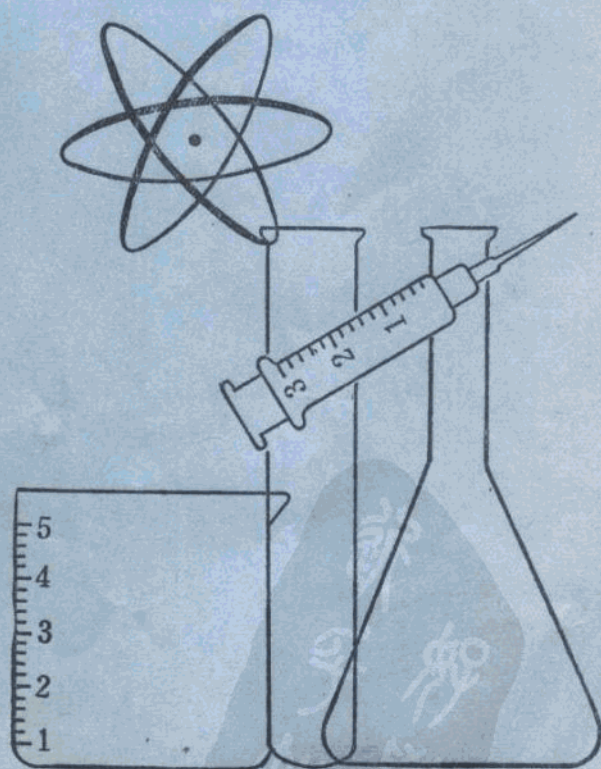


医疗用品

辐射灭菌的实践

佐藤健二著

北京市辐射中心
北京师范大学低能核物理研究所 编译组译



医疗用品辐射灭菌的实践

〔日本〕 佐藤健二著

北京市辐射中心
北京师范大学低能核物理研究所 编译组译

1986年·北京

序

医疗用品辐射消毒是同位素与辐射技术应用的重要方面之一。它是六十年代初发展起来的消毒新方法。由于这种消毒方法与已有的高压蒸汽消毒法、化学药剂熏蒸等方法相比,具有灭菌彻底,不污染环境,无残留,能耗低,可对包装后的产品进行消毒,而且是在常温下处理,特别适用于热敏材料的消毒等优点,因此,发展得非常迅速。特别是随着大功率辐射源的出现,辐照成本降低,在发达国家中很快地建立起许多专门用于医疗用品辐照消毒的工厂;在几个发展中国家也逐步建立了辐照消毒的示范装置。目前世界上已建成的一百三十多座钴-60辐照装置约有80%用于辐射消毒,辐射消毒的医疗用品已进入商业化生产。在欧美发达国家辐射消毒的医疗用品已占50%,预计到1990年将达到80%。日本的医疗用品辐射消毒的发展,起步虽落后于欧美发达国家约十年,但近年来在辐射消毒工艺技术和辐射消毒医疗用品的种类、数量、生产规模方面,与其它发达国家相比,已毫无逊色。

我国的医疗用品消毒方法,仍沿用落后的加热消毒法,消毒不彻底,能源消耗大,交叉感染严重。为了改善我国医疗用品消毒的落后状况,提高人民的保健水平,北京市辐射中心在“六五”期间接受了国家科委与北京市科委下达的“医疗用品辐射消毒”的研究任务。在工作中得到了日本佐藤健二先生编著的《医疗用品辐射灭菌的实践》。该书具体细致地阐述了医疗用品辐射消毒的各种有关问题,对我们的实验研究工作,起了很大的启迪作用。

佐藤健二先生原是日本东京都立同位素研究中心的研究员,从事医疗用品辐射消毒研究工作近二十年,有丰富的实践经验。他和他的同事们编著了有关医疗用品辐射消毒的系统著作。本书就是其系列著作之一。今年春,我们邀请了佐藤健二先生到北京市辐射中心访问并讲学,得到他的同意翻译出版本书。特在此向佐藤健二先生表示诚挚的感谢。

由于时间仓促和译者水平所限,纰漏错误在所难免,欢迎读者批评指正。希望此书的出版对我国医疗用品辐射消毒工作能有所裨益。

周瑞英

1986年8月

原 序

在我国，把辐射灭菌方法引入一次性使用的注射针头、注射器，从正式取得承认至今，已进入第十个年头了。在此期间，把辐射灭菌用在其制造过程的一次性使用的医疗用具，在种类上和数量上都有稳步增长的趋势，而且，这种趋势将会继续下去。

这种增长的趋势与辐射灭菌方法的以下主要特点有关：能在最终包装后进行灭菌处理；无残留毒性；如果灭菌工艺完整，与其它灭菌方法相比，在灭菌处理工作中，可以在管理手续少的条件下较好地确保灭菌水平（Level of Sterility）；工艺简便等。

另一方面，探讨初始污染菌数（Bioburden）以几率来衡量灭菌并引进辐射灭菌方法，确定灭菌条件，是比较新的动向，在实际工作中还有一些有待进一步探索。

在这个时机里，在《放射性产业》杂志的责任编辑杉本仙市先生的促进之下，把连续刊载了十一次的有关辐射灭菌的条件的实践情况收集起来而成本书。在医疗用具辐射灭菌领域中，为了达到灭菌的更高水平而从各个角度进行的讨论仍在继续；它同其它科学领域一样，在日新月异地发展。因此，本书需要修正补遗之处，显然很多。由于是以作者狭小有限范围内的研究经验为基础的，这些点滴片面的东西，如果能够仅仅作为设计灭菌条件的参考，就是作者最大的荣幸了。许多不妥之处，敬希各方面同仁的指教。

佐藤 健二

1981年6月

目 录

序.....	(iii)
原 序.....	(iv)
所谓灭菌的成立——存活曲线.....	(1)
灭菌前的污染菌数的测定方法 (之一)	(6)
灭菌前的污染菌数的测定方法 (之二)	(12)
污染菌对射线的抵抗性和辐射灭菌用的指示菌.....	(19)
灭菌剂量的计算和使用.....	(26)
灭菌工艺的管理.....	(34)
生物指示剂及其制备.....	(41)
辐射灭菌处理所引起的医疗用具材质的劣化 (其一)	(50)
辐射灭菌处理所引起的医疗用具材质的劣化 (其二)	(56)
关于把辐射灭菌方法导入一次性使用的医疗器械灭菌问题.....	(64)
确定灭菌条件的方法及其所依据的资料.....	(75)

1987/2/28/a.003

所谓灭菌的成立—存活曲线

与细渊和成合作

关于辐射灭菌法,是“用钴-60等放射性物质产生的 γ 射线等进行照射。本法对耐射线照射的物品实施”。第八次修订的日本药典是以这样的表达方式记载的。这是最早把这种方法记载在药典上的。

在第九次修改的药典中记载的是:“在来自放射性同位素辐射源的 γ 射线下进行照射,以杀灭微生物的方法。本法主要用于玻璃质、瓷质、金属、橡胶、塑料或纤维等制造的耐射线照射的物品,一般使用钴-60或铯-137等辐射源,根据待灭菌物品的材质、性状或污染状况等来调节总照射剂量而进行灭菌”。这比第八次的表达变得复杂了,但是并没有象对高压蒸汽灭菌那样标明大体上的标准处理条件,也没有给出灭菌剂量计算方法的标准。

另一方面,医疗用具中的辐射灭菌的研究,比这方面要早,承认其实用化也要早。关于所用的射线,仅限于钴-60的 γ 射线。电子束或铯-137的 γ 射线虽然后来也使用,在当初研究时是除外的。至于作为灭菌条件的照射剂量,与药典同样,听任实施者(医疗用具制造业)的决定,没有统一的标准。

与海外相比,辐射灭菌在实用方面的引进,虽然开始得相当晚,但在对象、品种方面在短期内急剧增加的趋势。同时,由于今后与医疗用具有关的文明生产的具体化(关于这方面,1975年美国食品药品监督管理局的Current Good Manufacturing Practices for Medical Device中有规定)、对一次性使用医疗用品灭菌的有效年月的重视等,辐射灭菌的医疗用具,不仅种类,数量上也会增加。

因此,在试行引入辐射灭菌法的情况下,为了进一步研讨灭菌条件,现在以在这个领域中比较常用的研究方法、实验方法为中心,介绍一下医疗用具的辐射灭菌。

■ 灭菌之适当与否

所谓灭菌,其定义是“把物品中全部微生物杀灭或除掉”。这是最近以来大家所熟知的。

按照这个定义,灭菌是把待灭菌的物品中存在的微生物全部杀掉或除去(用微生物过滤器等除去)。然后,为了了解存在的微生物是否杀掉,即,是否已经灭菌,用无菌检验法。药典中记载着:“灭菌适当与否,由无菌检验法来确定”。

但是,在考虑实际应用时,就出现了非常难的问题。即,关于前一段的杀灭或除去微生物,可以用各种方法,在后一段进行判定灭菌适当与否的无菌试验时,即使暂时“适当”,即,确认活的微生物完全不存在了,也不能作为灭过菌的物品而使用。更具体地说,有10个注射筒,为了供应使用,可以用任意的方法来灭菌。这样,这些注射筒是否完全灭菌,即灭菌处理是否正确,如果对每个注射筒进行无菌检验,就可以了解其灭菌是否适当。但是另一方面,能够确认完全没有活菌的物品,由于全部进入培养基中,也不能原封不动地给患者使

用。

因此，在现实中，认为“如果用这种方法，这样的条件处理就是灭菌”，即，几率地判断“灭菌成立”的处理的例子是很多的（实际上，在多数情况下，从已灭菌的物品中取出任意个进行无菌检验，或者用生物标记、试样与物品一起进行灭菌处理，实行无菌检验，作为辅助手段的情况也是存在的。在这种情况下，供使用或作为商品出售的物品，是由辅助手段的结果类推的）。

那末，可以试行考虑一下所谓“灭菌的成立”。

■ 求存活曲线方的法

现在这里屡次使用作为辐射灭菌法的指示菌的短小芽胞杆菌E601的芽胞，以每毫升 10^7 孢子的比例做成水的悬浮液（以下称为菌液）。

把菌液等量加入a, b, ……f 6个小试管

a : 0

b : $0.16 \times 10^6 R$ (0.16Mrad)

c : $0.3 \times 10^6 R$ (0.3Mrad)

d : $0.5 \times 10^6 R$ (0.5Mrad)

e : $0.7 \times 10^6 R$ (0.7Mrad)

f : $1.0 \times 10^6 R$ (1.0Mrad)

以上述比例在钴—60的 γ 射线照射，按以下方式调查各试管内存活的菌数。

(一) 稀释

(1) 在带有预先干燥加热灭菌的金属帽的试管（直径16毫米，长150毫米）中加入稀释用的灭菌的水4.5毫升。

(2) 充分搅拌试管a，用灭菌的吸量管取0.5毫升，将其加入加有4.5毫升的水的试管，搅拌均匀。把这个试管作为a-1（吸量管返回试管a，通过这个操作使菌液稀释10倍）。

(3) 把a-1中的液体0.5毫升，用与上面同样的方法，加入另外的有4.5毫升水的试管，充分搅拌，这个试管称为a-2（吸量管返回a-1，通过这样的操作把a-1的液体稀释10倍。a的菌液总计稀释 $10 \times 10 = 100$ (10^2) 倍)。

(4) :

(5) :

(6) 用同样的操作方法把a-4的液体稀释10倍，称为a-5（吸量管返回a-4，在a-5中加入新的吸量管，a-5把最初的菌液，即a，稀释到 10^5 倍）。

同样，

b试管中的液体稀释到 10^4 (b-4)

c试管中的液体稀释到 10^2 (c-3)

b试管中的液体稀释到 10^2 (d-2)

e试管中的液体稀释到10 (e-1)

f试管中的液体照原样 (f-0)

稀释到平均每个皿30~300个可见菌落。

(二) 混合稀释、培养

(1) 取灭菌皿3个, 各注入均匀搅拌的a-5的菌液1毫升。

(2) 把预先加热溶解的、在约50°C下保存的TSA (Trypticase soy agar, B.B.L.) 10~15毫升加入皿中, 使之与菌液充分混合之后, 放置起来固化。

在本例的情况下, 起始的菌数是了解的, 在了解照射状态下的菌的抵抗性的情况下, 供混合稀释试料的稀释步骤, a-5-10⁵倍就够了, 但对于考虑抵抗性变化时照射的气氛, 或者在不知道菌的抵抗性的情况下, 预先进行子试验, 知道适宜的稀释程度的标准, 是必要的。这样, 如果使用标准稀释程度周围的试料, 除了有得到正确数据的优点, 时间和经费都可节约。

对b-4, c-3, d-2, e-1, f-0的菌液, 也同样处理。

(3) 皿内的培养基凝固后, 在各个皿内加入在约50°C下保存的1.7%的琼胶液10毫升, 缓缓摇动皿, 在TSA培养基上能出现琼胶被复层。

为了防止发生扩散菌落而采用的这种操作技术, 除了短小芽胞杆菌以外, 在枯草杆菌, 蜡样芽胞杆菌的情形下也采用。与此相对应, 在*B. subtilis* var. *niger* (*B. globigii*, 枯草杆菌变种) 脂肪嗜热杆菌的情况下, 没有必要做成琼胶层。

(4) 琼胶层充分凝固之后, 把皿倒过来, 放入37°C的孵卵器, 进行约20小时的培养。

把皿倒置, 防止向培养基上落下凝缩水和防止污染。此外, 在培养时间长或培养温度高的情况下 (在脂肪嗜热杆菌的情况下为55°C等), 要兼带防止发生由于平板干燥引起的龟裂。

(5) 按规定的时间培养后, 用菌落计算器计算可见菌落的数字。

培养时间, 在以TSA作为培养基的情况下, 蜡样芽胞杆菌BSA, 枯草杆菌PCI219等, 17小时就够用, 但在短小芽胞杆菌E601的情况下, 要将近24小时才容易看到菌落的成长倾向。

除了以上的混释, 被覆层为二重层的方法外, 还有使用预先用TSA 7~10ml做成平板, 在板上放菌液, 用(二)之(1)、(二)之(2)……的操作, 做成三重层的方法。

以上试验结果得出以下数值 (可见菌落值)

a-5 三个皿的平均值 200

b-4 三个皿的平均值 200

c-3 三个皿的平均值 215

d-2 三个皿的平均值 185

e-1 三个皿的平均值 150

f-0 三个皿的平均值 175

a, b, c, d, e, f 试管内的活菌数为

a……稀释10⁵倍, 2 × 10⁷菌落/毫升

b……稀释10⁴倍, 2 × 10⁶菌落/毫升

c……稀释10²倍, 2.2 × 10⁵菌落/毫升

d……稀释10²倍, 1.9 × 10⁴菌落/毫升

e……稀释10¹倍, 1.5 × 10³菌落/毫升

f……稀释0倍, 1.7 × 10²菌落/毫升

然后,以纵轴为活菌数(对数),横轴为辐射剂量画出图象。如图1所示,各点几乎是直线上升的。

另外,使用 10^4 菌落/毫升的菌液,用同样方法照射,测定存活菌数,如图1的虚线所示。

一般把这个直线称为存活曲线。这种存活曲线,在短小芽胞杆菌、枯草杆菌变种、枯草杆菌、脂肪嗜热杆菌的情况下,大体上是直线,在巨大芽胞杆菌的情况下则成为弯曲的。

■ 取灭菌成立几率的方法

从图1可以了解到,在这个试验中,短小芽胞杆菌E601的芽胞,菌数大约以 0.16×10^6 R为单位减少十分之一。即在 2×10^7 个的菌液中以 0.16×10^6 R照射时,存活菌数为 2×10^6 个;以 0.32×10^6 R照射时,存活菌数为 2×10^5 ;如果以 1.12×10^6 R照射,存活菌数为 10^0 个。

这样,把这条直线进一步延长(图2),以 1.28×10^6 R照射时为 10^{-1} ,以 1.44×10^6 R照射时为 10^{-2} 个,无限趋近于0。

在这里使用 10^{-1} , 10^{-2} 这样的值,但是,对于有生命的物质,所谓 10^{-1} 或 $1/10$ 个,是没有意义的,这只是10个中有1个、100个中有1个、1000个中有一个的代用法而已。

相反,从找不出活菌的方面来看时,这意味着90%、99%、99.9%的可能性找不到灭菌后的活菌。

这样一来,照射剂量加大时,虽然存活菌数趋向于无限小,但另一方面,显然不会达到存活菌数为0,即灭菌几率为100%的情况。

但是,这不是实际情况。对于存活菌数达到什么程度为好,有各种说法。现在比较广泛的说法是“ 10^{-6} 个,即把1,000,000件物品进行灭菌处理,做总的无菌试验时,存在加号(即发现活菌)最多为1个时,这群物品(100万件)即被认为是无菌的”。这从灭菌的成立方面来说,是以99.9999%的几率灭菌。

由于对“灭菌成立的几率”的说法不熟悉,有采用新说法的倾向。实际上“灭菌不良引起的危险性”或“以何种安全度灭菌”等表达方法,是基于同样的考虑的。但是,也不能否定,完全理解了而使用与否以及在理解程度上是存在着很大差别的,而且,这种差别往往酿成致命伤。

这样的考虑方法,不仅适用于辐射灭菌,也适用于使用已久的高压蒸汽灭菌法或与辐射灭菌法同样被称为冷灭菌法的环氧乙烷灭菌法。在高压蒸汽灭菌法中,多使用实用型的灭菌器,以脂肪嗜热菌作为指示菌,求出图3所示的存活曲线,每2.5分钟减少十分之一。但在环氧乙烷气体灭菌的情况下,由于使用实用型的灭菌器时条件设定困难、再现性差等原因,所以要使用

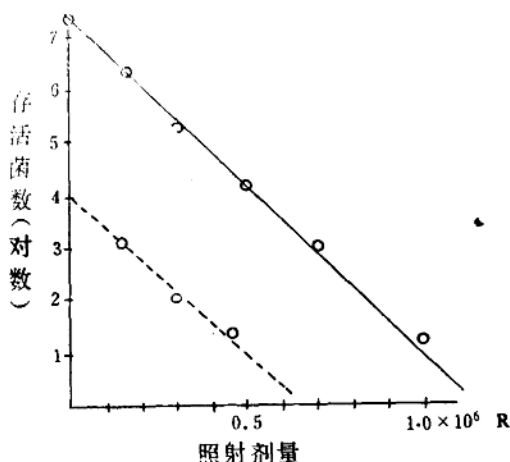


图1 短小芽胞杆菌E601的存活曲线

专门的实验规模的数据。但是，无论使用什么方法，必须注意灭菌条件一定要适当。这一点最近已被大家所理解。

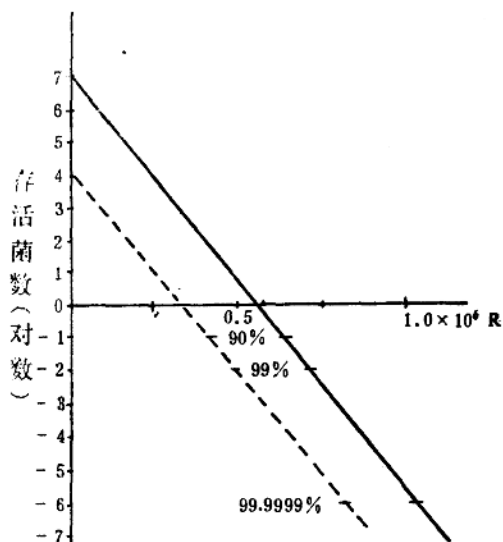


图2 残余菌数和灭菌的成立

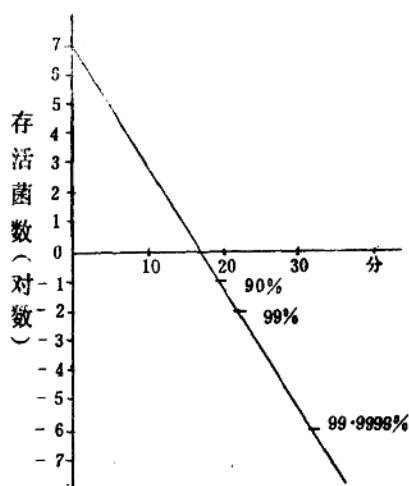


图3 脂肪嗜热杆菌的存活曲线和灭菌的成立

■ 最初的菌数如果少，灭菌就快

再一次观察图1、图2的实线、虚线两个存活曲线时，看到两条直线。虚线，即用 10^4 菌落/毫升的菌液进行试验的，为了减少到 10^0 个菌落/毫升，用较少的照射剂量可以办得到。

在 10^7 、 10^4 两种液体中，以 $1.6 \times 10^6 R$ 照射时，在 10^7 菌落/毫升的情况下，灭菌几率可以达到99.9%，与此相对应，在 10^4 菌落/毫升的情况下，灭菌几率可达99.9999%。对这种情况如果用言语表达，那就是：菌少灭菌易。

这是理所当然的，还有什么可说的呢？但是，在极为重要的灭菌实践过程中，这件事常常被忘掉。采取“反正是灭过菌的，虽不能说管理无用，但要恰如其分”的态度处理问题的（有意识地或无意识地）仍然很多。这种情况可以说明关于灭菌成立一再研讨的重要性。另外，有人虽然在实验室中工作很认真，可是对于要灭菌的物品，连污染菌数的测定都没有做就开展作业，与上述的例子，情况是相同的吧。

对“菌少易灭”这一点的再认识，对实施方面的重要性的充分理解，这就是取得完全灭菌物品的要点。

灭菌前的污染菌数测定方法

(之一)

与细浏和成合作

■ 附着菌数少时灭菌容易实现

附着菌数(污染菌数)少时就容易灭菌,现在通过实例来确认这一点。

图1为短小芽胞杆菌(*Bacillus Pumilus*) ATCC27142,枯草杆菌(*B. Subtilis*) var *niger* Presque Isle Culture 6201,脂肪嗜热杆菌(*B. Stearothermophilus*) ATCC7953的芽胞用钴-60的 γ 射线照射时的存活曲线。

由图可知,在只有几个菌(例如 10^0 个)的时候,不论是什么菌,初始菌数(准备进行灭菌时存在的菌数)少时,用低剂量就能达到目的。即容易实现灭菌。(用同一剂量,无菌的几率高,要达到同一个无菌几率时,用小的照射剂量即可)。

在表1、2(第11页)中用无菌试验实例证明了这个问题的。把短小芽胞杆菌ATCC27142的芽胞水溶液涂在滤纸上晾干成为试样(通称试片型)用钴-60的射线照射。进行无菌试验的条件为:培养基: Trypticase soy broth, 培养温度: 37°C , 培养时间: 7天。表1列出了求出的杀菌率结果。把市售的未经灭菌的缝合线绞成40厘米长,两根合起来成为一个试样,用射线照射,然后在以下条件下进行无菌试验。培养基: 药典规定的液状硫甘醇酸培养基,培养温度: 31°C , 培养时间: 7天。表2列出了求得的照射剂量与杀菌率的关系。从这个表可看到,涂敷菌数很少或污染菌数很少时,制造厂的缝合线用低剂量时,杀菌率为100%。可见附着菌数很少时,很容易做到灭菌。

不过像这种菌数很少、容易灭菌的现象,不仅在辐射灭菌时才有,在高压蒸汽灭菌法、乙烯氧化物气体灭菌法中也有。图2显示了脂肪嗜热杆菌的芽胞在高压蒸汽灭菌处理(用 121°C 的饱和蒸汽加热处理)时的存活曲线,从这个例子也可看到初始菌数很少时,灭菌很容易完成。

当初始菌数为 10^6 ,为了达到存活菌数为 10^{-6} ,即99.9999%的无菌几率,处理时间必须30分钟,而初始菌数为 10^3 时,处理时间只需要20分钟。

如此,“菌数少、灭菌容易”的情况,不论哪种灭菌法都是存在的。以前有许多研究报告也论证过了。正因为如此,制造无菌产品的厂家应该仔细了解和掌握这些情况。但是在实际情形中(产品的制造工序等),往往认为这些只是理论性的问题,与制造领域没有多大关系,或者恰恰处于制造领域时把这些忘掉。制造工序管理(包括设施的新建、改善)对于从污染菌数这一方面采取措施往往轻视,不充分利用。

这种现象,大概起因于对于灭菌法的错误理解,不够理解或者对灭菌法过于相信。在制造完全无菌的医疗用具时,关于污染菌数的讨论必须作为不可缺少的内容,充分考虑,妥善管理。

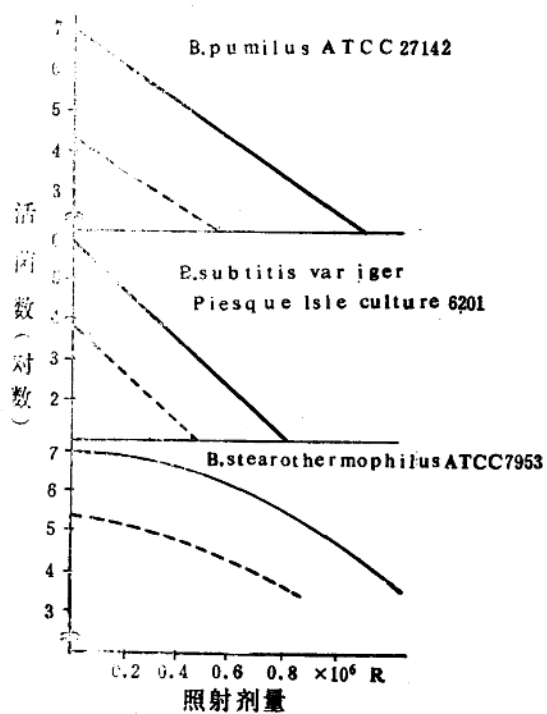


图1 各种菌的存活曲线

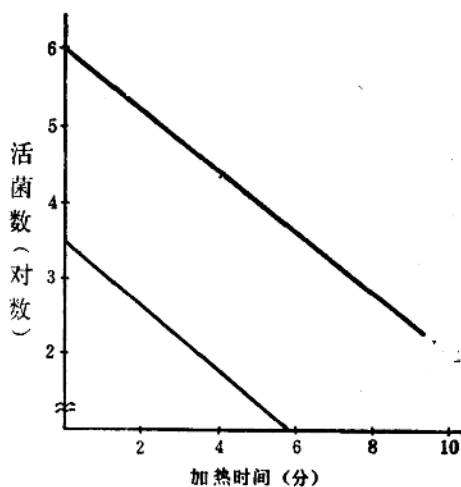


图2 脂肪嗜热芽胞杆菌 ATCC7593 在加热到121°C (饱和蒸汽) 时的存活曲线。

■ 关于灭菌前的污染菌数

如前所述, 灭菌前的污染菌数, 在灭菌的完成中是不可缺少的要素。这样, 在制造工序的卫生方面, 管理上的资料就具有重要意义, 它为设施的改善、设备管理、操作者洗手、保持衣服清洁和人员管理提供提南。

关于这类重要性在IAEA的关于医疗用具的辐射灭菌指南 (Code of Practice for Rad-
iosterilization of Medical Products) 中也提到了, 并且在挪威、丹麦、瑞典三国制定的
灭菌指南 (Microbiological Control of Sterilization Products and Standards for the
Sterilization of Medical Equipment) 中把公布灭菌前的污染菌数作为必须日常检查的事
项。

这样, 关于一次性使用医疗用具 (无菌医疗用具) 的利用、灭菌的讨论在海外已有较长的
历史, 他们对此类问题早有重视, 讨论文章也很多。

另一方面, 我国也逐渐开始理解有关灭菌、污染菌数的检测等的重要性, 开始对各种产
品进行讨论。不久的将来真正有意义的是把包括污染菌数的讨论结果应用于实际制造过程。

■ 关于污染菌数的测定

测定污染菌数的第一项工作是先把附着在医疗用具上的菌转移到溶液中去 (在溶液中洗
脱, 成为液体试样)。

这种液体试样的制做, 根据医疗用具的形状、大小、材质、构成等, 有各种各样的合成
方法, 所以, 如果计入细节上的差异, 方法是相当多的。

不过, 大体上可分为两类:

i 用液体试剂溶剂使附着菌脱离医疗用具、进入溶剂的 (洗脱) 方法。

ii 与医疗用品一起粉碎、乳化的方法。

这两类可再分为

i——

A. 溶剂 (洗脱液) 浸泡法 (小型表面污染物, 如注射针头, 片形解剖刀, 小注射筒
等)

B. 用溶剂通入法 (输血装置等管状器皿等)

ii——

C. 把试样粉碎后放到溶剂中 (棉制品, 丝缝合线, 生物试纸等滤纸类)

D. 乳化 (肠衣缝合线等)

E. 混合 (粉末剂等)

■ 洗脱用的溶液 (洗脱液)

使附着菌脱落 (洗脱) 的溶液自然应该具有不使细菌受损伤、洗脱效率高、易于获得、
易于配制等性质。

到目前为止, 已经对下列洗脱液进行了研究:

0.9% NaCl

0.1% 非离子活性剂80加0.9% NaCl

0.1% 胨

0.1% 非离子活性剂80加0.1% 胨

0.1% 非离子活性剂80、1% 胨加0.8% NaCl

水

这些溶剂的试验结果，根据产品而有所不同。

0.1% 非离子活性剂80、1% 胨加0.8% NaCl是使用效果较好的一种。

它的组成中，非离子活性剂80是一种表面活性剂，它具有促进细菌从被检产品上脱离，防止脱落菌凝集，保持细菌均匀分布等我们所希望的作用。另一方面，胨NaCl是根据营养细胞型菌的渗透压差，为防止其受损伤而加入的。

对于只涂了芽胞的生物试纸等进行活菌数测定时，洗液要含有足够的水。

■ 细菌的洗脱方法

A 在洗脱液中浸泡法

适用于金属、塑料制品等属于表面污染型的制品。一般不单单是浸泡，在浸泡的时候，采用震荡器等使其剧烈震荡，使附着菌容易脱落（图3）。

例如：

一次性使用注射针头等，放入直径10mm，长120mm的磨口试管，加洗液3~5ml，放入震荡器，以200~300次/分震荡5~20分钟（在片形解剖刀、柳叶刀、小型注射筒等情况下，准备好合适的试管照此法进行）。

塑料板、单丝塑料缝合线以及切成10~20mm长的导尿管，管子之类，让洗液正好淹没试样，放入50~100ml的三角烧杯，象试管那样震荡。

包装材料，塑料胶片制品的场合，只是为了检查内面，在口袋里面将小量空气溶液一起封入、密封，而后震荡。需要同时检测内、外面时，将它切成10×20mm大小放入三角烧杯处理。

B 洗脱液通入法

对输血、输液装置类，人工肾脏透析器，同样灵巧的血液回路之类的大型器具或管子部分很长的器具只需要检查血液或药液通过的一面就可以了。常用的方法是让洗液在密封系统循环（使用涡轮式泵等），使足够的洗脱液缓慢地、反复地通过。

使用这个方法时要注意，由于准备工作比其他方法复杂，所以必须保证没有细菌混入的无菌环境。

另外，聚烃硅氧，甘油等作为润滑剂或防干剂使用时，由于存在着与这些溶剂混合或者被这些溶剂覆盖的细菌，洗脱变得困难，因此对先前用的方法必须就洗脱条件、效果等进行讨论。

C 将试样粉碎后散布在洗脱液中

不同于塑料制品、金属制品之类单纯表面污染的制品，象丝缝合线、生物试纸（滤纸）棉制品等等，不仅是表面污染，还有细菌进入材料的内部。对这种制品所采用的方法有用截断器粉碎的匀化器法与玻璃球等放在一起剧烈震荡把滤纸、线等磨碎的方法。

1 匀化器法（使用截断器型匀化器）（图4）

用匀化器中的截断器把样品绞碎或磨碎，使制品的构成材料尽可能细碎，从而使夹杂、

渗入到内部的菌能转移到洗脱液中去。

该法的适用对象有：生物试纸（在滤纸片上涂菌）、丝缝合线、棉制品（脱脂棉、纱布以及用它制作的产品）等等。

（例）丝缝合线（不论软质硬质）

在干燥无菌的杯中，放入在无菌条件下绞成2~5mm的试样，接着加上20ml洗脱液，放置数分钟，让洗脱液充分渗入试样。

然后，在水冷却下用10000~15000转/分处理1~2分钟，将得到的溶液作为检体。还有以40~50cm的缝合线2~5根作为试样进行这种试验的。

ii 与玻璃球一起震荡的方法

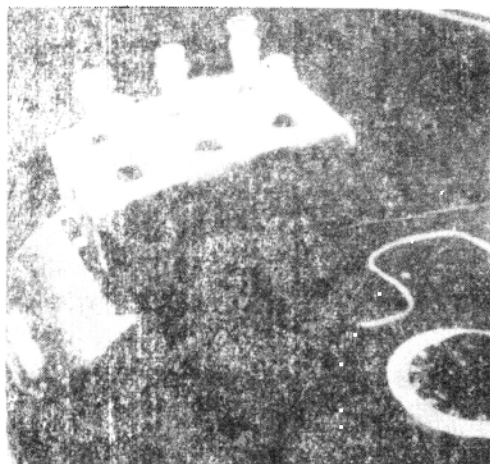


图3 洗出污染菌所用的震荡器

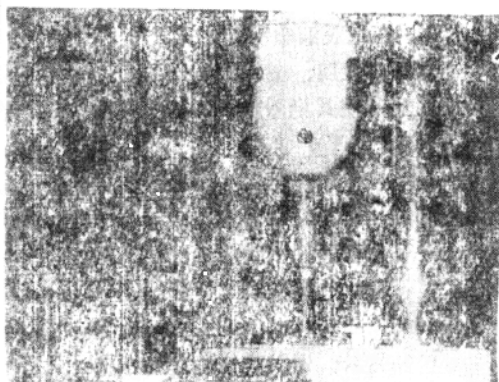


图4 截断器型匀化器

玻璃球（直径约5mm）、洗脱液、试样小片一起放入磨口三角烧杯震荡，把试样小片磨碎，使混在内部的细菌落入洗脱液中。

此方法适用于软质丝缝合线、棉制品（脱脂棉、纱布类的制品）、生物试纸等（但是必须注意载体的纸质，有些不易磨碎）。

（例）软质丝缝合线

在干燥无菌的磨口三角烧杯（50ml）中随同20个玻璃球（直径约5mm）放入绞成2~5mm的缝合线（40cm, 2~5根），加上10~20ml洗脱液，以300次/分震荡处理5~10分钟，然后检查该溶液。

纱布类

把绞成5×5mm的纱布与约20个玻璃球（直径5mm）一起放入磨口三角烧瓶，与丝缝合线同样处理。

D 乳化法

在肠衣缝合线等的情况下，用A~C的方法不能使样品破碎，同时考虑到内部有细菌混入，一般采用玻璃匀化器。不过在比较容易破碎时，也用乳钵、乳棒。

实验方法为：把肠衣缝合线绞成5~10mm长，与小量的水或洗脱液一起研磨，得到乳化

液，再加水作为检液，如有发热现象，必须设法使用冷却手段。

E 混合法

粉末剂在乳状制品中与水或洗脱液较充分地混合（均一分散系）成为试样，实际上由于一般多与乳化法（特别是使用乳钵、乳棒时）配合处理，所以不单独算作一类方法。

由上可知，为检查污染菌数而制做检液（预处理技术）的方法是各种各样的。在实施中必须根据医疗用品的形状、大小等合理地选择。应该注意所选的方法有利于防止由于工作中的过失而造成细菌混入。

另外，这不仅是一种方法的模仿（模仿文献、其它公司或前人），必须考虑污染菌存在的部位（想到最坏的情况），重视细菌洗脱的彻底性来确定条件。尽管根据模型实验不能百分之百地洗脱，重要的是确立重复性较好的洗脱率。对这个问题，应该作为日常工作，经常从实施的角度出发，充分研究。

也有一种倾向是，虽然理解灭菌前检测污染菌数的重要性，但由于怕麻烦而流于最少的检验。在这种情况下，特别是由于缺乏对制造设备和作业人员的卫生知识而使污染菌恒定化（重复性好）的情况下，常常会出现灭菌不完全而产生危险。

表1 短小芽胞杆菌ATCC27142涂布滤纸片的杀菌效率

剂量 $\times 10^6 R$ 菌数/个	0.4	0.6	0.8	1.0	1.5	2.0
10^8	0	0	37	69	98	100
10^6	0	12	71	92	100	100
10^3	5	95	100	100	—	—

检体数（100-300/区）

表2 市售的未灭菌缝合线被照射时的杀菌率变化

剂量 指标 菌数/克	0	0.5	0.7	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5
A. 7.6×10^5	0(24)	0(40)	74(38)	84(71)	94(90)	100(100)	100(50)		
B. 2.1×10^6	0(131)	0(50)	1(148)	3(100)	8(200)	18(196)	43(99)	91(199)	100(100)
C. 83×10^2	0(150)	80(50)	91(150)	100(150)	100(150)				
D. 23×10^3	0(50)	90(50)	100(49)	100(49)					

() 检体数；菌数：一般活菌数

灭菌前污染菌数测定方法

(之二)

与细测和成合作

在上篇中讨论了灭菌前污染菌数测定的第一步工作即医疗用具上附着菌的洗脱液的配制工作。这里归纳如下：

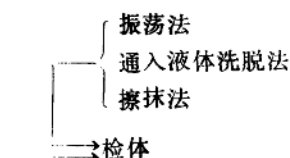
○污染状态的掌握

A 表面污染……塑料制品等

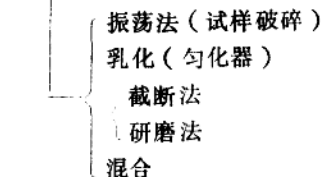
B 内部污染……棉、纤维制品类、粉末、液体等

○检体的制做(附着菌的洗脱)

A 属于表面污染类型



B. 属于内部污染类型



活菌数的测定

检体中所含菌数的测定方法有：用显微镜等直接计数的物理手段，用最合适的培养基使那些菌繁殖而推定或计算菌数(可见菌落)的方法，本文专门讨论后者，即通过培养而测定的方法。

i 琼脂平板混释法

在检体含有较多菌的情况下，作为预处理，用生理盐水之类逐步稀释*10倍，稀释成一个器皿中平均含有30~300个菌(1毫升中30~300个)。

*不用无菌水，使用灭菌生理盐水时，要防止营养细胞菌由于渗透出而死亡。

A. 往正确灭菌的器皿中加入1ml检液。

B. 预加热溶解，把在50°C下保存的10ml琼脂培养基(在一般活菌数的场合下使用标准琼脂培养基)注入放有1ml检体的器皿，在培养基还没有凝固时，将器皿前后左右晃动，使