取 1ml 混合液到平皿中做平皿计数，轻轻转动平皿以使菌落在培养基表面均匀分散开来，每组做两皿平皿，并做好标记。平皿在层流台下吹干，倒置于 37℃下培养 48 小时后计数。具体结果见附件一中和剂中

和效力评估测试记录

表一 中和剂效力、毒性确认试验操作步骤及结果判断

分组	试验操作	试验目的	试验结果判断	
A	4.5ml 消毒剂+0.5ml 菌悬液 $\xrightarrow{\text{作用 10min}}$ 取 0.5ml 作用液 →4.5ml 稀释液试管中混匀，吸取 1ml 最终作用液于平皿中，做活菌计数。	观察消毒剂对试验菌有无杀灭或抑制能力。	应无试验菌生长或极少数菌落生长	
B	4.5ml 消毒剂+0.5ml 菌悬液 $\xrightarrow{\text{作用 10min}}$ 取 0.5ml 作用液 →4.5ml 中和剂试管中混匀，吸取 1ml 最终作用液于平皿中，做活菌计数。	观察残留消毒液被中和后受到消毒剂作用后的试验菌是否能恢复生长。	B 组菌落数比 C、D、E 组少，并符合下列要求： A组平均菌落数 B 组平均菌落数	
			0	>5
			X(1~10)	>X+5
			Y(>10)	>Y+0.5Y
C	4.5ml 中和剂+0.5ml 菌悬液 $\xrightarrow{\text{作用 10min}}$ 取 0.5ml 作用液 →4.5ml 中和剂试管中混匀，吸取 1ml 最终作用液于平皿中，做活菌计数。	观察中和剂是否抑菌。	C、D、E 组有相似菌落数，其组间菌落数误差率应不超过 15%。 组间菌落数误差率 $= \frac{ \overline{CDE} - \overline{C} + \overline{CDE} - \overline{D} + \overline{CDE} - \overline{E} }{3 \times \overline{CDE}} \times 100\%$ $\overline{CDE}$ 表示三组间菌落总平均数； $\overline{C}$、$\overline{D}$、$\overline{E}$ 分别表示各组菌落平均数	
D	4.5ml 中和产物液+0.5ml 菌悬液 $\xrightarrow{\text{作用 10min}}$ 取 0.5ml 作用液 →4.5ml 中和剂试管中混匀，吸取 1ml 最终作用液于平皿中，做活菌计数。	观察中和产物，或未被完全中和的残留消毒剂对试验菌的生长繁殖是否有影响。		
E	4.5ml 稀释液+0.5ml 菌悬液 $\xrightarrow{\text{作用 10min}}$ 取 0.5ml 作用液 →4.5ml 稀释液试管中混匀，吸取 1ml 最终作用液于平皿中，做活菌计数。	作为菌数对照		
F	分别吸取 1ml 中和剂和 1ml 灭菌 0.9%氯化钠溶液于平皿中做活菌计数。	作阴性对照	应无菌落生长	
备注	若菌落太多不能计数，则移取 1ml 上述混合物，到 9ml 灭菌注射的生理盐水中（稀释 10 倍），充分振荡后再移取 1ml 做平皿计数。			

试验结果符合上述所有条件，所测中和剂才可判为合格。

3.3 消毒剂杀菌效率确认（定量悬浮试验）。

3.3.1 原理 将定量的细菌悬液加入消毒剂溶液中，作用一定时间。去除残留的消毒剂影响后，以上液定量接种于营养琼脂平板上。经培养后计算其菌落数。与未经消毒剂作用的对照菌液平板计数相比较，计算出杀菌效率。

3.3.2 菌悬液的制备

用第三代的菌悬液按 1：10 用 9ml 的稀释剂稀释 5 次，计数培养，大约 70-80 之间，以获得 10^{-4} - 10^{-6} 数量级的菌悬液。

将最终稀释的 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 三个数量级，即三个稀释梯度的菌悬液，各取 2 份 1ml 均匀接种涂布在培养基平板上进行培养计数。

将涂布的 6 块平板在 37℃ 进行培养，7 天后进行读数，以确认稀释浓度。

3.3.3 试验方法：4.5ml 消毒剂+0.5ml 菌悬液，作用 10min，取 0.5ml 作用液，加到 4.5ml 中和剂试管中混匀，吸取 1ml 最终作用液于平皿中，做活菌计数。白色念珠菌 23~28℃ 培养 72 h 后计数，其它菌液 30~35℃ 培养 48 h 后计数。记录每个梯度 1.0ml 样品的菌落数（ a_1, a_2 ）， a 和 a_1 的平均值都应处于 30-300CFU 之间。记录结果见附件二

3.3.4 阳性对照：用稀释剂代替消毒剂，进行平行试验，作为阳性对照。计算每一种挑战菌种的 Log 下降值，并记下消毒剂的浓度和各自的接触时间。

3.3.5 杀灭对数值计算

杀灭对数值（KD）= 对照组平均活菌浓度对数值 - 试验组活菌浓度对数值

3.3.6 判定标准

消毒剂对挑战菌的杀灭对数值 ≥ 3 判为合格。

3.3.7 结论

根据实验结果进行计算，如果计算结果符合接受标准，即在一定的接触时间内，消毒剂能够使挑战菌水平下降 99.9%（下降 3 个对数单位），则表明消毒剂能够进行日常消毒使用

3.4 消毒剂的消毒效果现场考察

消毒剂对物体表面消毒模拟现场鉴定试验

3.4.1 采样计划汇总表

试验位置	试验采样时间及频率	风险分析
------	-----------	------

分装机台面	消毒前、后，同一平面不同采样点分别进行 3 次	为保证消毒剂的效果，消毒前试验应在洁净室及设备运行之后，人员活动频繁，设备及洁净室墙面等最脏的时候进行消毒前的采样。
分装间墙面		
分装间地面		

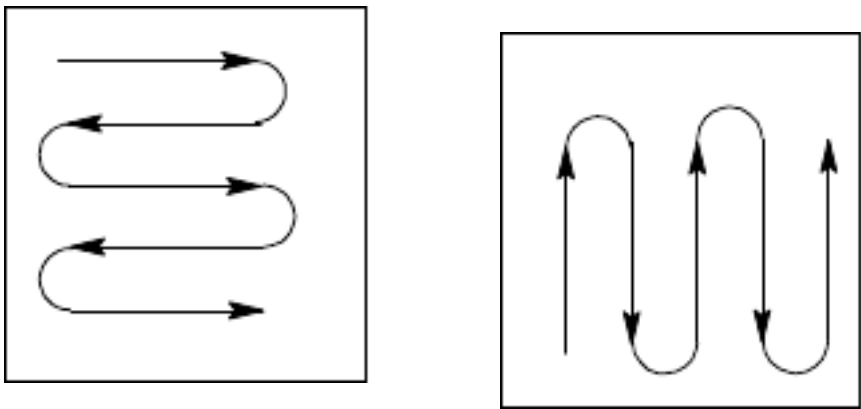
3.4.2 试验操作程序

(1)随机取物体表面（设备表面、台面、门等），用规格板标定 2 块面积各为 25cm 的区块，一供消毒前采样，一供消毒后采样。

(2)消毒前，将无菌棉拭于含 5ml 中和剂试管中沾湿，对一区块涂抹采样，横竖往返各 8 次。采样后，将棉拭采样端剪入原中和剂试管内，漩涡混合仪震荡 20s 或振打 80 次，作为消毒前样本。

(3)将配置好的消毒剂喷雾或涂擦于物体表面，保持湿润 10 分钟进行消毒。消毒后，将无菌棉签拭于中和剂试管中沾湿，并于试管壁上挤干后，对消毒区块涂抹采样，横竖往返各 8 次。采样后，以无菌操作方式将棉签拭采样端剪入原中和剂试管内，漩涡混合仪震荡 20s 或振打 80 次，作为消毒组样本。

擦拭法取样示意图



(4)试验结束后，将用过的同批次中和剂各 1.0ml 接种培养基，作为阴性对照组样本。每份吸取 1. 0ml 以琼脂倾注法接种平皿，每个样本接种 2 个平皿，放 37℃恒温箱中培养 48h，观察最终结果。

(5)计算杀灭对数值。

杀灭对数值 $N = \lg$ 消毒前平均菌落数 $- \lg$ 消毒后平均菌落数。

(6)判定标准

消毒剂杀灭对数值 ≥ 3 判为合格。

(7)结论

根据实验结果进行计算，如果计算结果符合接受标准，即在一定的接触时间内，消毒剂能够使菌落数水平下降 99.9%（下降 3 个对数单位），则表明消毒剂能够进行日常消毒使用

4 异常情况及偏差处理

4.1 异常情况处理程序

4.1.1 日常监测过程中，应严格按照消毒标准操作程序进行操作。

4.2 偏差或变更说明

验证过程中的偏差和异常必须详细记录和说明，并经过调查分析和处理。

5. 验证结果评价及建议

质量保证部负责收集各项验证、试验结果记录，根据验证、试验结果起草验证报告，报验证领导小组核对。验证领导小组对验证结果进行综合评审，做出验证结论，发放验证证书，确认该再验证周期。对验证结果的评审应包括：

5.1 验证试验是否有遗漏。

5.2 验证实施过程中对验证方案有无修改，修改原因、依据以及是否经过批准。

5.3 验证记录是否完整。

5.4 验证试验结果是否符合标准要求，偏差及对偏差的说明是否合理，是否需要进一步补充试验。

6、再验证周期

6.1 质量保证部根据验证结果确定再验证周期。

6.2 当环境监控的结果出现偏差时，应重新评估目前使用的消毒剂，必要时更换消毒剂的品种以及调整消毒剂的使用周期。新消毒剂使用前均需经效果验证后方可使用。

1.1. 工作菌液为金黄色葡萄球菌时，中和剂鉴定试验结果

序号	项目类型	菌落计数结果（CFU/ml）			
		75%乙醇溶液	1%新洁尔灭溶液	3%甲酚皂溶液	3%的过氧化氢溶液
		中和剂：1%卵磷脂 +0.1% 聚山梨酯 80	中和剂：1%卵磷脂 +0.1%聚山梨酯 80	中和剂：1%卵磷脂 +0.1%聚山梨酯 80	中和剂：0.5%硫代硫酸钠
1	（消毒剂+工作菌液）+稀释液				
2	（消毒剂+工作菌液）+中和剂				
3	中和剂+工作菌液				
4	（消毒剂+中和剂）+工作菌液				
5	阳性对照组				
6	第 3、4、5 组间误差率				
可接受标准		第 1 组无菌生长，或仅有少数试验菌菌落生长；			
		第 2 组菌落数比第 1 组菌落数多，但比第 3、4、5 组菌落数少；			
		第 3、4、5 组有相似菌落数生长，其每组间菌落数是误差率不超过 15%；			
		阴性对照组应无菌生长。			
结论		符合规定			

序号	项目类型	菌落计数结果（CFU/ml）			
		75%乙醇溶液	1%新洁尔灭溶液	3%甲酚皂溶液	3%的过氧化氢溶液
		中和剂：1%卵磷脂 +0.1% 聚山梨酯 80	中和剂：1%卵磷脂 +0.1%聚山梨酯 80	中和剂：1%卵磷脂 +0.1%聚山梨酯 80	中和剂：0.5%硫代硫酸钠
1	（消毒剂+工作菌液）+稀释液				
2	（消毒剂+工作菌液）+中和剂				
3	中和剂+工作菌液				
4	（消毒剂+中和剂）+工作菌液				
5	阳性对照组				
6	第 3、4、5 组间误差率				
可接受标准		第 1 组无菌生长，或仅有少数试验菌菌落生长；			
		第 2 组菌落数比第 1 组菌落数多，但比第 3、4、5 组菌落数少；			
		第 3、4、5 组有相似菌落数生长，其每组间菌落数是误差率不超过 15%；			
		阴性对照组应无菌生长。			
结论		符合规定			

1.3 时，中和剂鉴定试验结果

序号	项目类型	菌落计数结果（CFU/ml）			
		75%乙醇溶液	1%新洁尔灭溶液	3%甲酚皂溶液	3%的过氧化氢溶液
		中和剂：1%卵磷脂 +0.1% 聚山梨酯 80	中和剂：1%卵磷脂 +0.1%聚山梨酯 80	中和剂：1%卵磷脂 +0.1%聚山梨酯 80	中和剂：0.5%硫代硫酸钠
1	（消毒剂+工作菌液）+稀释液				
2	（消毒剂+工作菌液）+中和剂				
3	中和剂+工作菌液				
4	（消毒剂+中和剂）+工作菌液				
5	阳性对照组				
6	第 3、4、5 组间误差率				
可接受标准		第 1 组无菌生长，或仅有少数试验菌菌落生长；			
		第 2 组菌落数比第 1 组菌落数多，但比第 3、4、5 组菌落数少；			
		第 3、4、5 组有相似菌落数生长，其每组间菌落数是误差率不超过 15%；			
		阴性对照组应无菌生长。			
结论		符合规定			

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/576021243240010214>