

团 体 标 准

T/CADERM 5021—2024

肉毒梭菌的消毒效果检测方法

Test methods of disinfection effect of Clostridium botulinum

2024-12-14 发布

2025-1-13 实施

目 次

前言	1
引言	2
1 范围	3
2 规范性引用文件	3
3 术语与定义	3
4 缩略语	3
5 实验室要求	4
6 试剂和材料	4
7 试验步骤	4
7.1 肉毒梭菌芽孢悬液的制备与计数	4
7.2 中和剂鉴定试验	5
7.3 肉毒梭菌杀灭试验	5
8 结果判断（检测报告）	5
参考文献	7

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

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专利的责任。

本文件由中国医学救援协会提出，由中国医学救援协会标准化工作委员会归口。

本文件起草单位：中国疾病预防控制中心传染病预防控制所、中国疾病预防控制中心营养与健康所、中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所、中国疾病预防控制中心、四川省疾病预防控制中心、山东省疾病预防控制中心、中国人民解放军军事科学院军事医学研究院。

本文件主要起草人：徐雪芳、张必科、曹秋野、黄英、周海健、苏丽琴、王霄晔、赵红庆、张巾晖、罗霞、杨小蓉、张林、胡彬、辛文文。

引 言

肉毒毒素是目前已发现的最强烈的生物毒素之一，其造成的肉毒中毒病死率高，住院时间长，一直是生物战剂的重要组成部分，是重要的公共场所生物恐怖威胁因子之一，在国民安全和公共卫生安全中具有重要意义。产肉毒毒素的肉毒梭菌其污染源主要是存在于环境和土壤中的肉毒梭菌芽孢，在公共场所环境中也可以肉毒梭菌芽孢形式存在，一般消毒剂很难对其进行彻底杀灭。

建立肉毒梭菌芽孢的消毒效果实验室评价标准，对肉毒梭菌消毒剂的评价具有重要指导作用，对维护公共卫生安全具有重要意义。本标准依据现有标准 GB 4789.12《食品安全国家标准 食品卫生微生物学检验 肉毒梭菌及肉毒毒素检验》、WS/T 683—2020《消毒试验用微生物要求》和 WS/T 10009—2023《消毒产品检测方法》的基础上，在科技部国家重点研发计划项目（2021YFC2600501）的支持下，根据肉毒梭菌的生长特点和抵抗消毒剂特性，制定了对肉毒梭菌芽孢消毒效果评价的通用原则文件，适用于实验室对消毒剂的消毒效果评价同时可用于公共场所肉毒梭菌芽孢的消毒。

肉毒梭菌的消毒效果检测方法

1 范围

本文件规定了肉毒梭菌消毒产品的消毒效果检测方法的实验室要求、试剂和材料、试验步骤和结果判定。

本文件适用于肉毒梭菌消毒剂消毒效果的实验室检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 4789.12《食品安全国家标准 食品卫生微生物学检验 肉毒梭菌及肉毒毒素检验》

WS/T 683—2020《消毒试验用微生物要求》

WS/T 10009《消毒产品检测方法》

3 术语与定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

肉毒梭菌 *Clostridium Botulinum*

一类可产生肉毒毒素的专性厌氧革兰阳性粗大杆菌。

注：广泛分布于自然界的土壤、湖泊、河川及海底，直杆状或稍弯曲，常散在，有时成双或短链状，有周鞭毛，无荚膜，芽孢呈椭圆形，粗于菌体，呈梭状，多位于近极端，使细胞呈汤匙状或网球拍状。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

BSA: 牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin)

CFU: 菌落形成单位 (Colony Forming Unit)

TPS: 胰蛋白胍生理盐水溶液(Tryptone Physiology Solution)

TPGY: 胰蛋白胍葡萄糖酵母浸膏肉汤(Trypticase Glucose Yeast Extract Broth)

KL: 杀灭对数值 (killing log value)

5 实验室要求

肉毒梭菌消毒检测实验室应符合GB 19489《实验室 生物安全通用要求》，在生物安全Ⅱ级及以上的实验室内进行。

6 试剂和材料

有机干扰物 (BSA) 和胰蛋白胍生理盐水溶液 (TPS) 参考行业标准-《消毒试验用微生物要求》(WS/T 683—2020)。

培养基和革兰氏染色液: 肉毒梭菌固体培养基可用卵黄琼脂培养基或哥伦比亚血琼脂培养基, 液体培养基采用胰蛋白胍葡萄糖酵母膏肉汤(TPGY), 相关培养基和革兰氏染色液配制方法参照国家标准-《食品安全国家标准 食品卫生微生物学检验 肉毒梭菌及肉毒毒素检验》(GB 4789.12)。

设备中除厌氧培养装置外其他参考行业标准-《消毒产品检测方法》(WS/T 10009—2023)。

7 试验步骤

本检测方法试验步骤共为以下三个部分。

7.1 肉毒梭菌芽孢悬液的制备与计数

7.1.1 肉毒梭菌芽孢培养

将肉毒梭菌在固体培养基-卵黄琼脂培养基平皿或哥伦比亚血琼脂平皿上, 在适宜的温度置于厌氧培养装置中进行复苏与传代, 挑取第2代纯培养物中典型菌落 (在卵黄琼脂培养基平皿上菌落边缘有彩虹样

光泽)接种于5 mL TPGY肉汤中,培养48 h后1:100接种于TPGY肉汤中,培养5 d后取10-100 μ L培养物进行涂片、革兰染色和镜检,待显微镜下观察芽孢数大于90%后进行芽孢悬液的制备。

7.1.2 肉毒梭菌芽孢悬液制备

收集培养物于4 $^{\circ}$ C 10,000 \times g 离心15分钟,纯水重悬,重复三次,每次加入纯水体积为离心前的一半,最后加入适量纯水获得芽孢悬液,80 $^{\circ}$ C加热10 min,而后采用纯水进行倍比稀释,接种于卵黄琼脂平皿或哥伦比亚血琼脂平皿进行菌落计数,根据计数结果稀释获得试验所需浓度的芽孢悬液。

上述试验步骤除离心和重悬外均需在厌氧培养装置中进行。

7.2 中和剂鉴定试验

除肉毒梭菌的培养和鉴定按照本文件5.2外,其它按照WS/T 10009—2023《消毒产品检测方法》5.1.5章节执行,可根据消毒剂的有效成分和浓度,选择合适的中和剂。

7.3 肉毒梭菌杀灭试验

确定中和剂后,采用适当的中和剂和有机干扰物BSA,制备的肉毒梭菌芽孢悬液,对需开展评价的消毒剂开展杀灭试验与消毒效果检测试验。

肉毒梭菌芽孢杀灭与消毒效果评价试验按照WS/T 10009—2023《消毒产品检测方法》中5.1.7章节执行,获得相应的杀灭对数值作为评价指标。

8 结果判断(检测报告)

按消毒产品指定的作用浓度设置3个作用时间,分别是最短作用时间的0.5倍、最短作用时间和最短作用时间的1.5倍,试验重复3次。在产品指定最低浓度与最短作用时间,以及最短作用时间的1.5倍时,当肉毒梭菌杀灭试验中的杀灭对数值(KL)均 \geq 5.00时,判定该消毒产品为合格,当KL值 $<$ 5.00时判定该

消毒产品为不合格。在产品指定浓度与最短作用时间的0.5倍时，可允许在部分重复次数中，出现不合格结果。

检测报告中应将各次试验的结果全部以表的形式列出，阳性对照组应列出各次试验菌浓度，以及平均试验菌浓度，试验组应列出杀灭对数值。

全国团体标准信息平台

参 考 文 献

- [1] [1] GB 19193-2015 《疫源地消毒总则》。
- [2] [2] GB 27953-2020 《疫源地消毒剂通用要求》。
- [3] [3] WS/T 650—2019 《抗菌和抑菌效果评价方法》。
- [4] [4] WS/T 683—2020 《消毒试验用微生物要求》
- [5] [5] WS/T 797—2022 《现场消毒评价标准》
- [6] [6] WS/T 10009—2023 《消毒产品检测方法》。
- [7] [7] Assal N, Boone R, Harris RA, et. al. Inactivation of Group I and Group II *Clostridium botulinum* spores by ultraviolet irradiation in water. *Int J Food Microbiol*[J]. 2023, 395:110191.
- [8] Reddy NR, Patazca E, Morrissey TR, et. al. Thermal and Pressure-Assisted Thermal Destruction Kinetics for Spores of Type A *Clostridium botulinum* and *Clostridium sporogenes* PA3679. *J Food Prot.* 2016, 79(2):253-62.
- [9] [8] Oie S, Obayashi A, Yamasaki H, et. al. Disinfection methods for spores of *Bacillus atrophaeus*, *B. anthracis*, *Clostridium tetani*, *C. botulinum* and *C. difficile*. *Biol Pharm Bull*[J]. 2011, 34(8):1325-9.
- [10] [9] Johnston MD, Lawson S, Otter JA. Evaluation of hydrogen peroxide vapour as a method for the decontamination of surfaces contaminated with *Clostridium botulinum* spores. *J Microbiol Methods*[J]. 2005, 60(3):403-11.
- [11] Pendyala B, Patras A, Gopisetty VVS, et. al. Inactivation of *Bacillus* and *Clostridium* Spores in Coconut Water by Ultraviolet Light. *Foodborne Pathog Dis*[J]. 2019, 16(10):704-711.
- [12] [10] Clauwers C, Vanoirbeek K, Delbrassinne L, et. al. Construction of Nontoxigenic Mutants of Nonproteolytic *Clostridium botulinum* NCTC 11219 by Insertional Mutagenesis and Gene Replacement.

Appl Environ Microbiol[J]. 2016, 82(10):3100-3108.

[13] [11] Mah JH, Kang DH, Tang J. Effects of minerals on sporulation and heat resistance of *Clostridium sporogenes*. Int J Food Microbiol[J]. 2008, 128(2):385-9.

全国团体标准信息平台