

· 论 著 ·

# 短小芽胞杆菌 E<sub>601</sub> 抗电离辐射性的研究

耿彦生 袁洽<sup>△</sup> 李涛 张杏红

**【摘要】** 目的 短小芽胞杆菌 E<sub>601</sub> 已在中国确定为辐射灭菌指示菌。为使指示菌在灭菌过程中的应用标准化、规范化, 保证灭菌质量, 需要对其固有抗辐射性和影响因素, 以及如何制备抗辐射稳定的生物指示剂作详尽研究。方法 应用钴 60 $\gamma$  射线和高能电子束对短小芽胞杆菌 E<sub>601</sub> 进行辐照, 测定不同条件下的 D<sub>10</sub> 值。结果 ① 因载体、介质不同, D<sub>10</sub> 值变化在 1.60~2.53kGy 之间。② 不同温度下保存一年, 指示菌片芽胞抗辐射性无明显变化。但随着保存时间延长, 菌片上存活菌数逐渐减少。③ 载体、介质影响存活率, 电子束与钴 60 结果一致。结论 短小芽胞杆菌 D<sub>10</sub> 值在 1.60~2.53kGy 之间, 且抗性稳定。本试验条件下制备的可溶性菌片抗力高, D<sub>10</sub> 值为 2.53kGy, 可长期保存, 适宜作指示剂应用。

**【关键词】** 电离辐射灭菌 指示菌 短小芽胞杆菌 E<sub>601</sub> D<sub>10</sub> 值

**A study on the resistance and stability of *Bacillus pumilus* E<sub>601</sub> against radiation** GENG Yansheng YUAN Qiakuan LI Tao, et al. Medical College of Staff and Workers of Hebei Province, Baoding, 071000.

**【Abstract】 Objective** In order to confirm the radiation resistance and stability of *Bacillus pumilus* E<sub>601</sub> and to further standardize and normalize the application of this bacterium as biological indicator in the practice of radiation sterilization. **Methods** *B. pumilus*, suspended at different solutors and at different mediums was radiated 4 times at interval of 3 months for one year by Co-60  $\gamma$ -ray. According to the number of survival bacteria cells, D<sub>10</sub> values were calculated. **Results** ① The D<sub>10</sub> values are varied from 1.60-2.53kGy as the results from different mediums and carriers. ② Under the storage at different temperature for one year, the biological indicator's D<sub>10</sub> values had no significantly change but the number of living bacteria cells gradually reduced. ③ The percentage of living cells was affected by the carrier and temperature. **Conclusion** The results of this research suggested that the radiation resistance of *B. pumilus* spores was relatively high. The D<sub>10</sub> values were in the range of 1.60-2.53kGy and the spore innate resistance was stable, indicating that *B. pumilus* E<sub>601</sub> is a suitable indicator bacterium for ionizing radiation sterilization. The biological indicator was able to be stored for a long time without significant resistance changes. It could be prepared under the standard condition for commercial use.

**【Key words】** Ionizing radiation sterilization Radiation resistance indicator bacterium *B. pumilus* E<sub>601</sub> D<sub>10</sub> value

短小芽胞杆菌 E<sub>601</sub> 已在中国确定为辐射灭菌指示菌, 为使该菌在灭菌过程中的应用标准化、规范化, 保证灭菌质量, 作者对其固

有抗辐射性和影响因素及如何制备抗辐射稳定的生物指示剂进行了研究, 结果如下。

## 材料和方法

一、指示菌的制备: 短小芽胞杆菌 E<sub>601</sub> 由中国预防医学科学院流行病学微生物学研究

作者单位: 071000 保定, 河北省职工医学院(耿彦生); 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所(袁洽<sup>△</sup>、李涛); 河北省职工医学院附属医院(张杏红)

所提供。按《消毒技术规范》(卫生部 1991)的方法制备芽胞悬液。分别用磷酸盐缓冲液、2% 基质液、2% 牛血清稀释芽胞悬液,使芽胞浓度达  $1.0 \times 10^7$  cfu/ml, 备辐照应用。

用磷酸盐缓冲液将芽胞悬液稀释至  $5 \times 10^8$  cfu/ml, 取  $20 \mu\text{l}$  滴染脱脂布片、滤纸片、塑料膜,  $37^\circ\text{C}$  培养箱干燥 40 ~ 50min, 即制成指示菌片。

2% 基质液稀释芽胞悬液, 使浓度达  $5 \times 10^8$  cfu/ml, 取  $20 \mu\text{l}$  滴于脱脂塑料膜, 超净台下吹干则成可溶性菌片。

二、射线辐射: 辐照源由北京师范大学低能核物理研究所提供。钴-60 源, 总装源能量为  $2.22 \times 10^4$  贝克, 辐照剂量率为 5.28 kGy/h。BF-5 电子直线加速器  $E=5\text{MeV}$ ,  $I=100 \mu\text{A}$ , 扫描宽度为 60cm, 剂量率为 1.2 kGy/min。芽胞悬液装于 5ml 玻璃管中, 干燥菌片直接放于剂量均匀区进行辐射。

三、存活菌数的测定和  $D_{10}$  值的计算: 芽胞悬液或指示菌片洗脱液振打混匀后做 10 倍递减稀释到适宜浓度, 按《消毒技术规范》(卫生部 1991) 涂抹法进行菌落计数<sup>[1]</sup>。

本研究选用  $D_{10}$  值作为评价细菌芽胞抗辐射性的指标。 $D_{10}$  值是指细菌芽胞受电离辐射, 杀灭一个对数级 (90%) 微生物所需照射剂量。试验中, 电子束和  $\gamma$  射线的辐照剂量设置为:

电子束	0	1.4	3.3	5.4	7.8	10.1	kGy
$\gamma$ 射线	0	1.3	2.7	4.5	7.0	9.5	kGy

指示菌被辐射时, 按此剂量设置分为 6 组, 以辐照剂量为自变量, 残存菌数为应变量, 求出样品剂量存活曲线  $y = a + bx$ , 即得  $D_{10}$  值,  $D_{10} = 1/b$ 。

## 结 果

一、短小芽胞杆菌  $E_{601}$  对辐照的反应性: 用  $\gamma$  射线对含不同介质的芽胞悬液以及各种指示菌片进行照射。结果表明, 随着辐照剂量增大, 残存菌数逐渐减少。将芽胞存活菌数的对数与相应辐照剂量作图, 两者成直线

负相关, 相关系数  $r$  均大于 0.99 (表 1)。

表 1  $\gamma$  射线对悬液中芽胞的杀灭作用

芽胞悬液	回归方程	相关系数	$D_{10}$ 值(kGy)
蒸馏水悬液	$y = 7.16 - 0.590x$	0.9974	1.76
2% 基质液	$y = 7.24 - 0.524x$	0.9918	2.10
2% 牛血清	$y = 7.19 - 0.478x$	0.9940	2.07

二、共存介质及载体对芽胞抗性的影响: 芽胞悬液中的介质不同时,  $D_{10}$  值不同 (表 1)。蒸馏水悬液  $D_{10}$  值为 1.76kGy 与 2% 基质液 2.10 相比二者差异有显著性 ( $t = 10.9$ ,  $P < 0.01$ )。2% 小牛血清液中芽胞  $D_{10}$  值也明显高于蒸馏水悬液中芽胞  $D_{10}$  值。此结果表明, 有机介质对悬液中的短小芽胞杆菌  $E_{601}$  具有保护作用。

四种指示菌片的辐射抗性各不相同 (表 2), 以塑料作载体, 芽胞的  $D_{10}$  值明显高于滤纸片和布片作载体时的  $D_{10}$  值 ( $t = 9.36$ ,  $P < 0.01$ ), 表明细菌芽胞所依附的载体对其辐射抗性有影响作用。

表 2  $\gamma$  射线对干燥于菌片上的芽胞的灭活作用

指示菌片	回归方程	相关系数	$D_{10}$ 值(kGy)
布指示菌片	$y = 6.31 - 0.620x$	0.9929	1.60
滤纸指示菌片	$y = 7.01 - 0.624x$	0.9916	1.61
塑料指示菌片	$y = 7.03 - 0.459x$	0.9992	2.19
可溶性菌片	$y = 6.80 - 0.398x$	0.9990	2.53

与芽胞共存的介质对其抗辐射性也有影响。同样以塑料膜作载体, 当芽胞液用 2% 基质液稀释, 制备成可溶性菌膜时  $D_{10}$  值为 2.53kGy, 而单纯芽胞水悬液制成的塑料指示菌片,  $D_{10}$  值为 2.19kGy, 二者相比差异有显著性 ( $t = 7.69$ ,  $P < 0.05$ )。为进一步验证共存介质对指示剂抗性的影响作用, 试验中又用 2% 基质芽胞液滴染布片制成指示剂, 经测定, 这种指示剂的  $D_{10}$  值为 1.64kGy, 与芽胞水悬液制备的布片指示剂 ( $D_{10}$  值为 1.60 kGy) 相比差异有显著性 ( $t = 2.8$ ,  $P < 0.05$ )。可见, 有机介质对干燥芽胞具有保护作用。

三、细菌芽胞对电子线和  $\gamma$  射线抗性比较: 为比较电子线和  $\gamma$  射线对短小芽胞杆菌  $E_{601}$  的杀灭作用, 试验中同时应用电子束对芽胞悬液和干燥芽胞进行照射。结果, 短小

芽胞杆菌  $E_{601}$  对电子线的反应性与  $\gamma$  射线相同, 不论芽胞悬液或干燥菌片, 剂量灭活曲线均为直线, 有机介质对芽胞同样具有保护作用。但相同剂量的电子束对细菌芽胞的灭活作用强于  $\gamma$  射线。对于蒸馏水芽胞悬液,  $\gamma$  射线照射时  $D_{10}$  值为 1.76 kGy, 电子线照射时  $D_{10}$  值为 1.68 kGy, 二者差异有显著性 ( $t=3.0, P<0.05$ )。布指示菌片  $\gamma$  射线辐照,  $D_{10}$  值为 1.60 kGy, 而电子线照射时  $D_{10}$  值为 1.55 kGy, 前者明显高于后者 ( $t=3.3, P<0.05$ )。

四、菌种保存过程中芽胞抗辐射性的变化: 为观察短小芽胞杆菌  $E_{601}$  在菌种保存及传代过程中抗辐射性是否发生变化, 并寻找适宜的菌种保存方法, 本研究用几种常规菌种保存法: 冷冻真空干燥法、半固体培养剂保存法、菌液保存法保存菌种, 一年内每隔 4 个月制备芽胞悬液测定  $D_{10}$  值。结果表明, 三种保存方法, 在不同时间, 细菌芽胞  $D_{10}$  值均无明显差异。试验中, 将细菌连续传代 20 次后制备芽胞悬液, 其  $D_{10}$  值与直接制备的芽胞悬液的  $D_{10}$  值无明显差异。这表明, 短小芽胞杆菌  $E_{601}$  的固有抗辐射性相对稳定。

五、干燥指示菌片保存过程中抗辐射性的变化: 为研究影响细菌存活数及影响保存过程中抗性变化的因素, 应用正交设计进行试验, 选用  $L_8(4, 25)$  正交表。试验组的条件为: 第一组可溶性菌膜 4℃ 保存; 第二组可溶性菌膜 -20℃ 保存; 第三组塑料片指示剂 4℃ 保存; 第四组塑料片指示剂 -20℃ 保存; 第五组滤纸指示剂 -20℃ 保存; 第六组为滤纸指示剂 4℃ 保存; 第七组布片作载体加基质的指示剂 -20℃ 保存; 第八组布片作载体加基质的指示剂 4℃ 保存。按照试验条件, 在将制备好的指示菌片保藏 1 年的过程中, 每隔 4 个月对每一组样本进行活菌计数, 对第二、三、六、七组样本进行辐照, 测定  $D_{10}$  值。结果表明, 随着保存时间的延长, 各组指示剂细菌存活数逐渐降低。方差分析表明, 载体及保存温度影响细菌存活, 以塑料片作

载体、4℃ 保存有利于细菌存活, 加入保护基质存活率更高。二、三、六、七组样本在 4 个不同时期的  $D_{10}$  值, 经方差分析, 同一组不同时期差异均无明显性。可见指示菌片保存过程中芽胞本身的辐射抗性并未改变。

## 讨 论

国际上关于辐射灭菌指示菌问题, 还没有完全统一认识。我国初步确定以短小芽胞杆菌  $E_{601}$  作为电离辐射灭菌的指示菌。试验结果表明, 短小芽胞杆菌  $E_{601}$  的  $D_{10}$  值由于载体、共存介质的不同介于 1.60 ~ 2.53 kGy 之间, 而从医疗用品生产场所及其它场所分离到的抗性最强的细菌为革兰氏染色阳性芽胞形成菌,  $D_{10}$  值通常在 2.0 ~ 3.0 kGy, 所以短小芽胞杆菌  $E_{601}$  基本能代表抗性较强的实际污染菌。

细菌在长期保存过程中对化学物质的敏感性会发生改变, 但对物理因素, 尤其是对电离辐射的抗性是否会发生改变, 并未见报道。本试验将干燥指示菌片保存 1 年后  $D_{10}$  值没有明显改变; 常规方法保存菌种 1 年后重新制备悬液进行辐照或连续传代 20 次后再制备悬液辐射,  $D_{10}$  值均无明显改变。这表明短小芽胞杆菌  $E_{601}$  对电离辐射的固有抗性很稳定, 适宜作为指示菌应用。

已有研究表明, 共存有机介质对被辐射的细菌或其它微生物有保护作用<sup>[1]</sup>。本试验结果也显示出芽胞悬液受介质的影响, 干燥芽胞受共存介质及所依附载体的共同影响。在辐射灭菌的实际应用中, 微生物大多来源于空气尘埃、人的皮屑等, 而它所依附物品的材料又多样化, 与实验室纯培养的微生物相比, 抗性可能有很大差异。因此, 在辐射灭菌过程中, 使用生物指示剂以及确定灭菌剂量时应考虑到这一点。本试验条件下应用不同材料作载体制备的指示菌片, 以可溶性菌片  $D_{10}$  值最高为 2.53 kGy。由于细菌芽胞被有机基质保护, 更接近实际情况。因此, 作为指示剂应用, 可溶性菌片较为适宜。

在指示菌保存过程中,虽然细菌芽胞的抗力无明显变化,但由于存活菌数降低,指示范围(灭活剂量)会有一些变化,所以再使用时需重新计数。

本研究表明,短小芽胞杆菌 E<sub>601</sub> 的固体、共存介质及制作过程中的干燥时间等因素对其有明显影响作用,每制备一批需要对其抗性进行标定。由于指示菌片的制备较为复

杂,因此,指示菌片的制备应由有条件的单位统一进行,成批生产,这样才可使指示菌片的应用标准化,有利于对辐射灭菌过程的监测。

### 参 考 文 献

- 1 周瑞英. 医疗用品电离辐射灭菌研究进展. 消毒与灭菌, 1989, 6:166.

(收稿: 1999-06-25)

## 医院消毒剂使用中的污染调查

刘秀岩 宛悦 吴宪中

1994 年 4~6 月,我们选择了 15 所北京市城区区级医院,对使用中的消毒剂进行了细菌污染检测,并对医护人员使用消毒剂有关情况进行调查,现将结果报告如下。

### 一、材料与方法:

1. 中和剂配方: 0.5% 卵磷脂、0.5% 氨基乙酸、0.5% 硫代硫酸钠、1% 吐温-80。营养琼脂、营养肉汤。

2. 调查对象: 北京市城区 15 所区级医院,对各医院门诊化验室、口腔科、换药室、注射室、手术室使用中消毒剂和无菌器械保存液进行检测。

3. 方法: 参见《消毒技术规范》(卫生部 1991 年 12 月)。

使用中消毒剂: 取消毒剂 1.0ml 加入 9.0ml 相应中和剂(经中和剂鉴定试验合格)试管中,中和 10min 后,各取 0.5ml 平行接种两块平皿,倾注营养琼脂,37℃温箱培养 3 天,计数菌落数。

无菌器械保存液: 取消毒剂 1.0ml 加入 9.0ml 含相应中和剂(经中和剂鉴定试验合格)的双倍营养肉汤试管中,37℃温箱培养 3 天,观察肉汤管有无混浊。同时做阴、阳性对照。

4. 评判标准: 参照《医院消毒卫生标准》(征求意见稿)。

### 二、结果:

1. 各类消毒剂污染状况: 本次调查共采样 245 件,使用中消毒剂 170 件,无菌器械保存液 75 件,不合格率为 31.84%。使用中消毒剂不合格率为

4.71%。无菌器械保存液不合格率为 93.33%,两者差异具有显著性( $P < 0.05$ )。

本次调查的消毒剂包括氯、碘、季胺盐、过氧化物、洗必泰、酚、醛、醇及其它。使用中的消毒剂以季胺盐消毒剂不合格率最高为 16.67%,其次为氯制剂为 7.14%,醇类为 5.56%。但统计学处理表明各类消毒剂污染程度差异无显著性。

2. 不同科室内消毒剂污染状况: 5 个科室使用中消毒剂不合格率以化验室最高,为 10.71%,但统计学处理表明不同科室内消毒剂污染程度差异无显著性;无菌器械保存液不合格率在 90% 以上,化验室使用的无菌器械保存液不合格率达 100%。

### 三、建议:

1. 提高各级医疗卫生机构领导对医院消毒工作的重视程度,加强对医护人员消毒专业技术培训。在普及消毒基本知识的同时,有针对性地讲授新技术、新方法,实现知识不断更新。预防医学突飞猛进的发展,新的消毒方法、消毒药品不断推出,许多医护人员普遍感到缺乏专业知识。

2. 要注意研究和完善消毒技术,明确不同消毒目的和消毒对象,所适用的消毒剂种类、配制浓度和更换周期等,形成一整套消毒技术规范,便于实际操作及应用。

3. 在提倡医院的自身检查的同时加强防疫机构对医院消毒工作的技术指导 and 日常监测工作,如指导医院正确使用浓度试纸,各种消毒效果化学指示器材等,从而保证各种消毒措施的满意消毒效果。

(感谢蔡海燕、李嘉、冀玫同志在本次调查中所做的工作)

(收稿: 1999-05-21)

作者单位: 100021 北京,中国预防医学科学院消毒监测中心(刘秀岩);北京市卫生防疫站(宛悦、吴宪中)